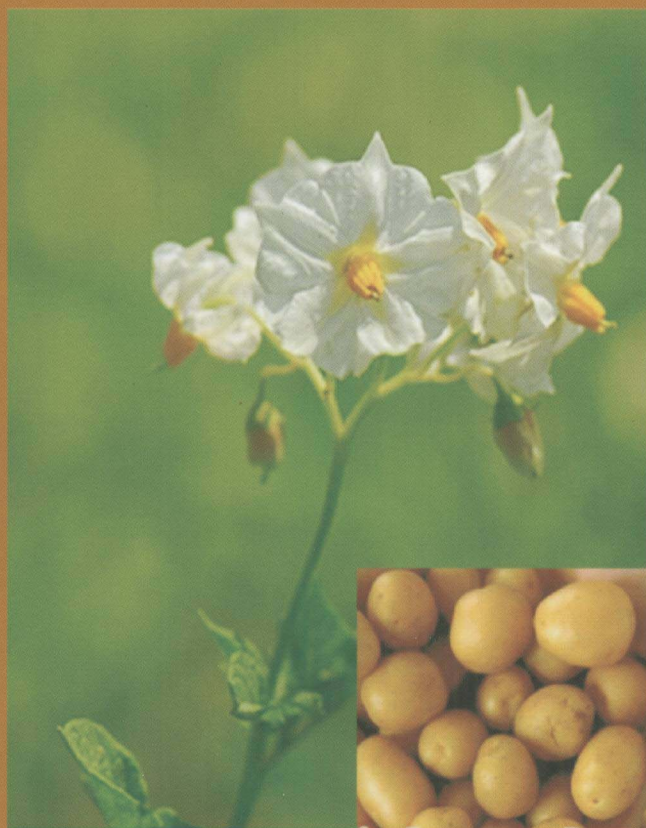


M 马铃薯病毒 的检测与防治

ALINGSHU
BINGDU DE
JIANCE YU
FANGZHI

主编 ● 吴兴泉



 郑州大学出版社

MALINGSHU BINGDU DE JIANCE YU FANGZHI



◎ 选题策划 吕双喜
◎ 责任编辑 赵 宁
◎ 责任校对 张锦森
◎ 封面设计 
◎ 版式设计 小羽毛

ISBN 978-7-5645-0133-3



9 787564 5013

定价:20.00

M

马铃薯病毒 的检测与防治

ALINGSHU
BINGDU DE
JIANCE YU
FANGZHI

主编 吴兴泉

图书在版编目(CIP)数据

马铃薯病毒的检测与防治/吴兴泉主编. —郑州:郑州
大学出版社, 2009. 9
ISBN 978 - 7 - 5645 - 0133 - 4

I. 马… II. ①吴… III. 马铃薯 - 植物病毒 - 防治 IV.
S435.32

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 146094 号

郑州大学出版社出版发行

郑州市大学路 40 号

出版人: 王 锋

全国新华书店经销

开封市精彩印务有限公司印制

开本: 787 mm × 1 092 mm

印张: 10.25

字数: 245 千字

版次: 2009 年 9 月第 1 版

邮政编码: 450052

发行部电话: 0371 - 66966070

1/16

印次: 2009 年 9 月第 1 次印刷

书号: ISBN 978 - 7 - 5645 - 0133 - 4

定价: 20.00 元

本书如有印装质量问题, 由本社负责调换

作者名单

主 编 吴兴泉

副主编 陈士华 赵永亮 杨庆东
董爱书

编 委 (按拼音排列)

陈士华 (河南工业大学)

董爱书 (黑龙江省农垦九三分局植保站)

吴兴泉 (河南工业大学)

杨庆东 (黑龙江省嫩江农场)

赵永亮 (河南工业大学)

内容提要

本书共分四章,主要介绍了马铃薯生产的基本情况、植物病毒的基本特性、引起马铃薯退化的病原种类,我国马铃薯主要病毒的基本特征,马铃薯病毒和类病毒的检测与鉴定技术及病毒病防治技术。本书图文并茂,科学性、指导性、实用性强,全面收集整理了马铃薯病毒检测与防治的方法及最新的研究成果。本书既可作为马铃薯生产单位人员进行病毒检测与防治的指导用书,又可作为科研院所人员进行相关科学研究的参考书。

前 言

马铃薯具有很高的营养价值,从营养学角度来看,它比大米、面粉具有更多的优点,能供给人体大量的热能,可称为“十全十美的食物”。虽然我国马铃薯栽培总面积和总鲜薯产量均已跃居世界第一,但据联合国粮农组织报告,我国马铃薯平均产量仅为 15 t/hm^2 ,而欧美发达国家平均单产 $35 \sim 43 \text{ t/hm}^2$,水平最高的荷兰可达 44.8 t/hm^2 。我国马铃薯单产水平在世界马铃薯生产国家中排名第40位,处于相对落后的地位。

马铃薯种薯带毒是导致我国马铃薯品种退化、产量和品质下降的主要原因。马铃薯病毒病分布于世界各马铃薯种植区。病毒的侵染可引起马铃薯种质退化、产量下降,一般减产 $10\% \sim 30\%$,发病严重时减产可达 80% 。马铃薯病毒病的危害已成为制约马铃薯生产的主要因素之一。

目前,在我国马铃薯生产实践中,为防治病毒病的危害,采用无毒种薯是主要措施之一。无毒种薯的生产主要有两种方式:一是因地制宜建立无毒种薯繁育基地,将原种田设在高纬度或高海拔的冷凉地带,通过从高纬度、高海拔的冷凉地区引种获得。二是采用多种方法进行种薯脱毒,生产推广脱毒种薯。经过茎尖脱毒、组织培养,生产出的脱毒种薯具有更大的增产潜力。

脱毒种薯的生产是实现马铃薯产业化发展的前提和基础。近年来,国家通过投入大量的人力、财力、物力资源,调整种植业结构,发展规模农业,使马铃薯种薯的生产基地化,运销加工规范化,为促进脱毒种薯生产和马铃薯产业的良性发展提供了保障。随着生物技术和分子生物学的不断发展,我国现已实现脱毒种苗的工厂化生产,打破了季节、气候的限制,实现了周年生产。

无论是从高纬度、高海拔地区进行种薯调运,还是通过组培技术生产脱毒种薯,均需要进行严格的病毒检测,及时清除病薯以保证生产的安全。因此,建立健全一套快速、准确、灵敏、特异的马铃薯病毒规范化检测体系,对于马铃薯病毒病的有效防控、确保马铃薯产业的健康发展具有重要意义。

本书收集整理了近年来应用于马铃薯主要病毒的检测与鉴定技术及病害防治技术,综合阐述了各种方法的基本原理、操作步骤、注意事项等内容,希望能为马铃薯种薯生产基地、脱毒种薯生产部门提供技术参考,为广大马铃薯生

产单位提供技术支持,为我国马铃薯产业的健康发展尽一点微薄之力。书中还介绍了马铃薯病毒检测技术方面的最新研究成果,可为大中专院校和相关科研院所提供参考。

由于作者水平有限,加以书写仓促,内容文字欠妥之处,欢迎读者批评指正。

吴兴泉

2009年6月

目 录

第一章 概述.....	1
第一节 马铃薯简介.....	1
第二节 植物病毒简介.....	2
一、植物病毒的形态、结构与组分.....	2
二、植物病毒的复制和增殖	4
三、植物病毒的传播	5
四、植物病毒的分类与命名	6
五、植物病毒病的诊断	6
第三节 引起马铃薯退化的主要病原.....	8
一、病毒	8
二、类病毒.....	10
三、类菌原质体.....	10
第二章 我国马铃薯主要病毒的基本特征	11
第一节 马铃薯 Y 病毒	11
一、病原.....	11
二、症状特点.....	12
三、寄主范围.....	15
四、分布与危害.....	15
五、传播途径与流行.....	16
六、分子生物学研究简介.....	16
第二节 马铃薯 A 病毒	17
一、病原.....	17
二、症状特点.....	18
三、寄主范围.....	18
四、分布与危害.....	18
五、传播途径与流行.....	18
六、分子生物学研究简介.....	19
第三节 马铃薯 X 病毒	23
一、病原.....	23
二、症状特点.....	24
三、寄主范围.....	24

四、分布与危害·····	24
五、传播途径与流行·····	25
六、分子生物学研究简介·····	25
第四节 马铃薯卷叶病毒·····	25
一、病原·····	25
二、症状特点·····	26
三、寄主范围·····	27
四、分布与危害·····	28
五、传播途径与流行·····	28
六、分子生物学研究简介·····	28
第五节 马铃薯 S 病毒·····	30
一、病原·····	30
二、症状特点·····	30
三、寄主范围·····	31
四、分布与危害·····	31
五、传播途径与流行·····	31
六、分子生物学研究简介·····	32
第六节 马铃薯 M 病毒·····	32
一、病原·····	32
二、症状特点·····	32
三、寄主范围·····	33
四、分布与危害·····	33
五、传播途径与流行·····	33
第七节 马铃薯纺锤形块茎类病毒·····	33
一、病原·····	33
二、症状特点·····	34
三、寄主范围·····	35
四、分布与危害·····	35
五、传播途径与流行·····	36
第三章 马铃薯病毒检测与鉴定技术·····	37
第一节 病害初步识别·····	37
一、马铃薯病毒病的总体症状特征·····	37
二、马铃薯病毒病的外部症状特征·····	37
三、马铃薯病毒病的内部症状特征·····	40
四、传染试验及物理化学特性·····	42
五、影响马铃薯病毒病症状表现的因素·····	42

第二节 鉴别寄主诊断	43
一、鉴别寄主	43
二、接种方法	44
三、主要马铃薯病毒的鉴别寄主及症状表现	47
第三节 显微镜技术	56
一、显微镜技术检测马铃薯病毒的依据	56
二、马铃薯病毒的电镜检测方法	56
第四节 血清学技术	58
一、抗体与抗原	58
二、马铃薯病毒抗血清的制备	63
三、马铃薯病毒单克隆抗体的制备	71
四、病毒 DNA 介导的抗血清的制备	76
五、病毒单链抗体的制备	77
六、马铃薯病毒的血清学检测技术	78
七、ELISA 检测试剂盒	90
第五节 分子生物学检测技术	91
一、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术	91
二、核酸杂交检测技术	106
三、基因芯片检测技术	110
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳检测马铃薯块茎类病毒	121
六、血清学技术与分子生物学技术的比较	124
第四章 马铃薯病毒病防治技术	127
第一节 采用健康马铃薯种薯	127
一、马铃薯种薯简介	127
二、种薯调运	127
三、马铃薯茎尖组培脱毒技术	128
四、其他脱毒方法	138
五、脱毒种薯生产技术体系	140
第二节 培育马铃薯抗病毒品种	142
一、马铃薯抗病毒育种的意义	142
二、马铃薯抗病毒育种技术	142
第三节 化学药剂防治马铃薯病毒病	147
一、具有抗植物病毒活性的化合物	147
二、防治马铃薯病毒的化学药剂及施用方法	148
第四节 采取防蚜避蚜措施	149
一、生物防治蚜虫	149
二、物理防治蚜虫	149

三、化学防治蚜虫	150
四、栽培及繁种措施防治蚜虫	150
第五节 改进栽培措施	151
参考文献	152

第一章 概 述

第一节 马铃薯简介

马铃薯(*Solanum tuberosum*, potato)是茄科茄属一年生草本植物,又称土豆、洋芋、洋山芋、山药、山药蛋、馍馍蛋、薯仔(香港、广州人的惯称)等。国外对它的称谓主要有:地豆(意大利)、地苹果(法国)、地梨(德国)、爱尔兰豆薯(美国)、荷兰薯(俄罗斯)等。马铃薯块茎可供食用,是重要的粮食、蔬菜、饲料兼用作物。

马铃薯原产于南美洲安第斯山区的秘鲁和智利一带。16世纪中期,马铃薯被一个西班牙人从南美洲带到欧洲。那时人们欣赏它的美丽花朵,把它当作装饰品。后来一位法国农学家在长期观察和亲身实践中,发现马铃薯不仅能吃,还可以做面包等,从此,法国农民便开始大面积种植马铃薯。19世纪初期,俄国彼得大帝游历欧洲时,以重金买了一袋马铃薯,种在宫廷花园里,后来逐渐发展到民间种植。

有的学者认为马铃薯共有7个栽培种,主要分布在南美洲的安第斯山脉及其附近沿海一带的温带和亚热带地区。最重要的马铃薯栽培种是四倍体种。四倍体栽培种马铃薯向世界各地传播,最初始于1570年从南美的哥伦比亚将短日照类型引入欧洲的西班牙,经人工选择,成为长日照类型,后来又传播到亚洲、北美、非洲南部和澳大利亚等地。马铃薯产量高,营养丰富,对环境的适应性较强,现已遍布世界各地,热带和亚热带国家甚至在冬季或凉爽季节也可栽培并获得较高产量。

马铃薯传入我国只有一百多年的历史,据说是华侨从东南亚一带引进的。目前,我国的马铃薯种植区主要分布在东北、华北和云贵高原等气候较凉的地区。我国马铃薯种植面积和总产量已跃居世界第一位,其中以西南山区的播种面积最大,约占全国总面积的1/3,黑龙江省则是全国最大的马铃薯种植基地。

普通栽培种马铃薯由块茎繁殖生长,形态因品种而异。株高约50~80 cm。茎分地上茎和地下茎两部分。块茎圆、卵圆或长圆形。薯皮的颜色为白、黄、粉红、红或紫色,薯肉为白、淡黄或黄色。由种子长成的植株形成细长的主根和分枝的侧根;而由块茎繁殖的植株则无主根,只形成须根系。初生叶为单叶,全缘,随植株的生长,逐渐形成羽状复叶。聚伞花序顶生,有白、淡蓝、紫和淡红等颜色,浆果。

马铃薯具有很高的营养价值和药用价值。一般新鲜薯中所含成分为:淀粉9%~20%,蛋白质1.5%~2.3%,脂肪0.1%~1.1%,粗纤维0.6%~0.8%。100 g马铃薯中所含的营养成分有:热量66~113 J,钙11~60 mg,磷15~68 mg,铁0.4~4.8 mg,维生素B₁ 0.03~0.07 mg,维生素B₂ 0.03~0.11 mg,烟酸0.4~1.1 mg。除此之外,马铃薯块茎还含有禾谷类粮食所没有的胡萝卜素和维生素C,可称为“十全十美的食物”。人只靠马铃薯和全脂牛奶就足以维持生命和健康,因为马铃薯的营养成分非常全面,营养结构也较

合理,只是蛋白质、钙和维生素 A 的量稍低,而这正好可以用全脂牛奶来补充。马铃薯块茎水分多、脂肪少、单位体积的热量相当低,所含的维生素 C 是苹果的 10 倍,B 族维生素是苹果的 4 倍,各种矿物质是苹果的几倍至几十倍不等,且食用后有很好的饱腹感。马铃薯鲜薯可供烧煮作粮食或蔬菜,但鲜薯块茎体积大,含水量高,运输和长期贮藏有困难。为此,世界各国十分注重生产马铃薯的加工食品,如法式冻炸条、炸片、速溶全粉、淀粉以及花样繁多的糕点、蛋卷等,为数达 100 多种。马铃薯的鲜茎叶通过青贮,可作饲料,但其中含龙葵碱,须防止引起牲畜中毒。我国一些地区利用马铃薯茎叶做绿肥,其肥效与紫云英相似。

马铃薯的赖氨酸含量较高,且易被人体吸收利用。脂肪含量为 0.1% 左右。矿物质比一般谷类粮食作物高 1~2 倍,含磷尤其丰富。在有机酸中,以含柠檬酸最多,苹果酸次之,其次有草酸、乳酸等。马铃薯是含维生素种类和数量非常丰富的作物,特别是维生素 C,100 g 鲜薯含量高达 20~40 mg。一个成年人每天食用 250 g 鲜薯,即可满足对维生素 C 的需要。马铃薯是一种粮饲菜兼用的作物,营养成分齐全,在欧洲被称为第二面包作物。由于营养价值高,马铃薯食品已成为目前的一种消费时尚。

世界各地马铃薯的栽培技术因地理气候条件不同而异,主要利用块茎进行无性繁殖。马铃薯最易感染病害。真菌病主要有晚疫病、疮痂病、早疫病;细菌病主要有环腐病、青枯病;病毒病主要有花叶病、卷叶病、类病毒病以及类菌原体质病等;虫害主要有块茎蛾、线虫、地老虎和蛴螬等。大部分栽培品种是通过杂交育种选育成的。鉴于马铃薯普通栽培种的品种资源贫乏,近年来尤其重视综合利用马铃薯的近缘栽培种,包括普通栽培种及二倍体栽培种的染色体组,以利于选育高产、高抗和高淀粉、高蛋白质含量的新品种。选育途径主要有二种,一是利用产生 2n 配子的二倍体杂种与普通栽培种杂交,二是利用新型栽培品种与普通栽培种杂交。

目前全世界有 146 个国家种植马铃薯,总面积 1 800 万公顷左右,主要分布在欧洲和亚洲,其中以中国、俄罗斯、波兰、印度的面积为最大。在中国,马铃薯主产区主要分布在黑龙江、吉林、内蒙古、山西、陕西和云南、贵州、四川等地,一般在高纬度及高海拔地带种植。据中国农业年鉴(2001)记载,我国马铃薯栽培总面积已达 472.343 万公顷,总鲜薯产量为 1 325.64 万吨,总播种面积和总产量均已跃居世界第一,但是马铃薯单产低、退化严重、品种混杂是严重制约农民经济收入的主要因素。据联合国粮农组织报告,我国马铃薯平均产量仅为 15 t/hm²,而欧美发达国家平均单产 35~43 t/hm²,水平最高的荷兰达 44.8 t/hm²。我国马铃薯单产水平在世界马铃薯生产国家中排名第 40 位,处于相对落后的地位。

第二节 植物病毒简介

一、植物病毒的形态、结构与组分

(一) 植物病毒的形态

1. 植物病毒粒体 病毒的基本形态为粒体(virion, virus particle),大部分病毒的粒体

为球状、杆状和线状,少数为弹状、杆菌状和双联体状等。球状病毒的直径大多在 20 ~ 35 nm,也称为多面体病毒,其球体是由很多正三角形有规则地排列组合成的,此形态的病毒占植物病毒科、属的一半左右。杆状病毒粒体多为(15 ~ 80) nm × (100 ~ 250) nm,两端平齐,少数两端钝圆。杆状病毒粒体刚直,不易弯曲。线状病毒粒体多为(11 ~ 13) nm × 750 nm,个别可以达到 2 000 nm 以上。线状病毒的两端也是平齐的,粒体有不同程度的弯曲。

2. 植物病毒的结构 完整的病毒粒体是由一个或多个核酸分子包被在蛋白衣壳里构成的。杆状或线状植物病毒粒体的中间是螺旋状的核酸链,外面是由许多蛋白质亚基(subunit)组成的衣壳。蛋白质亚基也排列成螺旋状,呈螺旋对称型结构,核酸链就嵌在亚基的凹痕处。因此,杆状或线状病毒粒体的中心是空的。球状病毒的结构要复杂一些,是由二十个或二十多个正三角形拼接形成的正多面体,呈等面体对称形结构。

3. 植物病毒的组分 植物病毒的主要成分是蛋白质和核酸。

(1) 蛋白质 病毒的蛋白质种类很少,分为结构蛋白和非结构蛋白两大类。结构蛋白是构成一个完整的病毒粒体所需要的蛋白,主要是衣壳蛋白(coat protein,缩写为 CP)。非结构蛋白是指病毒核酸编码的非结构必需的蛋白,包括病毒复制需要的酶和传播、运动需要的功能蛋白等。病毒蛋白具有良好的抗原特性,能刺激动物产生抗体,这是血清学方法鉴定病毒的依据。

(2) 核酸 核酸是病毒的核心,是病毒的遗传信息携带者,决定病毒的增殖、遗传、变异和致病性。植物病毒的核酸有 5 种类型:①正单链 RNA(positive single strand RNA, + ssRNA)病毒 其单链 RNA 可以直接翻译蛋白,起 mRNA 的作用。这是最主要的类型,70% 以上的植物病毒均为此种核酸类型,如烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)的 TMV、黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*)的 CMV、马铃薯 X 病毒属(*Potexvirus*)和马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)成员等;②负单链 RNA(negative single strand RNA, - ssRNA)病毒 其单链 RNA 不能起 mRNA 的作用,必须先转录成互补链,才能翻译蛋白;③双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)病毒 核酸为互补的双链 RNA,其负链 RNA 转录出正链 RNA,作为 mRNA 翻译蛋白;④单链 DNA(single strand DNA, ssDNA)病毒 由于 DNA 不能直接作为 RNA 而起作用,所以 DNA 病毒无正、负之分。单链 DNA 病毒仅有双联病毒(*Geminiviridae*)一科,为最小的球形粒体,由直径 17 nm 的两个不完全等面体结合而成。复制时单链 DNA 先合成双链 DNA,以常规途径转录 mRNA;⑤双链 DNA(double strand DNA, dsDNA)病毒 核酸为互补的双链 DNA。

核酸具有多分体现象,这是 + ssRNA 病毒所特有的现象,是指病毒的基因组分布在不同的核酸链上,分别包装在不同的病毒粒体里。由于遗传信息分开了,单独一个粒体不能侵染成功,必需是一组粒体同时侵染才能全部表达遗传特性。这种分段的基因组被称为多组分基因组。含多组分基因组的病毒被称为多分体病毒。整个遗传信息存在于一条核酸链上,包被在一种粒体中的病毒称为单分体病毒,如常见的烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)、马铃薯 X 病毒属(*Potexvirus*)和马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)。遗传信息为双组分基因组包被在两种粒体里的病毒称双分体病毒,如烟草脆裂病毒属(*Tobravirus*)和蠕传病毒属(*Nepovirus*)。核酸包被在三种粒体中的病毒称为三分体病毒,如黄瓜花叶病毒属

(*Cucumovirus*)和苜蓿花叶病毒(AMV),它们均有四条核酸链,但被包装在三种或四种粒体中。基因组分离和多分体病毒的产生对植物病毒的遗传及进化有着重要的作用。

(3)其他组分 水分是除核酸、蛋白质以外含量最高的组分。碳水化合物主要发现在植物弹状病毒科病毒中,以糖蛋白或糖脂的形式存在于病毒的囊膜中。某些病毒粒体含多胺,主要是精胺和亚精胺,可与核酸中的磷酸基团作用以稳定折叠的核酸分子。金属离子如钙离子、钠离子和镁离子等,起稳定衣壳蛋白与核酸结合的作用。

二、植物病毒的复制和增殖

病毒侵染植物以后,在活细胞内增殖后代需要两个步骤:一是病毒核酸的复制,从亲代向子代病毒传送核酸性状的过程,即病毒的基因传递(Gene transmission);二是病毒核酸信息的表达,即按照信使RNA的序列来合成病毒专化性蛋白的过程。

(一)病毒基因组的复制

病毒核酸的复制需要寄主提供复制的场所(通常是在细胞质或细胞核内)、复制所需的原材料和能量、部分寄主编码的酶以及膜系统。病毒自身提供的主要是模板核酸和专化的聚合酶,也称复制酶(或其亚基)。

1. 病毒核酸的转录 无论植物病毒含有何种核酸,要翻译出蛋白必须经过mRNA这一过程。+ssRNA病毒核酸可以直接作为mRNA使用,其他植物病毒则需要不同步骤的转录。

2. 植物病毒核酸的表达 由于真核生物体内的蛋白质合成机构仅仅识别病毒+RNA上的第一个开放阅读框架,同一核酸链上其他基因的表达则要借助病毒的特殊翻译途径。现在发现+ssRNA病毒基因组在真核生物蛋白合成系统中有五种翻译途径:亚基因组RNAs途径、多聚蛋白途径、多分体基因组途径、通读蛋白途径、核糖体移码途径。植物病毒基因组的翻译产物较少,一般RNA病毒的翻译产物有4~5种,多的可达9种。这些产物包括病毒编码的复制酶,病毒的衣壳蛋白、运动蛋白、传播辅助蛋白、蛋白酶等。

RNA翻译产物可与病毒的核酸、寄主的蛋白等物质聚集起来,形成内含体。内含体有不同的形状和大小,从不定形结构到精细的晶体结构,大的可在光学显微镜下看到,小的则只能在电子显微镜下观察。内含体可以分为在核质、核仁或者核围的核内含体(nuclear inclusions)和细胞质内含体(cytoplasmic inclusions)两类。不同属的植物病毒往往产生不同类型、不同形状的内含体,利用这种不同可作为鉴别不同病毒的方法之一。

(二)植物病毒的增殖

植物病毒以被动方式通过微伤(机械伤或介体造成的伤口)直接进入活细胞,并释放核酸。释放核酸的过程也称为脱壳(uncoating),然后进行核酸复制和基因表达。核酸复制包括产生子代病毒的核酸和产生翻译病毒蛋白质的mRNA。mRNA利用寄主提供的核糖体、tRNA、氨基酸等物质和能量,翻译形成病毒专化的RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp),在聚合酶作用下,以正链RNA为模板,复制出负链RNA,再以负链RNA为模板,复制出一些亚基因组核酸,同时大量复制出正链RNA。亚基因组核酸翻译出各种蛋白,包括衣壳蛋白。病毒合成的RNA与衣壳蛋白进行装配,成