

马铃薯 A 病毒适宜寄主的筛选与鉴定

张 威, 魏旭言, 范国权, 高艳玲, 孙旭红, 白艳菊

(黑龙江省农业科学院 哈尔滨 150086)

摘要: 马铃薯 A 病毒(PVA)是侵染马铃薯的重要病毒之一,属于马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)成员,可导致全球马铃薯产量减少 30%~40%。了解 PVA 的鉴定和繁殖寄主以及生物学特性,对进一步研究 PVA 致病机制以及制定有效的防控策略至关重要。采用摩擦接种法将 PVA 接种到 18 种指示植物上,经生物学症状观察和 RT-PCR 检测后,筛选出能系统感染的繁殖寄主和只能局部感染的鉴定寄主。然后再通过建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术对繁殖寄主的发病过程进行跟踪试验,研究不同寄主体内病毒含量的变化以及病毒累积速度的生物学表现,再结合寄主大小、叶片总面积,最终筛选出最佳繁殖寄主。结果显示,洋酸浆接种叶片局部出现褐色坏死斑,可作为 PVA 的鉴定寄主;假酸浆、德莫尼烟、黄花烟、黄苗榆烟和香料烟均能系统感染,可作为 PVA 的繁殖寄主,从植株大小、叶片总面积和病毒累积速度等方面综合考虑,黄花烟可作为 PVA 的最佳繁殖寄主。本研究结果为 PVA 的深入研究及科学防控提供了基础数据。

关键词: 马铃薯 A 病毒(PVA); TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术; 鉴定寄主; 繁殖寄主

中图分类号: S532

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)10-140-08

Screening and identification of suitable host for potato virus A

ZHANG Wei, WEI Xuyan, FAN Guoquan, GAO Yanling, SUN Xuhong, BAI Yanju

(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: Potato virus A (PVA) is one of the significant viruses infecting potato, belonging to the Potyvirus genus, and can reduce global potato yields by 30%–40%. Understanding the identification, propagation hosts, and biological characteristics of PVA is crucial for studying its pathogenic mechanisms and developing effective control strategies. In this study, PVA was inoculated into 18 indicator plants using the friction inoculation method. Through combined observation of biological symptoms and RT-PCR detection, systemically infected propagation hosts and locally infected diagnostic hosts were screened. TaqMan real-time quantitative PCR (TaqMan RT-qPCR) was employed to track the disease progression in propagation hosts, studying the changes in viral content and biological manifestations of virus accumulation rate in different hosts. By integrating host size, total leaf area, and viral accumulation dynamics, the optimal propagation host for PVA was identified. The results showed that *Physalis floridana* developed localized necrotic spots on inoculated leaves, making it a suitable diagnostic host for PVA. *Nicondra physaloides*, *Nicotiana rebneyi*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum*, and *Nicotiana tasacumca sanctum* exhibited systemic infections and were identified as propagation hosts. Considering plant size, total leaf area, and viral accumulation rates, *Nicotiana rustica* emerged as the most suitable propagation host for PVA. This study provides basic datas for further research and scientific prevention on PVA.

Key words: Potato virus A; TaqMan RT-qPCR; Identify host; Breeding host

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是全球及中国第四大粮食作物,仅次于水稻、小麦和玉米^[1]。自 1993 年起,中国已成为全球马铃薯产量最高的国家^[2-3],种植面积和产量分别占全球总量的 26.3%和 22.2%^[4]。然而单产却低于世界平均水平,作为一种

无性繁殖作物,病毒病的危害是导致马铃薯种性退化、产量降低和品质下降的主要因素之一^[5]。马铃薯易感染 50 多种病毒^[6]。其中,6 种病毒被列为马铃薯主要病毒,分别是马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)、马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)、马

收稿日期: 2025-01-17; 修回日期: 2025-06-13

基金项目: 黑龙江省农业科学院创新工程资助项目(CX23TS24); 国家马铃薯产业技术体系(CARS-09); 黑龙江省马铃薯产业技术创新推广体系

作者简介: 张 威,女,副研究员,主要从事马铃薯病害检测技术及种薯质量控制体系研究。E-mail: 449254339@qq.com

通信作者: 白艳菊,女,研究员,主要从事马铃薯种薯质量控制体系及病毒病致病机制研究。E-mail: potatovirus1@126.com

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)和马铃薯卷叶病毒(potato virus PLRV, PLRV)^[7-9]。其中,PVA 属于马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)成员^[10]。中国 PVA 于 1975 年在黑龙江省克山县马铃薯田间首次被发现^[11],随后在湖南、浙江、河北、四川、湖北、福建等地陆续报道,现已遍布中国所有马铃薯主要产区^[12-14]。PVA 宿主范围较窄,主要感染茄科植物^[15]。PVA 在马铃薯上引起的症状因分离株和品种等不同,呈现从轻花叶、重叶片到坏死等不同症状^[16-17]。通常情况下,PVA 单独感染马铃薯产量损失不严重,极少数情况下可达 40%^[18],然而,PVA 常与其他病毒共同感染马铃薯,产量损失则显著增加^[19]。PVA 与 PVX 复合侵染,可导致马铃薯皱缩病^[20],造成严重的产量损失^[21]。因此,PVA 是世界各国种薯生产过程中重要检测防控的目标对象之一,我国于 2007 年就将其列为检疫性病害生物^[22]。鉴于此,对 PVA 进行系统深入的研究,有效防控 PVA 对马铃薯产业的影响非常重要,而 PVA 生物学研究可以为其他研究提供基础数据。

为系统研究 PVA 的寄主范围,筛选适宜寄主,笔者将 PVA 毒源经摩擦接种法接种到 18 种指示植物上,进行 RT-qPCR 检测并观察接种后的生物学特性,根据结果筛选出可被 PVA 侵染的指示植物,并通过建立 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术(TaqMan RT-qPCR)进行过程跟踪,研究不同寄主中病毒含量的变化以及病毒累积速度的生物学表现,确定 PVA 的适合鉴定寄主和繁殖寄主,以期为 PVA 分离鉴定、株系划分、病毒提纯获得血清学检测试剂盒奠定基础,同时也为进一步研究 PVA 的流行及防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2020 年 5—9 月在黑龙江省农业科学院智能温室内进行。供试的 18 种指示植物有心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)、香科烟(*Nicotiana tasacumca sanctum*)、苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)、千日红(*Gomphrena globosa*)、白花刺果曼陀罗(*Datura stramonium*)、毛曼陀罗(*Datura innoxia*)、黄花烟(*Nicotiana rustica*)、德莫尼烟(*Nicotinana rebneyi*)、假酸浆(*Nicondra physaloides*)、洋酸浆(*Physalis floridana*)、黄苗榆烟(*Nicotiana tabacum*)、指尖

椒(*Capsicum annuum*)、丛生番茄(*Solanum lycopersicum*)、昆诺瓦藜(*Nicotiana glutinosa*)、珊西烟(*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi nc*)、本珊烟(*Nicotiana benthamiana*)、36 号烟(*Nicotiana occidentalis*)和双富大椒(*Capsicum annuum*);PVA 毒源材料是含有 PVA 的马铃薯品种大西洋的试管苗(经 RT-PCR 检测无 PVX、PVY、PVS、PLRV、PVM、PSTVd)。所有试验材料均由黑龙江省农业科学院经济作物研究所提供。

1.2 摩擦接种

接种时期和接种条件:植株生长至 4~6 叶期时采用摩擦接种的方法在避光温室接种,接种过程中保持温度为 20~26 °C。

病毒接种液制备:按照病毒叶片与接种缓冲液的比例为 1:10 配置(即 1 g 病毒叶片配置 10 mL 接种缓冲液),充分研磨制备病毒接种缓冲液。

接种过程:选取植株中上部对称叶片用手指进行摩擦接种。接种时将叶片上方喷洒适量金刚砂,为避免造成过度机械损伤而影响植株正常生长,一片叶摩擦力度较轻,另一片摩擦力度稍重,20 min 后用自来水冲洗掉残余接种液,以接种无菌水为对照(CK)。每隔 3 d 观察记录植株发病症状,7 d 后分别取接种叶片及接种叶上部的系统叶片进行检测。

1.3 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 法提取植物叶片总 RNA,称取 0.1 g 叶片置于研钵中,加液氮研磨成粉末,转至 1.5 mL 离心管,加入 1 mL TRIzol 混匀充分裂解;在 4 °C、14 000g 条件下离心 5 min;取上清液,加入 200 μ L 三氯甲烷振荡混匀,室温放置 15 min;在 4 °C、12 000g 条件下离心 15 min;吸取上层水相至新的 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL 异丙醇,混匀,室温放置 10 min;在 4 °C、12 000g 条件下离心 10 min;弃上清液,留沉淀,加入 1 mL 75%乙醇,温和振荡离心管,悬浮沉淀;在 4 °C、7000g 条件下离心 5 min,弃上清液,将离心管倒置于滤纸上,自然干燥;加入 50 μ L 超纯水溶解沉淀,得到 RNA。

通过 ND-ONE-WA 30221 超微量紫外分光光度计测量 OD₂₆₀/OD₂₈₀,以检测 RNA 的浓度和纯度,当 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 时,表示浓度和纯度适宜。

在 PCR 管中加入 RNA 4 μ L、随机引物(random primer)1 μ L、无酶水 5 μ L,将 PCR 管放入 PCR 仪中,70 °C 5 min,4 °C 2 min,进行 RNA 预变性;然后将预变性 RNA 再进行反转录合成 cDNA(步骤按

照反转录试剂盒操作说明书进行)。

1.4 PCR 扩增

PVA-F/R 的引物序列见表 1。PCR 扩增体系为 25 μL,取上述反转录产物 2 μL,上、下游引物各 0.5 μL,

rTaq 酶 12.5 μL,补水至 25 μL。

PCR 反应条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s;56 °C 30 s;72 °C 45 s,反应 35 个循环;72 °C 7 min。PCR 反应结束后经 1.5%琼脂糖凝胶(80 mL 1×TAE+

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物和探针序列 Primer and probe sequences	片段长度 Fragment length/bp
PVA 102-probe	(Texas)-CACTACCAATGCTCAAAGGTAAGAGTGTCTG-(BHQ)	30
PVA102-F	TGTCGATTTAGGTACTGCTGGGAC	132
PVA102-R	TGCTTTGGTTTGTAAGATAGCAAGTG	
PVA-F	GATGTCGATTTAGGTACTGCTG	273
PVA-R	TCCATTCTCAATGCACCATAC	

1.2 g 琼脂+8 μL 核酸染料)电泳进行检测。

1.5 PVA TaqMan 荧光定量 PCR 标准曲线的建立

1.5.1 RT-qPCR 引物 RT-qPCR 引物 PVA102-F/R 参考 Agindotan 等^[23]和 Xu 等^[24]的报道(表 1)。

1.5.2 重组质粒拷贝数的计算及梯度稀释 采用如下公式计算 PVA 质粒拷贝数^[25]:质粒拷贝数/(No.·μL⁻¹)=(6.02×10²³拷贝数·mol⁻¹)×(浓度×10⁻⁹)/(dsDNA×660 dalton·bp⁻¹)。其中,6.02×10²³为阿伏加德罗常数,dsDNA 为碱基数,最终计算得到的质粒浓度为 2.72×10¹⁰ copies·μL⁻¹。将获得的质粒为初始模板,按 10 倍梯度稀释出 9 个质粒标准品,以拷贝数表示为 2.7×10¹⁻⁹copies·μL⁻¹,每个样品 3 次重复。

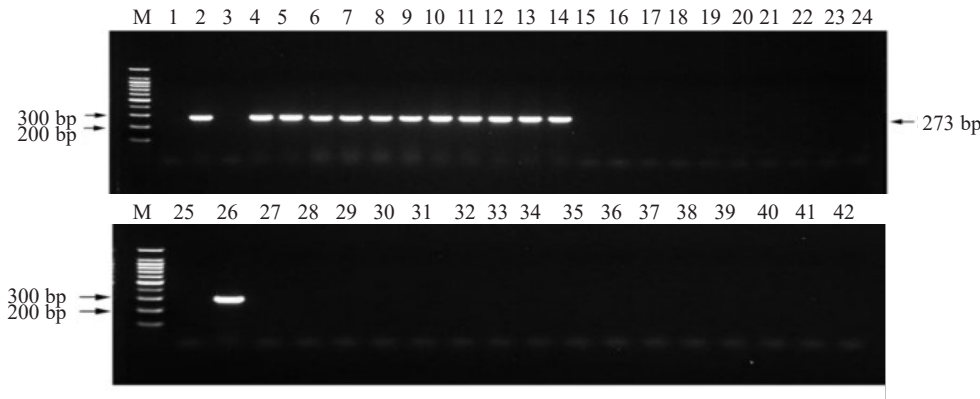
1.5.3 标准曲线的生成及 RT-qPCR 扩增 将上述稀释后的样品通过 LightCycler® 480 荧光定量仪

进行 TaqMan RT-qPCR 扩增,得到动力学扩增曲线,然后以 PCR 扩增循环阈值为纵坐标,以质粒拷贝数的对数值为横坐标建立标准曲线。反应体系:模版 2 μL,上下游引物各 0.5 μL(引物序列见表 1),探针 PVA 102-probe 0.5 μL(表 1),10×PCR 缓冲液 2.5 μL,rTaq 酶 0.2 μL,dNTP(2.5 mmol·L⁻¹) 0.25 μL,补水至 25 μL。TaqMan RT-qPCR 反应体系为:95 °C 30 s;58 °C 30 s;72 °C 30 s;40 个循环。

2 结果与分析

2.1 PVA 寄主植物筛选

2.1.1 RT-PCR 检测 将 PVA 毒源接种到 18 种指示植物上,接种 7 d 后,取接种叶片和新生叶片进行 RT-PCR 检测(图 1),发现有 6 种指示植物可以被



注:M. DNA Marker;1 和 25 表示阴性对照;2 和 26 表示阳性对照;3 和 27 表示水对照;4~24、28~42 依次是黄花烟、香料烟、黄苗榆烟、假酸浆、德莫尼烟、洋酸浆、心叶烟、苋色藜、千日红、白花刺果曼陀罗、毛曼陀罗、指尖椒、丛生番茄、昆诺瓦藜、珊西烟、本珊烟、36 号烟和双富大椒的接种叶片和新生叶片。

Note: M represents DNA Marker; No. 1 and 25 represent negative control; No. 2 and 26 represent positive control; No. 3 and 27 represent water control; The other numbers except the above numbers represent the inoculated leaves and new leaves of *N.rustica*, *N.asacumca sanctum*, *N.tabacum*, *N. physaloides*, *N. rebneyi*, *P.floridana*, *N. glutinosa*,*C. amaranticolor*; *G. globosa*, *P. stramonium*, *N. metel*, *C. annuum*, *S. lycopersicum*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. *xanthinc*, *N. benthamiana*, *N. occidentalis*"pi" and *C. annuum* in sequence.

图 1 PVA 指示植物 RT-PCR 检测电泳图

Fig. 1 The electropherogram of RT-PCR detection on PVA indicator plants

PVA 侵染。其中,5 种指示植物接种叶片和新生叶片都检测到 PVA 病毒,说明为系统侵染,分别是假酸浆、德莫尼烟、黄花烟、黄苗榆烟和香料烟;1 种指示植物只有接种叶片检测到 PVA 病毒,说明为局部侵染,为洋酸浆;而其他 12 种指示植物均未呈现症状,且 PCR 检测为 PVA 阴性。

2.1.2 生物学特性表现 接种 PVA 毒源后,观察所有参试指示植物的接种叶片和新生叶片变化,发现黄苗榆烟、香料烟、德莫尼烟、洋酸浆、黄花烟和假酸浆 6 种指示植物表现出发病症状,且症状各不相同(表 2),黄苗榆烟的症状表现为接种 10 d 后,新生叶片出现花叶,15 d 后出现明脉(图 2);香料烟的症状表现为接种 15 d 后,新生叶出现明脉(图 3);德莫尼烟的症状表现为接种 30 d 后,新生叶出现花叶(图 4);洋酸浆的症状表现为接种 25 d 后,接种叶片开始出现褐色坏死斑(图 5);黄花烟的症状表现为接种 10 d 后,新生叶出现明脉,15 d 后新生叶发生严重皱缩并伴有花叶现象(图 6);在假酸浆上的症状表

表 2 PVA 接种 6 种指示植物引起的症状
Table 2 Symptoms caused by PVA inoculation on 6 indicator plants

寄主 Host	接种叶片 Inoculated leaves	新生叶片 Newly emerged leaves
黄苗榆烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	花叶 Mosaic	花叶,明脉 Mosaic, vein clearing
香料烟 <i>Nicotiana tasacumca sanctum</i>	无症状 No symptom	明脉 Vein clearing
德莫尼烟 <i>Nicotinana rebneyi</i>	无症状 No symptom	花叶 Mosaic
洋酸浆 <i>Physalis floridana</i>	坏死斑 Necrosis	无症状 No symptom
黄花烟 <i>Nicotiana rustica</i>	花叶 Mosaic	花叶,明脉,叶片皱缩 Mosaic, vein clearing, shrinking
假酸浆 <i>Nicondra physaloides</i>	无症状 No symptom	花叶,矮化,坏死斑 Mosaic, stunt, necrosis

现为接种 25 d 后,植株出现矮化,新生叶片呈现花叶,35 d 后下部叶片向上坏死至全株死亡(图 7)。

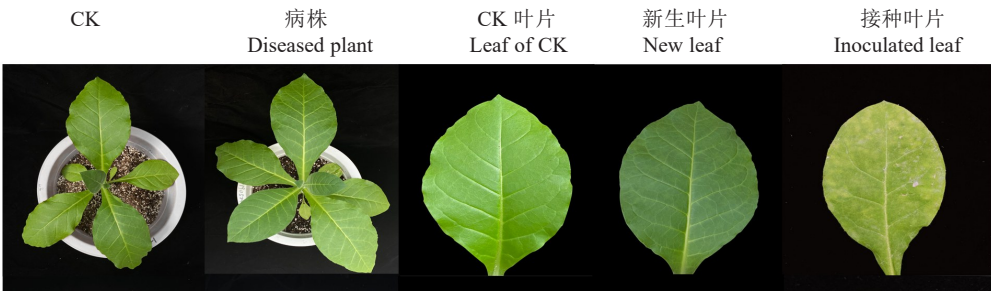


图 2 黄苗榆烟感染 PVA 的症状
Fig. 2 Symptoms of PVA infection on *N. tabacum*

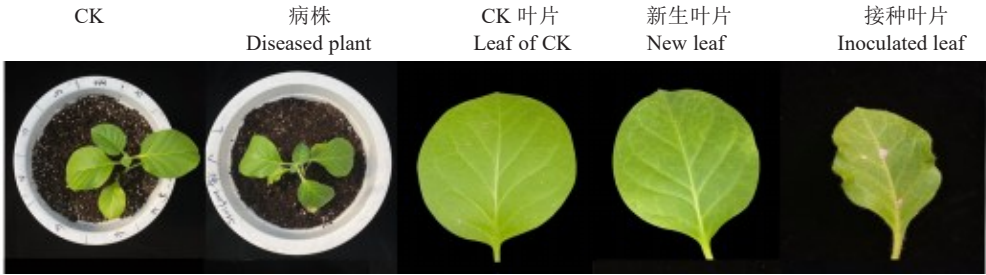


图 3 香料烟感染 PVA 的症状
Fig. 3 Symptoms of PVA infection on *N. tasacumca sanctum*

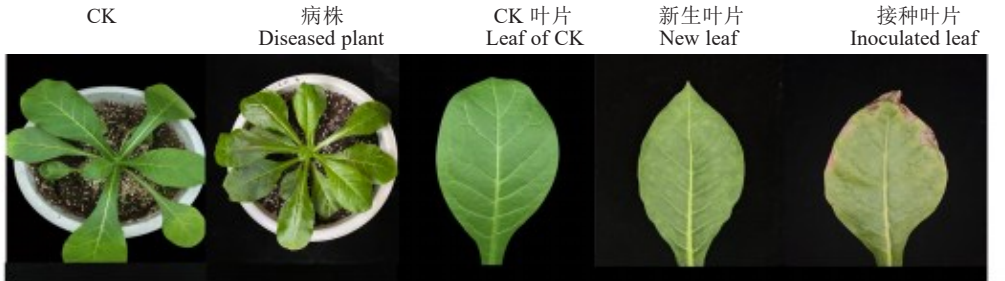


图 4 德莫尼烟感染 PVA 的症状
Fig. 4 Symptoms of PVA infection on *N. rebneyi*

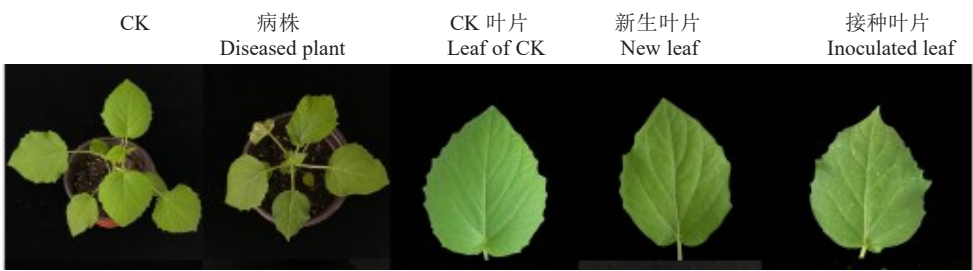


图 5 洋酸浆感染 PVA 的症状
Fig. 5 Symptoms of PVA infection on *P. floridana*

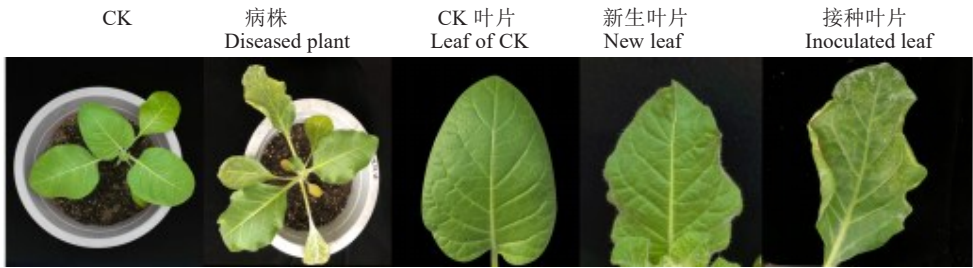
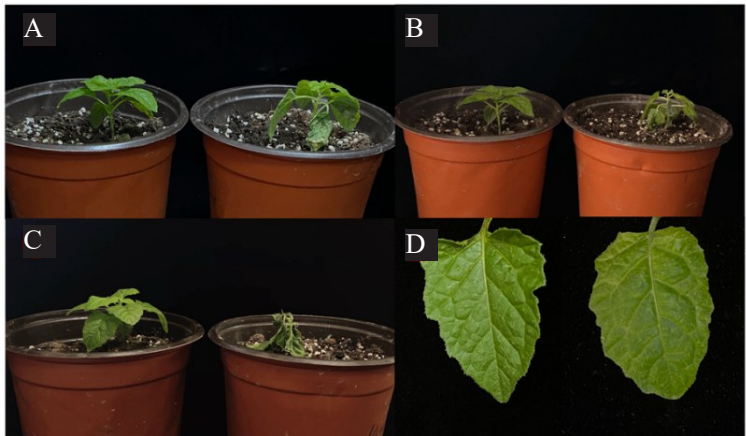


图 6 黄花烟感染 PVA 的症状
Fig. 6 Symptoms of PVA infection on *N. rustica*



注:A、B 和 C 分别为假酸浆接种 15、25、35 d 后植株的症状;D 为假酸浆接种 20 d 后叶片的症状。每组图片左侧均为阴性对照,右侧均为 PVA 接种植株或叶片。

Note: A, B, C represent the symptoms of plants after *N. physaloides* inoculation for 15, 25, 35 days; D represent the symptoms of leaf after *N. physaloides* inoculation for 20 days. In each group of pictures, the left side is negative control, the right side is inoculated plant or leaf.

图 7 假酸浆感染 PVA 的症状
Fig. 7 Symptoms of PVA infection on *N. physaloides*

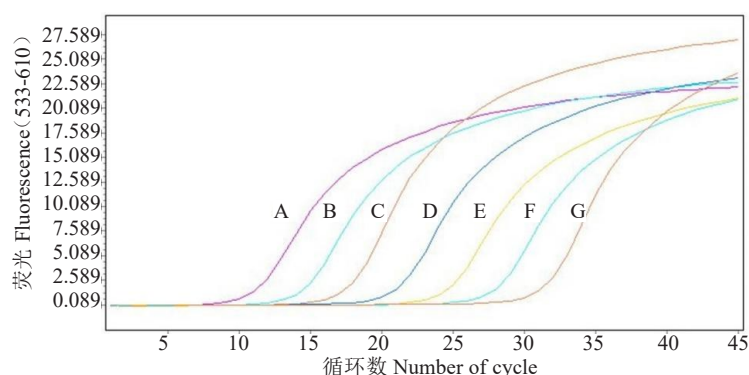
2.2 病毒在寄主体内累积

2.2.1 PVA 的 qPCR 标准曲线建立 以 $2.72 \times 10^{1-9}$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度梯度的标准质粒为模板进行 qPCR 扩增,得到不同浓度的标准质粒扩增曲线,从中选取最适浓度的标准质粒建立标准曲线(图 8),最终确定标准品在 $2.72 \times 10^{2-8}$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 范围内,标准质粒浓度与 Ct 值呈线性关系,相关系数 R^2 为 0.996 2,回归曲线斜率为-3.272,扩增效率为 2.021(图 9)。

2.2.2 PVA 在不同寄主体内含量的变化 为进一步深入研究 PVA 在寄主体内的富集过程,采用实时

定量 PCR(TaqMan RT-qPCR)技术进行发病过程跟踪,检测 PVA 在不同寄主体内病毒含量的变化。因假酸浆接种后会逐渐枯死,为接种叶局部发病,只能作为鉴别寄主。

研究其他 4 种系统发病的寄主,从中筛选适宜的寄主作为 PVA 的繁殖寄主,黄花烟、黄苗榆烟、香料烟和德莫尼烟在接种后 5、10、15、20、25、30 d 取新生叶片进行 qPCR,检测病毒含量。qPCR 检测结果如图 10 所示,PVA 在接种黄苗榆烟 5 d 后即可检测到,浓度为 5.66×10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$,接种 20 d 后病毒浓



注: A~G 分别为 2.72×10^8 、 2.72×10^7 、 2.72×10^6 、 2.72×10^5 、 2.72×10^4 、 2.72×10^3 、 2.72×10^2 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 PVA 质粒标准品。

Note: A-G represent PVA plasmid standard of 2.72×10^8 , 2.72×10^7 , 2.72×10^6 , 2.72×10^5 , 2.72×10^4 , 2.72×10^3 , 2.72×10^2 .

图 8 PVA TaqMan RT-qPCR 标准质粒扩增曲线

Fig. 8 Standard plasmid amplification curve of PVA TaqMan RT-qPCR

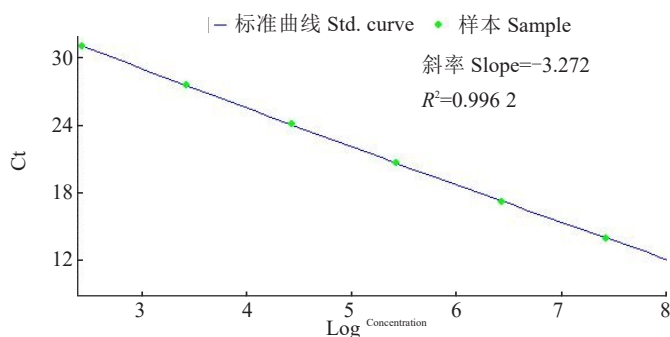
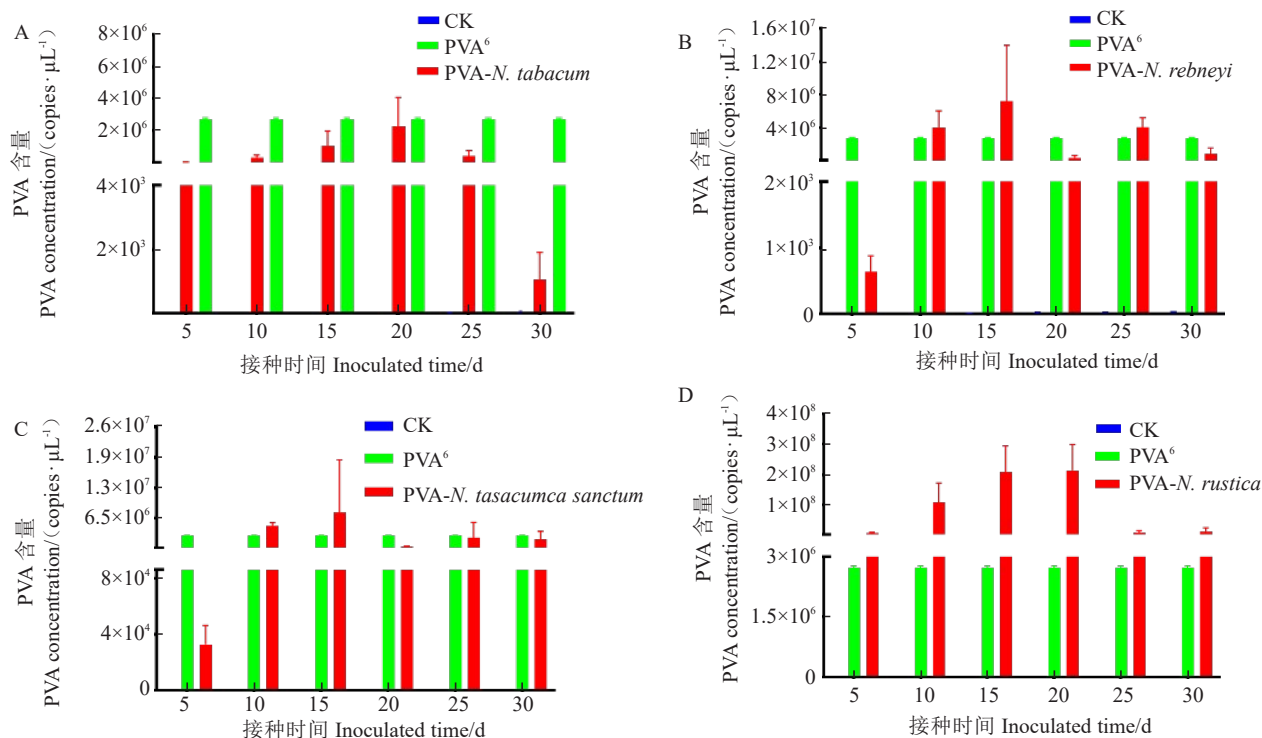


图 9 PVA TaqMan RT-qPCR 标准曲线

Fig. 9 Standard curve of PVA TaqMan RT-qPCR



注: PVA⁶ 为阳性对照质粒。

Note: PVA⁶ represent positive control plasmid.

图 10 黄苗榆烟(A)、德莫尼烟(B)、香科烟(C)、黄花烟(D)体内 PVA 含量变化

Fig. 10 The changes of PVA content in *N. tabacum*(A), *N. rebneyi*(B), *N. tasacumca sanctum*(C) and *N. rustica*(D)

度达到峰值,然后逐步降低(图 10-A)。PVA 在接种德莫尼烟 5 d 后检测到的浓度为 $8.96\times10^2\text{copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 在 15 d 时浓度达到峰值,然后逐步降低,在 25 d 病毒浓度又开始升高,随后降低(图 10-B)。PVA 在接种香料烟 5 d 后检测到浓度可达 $2.45\times10^4\text{copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 然后病毒浓度逐渐增高,在 15 d 时达到峰值,随后逐步降低,在 25 d 病毒浓度又开始升高,并趋于稳定(图 10-C)。PVA 在接种黄花烟 5 d 后检测到的浓度可达 $4.96\times10^6\text{copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,随着时间推移,病毒浓度逐渐增高,在 20 d 时浓度达到峰值,随后逐渐降低并趋于稳定(图 10-D)。

2.2.3 PVA 在不同寄主体内累积速度的表现 从 qPCR 结果和 PVA 在寄主体内累积速度的生物学表现来看(表 3),黄苗榆烟叶片多且叶面积大,但是 PVA 在其体内的累积速度较慢且含量较低、不稳定;香料烟的生长速度较慢,叶片少且叶面积小,但是 PVA 在其体内的累积速度适中且含量较高、较稳定;德莫尼烟叶面积较小,但是 PVA 在其体内的累积速度适中且含量较高、较稳定;黄花烟叶片较多且叶面积大,PVA 在其体内的累积速度很快且含量最高、较稳定。因此,通过这 4 种寄主植物的叶片数量和面积及 PVA 在体内积累速度、含量、稳定性等因素综合比较,最终确认黄花烟最适合作为 PVA 的繁殖寄主。

表 3 指示植物接种 PVA 30 d 后的各项指标
Table 3 Status of various indexes in indicator plants inoculated with PVA after 30 days

指示植物名称 Name of indicator plant	叶片数 Number of leaves	叶片面积 Leaf area/cm ²	叶片总面积 Total leaf area/cm ²	PVA 稳定性 Stability of PVA
黄苗榆烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	11	153	1683	不稳定 Instability
香料烟 <i>Nicotiana tasacumca sanctum</i>	9	35	315	稳定 Stability
德莫尼烟 <i>Nicotinana rebneyi</i>	10	50	500	稳定 Stability
黄花烟 <i>Nicotiana rustica</i>	10	132	1320	稳定 Stability

注:叶片数为接种后 30 d 植株总叶片数;叶片面积为接种后 30 d 茎尖下方第 3~5 片叶面积平均值。

Note: Number of leaves represents total number of leaves on the 30 days after inoculation; Leaf area represents the average area of the 3-5 leaves below the stem tip on the 30 days after inoculation.

3 讨论与结论

PVA 是危害马铃薯的主要病毒之一,也是检疫性病害,在马铃薯主产区都有不同程度的发生。虽然 PVA 单独侵染马铃薯造成的产量损失不严重,但与其他病毒复合侵染会加重病毒病的危害,PVA 与

PVY 复合侵染最高可减产 80%^[26]。因此,应加强对 PVA 的检测技术体系、致病机制与防控等方面的研究,避免其进一步扩散蔓延。

笔者采用 TaqMan RT-qPCR 技术体系筛选 PVA 适合鉴定寄主和繁殖寄主的生物学研究可为 PVA 其他领域研究提供基础数据。在生物学检测领域,1929 年美国病毒学家 Holmes^[27]建立了生物学鉴定法,为病毒检测奠定基础,将病毒接种到指示植物上,通过症状观察来初步鉴定病毒种类或株系类型。研究表明,PVA 宿主范围较窄,主要感染茄科植物,如树番茄(*S. betacea*)、醋栗番茄(*Lycopersicon pimpinellifolium*)、马铃薯(*Solcimim tuberosum*)、马铃薯野生种(*Solcimim demissum*)、普通烟(*Nicotiana tabacum*)、特大管烟(*Nicotiana megalosiphon*)等^[28]。刘卫平^[29]通过研究发现,PVA 的寄主有香料烟、枸杞、A6 和丛生番茄;而刘喜才等^[30]研究发现,PVA 的保毒植物是马铃薯布尔斑克和普通烟;徐洁^[31]研究发现,A6 和香料烟接种 PVA 症状明显。但目前尚缺少对 PVA 寄主范围进行系统研究的报道。笔者将 PVA 接种到 18 种指示植物上,通过症状观察和 RT-PCR 相结合,筛选出 5 个繁殖寄主和 1 个鉴定寄主,然后通过 TaqMan RT-qPCR 测定繁殖寄主体内病毒浓度、累积速度,再结合植株长势,发现黄苗榆烟在接种后的病毒含量呈先升高后降低的趋势,德莫尼烟和香料烟呈先升高后降低再升高又下降的趋势,而黄花烟表现为先升高达到峰值后逐渐降低并趋于稳定。同时从植株大小、叶片总面积和病毒累积速度综合来看,黄花烟为 PVA 的最佳繁殖寄主,研究结果为 PVA 生物学研究补充了基础数据。

在血清学检测领域,马铃薯病毒 DAS-ELISA 检测技术因广谱性强、操作简便等特点,比较适合田间大规模病毒检测^[32],但目前中国主要依靠进口试剂盒,检测成本高,不易于推广。因此,试剂盒国产化势在必行,病毒提纯是试剂盒生产的关键环节,而筛选到扩繁速度快、生产量大的繁殖寄主是病毒提纯的关键步骤。吴凌娟等^[33]研究指示植物鉴定及分离 PVX 方法,为 PVX 抗血清制备提供技术保证;张威等^[34]对 PVM 病毒生物学特性进行研究,为 PVM 抗血清制备提供技术保障。目前,尚缺乏对 PVA 生物学特性的系统研究,笔者在本研究中筛选到了 PVA 的最适繁殖寄主黄花烟,为 PVA 的血清学试剂盒制备奠定基础。

在分子生物学检测领域,目前主要用到的是反

转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、基因芯片技术(gene chip)、环介导等温扩增技术(LAMP)等。其中,RT-PCR 在马铃薯病毒检测上应用最为广泛,技术不断改进,如一步 RT-PCR、多重 RT-PCR 检测技术等^[12]。笔者建立了 TaqMan RT-qPCR 技术体系,同时也建立了 PVA 标准曲线,不仅提高了 PVA 的检测效率、检测特异性和灵敏度,还可以检测到寄主体内 PVA 含量的变化。

综上所述,笔者建立了 PVA TaqMan RT-qPCR 检测技术体系,同时对 PVA 的生物学特性进行了系统研究,明确了 PVA 的寄主范围,筛选出洋酸浆可作为 PVA 的鉴定寄主,假酸浆、德莫尼烟、黄花烟、黄苗榆烟和香料烟可作为 PVA 的繁殖寄主,其中黄花烟可作为 PVA 的最佳繁殖寄主。研究结果可为分离、纯化和扩繁 PVA 病毒提供基础数据,也为 PVA 流行、防控以及遗传多样性研究奠定基础。

参考文献

- [1] QU D Y, XIE K Y, JIN L P, et al. Development of potato industry and food security in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(2): 358-362.
- [2] WANG Q B, ZHANG W. China's potato industry and potential impacts on the global market[J]. American Journal of Potato Research, 2004, 81(2): 101-109.
- [3] JANSKY S H, JIN L P, XIE K Y, et al. Potato production and breeding in China[J]. Potato Research, 2009, 52: 57-65.
- [4] WANG B A, MA Y L, ZHANG Z B, et al. Potato viruses in China[J]. Crop Protection, 2011, 30(9): 1117-1123.
- [5] 邹莹, 张远学, 闫雷, 等. 关于马铃薯病毒病综合防控的思考[C]//中国作物学会马铃薯专业委员会. 2021 年第二十三届中国马铃薯大会, 2021.
- [6] VALLI A, LÓPEZ-MOYA J J, GARCÍA J A. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family Potyviridae[J]. Journal of General Virology, 2007, 88: 1016-1028.
- [7] 白艳菊, 文景芝, 杨明秀, 等. 西南地区与东北地区马铃薯主要病毒发生比较[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(6): 733-736.
- [8] 张威, 白艳菊, 高艳玲, 等. 马铃薯主产区病毒病发生情况调查[J]. 黑龙江农业科学, 2010(4): 71-73.
- [9] MAO Y Z, SUN X H, SHEN J G, et al. Molecular evolutionary analysis of potato virus Y infecting potato based on the VPg gene[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1780.
- [10] 吴兴泉, 谭晓荣, 陈士华. 马铃薯 A 病毒复制相关蛋白研究进展[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(4): 231-234.
- [11] 李芝芳. 中国马铃薯主要病毒图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [12] 姜立慧. 四川省 6 种主要马铃薯病毒的发生及其多重 RT-PCR 检测体系的建立[D]. 成都: 四川农业大学, 2016.
- [13] 吴兴泉, 陈士华, 魏广彪, 等. 福建马铃薯 A 病毒的分子鉴定及检测技术[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 90-95.
- [14] 胡新喜, 雷艳, 何长征, 等. 湖南省马铃薯主产区马铃薯病毒种类及流行分析[J]. 中国马铃薯, 2012, 26(6): 358-361.
- [15] THOMAS P E. *Nicotiana megalosiphon*, a highly susceptible, new, and useful host for potato virus A[J]. Plant Disease, 2004, 88: 1160.
- [16] RAJAMAKI M, MERITS A, RABENSTEIN F, et al. Biological, serological, and molecular differences among isolates of potato A potyvirus[J]. Phytopathology, 1998, 88(4): 311-321.
- [17] NIE X Z, SINGH R P. Differential accumulation of potato virus A and expression of pathogenesis related genes in resistant potato cv. Shepody upon graft inoculation[J]. Phytopathology, 2001, 91(2): 197-203.
- [18] PUURAND U, VALKONEN J P T, MKINEN K, et al. Infectious *in vitro* transcripts from cloned cDNA of the potato A potyvirus[J]. Virus Research, 1996, 40(2): 135-140.
- [19] WANG X M, JING L P, YI H. Advances in breeding of potato virus-resistant cultivars[J]. Chinese Potato, 2005, 19: 285-289.
- [20] MACLACHLAN D S, LARSON R H, WALKER J C. Potato virus A[J]. American Journal of Potato Research, 1954, 31: 67-72.
- [21] HE C Z, ZHANG W, HU X X, et al. Molecular characterization of a Chinese isolate of potato virus A (PVA) and evidence of a genome recombination event between PVA variants at the 3'-proximal end of the genome[J]. Archives of Virology, 2014, 159(9): 2457-2462.
- [22] 张洪峰, 陈阳婷, 孟兴, 等. 马铃薯 A 病毒及其风险分析[J]. 植物检疫, 2010, 24(4): 48-51.
- [23] AGINDOTAN B O, SHIEL P J, BERGER P H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 142(1/2): 1-9.
- [24] XU H M, AUBIN J D, NIE J B. Genomic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes[J]. Virology Journal, 2010, 7(1): 25.
- [25] SHIRIMA R R, MAEDA D G, KANJU E, et al. Absolute quantification of cassava brown streak virus mRNA by real-time qPCR[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 245: 5-13.
- [26] GEBHARDT C, VALKONEN J P T. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome[J]. Annual Review of Phytopathology, 2001, 39: 79-102.
- [27] HOLMES F O. Local lesions in tobacco mosaic[J]. Botanical Gazette, 1929, 87(1): 39-55.
- [28] SINGH R P, BOUCHER A, SOMERVILLE T H. Detection of potato viruses A, M, S, X, Y and leafroll and potato spindle tuber viroid from tissue culture plantlets using single leaf discs[J]. American Potato Journal, 1996, 73(3): 101-112.
- [29] 刘卫平. 马铃薯 A 病毒分离鉴定技术的研究[C]//中国作物学会马铃薯专业委员会. 2016 年中国马铃薯大会论文集, 2016.
- [30] 刘喜才, 李芝芳. 马铃薯主要病毒保毒植物试管保存技术及其效果的研究[J]. 马铃薯杂志, 1996(2): 79-85.
- [31] 徐洁. 指示植物鉴定马铃薯病毒技术的研究与应用[J]. 中国马铃薯, 2002, 16(2): 73-75.
- [32] 白艳菊, 李学湛, 吕典秋, 等. 应用 DAS-ELISA 法同时检测多种马铃薯病毒[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(3): 143-144.
- [33] 吴凌娟, 张雅奎, 董传民, 等. 用指示植物分离鉴定马铃薯轻花叶病毒(PVX)的技术[J]. 中国马铃薯, 2003, 17(2): 82-83.
- [34] 张威, 白艳菊, 文景芝, 等. 马铃薯 M 病毒生物学特性研究[J]. 东北农业大学学报, 2017, 48(1): 1-6.