

高原,杨洪一.马铃薯纺锤形茎块类病毒防治与检测研究进展[J].黑龙江农业科学,2020(4):135-138.

马铃薯纺锤形茎块类病毒防治与检测研究进展

高原,杨洪一

(东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:马铃薯纺锤形茎块类病毒在自然状态下也能感染马铃薯。PSTVd 是一种具有单链环状 RNA 结构的类病毒,感染能力强,在寄主中传播率较高,且会在感染马铃薯后降低其作物产量及品质,因此对于 PSTVd 分子结构及致病机理的研究很有必要。本文简要介绍了 PSTVd 的分子结构、最新检测与防治方法,并提出了展望,旨在为今后马铃薯病毒防治提供参考。

关键词:马铃薯;类病毒;PSTVd

马铃薯是一种具有悠久历史的经济作物,属于茄科多年生草本植物,其在全世界范围内均被大面积种植,已成为在水稻、小麦、玉米之后的世界第四大粮食作物。在我国,马铃薯早已进入千家万户的餐桌,成为不可缺少的食物。随着马铃薯种植规模的扩大,人们发现马铃薯容易出现植株矮小、块茎变小、叶片萎缩等退化的现象^[1]。为研究马铃薯的退化现象,在 20 世纪初期,专家提出了一种病毒学说:病毒在侵染马铃薯后会逐代在块茎里累积,从而致使马铃薯发生退化现象。国内外学者和专家的多年研究发现,约有 40 种病毒会侵入到马铃薯植株体内,影响马铃薯的产量和品质^[2-4]。在中国,危害较大的病毒有马铃薯 X 病毒(Potato Virus X, PVX)、马铃薯 Y 病毒(Potato Virus Y, PVY)、马铃薯 S 病毒(Potato Virus S, PVS)、马铃薯 A 病毒(Potato Virus A, PVA)、马铃薯 M 病毒(Potato Virus M, PVM)以及马铃薯卷叶病毒(Potato Leaf Roll Virus, PLRV)^[5-6]。除了病毒,某些类病毒如 PSTVd 也会侵染马铃薯,导致马铃薯发生多种病害。

类病毒是一类环状闭合的单链 RNA 分子,分子量约为 105 D,由 246~401 个核苷酸构成自身 RNA 链,侵入寄主体后自主复制。类病毒没有蛋白质外壳,是裸露的 RNA 分子,也没有 mRNA 活性。当植物表面有损伤时,类病毒会通过损伤处进入植物体侵染植物,且某些条件下也可

以通过花粉和种子垂直传播。目前已发现类病毒约 40 种,其中大多数易于感染植物并引发植物疾病,如番茄簇顶病(Tomato cluster disease),柑桔裂皮病(Citrus split skin disease),黄瓜白果病(Cucumber ginkgo),椰子死亡病(Coconut death)等,危害较为严重。类病毒的防治途径一般通过选用没有受感染的种子和繁殖体进行隔离培育。

目前已经发现的能够特定感染植物的类病毒有 30 多种。Flores 等^[7]将类病毒分为两个科:即马铃薯纺锤形块茎类病毒科和鳄梨日斑类病毒科。其中, RNA 结构中是否有保守区是两个科的区分依据,鳄梨日斑类病毒科在 RNA 结构中没有保守区,但可实现锤头中间体的自我剪切。以保守区形成的侧翼序列的不同为标准进行分类,马铃薯纺锤形块茎类病毒科可分为铃薯纺锤形块茎类病毒属(*Pospiviroid*)、啤酒花矮化类病毒属(*Hostuviroid*)、椰子死亡类病毒属(*Cocadvir-oid*)、苹果锈果类病毒属(*Apscaviroid*)及锦紫苏类病毒属(*Coleviroid*)5 个属;又以锤头中间体自我剪切产物的不同为标准分类,鳄梨日斑类病毒科分成鳄梨日斑类病毒属(*Avsunviroid*)和桃潜花叶类病毒属(*Pelamoviroid*)两个属。在天然状态下,类病毒 RNA 碱基自身发生互补配对,二级结构呈现棒状。多数类病毒的 RNA 结构可分为 5 个区域,自左向右依次为:左末端区(Left terminal region, TL)、致病区(Pathogenicic region, p)、中央保守区(Central conserved region, CCR)、可变区(Variable region, V)和右末端区(Right terminal region, TR)^[8]。TL 和 TR 的位置在二级结构两端,猜测可能与类病毒的起源和进化有关^[9];P 区与类病毒的致病特性有密切关系;V 区

收稿日期:2019-12-16

基金项目:哈尔滨市科技创新基金(RC2008QN002060)。

第一作者:高原(1995-),女,在读硕士,从事微生物研究。E-mail:2046679400@qq.com。

通信作者:杨洪一(1978-),男,博士,教授,从事微生物研究。E-mail:18830701@qq.com。

的碱基变化性较大,同一种病毒的不同株在此区域差别较大;CCR 区位于中心,核苷酸序列高度保守,可能与类病毒的复制有关。类病毒感染能力强,侵染后植物会表现出一些明显的症状,如植株矮小,叶片皱缩,产量减少等,甚至可导致植株死亡。本文对马铃薯纺锤形茎块类病毒(Potato spindle tuber viroid,PSTVd)的分子结构、防治方法及检测方法进行了简要介绍,以期今后马铃薯病毒防治提供借鉴。

1 PSTVd

目前发现,自然状态下能感染马铃薯的有两种类病毒^[10-11],其中 PSTVd 对马铃薯的影响较大。PSTVd 早在 1922 年就被发现,科学家 Diener 在 1971 年首次将其分离出来,命名为马铃薯纺锤形茎块类病毒。PSTVd 是一种环状单链 RNA,由于碱基高度配对导致二级结构呈棒状,在寄主体内复制转运,多数大小为 359 个碱基对,也有少数为 358 或 360 个^[12]。PSTVd 的自然寄主范围较窄,一般侵染具有匍匐茎和块茎的茄属植物,如马铃薯、番茄等^[13-14],但是 PSTVd 的实验寄主范围较宽泛,可侵染 31 个科的 94 个种^[2]。

PSTVd 在马铃薯中主要以无性繁殖的方式传播,在田间通过农具机械和块茎切分两种接触途径传播。生产中带毒马铃薯薯传播 PSTVd 的传播率很高,因此,北美等国家主要通过严格的控制种薯质量来清除 PSTVd^[15-16]。此外,PSTVd 还可以通过带毒的花粉和种子传播^[17-21]。

2 PSTVd 防治

2.1 选择抗病材料

在农业生产中,使用抗病品种不仅会大大降低植株的染病率,同时减少了农药的使用,降低了生产成本,减少了劳动力的投入,产出绿色粮食,对环境友好。在选择育种品种的时候,尤为注意要区别抗病品种和非抗病品种。PSTVd 非常容易通过接触传播,抗病种在植株生长过程中不仅能抵抗外界侵染,而且不会作为传染源感染其他健康植株,而抗病品种只是表现出轻微或不表现病症,作为 PSTVd 携带植株极易传播病害。抗病株在表观上不易与健康株区分,应与实验室检验相结合选择。

2.2 加强消毒工作

在种植中,PSTVd 易通过耕作器具进行传播,因此严格消毒器具极为重要。Olivier 等^[23]以

漂白剂作为对照,研究了 Virkon[®],Hyprelva[™] SL,Jet 5[®],MENNO clean 和 Virocid[™] 这 5 种消毒剂对 PSTVd 的作用,试验结果表明,Virocid、Hyprelva SL、Virkon 和 Jet 5 与 0.8% 家用漂白剂溶液无显著差异,均对 PSTVd 有较好的消毒效果,MENNO clean 虽然在几个欧洲国家被批准用于类病毒消毒,但在接触时间为 3 或 15 min 时,在建议最低浓度 1% 的处理条件下,并未发现与阴性对照有显著处理差异。注意耕作器具的消毒可有效减少 PSTVd 的感染。

2.3 基因工程技术

核酶是具有催化功能的小分子 RNA,可降解特异的 RNA 序列,属于生物催化剂。因此研究者们利用核酶切割目的 RNA 从而抑制基因表达的这一特性,设计出特异切割 PSTVd RNA 的核酶基因,将其转入到马铃薯中,获得了抗 PSTVd 侵染的马铃薯植株^[23]。

2.4 严控进出口检疫

据报道,我国境内未曾发现 PSTVd 的强毒株系^[24-25],要防止在马铃薯进口中境外 PSTVd 的入侵,检疫部门应加大力度检测。

3 检测方法

3.1 生物学检测

生物学检测是根据寄主植物是否产生病症从而判断有无类病毒感染的方法,此种方法可以检测到多种类病毒。但是,这种检测方法只是对植物感染情况进行粗略辨认,无法确定感染病毒是否为 PSTVd。1964 年,Raymer 等^[26]利用番茄作为 PSTVd 的指示植物,方法是前期种植番茄,待到番茄植株长到有两三片真叶时接种 PSTVd,经 7~14 d 后观察植株生长状态,如若叶片出现皱缩、变小、发黄,中脉和支脉坏死等现象发生,便可判断为典型的 PSTVd 感染。生物指示法需要大量空间和人力的投入,实验周期较长,温度、水分、阳光等条件对实验结果有较大的影响,并且不同品种感染 PSTVd 后有不同表观特征,甚至有耐 PSTVd 品种潜伏侵染无表观上的改变,因此用生物指示法鉴定 PSTVd 的结果准确性不足。

3.2 分子检测

PSTVd 很难通过茎尖脱毒去除,并且病害极易传播,因此早期的准确诊断十分有必要。PSTVd 无蛋白质外壳,只有 RNA 结构,因此所有的分子检测方法都只是针对 RNA 的检测。

3.2.1 R-page 法 往返电泳法^[27-29] (Return-polyacrylamide gel electrophoresis, R-PAGE) 的原理是类病毒在自然状态下和变性条件下在电泳中的迁移率不同,变性后,线性分子结构改变为环状分子使得相同分子量的类病毒迁移变慢。第一次电泳是在非变性条件下,类病毒分子为线性结构与植物核酸一起被分离出来,第二次的返回电泳是在变性条件下进行的,由于类病毒的迁移率变慢而与植物核酸分开,类病毒的条带由硝酸银染色后观察。但是此种方法特异性较低,检测到的 RNA 条带并非特异的 PSTVd,而是所有存在于植株中的类病毒。

3.2.2 分子杂交技术 20 世纪 70 年代发展起来的分子杂交技术被用于确定单链核酸碱基序列^[30],其基本原理是待测序列与已知序列的单链核酸之间通过碱基配对形成可检测出的双螺旋片段,这种技术可以在 DNA 与 DNA、RNA 与 RNA 或 RNA 与 DNA 之间进行,形成 DNA-DNA 结合、RNA-RNA 结合或 RNA-DNA 结合等不同类型的杂交分子。其中已知序列的单链即为探针,探针必须预先标记,类病毒与探针结合后,通过对标记物显色以检测病毒。

20 世纪 80 年代通常用³²P 标记 cDNA,但是³²P 有放射性对实验人员身体有伤害且半衰期短,同期被用于标记的生物素成本过高,因而没有被大范围应用^[31]。吕典秋等^[32]利用地高辛标记 PSTVd 探针,由于地高辛没有放射性对人体没有伤害,且灵敏度高,因此被广泛应用。地高辛探针的制备^[33]方法为预先用 Dig-labeling Mix 标记 UTP,通过 PCR 反应程序得到的被插入 UTP 的扩增产物,该产物被称为探针。探针与目的片段特异性结合,同时 Dig 与碱性磷酸酶作用得到紫色化合物,从而检测出 PSTVd。上述分子杂交技术的灵敏度和特异性高,因此被广泛应用。

原位杂交为常用的分子杂交检测方法。探针在待测植物组织切片中杂交,在显微镜下观察,根据显色结果可以判断组织是否被 PSTVd 感染,并可精确定位 PSTVd 在植物中的位置。

3.2.3 RT-PCR 法 逆转录-聚合酶链式反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 是一种高灵敏的、特异性强的检测 PSTVd 的方法^[34]。先从待检测植物中提取植物总 RNA,再将 RNA 反转录为 cDNA (Complementary DNA, cDNA),此 cDNA 与 PSTVd 核酸

序列互补,设计 PSTVd 特异性引物,通过 PCR 扩增反应获得产物,检测产物的扩增情况即可判断植物是否受 PSTVd 感染。

4 展望

民以食为天,粮食作物的产量多少与质量高低对国家的发展有着重大影响,马铃薯作为全世界第四大粮食作物,在种植过程中品种发生感染或退化的现象应引起重视。PSTVd 严重危害了马铃薯的生产,但随着分子生物学的发展,科学家对于 PSTVd 分子结构及致病机理的研究已越来越透彻。相信在以后的马铃薯大规模栽培中,PSTVd 会得到很好的控制,马铃薯的产量和品质会有大幅度的提高。

参考文献:

- [1] Lawson C, Kaniewski W, Haley L, et al. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic russet burbank[J]. *Nat Biotechnol*, 1990, 8(2): 127-134.
- [2] Jeffries G J. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of potato germplasm: No 19, Potato[M]. Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998.
- [3] Loebenstein G, Berger P H, Brunt A, et al. Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes[M]. Springer: Softcover reprint of the original 1st ed, 2001.
- [4] Kluwer, Dordrecht, Valkonen J P T. Viruses: economical losses and biotechnological potential[M]. In: Vreugdenhil, D. (Ed.), *Potato Biology and Biotechnology Advances and Perspectives*. Elsevier, Amsterdam, 2007: 619-641.
- [5] 谷爱仙. 马铃薯病毒病及其防治[J]. *植物医生*, 1998, 11(5): 11-12.
- [6] 汪平. 基于 LDR-PCR 通用寡核苷酸芯片同时检测十种马铃薯病毒研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2011.
- [7] Flores R, Randles J W, Bar-Joseph M, et al. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature[J]. *Archives of Virology*, 1998, 143(3): 623-629.
- [8] Keese p, Symons R H. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(14): 4582-4586.
- [9] Sano T, Ishiguro A. Viability and pathogenicity of inter-subgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication[J]. *Virology*, 1998, 240(2): 238-244.
- [10] Palukaitis P. Resistance to viruses of potato and their vectors[J]. *Plant Pathology Journal*, 2012, 28: 248-258.

- [11] Wang B A, Mayl, Zhang Z B, et al. Potato viruses in China[J]. Crop Protection, 2011, 30: 1117-1123.
- [12] Gross H J, Domdey H, Lossow C, et al. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid[J]. Nature, 1978, 273: 203-208.
- [13] Puchta H, T Herold, K Verhoeven, et al. A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other strains sequenced so far[J]. Plant Molecular Biology, 1990, 15(3): 509-511.
- [14] Jtj V, Roenhorst J W. Virological risks accompanying the increased interest in pepino (*Solanum muricatum*). [J]. 1995, 7: 9-15.
- [15] Owens R A. Potato spindle tuber viroid: The simplicity paradox resolved[J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8: 549-560.
- [16] Singh R P, Growley C F. Successful management of potato spindle tuber viroid in seed potato crop[J]. Canadian Plant Disease Survey, 1985, 65: 9-10.
- [17] Fernow K H, Peterson L C, Plaisted R L. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected potato plants[J]. American Journal of Potato Research, 1970, 47: 75-80.
- [18] Hunter D E, Darling H M, Beale W L. Seed transmission of potato spindle tuber virus[J]. American Journal of Potato Research, 1969, 46: 247-250.
- [19] Singh R P. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato[J]. American Journal of Potato Research, 1970, 47: 225-227.
- [20] Grasmick M E, Slack S A. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature[J]. Plant Disease, 1985, 69: 49-51.
- [21] Singh R P, Boucher A, Somerville T H. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen[J]. Plant Disease, 1992, 6: 951-953.
- [22] Olivier T, Sveikauskas V, Grausgruber-Groger S, et al. Efficacy of five disinfectants against potato spindle tuber viroid[J]. Crop Protection, 2015, 67(2): 257-260.
- [23] 郭梅. 马铃薯纺锤形块茎类病毒研究现状[C]//中国作物学会马铃薯专业委员会. 2005年全国马铃薯产业学术年会论文集. 中国作物学会马铃薯专业委员会, 2005: 294-297.
- [24] 何小源, 周广和, 刘艾生. 马铃薯纺锤块茎类病毒株系鉴定[J]. 植物病理学报, 1993, 23(4): 361-365.
- [25] Qiu C L, Zhang Z X, Li S F, et al. Occurrence and molecular characterization of potato spindle tuber viroid (PSTVd) isolates from potato plants in North China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(2): 349-363.
- [26] Raymer W B, O'Brien M J, Merrian D. Tomato as a source of an indicator plant for potato spindle tuber virus[J]. Amer potato J, 1964, 41: 311-314.
- [27] Morris T J, Wright N S. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid[J]. American Potato Journal, 1975, 52: 57-63.
- [28] Schumann G L, Thurston H D, Horst R K. Comparison of tomato bioassay and slab gel electrophoresis for detection of potato spindle tuber viroid in potato[J]. Phytopathology, 1978, 68: 1256-1259.
- [29] Pfannenstiel M A, Slaok S A, Lane L C. Detection of potato spindle tuber viroid in field-grown potatoes by an improved electrophoretic assay [J]. P hytopathology, 1980(70): 1015-1018.
- [30] 童英林. 核酸分子杂交技术在环境微生物研究中的应用[J]. 硅谷, 2011(10): 133-134.
- [31] 张鹤玲, 曹先维, Balbo I, 等. 用生物素标记 cDNA 探针检测马铃薯纺锤块茎类病毒[J]. 病毒学报, 1989, 5(1): 72-75.
- [32] 吕典秋, 邱彩玲, 王绍鹏, 等. 马铃薯类病毒 cDNA 双体探针的研制及其在检测上的应用[J]. 园艺学报, 2009, 36(10): 1538-1544.
- [33] 雷质文, 史成银, 黄使. PCR 法制备地高辛标记探针斑点杂交检测白斑综合症病毒 (WSSV) [J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001(2): 201-204.
- [34] 蒋燕军. 感染性甲肝病毒的特异性检测和嵌合甲肝病毒的构建[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.

Research Progress on the Control and Detection of Potato Spindle Stem viroid

GAO Yuan, YANG Hong-yi

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Potato spindle stem like virus can also infect potato in natural state. PSTVd is a kind of virus like virus with single stranded circular RNA structure, which has strong infection ability, high transmission rate in the host, and can reduce the yield and quality of potato after infection. Therefore, it is necessary to study the molecular structure and pathogenesis of PSTVd. In this paper, the molecular structure, the latest detection and control methods of PSTVd were briefly introduced, and the prospect was put forward in order to provide reference for potato virus control in the future.

Keywords: potato; viroid; PSTVd