

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2009)01-0011-04

马铃薯 Y 病毒黑龙江分离物株系鉴定

高秀妍^{1,2}, 高艳玲², 耿宏伟², 张 威², 范国权², 白艳菊^{2*}, 吕文河¹, 蒋希峰²

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要: 通过生物学方法、血清学方法、RT-PCR 方法对黑龙江省一个马铃薯 Y 病毒分离物进行株系鉴定。该病毒侵染洋酸浆产生枯斑, 在黄苗榆烟上表现系统花叶, 并伴有坏死症状, 血清学反应强烈, 三重 PCR 特异性条带清晰, 鉴定该分离物为 PVY^N。

关键词: PVY^N; 生物学; 血清学; RT-PCR; 花叶; 坏死

马铃薯是世界性高产作物, 我国种植面积居世界第一位, 但是各种马铃薯病毒病害可导致马铃薯退化, 降低产量和品质, 严重时减产 80% 以上^[1]。在马铃薯的诸多病毒中, 马铃薯 Y 病毒(PVY)由于蚜虫和机械接触都能传播, 在田间扩散速度快, 因此该病毒能引起马铃薯严重减产, 对马铃薯生产造成较大危害^[2]。

PVY 属 Y 病毒科, 马铃薯 Y 病毒属是植物病毒中最大的属, 能侵染茄科、藜科、豆科、葫芦科等多种植物^[3]。PVY 侵染植物后, 表现症状有所不同, 依据症状的不同被分成不同的株系: PVY⁰ 为普通株系, 该株系可以引起花叶, 严重时甚至能引起落叶和脉坏死症状; PVY^C 为条痕花叶株系, 蚜虫不能传毒, 发现于澳大利亚和英国^[4]; PVY^N 为叶脉坏死株系, 19 世纪 50 年代在欧洲和南美国家首次被发现^[5], 近年来, PVY⁰ 和 PVY^N 全球范围内发生普遍, 且比例较高。

PVY 的鉴定技术经历了生物学检测技术、免疫学检测技术和核酸分子检测技术三个阶段。生物学鉴定技术专业化性强, 但周期长, 而且费时费工, 受环境条件影响大。免疫学中的酶联免疫技术自建立以来不断改进, 已形成多种测试方法, 其中主要

包括双抗夹心法、间接法等^[6]。Ellis 等^[7]采用双抗夹心技术进行了 PVY 鉴定和 PVY 血清型地理分布工作。目前 RT-PCR 技术广泛应用于 RNA 病毒的鉴定和检测。Barker 等^[8]应用 RT-PCR 技术检测马铃薯块茎的 PVY。李浩戈等^[9]也采用 RT-PCR 技术检测了马铃薯块茎中的 PVY。这三种鉴定技术各有优缺点, 互为补充, 通常植物病毒采用多种技术进行大量的特异性实验, 相互验证, 科学鉴定。

黑龙江省是我国马铃薯主产区, 目前还没有关于 PVY 株系鉴定的任何报道, 本文旨在对黑龙江省马铃薯 Y 病毒株系进行鉴定, 为明确黑龙江省马铃薯 Y 病毒的起源, 发生, 发展进化等提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料来源于黑龙江省红旗农场感病的马铃薯品种早大白, 被命名为 H2-1; 指示植物种子、病毒血清检测试剂盒、三重 PCR 所用 PVY^N 和 PVY⁰ 阳性对照均由黑龙江省农科院植物脱毒苗木所提供; 其它生物学试剂购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 引物

本研究涉及多对引物。引物序列来自 2002 年 Nie 等^[10]分析 PVY 株系的引物, 所有引物均委托上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。

收稿日期: 2008-12-16

基金项目: 黑龙江省青年基金项目“黑龙江地区马铃薯 Y 病毒株系的鉴定与序列分析”(QC08C81)。

作者简介: 高秀妍(1982-), 女, 硕士研究生, 从事马铃薯遗传育种和马铃薯病毒检测工作。

* 通讯作者: E-mail: yanjubai@163.com

表 1 引物名称和序列

引物名称	引物序列	引物位置	扩增长度
PVY A	5'-catttgcccaattgcc-3'	1068bp-1085bp	
PVY a	5'-aagcttcatactcaccgc-3'	213bp-248bp	856bp
PVY b	5'-ggtgaagetaatcatgtcaac-3'	642bp-661bp	443bp
PVY c	5'-gacagtggacttttgcaacg-3'	805bp-825bp	280bp

注: PVY a、PVY b 和 PVY c 均为上游引物, PVY A 为下游引物, 其中 PVY a 为 PVY 的通用引物, PVY b 为 PVY^N 的特异性引物, PVY c 为 PVY^O 的特异性引物。

1.3 试验方法

1.3.1 血清学鉴定

采用 PVX、PVS、PVA、PLRV、PVM 和 PVY 的 DAS-ELISA 检测试剂盒检测 H2-1。

1.3.2 生物学鉴定

设置两次重复, H2-1 分别接种到洋酸浆和黄苗榆烟上, 每种植物接两株, 另外设阴性对照, 在所有条件均一致的条件下进行试验。洋酸浆于 4 叶期接种, 黄苗榆烟于 4~6 叶期接种。

均采用机械接种法接种, 待 3~5 d 后可逐日观察症状反应。自然光下 18~25℃ 培养, 每天 12 h 暗处理。

1.3.3 分子生物学鉴定

(1) 总 RNA 的提取: 对接种发病的黄苗榆烟进行植物总 RNA 的提取, 具体方法参照加拿大马铃薯研究中心 Nie 等^[10] 的提取方法。

(2) 反转录合成病毒 cDNA 第一条链: 以带毒植物总 RNA 为模板, 用反向引物在 M-MLV 反转录酶的作用下合成 cDNA 第一条链, 反应体系见表 2。

表 2 cDNA 反应体系

反应试剂	用量(μL)
RNA	2.5
dNTP	1.5
DEPC-H ₂ O	1
三个反向引物	各 0.5
5×反转录buffer	2
RNasin	0.5
M-MLV tase	1
合计	10

混匀后, 放入 PCR 仪中, 95℃ 变性 5 min, 42℃ 运行 60 min 后, 直接用于 PCR 反应。

(3) PCR 扩增: 以总 RNA 合成的 cDNA 为模板, PCR 反应体系如表 3。

表 3 PCR 反应体系

反应试剂	用量(μL)
反转录产物	2
一个下游引物	0.5
dNTP	1.0
DEPC-H ₂ O	14.375
三个反向引物	各 0.5
10×PCR buffer r	2.5
RNasin Mg ²⁺	3
TaqDNA 聚合酶	0.125
合计	25

PCR 反应条件为: 92℃ 反应 2 min 后, 92℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 共进行 5 个循环; 92℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 共进行 5 个循环; 92℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 共进行 5 个循环; 92℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 共进行 5 个循环; 循环结束后 72℃ 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 血清学结果

DAS-ELISA 检测 H2-1, PVY 试剂盒的检测结果呈阳性, 其他均为阴性, 初步确定 H2-1 为 PVY。

2.2 指示植物结果

该毒源接种到洋酸浆 10 d 后, 在洋酸浆叶片上产生大小均匀的褐色斑点; 接种 15 d 后, 叶片下垂, 生长缓慢, 最后系统落叶, 而阴性对照则叶片舒展, 生长旺盛。

该毒源接种到黄苗榆烟, 接种 7 d 后, 新叶出现花叶; 9 d 后, 背部叶脉有坏死现象; 15 d 后, 叶柄坏死病斑面积扩大; 21 d 后, 底部叶片枯萎并逐渐脱落, 长势缓慢。

生物学鉴定为 PVY^N 典型症状见图 1~5。



图 1 左为接种洋酸浆矮化植株, 右为健康植株



图2 PVY 侵染洋酸浆产生枯斑



图3 黄苗榆烟花叶



图4 黄苗榆烟脉坏死



图5 感病植株系统落叶

2.3 三重 PCR 检测结果

采用三重 PCR 对 H2-1 进行株系鉴定(图 6)。H2-1 在 443 bp 和 856 bp 处均产生特异性条带, 与 PVY^N 对照特异性条带位置一致; PVY⁰ 对照在

281 bp 位置产生特异性条带, 而 H2-1 在该位置无带; 水对照和阴性对照无目的条带, 证明该分离物是 PVY^N。

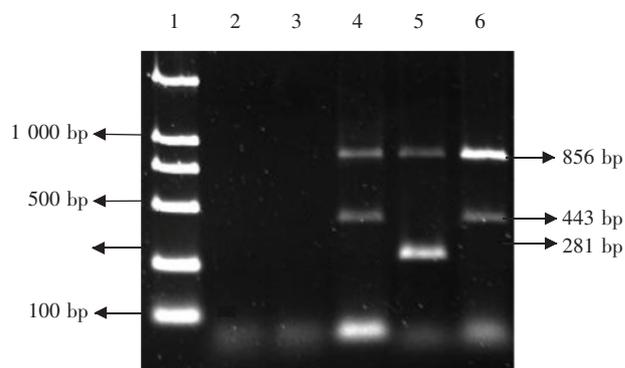


图6 三重 PCR 检测 H2-1

泳道 1: 核酸标准分子量; 泳道 2: 水对照; 泳道 3: 阴性对照; 泳道 4: H2-1 样品; 泳道 5: PVY⁰ 阳性对照, 泳道 6: PVY^N 阳性对照。

3 讨 论

世界范围内, 已分离出多种 PVY 病毒分离物, 被划分为三个株系, 为 PVY⁰、PVY^N 和 PVY^C。近年来, 很多文献报道 PVY 株系变异。马铃薯块茎表现环形坏死, Beczner 等^[11]将其命名为 PVY^{NIN}, 研究表明, PVY^{NIN} 又有重组型^[10]和非重组型^[12]。中国相继出现了一些关于 PVY 株系研究的报道, 王秀芳等^[13]调查了山东 PVY 株系发生情况, 并明确了马铃薯 Y 病毒山东分离物 PVY-SD 属于 PVY⁰ 株系; 吴志明等^[14]对河北省马铃薯 Y 病毒分离物 PVY-HBEI 的外壳蛋白序列进行氨基酸序列分析, 证明归属于 PVY⁰ 株系。储瑞根^[15]对马铃薯 Y 病毒的外壳蛋白基因进行了克隆, 表明该株系属于 PVY^N; 孙琦等^[16]对 PVY^N 与 PVY⁰ 的基因序列进行比较, 建立了可鉴定 PVY^N 与 PVY⁰ 的复合 RT-PCR 体系, 初步推断, 中国马铃薯生产上主要有 PVY^N 和 PVY⁰ 两株系, 目前还没有关于 PVY^C 的报道。

黑龙江省是我国马铃薯主产区, 目前还没有关于 PVY 株系鉴定的任何报道, 本研究对黑龙江省马铃薯 Y 病毒的一个分离物通过生物学方法、血清学方法和分子生物学进行株系检测, 不同角度鉴定, 相互验证, 确定黑龙江 PVY 分离物 H2-1 归属于 PVY^N。

[参 考 文 献]

- [1] 苗洪芹. 植物病毒检测技术和防治策略[J]. 河北农业科学, 2005, 9(3): 103-106.
- [2] 裴维蕃. 植物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1984.
- [3] Nie X, Singh R P. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR [J]. Virol Methods, 2002, 104: 41-54.
- [4] 姚文国, 崔茂森. 马铃薯有害生物及其检疫[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 241-242.
- [5] Piche L M, Singh R P, Nie X, et al. Diversity among potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States. Virology, 2004(2): 1368-1375.
- [6] Matthews R E F. Plant virology [M]. 2nd ed. New York: Academic Press, 1981.
- [7] Ellis P, Stace-smith R, de Villiers G. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y [J]. Plant Disease, 1997, 8(5): 481-484.
- [8] Barker H, Webster K D, Reavy B. Detection of potato Virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Potato Res, 1993, 36: 13-20.
- [9] 李浩戈, 吴元华, 赵秀香, 等. 马铃薯 Y 病毒的 RT-PCR 检测 [J]. 沈阳农业大学学报 1999, 30(3):244-246.
- [10] Nie X, Singh R P. Specific differentiation of recombinant PVY^{NO} and PVY^{MN} isolates by multiplex RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2003, 113: 69-77.
- [11] Beczner L, Horvath J, Romhanyi I, et al. Studies on the aetiology of tuber necrotic ringspot disease in potato[J]. Potato Res, 1984, 27: 339-352.
- [12] Nie X, Singh, R P. Evolution of North American PVY^{NTN} strain Tu 660 from local PVY^N by mutation rather than recombination [J]. Journal of Virological Methods, 2003, 113: 69-77.
- [13] 王秀芳, 朱常香, 温孚江, 等. 一个马铃薯 Y 病毒山东分离物的分离与鉴定[J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 203-208.
- [14] 吴志明, 时星. 河北省马铃薯 Y 病毒株系分子鉴定及其 RT-PCR 检测[J]. 河北农业大学学报, 2005, 5(3): 54-59.
- [15] 储瑞根. 利用聚合酶链式反应扩增 PVY 外壳蛋白基因[J]. 植物学报, 1992, 32(7): 523-528.
- [16] 孙琦, 张春庆. PVY^N 与 PVY^O 病毒 RT-PCR 快速检测体系研究 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(1): 213-216.

Identification of a Potato Virus Y Isolate from Heilongjiang

Gao Xiuyan^{1,2}, Gao Yanling², Geng Hongwei², Zhang Wei², Fan Guoquan²,

Bai Yanju², Lu Wenhe¹, Jiang Xifeng²

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: A Potato Virus Y isolate collected from Heilongjiang was identified using host plants, serology and RT-PCR. The virus could infect *Physalis floridana* and produce necrotic ringspot. Serological reaction to this virus was very strong. Specific bands were obvious when the isolate was tested by Multiplex RT-PCR. Therefore, the isolate was considered to be PVY^N.

Key Word: PVY^N; biology; serology; RT-PCR; mosaic; necrosis