



马铃薯纺锤块茎类病毒不同株系及 不同接种方法对产量的影响

崔荣昌 李晓龙

(黑龙江省农业科学院马铃薯研究所)

摘 要

马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid)是危害黑龙江省马铃薯生产的一种重要病害。为了查明不同类病毒变株对主栽品种克新1号和4号所引起的产量损失和症状反应,应用往复聚丙烯酰胺凝胶电泳法(Poturn-Polyacmdegel electrophoresis)鉴定类病毒。

试验结果表明,接种当年,接种类病毒的处理平均减产37%,按商品产量计算减产达47%。当年表现症状的植株平均为59.6%,块茎产生症状的植株平均为57.4%。用于接种的3个马铃薯纺锤块茎类病毒变株的致病力,以当地的类病毒弱系为最强,其次为北美的类病毒强系,北美的类病毒弱系的致病力较弱。类病毒对产量的影响与马铃薯品种和类病毒变株的组合有极为密切的关系。克新1号接种当地的类病毒弱系时薯块严重畸变,商品产量只为不接种对照的21%。用往复电泳法检测各个试验处理被类病毒侵染的情况,芽接种处理,于出苗后1周即可检测到类病毒;叶接种处理,于接种后2周即能检测到类病毒。出苗后7周,植株中类病毒浓度达到高峰,随即急剧下降,到出苗后10周,大部分接种植株已检测不到类病毒。块茎直径达1厘米时,即能检测到类病毒,随着块茎膨大,类病毒浓度也相应增高,到收获前,块茎中的类病毒含量只略低于植株含类病毒高峰期的浓度。用于本试验的克新1号、4号无类病毒和主要马铃薯病毒的核心材料,在1988年已交付给省内外的良种场繁殖使用。于当年秋季抽样检测克山第二良种场连续种植二年的种薯,当年种植试管苗生产的种薯,以及试管苗等,均未检测到类病毒。

1 前 言

马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid)是世界性的马铃薯病害,严重危害北美、欧洲、苏联和我国的一些马铃薯产区,降低产量,尤其是使薯块商品品质

变劣,造成重大的经济损失。马铃薯纺锤块茎类病毒的致病力常因马铃薯品种和侵染的类病毒株系(或分离系Isolate)的组合不同而异。有时类病毒症状轻微不易识别,给目测检测和淘汰病株造成困难。

类病毒危害是提高黑龙江省马铃薯生产的重要限制因素,严重影响产量和质量。尤

其是黑龙江省北部的一些县份宜我国重要的种薯基地, 每年调出大量种薯, 这就使类病毒也随之传播蔓延, 危害了调种省区的马铃薯生产。为了从我省马铃薯脱毒薯留种体系中汰除类病毒, 一方面把已获得的无类病毒和主要马铃薯病毒的克新1号、4号核心种提供给省内外良种生产单位繁殖使用; 同时利用3个品种和3个类病毒变株进行接种研究, 以进一步查明不同类病毒变株在主栽马铃薯品种的上的症状反应、产量损失; 生育期间植株和块茎中类病毒的相对浓度, 以为目测检验, 汰除病株、病薯和用往复聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测类病毒, 提供适宜时期等方面依据。

2 材料和方法

用于接种类病毒的共3个马铃薯品种(原种级别); 抗疫白(Kennebec R. P. Singh提供), 克新1号和4号。

用于接种的类病毒变株是: 强系(简称S-PSTV), 弱系1(简称M₁-PSTV), 以上两个变株是R. P. Singh提供, 弱系2(简称M₂-PSTV), 是从地方品种上分离的。

2.1 接种类病毒的3种方法

a. 针刺芽接种 在半光生芽上喷洒600目金刚砂, 再用消毒针蘸接种体针刺幼芽约1毫米深, 然后用消毒棉球蘸接种体摩擦幼芽。于播种前2天接种。

b. 针刺幼芽加叶片摩擦接种 针刺幼芽接种同前。叶片接种是在苗高约10厘米、具有3~4片复叶时接种(6月25日)。先向叶片上喷洒金刚砂, 然后用消毒棉球蘸接种体擦磨接种, 接完1株后用清水淋洗接种叶片。

c. 叶片擦磨接种 具体做法同前。

接种用的每1个种薯用消毒切刀纵切为

4块, 其中3块分别按上述3种接种处理接种, 另1薯块用针蘸缓冲液针刺, 作为对照。

3个品种×4种接种方法×3个类病毒变株, 总计36个处理。每个处理为12株。6月2播种, 9月5日收获。

2.2 接种体制制备方法

按 Pfannenstiel 等人(1980)的方法制备^[1], 主要如下: 2克薯芽, 加适量缓冲液, 用装有PT—10—ST微型转头的PT—35型研磨机研碎薯芽。提取缓冲液的组成是: 4毫升蒸馏水, 16毫升4mol/l氨水, 1.6毫升0.1mol/l乙二胺四乙酸钠(用Tris调为pH7.0), 1.8毫升10mol/l氯化锂, 16毫升含0.1% 8-羟基喹啉的水饱和酚。研碎后用8000rpm(7710g)离心15分, 把上清液移入另一离心管中, 加2.5倍体积乙醇, 于-20℃条件下30分钟沉淀核酸。再用8000转/分离心15分收集核酸, 真空干燥后溶于2毫升甘氨酸、磷酸缓冲液中(0.05mol/l甘氨酸, 0.03mol/l K₂HPO₄, pH值9.2), 作为接种体。

2.3 核酸的提取与制备

a. 称取0.5克组织(叶片或块茎), 加入适量提取缓冲液和水饱和酚, 在4~5℃条件下提取核酸。

b. 用高速粉碎机(Polytron generator)粉碎样品, 每粉碎完1个样品后, 用1%次氯酸钠溶液清洗转头, 再用水洗2次。

c. 提取的核酸最后溶于50微升含40%丙三醇的“高盐”缓冲液中(89mM Tris, 89mM 硼酸, 2.5mM EDTA, pH=8.3), 再加1滴0.1%二甲苯兰液。

2.4 类病毒的检测及电泳方法

用聚丙烯酰胺分离开强、弱系的往复聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测类病毒, 所用的仪器

是: LKB 2197型电泳仪 (瑞典产), SE600型电泳槽 (美国产) 和 HAAKE-L 型带泵定温水浴 (西德产)。电泳的主要过程如下:

a. 第一相电泳 用5%凝胶(5%丙烯酰胺, 0.125%双丙烯酰胺), 用“高盐”缓冲液作电泳液, 用板型凝胶 (14×16×0.15厘米), 每块凝胶板上有20个样品凹。上样量为6微升。电泳时上电泳槽接负极, 下电泳槽接正极, 每板凝胶用46微安恒流电流, 温度为20℃, 电泳直到二甲苯兰染料泳到胶板底部为止, 约需2.5小时。

b. 第二相电泳 用“低盐”缓冲液(1:8稀释“高盐”缓冲液)作电泳液。先把2升温度为87~90℃的电泳液加到下槽中, 以使类病毒变性, 稍候片刻, 再把3升加热到70~71℃的电泳液补满下槽和加满上槽, 电泳过程中, 带泵定温水浴使电泳缓冲液保持为71℃恒温。变换电极, 上槽接正极, 下槽接负极, 电流量与上次电泳相同, 约2小时, 当二甲苯兰染料泳到胶板顶端, 第二相电泳即告完成。用银染法染色凝胶板。

2.5 检测时期和样品数

各个处理检测类病毒的时期是: 芽接种处理, 从出苗后1周开始, 每隔1周检测1次, 直到第10周为止。叶接种处理从接种后2周开始检测, 到第8周为止。测定的样品

数是: 出苗后第1周和现蕾期检测全部植株, 其余各次则是检测每一处理的4株典型症状植株。取样部位为中部叶片。块茎形成直径达1厘米后, 每1处理每次检测2株的块茎样品。

2.6 类病毒核酸相对浓度的估价

为了对各个处理样品中的类病毒核酸定量, 按前述方法提取核酸。再在5%聚丙烯酰胺凝胶上分离核酸。当二甲苯兰泳到胶板底部时, 纵切下一狭条凝胶进行类病毒核酸染色定位。比照已染色的凝胶, 切下未染色凝胶的类病毒核酸带, 研碎后装入下方已灌入2厘米高凝胶的圆盘电泳的玻璃电泳管中(0.6厘米×9厘米), 管下部缚一装有1毫升“高盐”缓冲液的透析管, 以每管2.5微安电流电洗脱4~5小时。向洗脱液上加2.5倍体积乙醇, 在-20℃条件下沉淀类病毒核酸, 经离心、干燥后溶于蒸馏水中。按核酸消光系数 $E_{260nm}^{0.1\%} = 20$ 计算洗脱的类病毒核酸量。把提纯的类病毒核酸稀释为15, 7.5, 3.75, 1.88, 0.94等几种浓度, 用往复电泳法检测染色, 作为定量比较标准。不同时期的检测结果, 按5级记录类病毒核酸带宽度及色泽, 和类病毒核酸定量的标准凝胶板比较, 估价各个样品类病毒核酸含量。

表1 不同接种方法和不同类病毒变株处理的类病毒侵染株率和症状表现

处 理	电泳法检测阳性率	植株和块茎表现症状株率及症状严重程度			
		植株	块茎*	植株	块茎
芽加叶接种	97.2	63.0	61.1	重	重
芽接种	93.5	54.6	55.6	中	中
叶接种	90.7	50.9	55.6	重	中
S-PSTV	93.7	49.1	48.1	中	轻
M ₁ -PSTV	91.7	48.1	54.6	轻	中
M ₂ -PSTV	97.2	72.2	69.4	重	重
抗疫白	94.4	53.7	57.4	轻	轻
克新1号	96.3	77.8	67.6	重	重
克新4号	90.7	67.6	47.2	中	中

* 块茎中典型病毒超第1/3的株率; 表中所列数值是9个处理的平均值

3 研究结果

3.1 不同接种方法处理的类病毒侵染株率和症状表现

从表1引列的资料看出,在接种当年,芽加叶接种处理的类病毒侵染株率和植株、块茎显现类病毒病征的比率数都较另外两个接种处理的高,其植株的类病毒侵染株率达到97.2%;63.0%的植株表现出极明显的症状,植株矮化,叶片小,叶柄短,株型上竖;61.1%的植株生产出变长、纺锤形和具有不同程度龟裂的块茎。芽接种处理的类病毒侵染率和症状严重程度略低于芽加叶接种处理,叶接种处理则比上述两个处理轻微。

从用于接种的3个类病毒变株对侵染株率和植株、块茎显现症状的影响来看,以当地变株M₂-PSTV的侵染株率最高,达97.2%,表现明显症状的植株和块茎的比率也最高,症状也最严重:依次是接种S-PSTV的处理和接种M₁-PSTV的处理。

从用于接种的3个马铃薯品种对不同类病毒变株的反应来看,克新1号的类病毒侵染株率最高,表现症状的植株和块茎也多,症状也重,克新4号表现居中。抗疫白品种耐类病毒,表现病征的植株和块茎少,症状也轻。

不同类病毒变株对寄主的致病力因类病毒变株和马铃薯品种的组合不同而异。试验中应用的3个类病毒变株,以M₂-PSTV的致病力最强,其次为S-PSTV;M₁-PSTV的致病力较弱。用M₂-PSTV接种克新1号时,几乎所有的植株和块茎都表现出典型的严重病征,商品产量极低。

3.2 3种接种方法对马铃薯植株和块茎中类病毒浓度的影响

从出苗后1周到第10周,检测了3种接种方法处理的植株和块茎(从出苗后第5周开始)中类病毒的相对浓度(图1、照片1、2和3)。

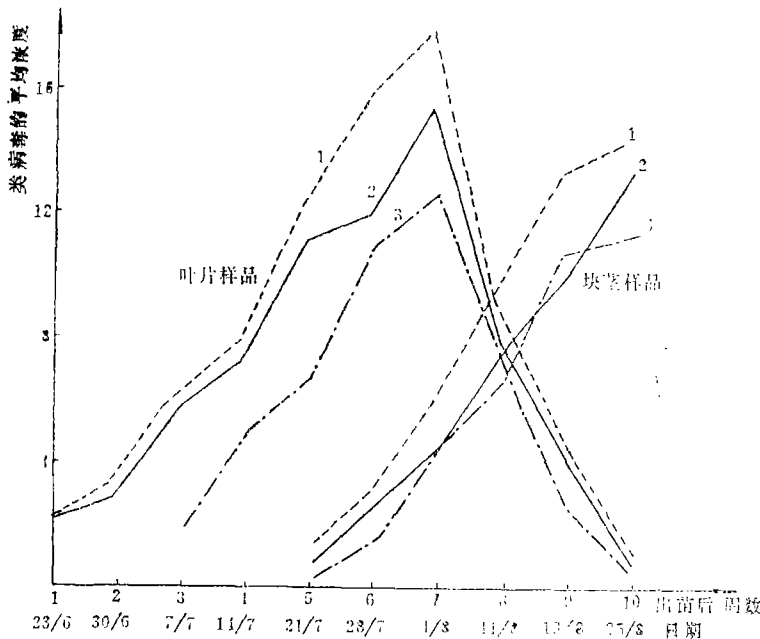
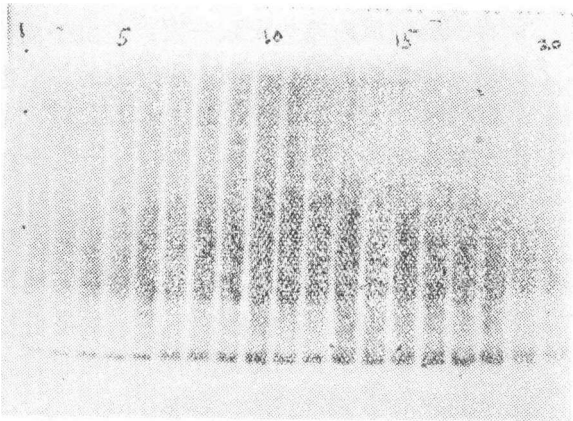


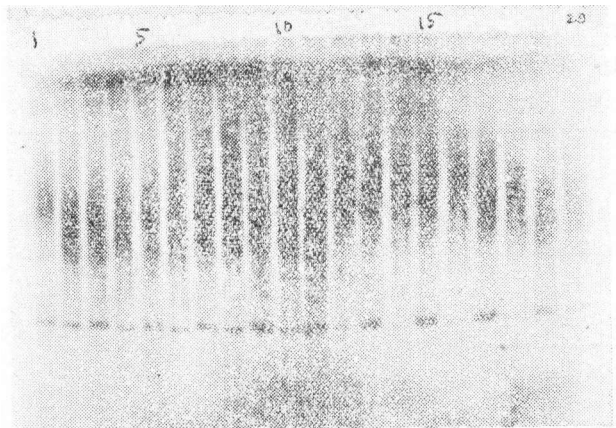
图1 3种接种方法处理不同时期取样中的类病毒核酸的浓度

注: 1是芽加叶接种处理(12株平均), 2是芽接种处理(12株平均), 3是叶接种处理(12株平均)



照片1 出苗后8周，3种接种方法处理的类病毒核酸的浓度

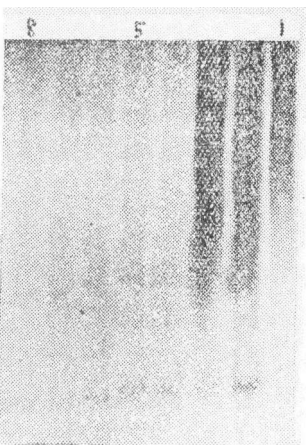
注：1~6泳道为叶接种处理，7~10泳道为芽接种处理，13~18泳道为芽加叶接种处理，19泳道为强系对照，20泳道为弱系对照（从左到右），品种为克新1号。类病毒核酸浓度同图1



照片2 出苗后8周，芽加叶接种处理的叶片、块茎样品中类病毒核酸的相对浓度

注：第1，3，5，7，9，11，13，15和17泳道为块茎样品。第2，4，6，8，10，12，14，16和18泳道为叶片样品，19泳道为强系对照，20泳道为弱系对照（从左到右）。品种为克新1号。类病毒核酸浓度同图1

从图1可以看出，芽接种处理在出苗后1周即可检测到类病毒；叶接种处理在接种后2周能检测到类病毒。随后其浓度逐渐增高，到出苗后7周达到高峰（盛花期），随即急剧下降，到第10周，大部分植株样品已检测不到类病毒。



照片3 提纯的马铃薯纺锤块茎类病毒核酸的电泳结果

注：第1泳道为阴性对照，第2泳道为类病毒强系对照，第3泳道为类病毒弱系对照，第4泳道为类病毒核酸15ng，第5泳道为7.5ng，第6泳道为3.75ng，第7泳道为1.88ng，第8泳道为0.94ng（从左到右）

块茎带类病毒的状况：若薯块直径达到1厘米，有些样品即可检测到类病毒；随着薯块膨大，其浓度直线上升，到出苗后第10周达到最高浓度，只略低于植株带类病毒高峰期的含量。

3.3 不同接种方法对产量的影响

如前所述，接种当年，芽加叶接种处理的类病毒侵染株率和植株、块茎中的类病毒相对浓度都依次高于芽接种和叶接种处理。针刺芽接种早，接种体深入到组织内部，随后又补充以叶片接种，从而使类病毒侵染的植株多，植株体内类病毒相对浓度也高，因而促使植株症状重并使产量降低。3种接种方法在3个被接种品种上的反应趋势相同。即芽加叶处理减产最多，芽接种处理居中，叶接种处理减产最少。

3.4 不同类病毒变株所引起的产量损失

资料表明(表2、表3), 接种类病毒当年, 就使产量明显降低。从接种3个类病毒变株的3个品种产量看, 平均减产37%, 商品产量降低47%。从3个类病毒变株对产量的影响程度看, 接种M₂-PSTV的减产最多, 尤其是块茎产重畸变, 商品产量竟降低54%。最次是接种S-PSTV的, 商品产量几乎降低近一半, 再次是接种M₁-PSTV

的, 商品产量减少41%。3个品种对3个类病毒变株的反应趋势大致一致; 但由于品种和类病毒变株的组合不同, 对产量的影响也不全相同。克新1号接种M₂-PSTV时, 植株的症状极重(照片4、5和6), 产生一些变长, 龟裂极重的薯块(照片7、8和9), 商品产量只为不接种对照的21%。克新4号对3个类病毒变株的反应相似, 接种不同类病毒变株的处理间产量相差不多。抗疫白接种类病毒后减产少, 表现耐病。这和北美对这一品种的研究报导是一致的。

表2 不同马铃薯纺锤块茎类病毒变株对产量的影响

接 种 的 类 病 毒 变 株	克新1号				克新4号				抗 疫 白				按变株平均			
	单株 产量 (克)	为 CK (%)	单株 产量 (克)	为 CK (%)	单株 产量 (克)	为 CK (%)	单株 商品 产量 (克)	为 CK (%)	单株 产量 (克)	为 CK (%)	单株 商品 产量 (克)	为 CK (%)	单株 产量 (克)	为 CK (%)	单株 商品 产量 (克)	为 CK (%)
未接种(K)	811	100	756	100	993	100	874	100	817	100	765	100	874	100	798	100
M ₁ -PSTV	576	71	425	56	585	59	370	42	655	80	610	80	605	70	468	59
M ₂ -PSTV	378	47	158	21	519	52	432	49	571	70	510	67	489	56	367	46
S-PSTV	500	62	351	46	615	62	485	55	585	72	481	63	567	65	439	55
平 均	484	60	311	41	573	58	429	49	601	74	534	70	551	63	425	53

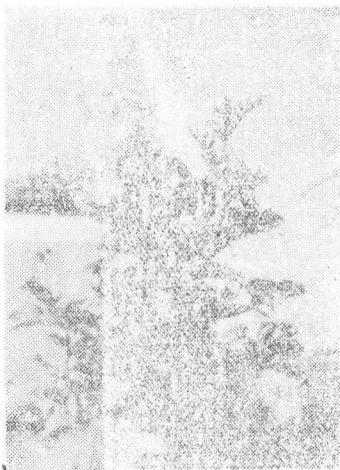
注: 表中列举的产量为36株的平均数

表3 不同接种方法对产量的影响

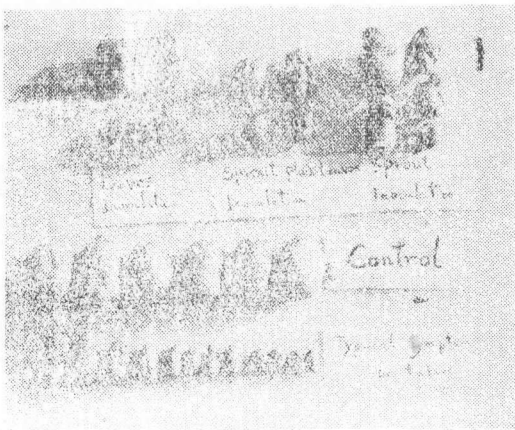
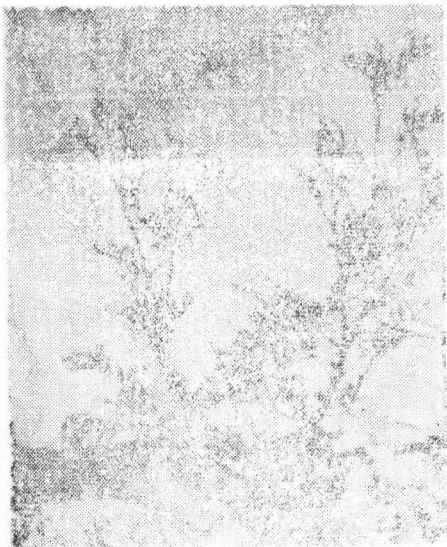
接 种 方 法	类病毒变株	克新1号				克新4号				抗 疫 白			
		单株 产量 (克)	为 CK (%)	单株商 品产量 (克)	为 CK (%)	单株 产量 (克)	为 CK (%)	单株商 品产量 (克)	为 CK (%)	单株 产量 (克)	为 CK (%)	单株商 品产量 (克)	为 CK (%)
未接种	CK	811	100	756	100	992	100	879	100	817	100	763	100
芽加叶接种	M ₁ -PSTV	578	71	378	50	556	56	338	39	628	77	570	75
	M ₂ -PSTV	213	26	0	0	489	49	119	13	516	63	439	60
	S-PSTV	372	46	278	37	511	52	380	43	556	68	452	59
	平 均	388	48	219	29	519	52	379	43	567	69	491	65
芽接种	M ₁ -PSTV	555	68	430	57	593	60	341	39	653	81	628	82
	M ₂ -PSTV	430	53	200	26	521	53	412	47	553	68	523	69
	S-PSTV	552	68	393	52	616	62	506	58	571	70	551	66
	平 均	512	63	341	45	577	58	420	48	594	73	562	72
叶接种	M ₁ -PSTV	596	73	437	62	606	61	431	49	679	83	632	83
	M ₂ -PSTV	490	60	274	36	548	55	466	53	644	79	547	72
	S-PSTV	577	64	381	50	719	76	568	56	629	77	488	64
	平 均	554	68	374	49	624	63	488	56	650	80	556	73



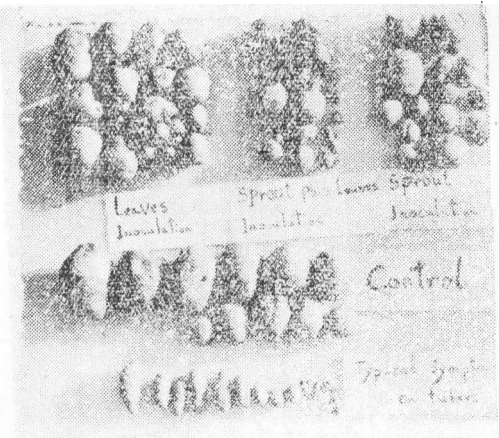
照片4 克新号未接种植株的生育表现



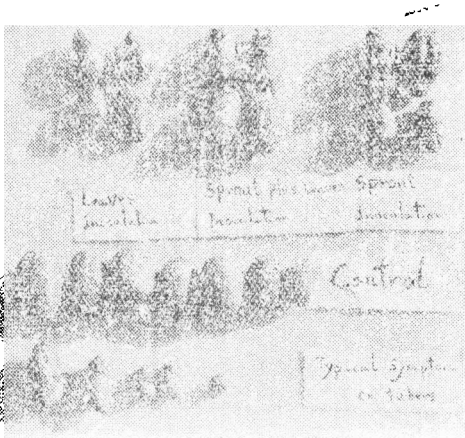
照片5 克新1号品种接种 M_1 -PSTV (左) 和 M_2 -PSTV(右)的植株的症状表现



照片7 克新1号品种接种 M_2 -PSTV块茎上的症状表现



照片 8 克新 4 号品种接种M₂—PSTV后块茎上的症状表现



照片 9 抗疫白品种接种M₂—PSTV块茎上的症状表现

3.5 应用无类病毒核心材料防治类病毒的初步效果

80年代初期，我省初步建成马铃薯脱毒薯留种体系，当时由于受类病毒检测水平限制，还不能进行以筛选无类病毒材料为主要目的的大量筛选鉴定。1987年，应用马铃薯

Y 病毒等 8 种主要马铃薯病毒的酶标抗体进行了大量材料的鉴定筛选，获得了一批无主要马铃薯病毒的材料，又用往复电泳法筛选，得到了无类病毒的克新1、4号试管苗，并从1988年开始提供给省内外良种生产单位繁殖使用。1989年秋季，经抽样用往复电泳法检测，未发现有类病毒侵染。

表 4 1988 年以来提供给克山第二良种场的无类病毒原种抽样检测类病毒情况

检测材料种类	结 果 (阳性样品数/检测样品数)	检测材料种类	结 果 (阳性样品数/检测样品数)
克新 1 号试管苗	0/25	克新 4 号核心种	0/25
克新 1 号核心种	0/25	克新 4 号原种 1 代	0/25
克新 1 号原种 1 代	0/25	生产田 1	7/32
克新 4 号试管苗	0/25	生产田 2	12/23

注：生产无类病毒核心种是国际合作项目；表中所列结果是由 R. P. Singh 工程师主持检测

4 结果和讨论

通过试验，进一步明确了马铃薯纺锤块茎类病毒是危害黑龙江省马铃薯生产的重要病害，是提高产量的主要限制因素。3 个品种接种类病毒当年，平均减产 37%，商品产量降低达 47%。类病毒对产量的影响与马铃薯品种和类病毒变株的组合关系密切，并

非类病毒强系致病力就强，而弱系致病力就弱。

接种当年，植株体内类病毒浓度以生育盛期含量最高，而块茎则是停止膨大时达到最高浓度。因而在检疫和种薯质量检测中，除以植株和块茎症状为依据外，对症状可疑的植株，于开花期前后用往复电泳法检测；生育后期可以检测块茎。

Pfannenstiel 发现, 生育后期取样并用聚丙烯酰胺凝胶法检测类病毒时, 类病毒核酸带模糊不清^[1]。Morris 等人也提出生育后期叶片中类病毒含量有所降低^[2]。这和本试验的类病浓度变化趋势是相似的。试验中应用的 3 种接种方法, 以针刺芽并辅以叶片摩擦接种效果最好, 因此做类病毒的接种试验或繁殖类病毒, 可以采用此接种方法。

提供给良种繁殖单位的无类病毒、无主要马铃薯病毒的克新 1、4 号核心种, 已连续 2 年; 保存的试管苗已连续繁殖多次, 经抽样检测, 未检测到类病毒。可见, 在我国

各地建立健全马铃薯脱毒留种体系过程中, 实行严格的类病毒检测程序, 确保核心种的质量, 繁殖中防止类病毒侵染, 将会获得良好的防治效果。

参 考 文 献

- 1 Pfannenstiel M A, S A Stack and L C Lane. Detection of potato spindle tuber viroid in field-grown potatoes by an improved electrophoretic assay. *Phytopathology*, 1980, 70 : 1015~1018
- 2 Morris T J and Smith EM. Potato spindle tuber disease: procedures for the detection of viroid RNA and certification of disease-free potato tubers. *Phytopathology*, 1977, 67 : 145~150

INFLUENCE OF VARIOUS METHODS OF INOCULATION AND VARIOUS STRAINS ON THE INFECTION OF POTATO SPINDLE TUBER VIROID(PSTV)AND ITS YIELD LOSSES

Cui Rongcang Li Xiaolong

(Keshan Potato Research Institute of Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences)

ABSTRACT

The purpose this study was to determine the influence of strains of potato spindle tuber viroid and of several inoculation ways on the infection of plants, detectability, and its yield losses by mechanical inoculation of sprouts, leaves and both sprouts and leaves in screenhouse experiments.

Three potato cultivars(superelite)were used for study: Kennebec, Kexin No. 1 and Kexin No. 4. Strains of PSTV: severe, mild originated from North America and another mild strain isolated from a local cultivar were used for inoculation.

The highest infection rate of potato plants with PSTV, highest percentage of plants with disease symptoms on plants and tubers and highest yield losses were obtained after both sprouts and leaves inoculation, followed by sprouts, and leaves inoculation.

The highest yield losses were acquired by inoculation with a locally mild strain of PSTV, followed by inoculation with severe strain and mild strain originated from North America respectively. The development of symptoms and yield losses is also affected by PSTV strains. The locally mild strain of PSTV inoculated produced more severe symptoms of PSTV and yield losses than the severe and mild strains.

bination between PSTV strains and potato cultivars.

When Kexin No. 1 was inoculated with locally mild strain of PSTV, it developed most severe symptoms of PSTV and produced less marketable yield, it was as little as 21% of the uninoculated control. The relative concentration of PSTV during current year of infection was evaluated by Return-polyacrylamide gel electrophoresis. The PSTV was detected as early as 1 week after emergence in samples taken from middle leaves of sprouts inoculation methods and early as 2 weeks after inoculation in leaves taken from leaves inoculation methods. Thereafter the PSTV concentration increased rapidly in middle leaves and reached a peak 7 weeks after emergence for sprouts inoculation methods, and 5 weeks after inoculation for leaves inoculation methods, and then declined sharply. 10 weeks after emergence, the PSTV concentration in middle leaves reached a lowest level sometimes it was not detected by R-PAGE. The PSTV was readily detected by R-PAGE after tuber initiation. While the tubers are increasing with weights, the concentration of PSTV in tubers was raised, and reached a highest level, when potato plants came to maturity.

The nucleic propagating materials free from viroid were planted two year by a elite seed farm, some tubers of the nucleic propagating materials were sampled and detected viroid by R PAGE this year. The potato spindle tuber viroid was not detected in these samples.

(上接143页)

THE EFFECT OF HIGH TEMPERATURE PREINCUBATION AND THE RESPONSE OF DIFFERENT GENOTYPE IN POTATO ANTHER CULTURE

Wang Di, Ran Yidong and Dai Chaoxi

(Department of Agronomy, Gansu Agricultural University)

ABSTRACT

Anther culture was performed to 15 tetraploid and diploid species and accessions, 12 produced embryos on three media respectively. A suitable medium selection is considered very important for a successful pollen embryogenesis. High temperature preincubation could increase the number of embryos, while the low temperature is harmful. There was a strong interaction between "tissue culture ability" (TCA) gene and intra environment (medium). However, the attempt to transfer TCA gene from TCA clone into the non TCA clone was proved to be easy and may be useful in the potato haploid breeding.