

# 怀山药病毒病的研究

李明军,张 峰\*,陈明霞,于相丽\*

(河南师范大学生命科学学院,河南 新乡 453002)

**摘要:**目的 探明怀山药病毒病的症状和感染病毒的种类,为脱除怀山药病毒、提高产量、改善品质奠定基础。方法 调查怀山药大田感病情况,应用电镜法观察病毒的大小和形状,采用分子生物学方法进一步探明病毒种类。结果 怀山药感染病毒后的症状为叶色失绿、花叶、畸形;在透射电镜下,观察到长 600~1 200 nm 的线状病毒,并初步判断为马铃薯 Y 病毒;PCR 扩增后的电泳检测显示出了清晰的马铃薯 Y 病毒和马铃薯卷叶病毒的电泳条带。结论 首次发现怀山药感染的病毒为马铃薯 Y 病毒和马铃薯卷叶病毒,它是造成怀山药产量下降和品质退化的主要原因。

**关键词:**怀山药;马铃薯 Y 病毒;马铃薯卷叶病毒;病毒病

中图分类号: R282.22 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-附 2-03

## Study on virus diseases of *Dioscorea opposita*

LI Ming-jun, ZHANG Feng, CHEN Ming-xia, YU Xiang-li

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

**Key words** *Dioscorea opposita* Thunb.; potato virus Y; potato leafroll virus; virus disease

怀山药 *Dioscorea opposita* Thunb. 为薯蓣科薯蓣属植物,与怀地黄、怀牛膝、怀菊花合称为“四大怀药”,主产于河南温县、武陟、沁阳、博爱等地,其肉质根状茎可入药,“主治伤中、补虚羸、除寒热邪气,补中益气力”等<sup>[1]</sup>。由于其药用价值高、品质好,故长期以来其产品畅销东南亚和日本等国。在生产中,怀山药由于长期采用营养繁殖,病毒感染严重,造成产量下降、品质退化,致使怀山药种植者放弃种植,使某些优良品种(如铁棍山药)处于濒临灭绝的境地。因此,探明怀山药感染病毒的症状和种类,并采用生物技术的方法脱除病毒,提高产量,改善品质已成为怀山药生产中亟待解决的一个重要问题。

近年来,我们对怀山药组织培养和病毒病进行了系统的研究<sup>[2-4]</sup>,首次探明了怀山药感染病毒的种类和症状,并通过茎尖培养脱除病毒的方法证明了病毒病是导致怀山药产量下降、品质退化的主要原因。本实验报道的是关于怀山药病毒病方面的研究结果。

### 1 材料与方法

1.1 材料:怀山药优良品种“铁棍山药”和“47号山药”,均来自温县农业科学研究所。

### 1.2 方法

1.2.1 病毒病症状的观察:在怀山药生长旺盛的季节(7~9月份)到怀山药主产区的大田中观察病毒感染情况,并拍照记录。

1.2.2 病毒颗粒的分离与提取:从大田采取有典型症状的感病叶片和地下根状茎,作为实验材料,取染病叶片 100 g,加入 250 mL 提取液和 5 g PVP,分批捣碎;匀浆用干净的双层纱布滤过,挤出全部汁液,弃去残渣;加入 10% 氯仿,搅拌均匀,在高速冷冻离心机中离心(8 000 r/min, 15 min);上清液转移到一个干净的烧杯中,加入混合均匀的 PEG 和 NaCl (6% PEG+ 3% NaCl),将沉淀好的上清液再一次搅拌均匀,离心(8 000 r/min, 15 min),弃去上清液,取沉淀,加入重悬浮液(体积为上清液体积的 1/3),搅拌均匀,在高速冷冻离心机离心(8 000 r/min, 15 min)2次;取上清液,然后加入混合均匀的 PEG 和 NaCl(6% PEG+ 3% NaCl),上清液中加入体积分数为 2% 的 Triton-x-100(澄清剂)澄清,在高速冷冻离心机离心(8 000 r/min, 20 min);弃去上清液,取沉淀,加入重悬浮液,磁力搅拌均匀,高速冷冻离心机离心(8 000 r/min, 15 min);离心好的样品中加入

\* 收稿日期: 2003-05-30

基金项目:河南省重点科技攻关项目(0123030900; 0324420016)

作者简介:李明军(1962-),男,河南温县人,1992年获中国科学院植物研究所理学硕士学位,现为河南师范大学生命科学学院副教授,硕士生导师,研究方向为植物生物技术及其应用。Tel (0373) 3326340/3328189 (O) E-mail limingjun2002@ 263.net

\* 现工作单位:河南商丘师范学院生物系

重悬浮液和 20% 的蔗糖溶液,超速离心机中离心 (35 000 r/min, 2 h);弃去上清,所得的沉淀即为病毒沉淀,加入约 100 $\mu$  L 的重悬浮液,使沉淀完全溶解,把溶液转移到小的离心管中,再离心 (1 000 r/min, 10 min) 1 次,把上清液转移到小离心管中,获得病毒提取汁液

1. 2. 3 病毒颗粒的形态观察:取病毒提取汁液少许于铜网上,用 3% 磷钨酸负染,于透射电镜下观察并拍摄照片,分析结果,初步判断病毒的种类。

1. 2. 4 PCR 鉴定法:用试剂盒 (上海生工 RNA 试剂提取盒) 提取铁棍山药的上部叶片、下部叶片和根状茎 (地下块茎) 中的总 RNA;用 PVA (马铃薯 A 病毒)、PVM (马铃薯 M 病毒)、PLRV (马铃薯卷叶病毒)、PVS (马铃薯 S 病毒)、PVX (马铃薯 X 病毒) 和 PVY (马铃薯 Y 病毒) 的 3' 引物分别反转录各 RNA,分别标记为 1A, 2A, 3A, 1M, 2M, 3M, 1R, 2R, 3R, 1S, 2S, 3S, 1X, 2X, 3X, 1Y, 2Y, 3Y; 对各反转录产物进行 PCR 目的片段扩增并对 PCR 结果进行琼脂糖电泳检测。

2 结果

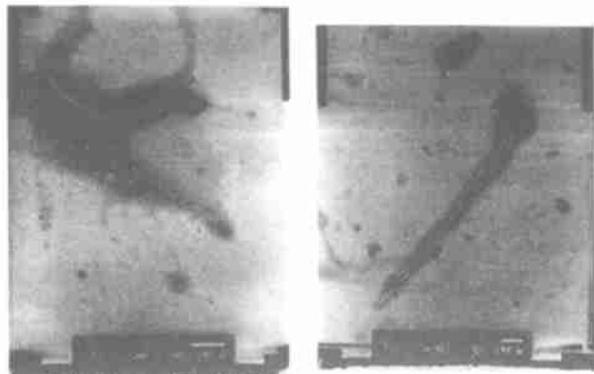
2. 1 病毒病的症状:在怀山药生长初期,病毒病症状并不明显,在生长的中后期,症状逐渐明显,初时叶上出现明显的褪绿斑,随后绿色花斑逐渐隆起,叶片斑驳花叶、凸凹卷曲畸形、黄化或坏死,感病叶片明显小于健壮叶片,严重时整株矮化,生长缓慢,地下块茎明显小于健壮的植株,并且畸形,产量下降。经大田调查发现,受病毒危害的植株占 50% 左右。

2. 2 感染病毒的种类:透射电镜下,在症状明显的“铁棍山药”和“47 号山药”的病毒提取液中均看到了病毒,他们位于黏液质的包围之中,其形状为线型,长度在 600~ 1 200 nm (图 1),给它定名为“怀山药花叶病毒”,根据其大小和形状,可初步判定其属于马铃薯 Y 病毒。

经 PCR 检测后发现,铁棍山药的上部叶片含有马铃薯 Y 病毒 (potato virus Y, PVY),下部叶片含有马铃薯卷叶病毒 (potato leafroll virus, PLRV),根部含有马铃薯 Y 病毒和马铃薯卷叶病毒 (图 2)

3 讨论

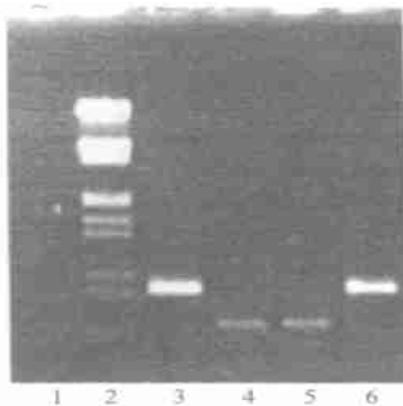
怀山药是一种传统的道地中药材,在源头的生产中保证其优质和高产具有重要的意义。但由于怀山药长期采用营养繁殖,导致其产量下降、品质退化,而病毒病可能是造成这种现象的重要原因。目前关于怀山药病毒病方面的研究国内外还未见报道。笔者首次通过电镜观察,发现了形态和大小与马铃薯 Y 病毒相



a-铁棍山药 a-*D. opposita* tie-gun  
b-47号山药 b-*D. opposita* 47

图 1 电镜下怀山药病毒颗粒的形态

Fig. 1 Shape of virus partide of *D. opposita* by electron-microscopy



泳道 1~ 6 分别为阴性对照、Marker 上部叶片、下部叶片、根部、根部的 PCR 电泳结果。其中 3, 6 为 PVY; 4, 5 为 PLRV。

Electrophoresis results display 1~ 6 indicate negative control, Marker, upper leaves, under leaves, roots, root EM of PCR respectively, 3, 6 are PVY; 4, 5 are PLRV

图 2 PCR 检测结果

Fig. 2 Results of PCR test

同的病毒颗粒,经过分子生物学方法进一步检测后,证明怀山药确实含有马铃薯 Y 病毒,同时还发现其含有马铃薯卷叶病毒。马铃薯 Y 病毒通过感染的块茎长期存在,在马铃薯上产量损失可达 80%; 马铃薯卷叶病毒所造成的卷叶病是马铃薯的主要病毒病害之一,精确的损失难以统计,一般与其他病毒同时侵染时受害较重,重病损失可高达 90%,使薯块变小,降低商品价值等。我们将茎尖培养获得的怀山药脱毒苗大田种植后,发现其产量较感病植株大幅度提高 (另文发表),这进一步证实了病毒病是造成怀山药产量下降、品质退化的重要原因。

目前,在怀山药的生产中应当利用生物技术培养脱毒苗并大力推广应用 (这一工作我们正在进行,

研究成果已通过省级鉴定)。除此之外,还应该加强田间管理,及时发现并淘汰田间病株,感病的地下根状茎也不能作为下一年的种栽,防止再度传染;培养和利用抗病或耐病品种,尤其是要运用基因工程等手段培育抗病新品种,从根上解决病毒感染的问题,为怀山药的优质高产打下良好的基础,真正实现中药材生产中提出的“药材好,药才好”的目标,使怀山药这种道地的中药材更好地为人类服务。

致谢:本实验得到了福建农林科技大学谢联辉院士和山东农业大学王玉军副教授的大力协助。

## References

[1] Nie G H, Zhou K F, Dong X H, et al. A review of *Dioscorea opposita* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24

(3): 158-160.

- [2] Li M J. Callus induction and multi-bud body formation from stem segment of *Dioscorea opposita* [J]. *Acta Agr Boreali-Sin* (华北农学报), 2000, 15(2): 85-88.
- [3] Li M J, Li J T, Zhu M W, et al. *In vitro* propagation of *Dioscorea opposita* Thunb. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(4): 296-298.
- [4] Li M J, Liu P, Zhang J B. Induced formation of microtubularization of *Dioscorea opposita* Thunb. [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 2000, 36(1): 41-42.
- [5] EK S, Pei M Y. *The Guide of Plant Virus Comparing Diagnosis* (植物病毒比较诊断指南) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1991.
- [6] Ma X S, Liao Y X, Zhao C Y, et al. *Classification and Nomenclature of Plant Virus* [M]. Beijing: Science Press, 1987.

# 罂粟霜霉病越冬菌态及初侵染来源研究

李金花<sup>1</sup>, 柴兆祥<sup>1</sup>, 董克勇<sup>2</sup>, 魏勇良<sup>1\*</sup>

(1. 甘肃农业大学 植物保护系, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农垦良种有限责任公司, 甘肃 景泰 730400)

罂粟霜霉病树状霜霉 *Peronospora arborescens* de Bary 一直严重威胁着罂粟的生产。植物病害的防治,总是要从病害循环的某一环节入手。而对于既有初侵染又有再侵染的罂粟霜霉病来说,初侵染来源及越冬菌态问题成了防治的关键所在。为此,作者于1995-1997年对罂粟霜霉病的初侵染来源进行了研究

## 1 材料与方

1.1 供试材料: 1995-1997年连续3年从种植区1分别采集系统型病株的根、茎、叶片、花瓣、果壳、萼片、种子和非系统型病株的显症叶片<sup>[1]</sup>。检查叶片时,材料取自病斑处及与病部相邻的健部

1.2 方法: 对根、茎、萼片、果壳回软后进行徒手切片;花瓣、叶片剪成0.5 cm<sup>2</sup>的方块,用3% NaOH或KOH煮数分钟至病组织退色,清水冲洗后用吸水纸吸干,在乳粉油中浸泡0.5 h<sup>[2]</sup>。后镜检卵孢子的有无及数量。各器官随机镜检40个视野,计算40个视野的平均值

镜检种子前,用拨针剥开种子,挤出胚乳,分别镜检胚乳和种子。以蒸馏水为载浮剂。

1.3 卵孢子形成时期: 分别于1995, 1996和1997年4-7月,每隔10 d左右从种植区1采集系统型

病株。采集到的标样压制成干标本,镜检卵孢子的有无。方法同1.2

## 1.4 种子带菌检验

1.4.1 收集系统型病株种子: 1995-1997年连续3年在种植区1对系统型病株挂牌,收集系统型病株的种子。

1.4.2 种子内部带菌检验: 检查新1号系统型病株上严重皱缩的果壳种子、系统型病株上外表正常的果壳种子、非系统型病株种子及健株种子种皮和胚乳的带菌情况。方法同1.2

1.4.3 种子外部带菌检验: 将新1号系统型病株上严重皱缩的果壳种子、外表正常的果壳种子、非系统型病株种子及健株种子分别取0.5 g,置于小烧杯中,分别加灭菌水10 mL,充分搅拌。将上清液1000 r/min离心5 min,取沉淀物镜检。所用器皿都经过严格清洗。

1.5 连作年限与系统型病株率关系的田间调查: 1995-1997年4月下旬在种植区1调查不同连作年限罂粟田的系统型病株率。每一处理调查1小区,每小区200 m<sup>2</sup>,共11行,每行5个样点,每样点30株,共1650株。调查品种为新1号。

## 2 结果与分析

\* 收稿日期: 2003-01-11

作者简介: 李金花(1972-),女,甘肃秦安县人,讲师,硕士,现于甘肃农业大学攻读作物遗传育种学博士学位,主要从事植物病害研究。