

# 马铃薯病毒疫情调查及马铃薯S 病毒的检测鉴定

田永蕾, 张永江, 刘冬梅, 刘梅, 马占鸿, 李明福\*, 陈洪俊

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

**摘要** [目的] 了解河北省张家口市马铃薯病毒病害发生情况并对马铃薯S 病毒(PVS) 进行鉴定。[方法] 对采自河北省张家口市的46 份马铃薯样品进行生物学测定和血清学及分子生物学检测。[结果] 46 份样品中有35 份为马铃薯Y 病毒(PVY) 侵染, 其中有6 份是PVY 与PVS 混合侵染, 其余29 份为PVY 单独侵染。用特异性引物扩增PVS 外壳蛋白基因的部分序列, 获得685 bp 的目的产物, 该序列与已报道的PVS 核苷酸序列同源性在80% 以上, 编码227 个氨基酸, 与已报道的PVS 外壳蛋白的氨基酸同源性均在90% 以上。证明该样品中确实携带PVS。[结论] 该研究为今后该地区马铃薯病毒病害的控制及防治提供了依据。

**关键词** 马铃薯病毒; 调查; 鉴定

中图分类号 S435.32 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)03-01001-02

## Epidemic Survey on Potato Virus and Detection and Identification of Potato Virus S in Zhangjiakou City of Hebei Province

TIAN Yonglei et al. (College of Agricultural and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193)

**Abstract** [Objective] The aim was to understand the occurrence condition of the potato virus disease in Zhangjiakou City of Hebei Province and identify the potato virus S (PVS). [Method] 46 potato samples collected from Zhangjiakou City of Hebei Province were detected through biological determination and serological and molecular biological detection. [Result] Among the 46 potato samples, 35 samples were infected by potato virus Y (PVY), of which 6 samples were mixed infection of PVY and PVS, the rest of 29 samples were single infection of PVY. The partial sequence of coat protein gene of PVS was amplified by using specific primers and the target product of 685 bp was obtained. The sequence shared above 80% nucleotide homology with the reported PVS and it encoded 227 amino acid. The amino acid homology of the sequence was more than 90% compared with that of the reported PVS coat protein, which confirmed that the sample was taking PVS. [Conclusion] The research provided the basis for the control of potato virus disease in the area in the future.

**Key words** Potato virus; Epidemic survey; Identification

马铃薯病毒病害达20 多种, 成为很多地区马铃薯生产的重要制约因素。马铃薯S 病毒(Potato virus S, PVS) 是危害马铃薯的主要病毒之一, 该病毒单独侵染时症状不明显, 往往与其他病毒混合侵染, 可通过机械传播, 也可通过蚜虫以非持久方式传播, 一般可使马铃薯减产10%~20%。该病毒目前在我国的福建、浙江及四川等地区已有报道<sup>[1-4]</sup>。笔者对河北省张家口市马铃薯主产区田间进行取样调查, 了解该地区马铃薯病毒病害发生情况, 发现并分离鉴定了马铃薯S 病毒, 旨在为今后该地区马铃薯病毒病害的控制及其针对性防治工作提供依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 疫情调查样品采自河北省张家口市的张北和鱼儿山地区田间自然发病的马铃薯叶片, 根据症状及来源地区共分为46 份。

马铃薯X 病毒(Potato virus X, PVX)、马铃薯Y 病毒(Potato virus Y, PVY)、马铃薯A 病毒(Potato virus A, PVA)、马铃薯M 病毒(Potato virus M, PVM)、马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus, PLRV)、马铃薯黄矮病毒(Potato yellow dwarf virus, PYDV)、PVS 抗体为美国ACD 公司产品; 马铃薯帚顶病毒(Potato mop-top virus, PMTV) 抗体为H OREBA 公司产品。

核酸提取试剂盒 TRNzol 为 TIANGEN 公司产品; M MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、dNIP mix 购自 Promega 公司; Ex Taq DNA 聚合酶、克隆载体 pMD18-T vector kit 购自 Takara 公司; DNA 凝胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。

## 1.2 方 法

**1.2.1 生物学测定。** 将症状明显的样品摩擦接种到三生烟

(*Nicotina tabacum* Sansonn)、白肋烟(*Nicotina tabacum* White-Burley)、昆藜(*Chenopodium quinoa*) 和苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*) 上, 置24℃ 温室中观察症状。并对苋色藜上出现的枯斑进行单斑分离。

**1.2.2 血清学检测。** 取46 份马铃薯样品各0.2 g 按照1:10 (W/V) 的比例在样品抽提缓冲液中充分研磨, 将研磨所得汁液以4 000 r/min 离心3 min 去除残渣, 取上清液进行双抗体夹心(DAS)-ELISA 检测, 操作按试剂盒说明书进行。所用的抗体包括PVX、PVY、PVA、PVM、PVS、PLRV、PYDV 和PMTV 共8 种。

**1.2.3 分子生物学检测。** 取经过单斑分离的苋色藜叶片, 用 TRNzol 核酸提取试剂盒提取植物总 RNA, 以此为模板用特异性引物<sup>[1]</sup> PVS<sup>+</sup>: 5'-CCT CAA AAA GGC ACA ATT CAA C-3' 和 PVS<sup>-</sup>: 5'-AAT CTC AGC GCC AAG CAT C-3' 进行 RT-PCR 扩增 PVS CP 基因的部分序列。RT-PCR 反应体系及条件: 0.2 ml PCR 管中加入 2.5 μl DEPC 水, 2 μl 5 × M MLV Buffer, 1 μl dNTP (浓度 10 mmol/L), 0.5 μl 下游引物 PVS<sup>-</sup> (浓度 20 μmol/L), 0.5 μl RNasin (40 U μl), 3 μl 总 RNA, 0.5 μl M MLV Reverse Transcriptase (200 U μl), 总体系 10 μl, 42℃ 水浴 50 min。取上述反应产物 2 μl 作模板, 加入 36 μl DEPC 水, 5 μl 10 × Buffer, 2 μl dNTP、上下游引物各 1 μl, 1 μl Ex Taq DNA 聚合酶 (5 U μl), 总体系 50 μl。94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。

扩增结束后将全部 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳并用凝胶成像系统观察结果。目的条带在紫外灯下切胶回收后连接到 pMD18-T 载体上克隆。阳性克隆经 BamH I 和 Hnd III 双酶切和 PCR 验证后送北京三博远志公司测序。用软件 DNAMAN 6.0.40 和 BLAST 工具对测序结果进行分析<sup>[2]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 生物学检测结果** 三生烟和白肋烟在接种后 4~5 d, 叶

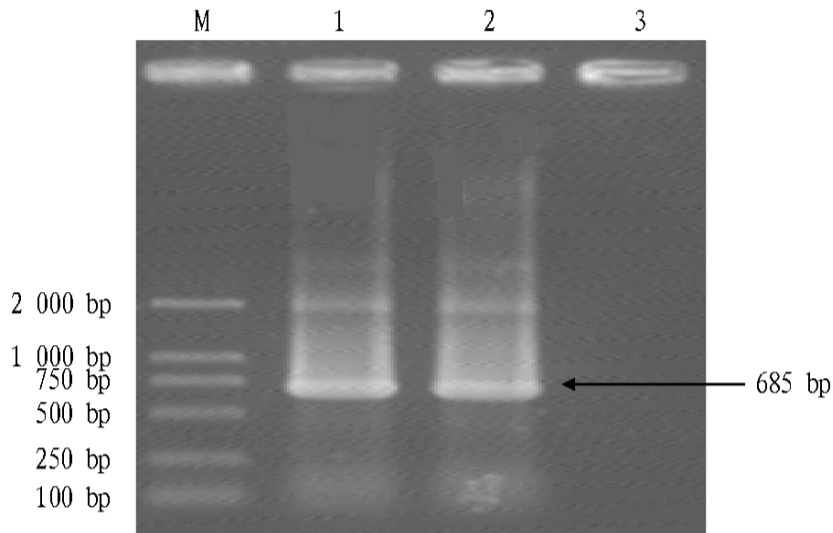
基金项目 国家质检总局马铃薯种薯检验检疫关键技术研究(2006-IK209) 资助。

作者简介 田永蕾(1984-), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向: 植物病毒检验。\* 通讯作者, 研究员, E-mail: li n f 9 @ p v c h i - n a . o r g .

收稿日期 2008-11-17

片上出现明显的花叶症状,随后叶片逐渐变黄并萎蔫脱落。莧色藜在接种4~5 d后接种叶片出现枯斑。

**2.2 血清学检测结果** 样品经 DAS ELISA 反应后,在酶标仪405 nm下读数,样品 OD<sub>405</sub> 值与阴性对照 OD<sub>405</sub> 值之比 2者判为阳性。检测结果表明,该批样品对 PVX、PVA、PVM、PLRV、PYDV 和 PMIV 6 种抗体均为阴性反应,大部分样品对 PVY 和 PVS 呈阳性反应。46 份样品中有35 份经检测为马铃薯 Y 病毒侵染,其中有6 份是 PVY 与 PVS 混合侵染,其余29 份为 PVY 单独侵染。



注:M 为 Marker(DL 2000);1~2 为 PVS 阳性样品;3 为阴性对照。

Note: M. Marker(DL 2000);1-2. PVS positive samples;3. Negative control.

图1 PVS 扩增产物凝胶电泳结果

Fig.1 Gel electrophoresis result of PVS amplification product

**2.3 分子生物学检测结果** PCR 扩增结束后,经1%的琼脂糖凝胶电泳显示(图1),在680 bp左右出现预期的目的条带。目的条带克隆测序结果显示,扩增的片段为685 bp,位于基因组的7 380~8 064 位置,属于外壳蛋白的编码基因(7 211~8 095)的部分序列。BLAST 比对结果显示,该序列与 PVS 病毒同源性最高,利用 BLAST 工具根据核酸同源性作进化树分析,结果显示,该序列与 Mtava 分离物(AJ863510.1) 和 Andean (Peruvian) 分离物(D00461.1) 亲缘关系较近,序列一致性均为

88%,与我国报道的 PVS 杭州分离物(AY687337.1) 和 PVS 河北分离物(DQ815387) 的序列一致性均为84%。氨基酸序列分析结果显示,该序列编码的227 个氨基酸与已报道的 PVS 外壳蛋白的氨基酸同源性均在90%以上,证明该样品中确实携带马铃薯 S 病毒。

### 3 结论与讨论

(1) 试验结果表明,河北张家口市田间马铃薯的带毒率较高,尤其是 PVY 的带毒率高达76%,而 PVS 则是与 PVY 混合侵染。由于所采样品大部分为田间自然发病的样品,发病率高一方面由于所用的种薯多为自留种薯,未经脱毒或脱毒不彻底;另一方面种植的马铃薯品种不具有抗病毒特性或抗性不高,另外发病率较高与田间栽培管理也有很大关系。这说明目前我国马铃薯生产中植物病毒尚未得到有效控制。另外,马铃薯纺锤块茎类病毒也是引起马铃薯退化和产量损失的主要病害之一,目前对其主要检测方法包括生物学检测、聚丙烯酰胺电泳及基于核酸特性的 RT-PCR 及核酸杂交技术等<sup>[3]</sup>。该试验检测的均为马铃薯上重要的病毒病害,对类病毒的检测鉴定未涉及,而这部分也应成为常规疫情调查的内容之一,拟在下一步工作中展开。

(2) 马铃薯 S 病毒在我国的马铃薯主产区发生较为普遍,而由于其往往与其他病毒混合侵染在田间不易识别,并且该病毒脱毒困难,因此建立一套快速准确的 PVS 检测鉴定体系,不仅可以为脱毒种薯和种苗的健康检测和鉴定提供技术支持,而且可为该病毒病害的防治及进一步进行抗病毒研究奠定基础。

### 参考文献

- [1] NEXZ, SINGH R P. Detection of multiple potato viruses using an digo(dI) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2000, 86:179-185.
- [2] 张永江. 应用 IC RT-PCR 方法检测番茄环斑病毒[J]. 中国植保导刊, 2005, 25(9):8-10.
- [3] 李桂芬, 李明福, 张永江. 植物类病毒检测技术概述[J]. 河南农业科学, 2007(3):19-21.
- [4] 马青, 渡边牧夫, 洲崎敏伸. 应用 Gde Gde 公式分析蛙血液细胞介电谱[J]. 中国生物医学工程学报, 2003, 22(4):309-312.
- [5] 张春梅, 马青, 刘建军. 人红细胞叠连的介电特性的实验研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2000, 17(2):93-94.
- [6] 马青, 渡边牧夫, 洲崎敏伸. 100 Hz~100 MHz 蛙骨骼肌介电谱的椭圆壳理论解析[J]. 生物物理学, 2003, 19(3):309-316.
- [7] 马青, 张永鹏, 何学影. 大鼠骨骼肌细胞的频域电生理特性研究[J]. 中国运动医学杂志, 2006, 25(4):424-427.
- [8] 何学影, 王淑秋, 马青. 大鼠腓肠肌介电谱的实验研究[J]. 黑龙江医药科学, 2006, 29(6):13-14.
- [9] 马青, 何学影, 张红波. 交流阻抗方法研究大鼠正常血细胞电生理特性[J]. 中国运动医学杂志, 2007, 26(1):93-95.
- [10] 赵孔. 双微小生物细胞的介电研究方法[J]. 生物物理学报, 2000, 16(1):176-182.

(上接第936页)

质。土豆组织中除细胞外,还有细胞外基质等成分。细胞作为电解质具有导电和绝缘的双重特性。当外加电场作用于细胞时,界面限制电荷的转移,界面上的电荷聚集导致了不连续性,在电性不相同的两种介质界面发生极化现象,称为 Maxwell-Wagner 效应,通过测量极化细胞的输出电压可以了解细胞对交流电场的频率响应特性。从本质上讲,土豆组织属于混浊介质,不同的成分、不同分子在相同频率的电场中,其行为和极化特征具有很大区别,这是生物组织与无机材料在电学性质方面的根本区别。

### 参考文献

- [1] 于冬雁, 崔湘屏, 马青. 人血液细胞介电谱的实验研究[J]. 生物医学工程学报, 2006, 23(6):1198-1201.
- [2] JASPARD F, NADI M, ROUANE A. Dielectric properties of blood: An investigation of haematocrit dependence[J]. Physiological Measurement, 2003, 24:137-147.