

甘肃河西地区番茄病毒病病原种类鉴定

文朝慧,刘雅莉,刘 箐,王军平,宋 葵

(甘肃出入境检验检疫局,甘肃兰州 730020)

摘 要: 2006—2008 年对甘肃河西地区番茄病毒病的种类进行了调查和鉴定。河西地区番茄病毒病田间表现为花叶和条斑等症状,种子可带毒。采用 DAS-ELISA 方法,从田间样本及该地区出入境番茄种子上检测到烟草花叶病毒(TMV)、番茄花叶病毒(ToMV)和黄瓜花叶病毒(CMV),并对 TMV 和 ToMV 阳性样品进行了 IC-RT-PCR 鉴定。该地区番茄病毒病优势病毒为烟草花叶病毒;13%的样本中检测出 2 种病毒的复合侵染。

关键词: 番茄;番茄病毒病;病毒鉴定

中图分类号: S436.412.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2009)06-0291-04

Identification of Viruses Infecting Tomato in Hexi Region of Gansu Province

WEN Zhaohui, LIU Yali, LIU Qing, WANG Junping and SONG Rui

(Gansu Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou Gansu 730020, China)

Abstract: During 2006—2008, the virus disease on tomato (*Lycopersicon esculentum*) was investigated and identified in Hexi region of Gansu province. In the field, virus symptoms of mosaic and streak were found on tomato leaf and fruit. Detections by DAS-ELISA and IC-RT-PCR showed that samples of plants and seeds were infected with Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV) and Cucumber mosaic virus (CMV) respectively. It was proved that TMV was the advantage virus. The proportion of the seed lots infected by the viruses were 15%. Two types of viruses were found in about 13% infected samples.

Key words: Tomato; Tomato virus disease; Identification of viruses

番茄是经济效益较高的蔬菜品种之一,近年来,随着种植面积不断扩大,以及种子带毒传播、气候条件适宜等因素的影响,病毒病上升迅速,危害严重。以酒泉、张掖、武威 3 市为主的甘肃省河西地区是中国重要的制种基地,对境外制种是当地的特色产业^[1],外繁番茄品种有近 200 种,为繁种面积最大的蔬菜种子。番茄病毒病的发生,造成了番茄种子产量及品质的降低,严重影响制种业的发展和农民的经济收益。为明确甘肃河西地区番茄病毒病的主要毒原种类,笔者对该地区出入境番茄种子和田间病样进行了系统的调查和鉴定,以便为有效地防范和控制病虫害的发生提供依据。

1 材料和方法

1.1 病害的调查和样品采集

采用普查和定点调查结合的方法,2006—2008 年每年 7 月在河西地区田间采集可能被病毒感染、症状明显的番茄叶片或幼嫩的茎秆、果实 26 份,分别装在不同的洁净塑料袋中,标明采集时间、地点和材料,保存于-70℃低温冰箱。

供试种子 140 份,为甘肃出入境检验检疫局实验室检测的河西地区出入境番茄种子,检测样本为随机抽取材料。

1.2 血清学测试

采用的抗体番茄环斑病毒(Tomato ringspot

收稿日期:2009-02-20

修回日期:2009-05-18

作者简介:文朝慧,农艺师,主要从事植物检疫研究。E-mail:wzhhi@163.com

virus, ToRSV)、烟草环斑病毒(Tobacco ringspot virus, TRSV)、南芥菜花叶病毒(Arabis mosaic virus, ArMV)、烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)、马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX)、苜蓿花叶病毒(Alfalfa mosaic virus, AMV)、番茄花叶病毒(Tomato mosaic virus, ToMV)、番茄斑萎病毒(Tomato spotted wilt virus, TSWV)、凤果花叶病毒(Pepino mosaic virus, PepMV)购自美国 Agdia 公司, 黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)和马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY)抗体购自美国 ADI 公司, 均采用碱性磷酸酯酶标记双抗体夹心法(DAS-ELISA), 具体检测步骤参照提供抗体的公司产品说明书。以健康植株/种子为阴性对照, 样品 OD 值/阴性对照 OD 值大于 2 为阳性反应, OD 值利用 MUTISKAN 型 Thermo labsystems 酶标仪在 405 nm 波长下测定。

1.3 IC-RT-PCR

1.3.1 引物合成 对 ELISA 检测结果为阳性的 TMV、ToMV 样品进行 IC-RT-PCR 扩增, 根据 GenBank 已报道的病毒基因组序列, 设计并合成寡核苷酸引物。烟草花叶病毒(TMV)衣壳蛋白 CP 基因特异性引物, 上游引物: 5'-AGTTGTTGATGAGTTCATGGA-3'、下游引物: 5'-CAACCCTTCGATTTAAGTGGA-3'。

番茄花叶病毒(ToMV)运动蛋白 MP 基因特异性引物, 上游引物: 5'-CCGGATCCATG-GCTCTAGTTGTTAAAG-3', 下游引物: 5'-TC-CCGGGTTAATACGAATCAGAATCCGCG-3'^[24]。

1.3.2 抗体吸附 在 PCR 管中加入 150 μL 以适当比例稀释的烟草花叶病毒(TMV)抗体, 置于 37℃, 孵育 3 h; 用 PBST 洗涤 3 次。按 1:10 的比例用样品抽提缓冲液研磨样品, 吸取 100 μL 上清液包被 PCR 管, 37℃, 孵育 3 h(或 4℃过夜); PBST 洗 3 次, DEPC-H₂O 洗 2 次, 进行反转录和 PCR 反应。

番茄花叶病毒(ToMV)抗体的吸附同上。

1.3.3 cDNA 合成 在吸附了病毒的 PCR 管中直接进行反转录, 以吸附的病毒为模板反转录合成 cDNA 的第一链^[5-6]。各病毒样品均以各自的下游引物为起始引物。20 μL 反应体系中加入 4 μL 5×M-MLV 逆转录反应缓冲液, 1 μL 下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL dNTP (10 mmol/L), 12

μL DEPC-H₂O, 混匀后, 置 90℃变性 5 min, 迅速置冰上 2~3 min, 然后加入 1 μL M-MLV 反转录酶 (200 U/ μL , TaKaRa), 1 μL RNase 抑制剂 (40 U/ μL , TaKaRa), 42℃反应 1 h。

1.3.4 PCR 扩增 烟草花叶病毒(TMV)的 PCR 扩增反应, 在 PCR 反应管中加入 10 mmol/L dNTP 1 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL , 10×PCR Buffer 2.5 μL , 上游引物、下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , Taq 酶 0.3 μL (5 U/ μL), 加 ddH₂O 使体系为 25 μL (以上试剂为 TaKaRa 产品)。扩增条件为 94℃, 预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min 后保存于 4℃。扩增结束后, 取 10 μL PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳, 并用 UVP 凝胶成像系统记录结果。

测序验证: PCR 产物回收后, 利用 ABI 3730XL DNA 测序仪进行序列测定 (测序委托 TaKaRa 公司完成)。测序结果通过 BLASTn 与 GenBank 中目标序列进行同源性比对。

番茄花叶病毒(ToMV)的 PCR 扩增反应, 退火温度为 53℃, 其余操作同烟草花叶病毒。

2 结果与分析

2.1 河西番茄病毒病症状

河西地区番茄病毒病田间症状主要包括花叶型和条斑型, 在叶片和果实上显症 (图 1~2)。花叶型: 一种是番茄叶片上轻微花叶或斑驳, 植株不矮化, 叶片不变小、不变形; 另一种是番茄叶片有明显花叶, 随后叶细长狭窄, 扭曲畸形, 植株矮小, 下部多卷叶, 果小质劣, 多呈花脸状。条斑型: 病株上部叶片初呈花叶或黄绿色, 随后茎秆上中部生暗绿色下陷短条纹, 后为深褐色下陷油渍状坏死条斑; 病株果实畸形, 果面有不规则形褐色下陷油渍状坏死斑块或果实呈淡褐色水浸状坏死。

2.2 血清学检测

番茄田间病样及种子分别与番茄环斑病毒(ToRSV)、烟草环斑病毒(TRSV)、南芥菜花叶病毒(ArMV)、烟草花叶病毒(TMV)、马铃薯 X 病毒(PVX)、苜蓿花叶病毒(AMV)、番茄花叶病毒(ToMV)、番茄斑萎病毒(TSWV)、凤果花叶病毒(PepMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)和马铃薯 Y 病毒(PVY)的抗体进行 ELISA 反应, 结果样品中检出烟草花叶病毒(TMV)、番茄花叶病毒(ToMV)和黄瓜花叶病毒(CMV), 阳性样品中存

在病毒的复合侵染现象。

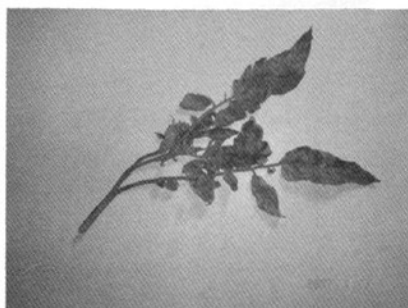


图1 番茄花叶症状

Fig. 1 Leaf mosaic symptoms



图2 番茄条斑病果

Fig. 2 Necrotic fruit lesions

2.3 IC-RT-PCR 检测结果

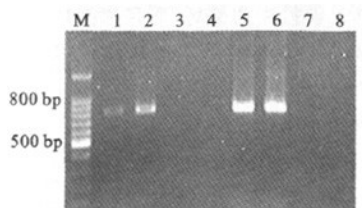
扩增结束后,经1%琼脂糖凝胶电泳(图3)显示,从TMV待测样品和阳性对照中扩增出约800 bp的目标条带,与预期片段大小一致,而阴性对照和空白对照未扩增出目的片段;从ToMV待测样品和阳性对照中扩增出约800 bp的目标条带,与预期片段大小一致,而阴性对照和空白对照未扩增出目的片段。

经测序和序列同源性比较,所测得的TMV扩增产物与国内外已报道的部分TMV目标序列之间存在89%~95%的一致性,氨基酸序列同源性为92%~99%,证明该DNA片段为TMV的部分序列。ToMV扩增产物与ToMV目标序列比较,核苷酸同源性高达98%,氨基酸序列同源性达89%~100%,证明该DNA片段为ToMV的部分序列。

2.4 河西番茄病毒病原检测结果

在采集的田间番茄病样中检出TMV、ToMV和CMV 3种病毒,TMV的总检出率为15%、ToMV为7%、CMV为2%。在140份番

茄种子中总带毒率为15%,TMV、ToMV和CMV的检出率分别为11.4%、4.4%和1.4%,表明TMV是当前河西地区侵染番茄的主要病毒种类。TMV和ToMV复合侵染的检出率为19%,TMV、ToMV和CMV复合侵染的检出率为4.7%。



M. 分子量 Marker;泳道1. ToMV样品 ToMV;泳道2. ToMV阳性对照 ToMV positive control;泳道3. ToMV阴性对照 ToMV negative control;泳道4. ToMV空白对照 ToMV blank control;泳道5. TMV样品 TMV;泳道6. TMV阳性对照 TMV positive control;泳道7. TMV阴性对照 TMV negative control;泳道8. TMV空白对照 TMV blank control

图3 IC-RT-PCR 扩增 ToMV、TMV 结果

Fig. 3 Results of IC-RT-PCR amplification

3 讨论

连续3a在甘肃河西地区田间采集各种类型的番茄病毒病病样,采用血清学及IC-RT-PCR方法检测田间病样及出入境番茄种子,检测到烟草花叶病毒(TMV)、番茄花叶病毒(ToMV)和黄瓜花叶病毒(CMV),当地番茄病毒病优势病毒种类为TMV,阳性样品中存在两种病毒的复合侵染现象。

据报道,能侵染番茄的植物病毒有30多种^[7],病毒病是番茄上发生最普遍的危害之一,也是最难防治的危害,可对番茄种子生产造成重大损失。甘肃河西地区生产的番茄种子以外观整齐、籽粒饱满、芽率高,而深受国内外客商青睐,为保护番茄制种业的可持续发展,只有明确了对外繁育种子基地番茄病毒病的毒原,才能在生产上针对毒原采取相应的防治措施。播种前以10%磷酸三钠浸种、有效防治传毒蚜虫并以NS-83增抗剂或弱病毒疫苗N14、2.0%氨基寡糖素处理植株等,对番茄病毒病有很好的防治效果^[8-9]。

由于植物病毒的传统血清学检测方法特异性较差,将植物病毒血清学检测和现代分子生物学技术相结合,有助于克服采用单一方法的局限性,

能够准确、全面地对植物病毒进行鉴定,从而提高实验结果的真实性。IC-RT-PCR 是在进行 RT-PCR 扩增反应前,利用病毒专化性抗体与病毒抗原相结合的原理,将目标病毒固定在微管或微板等固相上,经洗脱处理后富集病毒,然后再进行 RT-PCR 反应。该方法避免了常规 RT-PCR 中对 RNA 样品的损失和破坏,而且捕捉病毒 RNA 的效率很高。血清学检测具有操作简单、可大批量检测的特点,适合于病毒初筛,其后可依靠 IC-RT-PCR 等现代分子手段进行确认^[10]。

参考文献:

- [1] 朱 勇,侯建雄.甘肃外繁种子检疫现状及其对策[J].植物检疫,2000,14(3):172-175.
- [2] 黄晓曦,陈 青,薛朝阳,等.番茄花叶病毒移动蛋白基因转化烟草及在转基因烟草中的表达[J].南京农业大学学报,2001(4):8-11.
- [3] 周雪平,薛朝阳,刘 勇,等.番茄花叶病毒番茄分离物与烟草花叶病毒蚕豆分离物生物学、血清学比较及 PCR 特异性检测[J].植物病理学报,1997,27(1):53-58.
- [4] 于 翠,胡东维,董家红,等.烟草花叶病毒和番茄花叶病毒在含 N 基因烟草上的症状差异是由运动蛋白基因决定的[J].中国科学 C 辑:生命科学,2004(3):9-14.
- [5] 杨翠云,曹 洁,于 翠,等.烟草环斑病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测方法研究[J].上海农业学报,2007,23(1):83-87.
- [6] 杨国慧,张仲凯,崔崇士.西瓜花叶病毒 2 号南瓜分离物及其外壳蛋白基因序列分析[J].植物病理学报,2004,34(1):8-13.
- [7] Martelli G P, Quacquarelli A. The Present Status of Tomato and Pepper Viruses[J]. Acta Horticulturae, 1983, 127: 39-64.
- [8] 周一万,陈 丽,郝双红,等.关中地区番茄病毒病原种类调查及药剂防治试验[J].西北农业学报,2003,12(4):59-62.
- [9] 苏小记,王亚红,贾丽娜,等.氨基寡糖素对番茄主要病害的防治作用[J].西北农业学报,2004,13(2):84-87.
- [10] 商明清,魏梅生.植物病毒检测新技术研究进展[J].植物检疫,2004,18(4):236-240.

(上接第 279 页)

响差异显著,2 h 处理效果最理想;而 40℃ 条件下,30 min 处理效果最理想。40℃ 大于 2 h 时,由于处理时间过长、温汤温度偏高,发生、增殖小子球的数量明显减少;50℃ 30 min 以后及 60℃ 条件下,鳞片失去活力,不发生小子球,而且极易腐烂。建议百合鳞片扦插生产中使用 30℃ 2 h 和 40℃ 30 min 处理。

参考文献:

- [1] 钟海丰,张延龙,牛立新.秦巴山区野生山丹百合 DNA 提取与 RAPD 反应体系建立[J].西北农业学报,2008,17(3):285-289.
- [2] 赵祥云.鲜切花百合生产原理及实用技术[M].北京:中国林业出版社,2005.
- [3] 罗建让,张延龙,牛立新.消毒处理对百合鳞片扦插的影响[J].西北林学院学报,2008,23(2):87-90.
- [4] 郭文杰,欧阳桐娇,方少忠,等.激素对东方百合鳞片扦插繁殖的影响[J].江西农业学报,2007,19(9):46-47.
- [5] 毕兆东,孙淑萍,王 燕.不同基质与 NAA 对百合鳞片扦插繁殖的影响[J].南京农专学报,2002,18(3):45-48.
- [6] 张百俊,蒋学杰,张志安.不同浸种时间对辣椒种子活力的影响[J].河南职业技术学院学报,2003,31(1):22-25.
- [7] 王子崇,杨红丽.不同浸种时间对茄子种子发芽的影响[J].河南农业科学,2005(2):62-63.
- [8] 李志清,肖光辉.浸种时间和水温对无籽西瓜发芽的影响[J].湖南农业科学,2001(6):35-36.
- [9] 孙玉河,李怀智,霍振荣,等.温汤浸种对华北型黄瓜种子休眠的影响[J].天津农业科学,2002(9):14-16.
- [10] 张鲁刚,张 静.几种芸薹属作物的温汤浸种试验[J].长江蔬菜,2006(10):40-41.
- [11] 单 艳,李枝林,赵 辉.百合鳞片扦插繁殖技术研究综述[J].中国农学通报,2006(8):365-368.
- [12] Matsuo E, Ohkurano T, Arisumi K, et al. Scale bulblet malformations in Liliun longiflorum during scale propagation[J]. HortScience, 1986, 211, 21(1):150.
- [13] LORETTAB, PATRIZIO CR, CLAUDIAB, FRANCES-COS. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of Liliun[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 74, 74:37-44.
- [14] 黄翔翔,陈 华,刘金燕,等.东方百合鳞片扦插繁殖研究[J].中国农学通报,2005(10):273-275.

刊名: [西北农业学报](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名: [ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)
年, 卷(期): 2009, 18(6)
被引用次数: 4次

参考文献(10条)

1. 朱勇;侯建雄 [甘肃外繁种子检疫现状及对策](#)[期刊论文]-[植物检疫](#) 2000(03)
2. 黄晓琛;陈青;薛朝阳 [番茄花叶病毒移动蛋白基因转化烟草及在转基因烟草中的表达](#)[期刊论文]-[南京农业大学学报](#) 2001(04)
3. 周雪平;薛朝阳;刘勇 [番茄花叶病毒番茄分离物与烟草花叶病毒蚕豆分离物生物学、血清学比较及PCR特异性检测](#) 1997(01)
4. 于翠;胡东维;董家红 [烟草花叶病毒和番茄花叶病毒在含N基因烟草上的症状差异是由运动蛋白基因决定的](#)[期刊论文]-[中国科学C辑](#) 2004(03)
5. 杨翠云;曹洁;于翠 [烟草环斑病毒的RT-PCR和IC-RT-PCR检测方法研究](#)[期刊论文]-[上海农业学报](#) 2007(01)
6. 杨国慧;张仲凯;崔崇士 [西瓜花叶病毒2号南瓜分离物及其外壳蛋白基因序列分析](#)[期刊论文]-[植物病理学报](#) 2004(01)
7. Martelli G P;Quacquarelli A [The Present Status of Tomato and Pepper Viruses](#) 1983
8. 周一万;陈丽;郝双红 [关中地区番茄病毒病毒原种类调查及药剂防治试验](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2003(04)
9. 苏小记;王亚红;贾丽娜 [氨基寡糖素对番茄主要病害的防治作用](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2004(02)
10. 商明清;魏梅生 [植物病毒检测新技术研究进展](#)[期刊论文]-[植物检疫](#) 2004(04)

本文读者也读过(10条)

1. 周一万, 陈丽, 郝双红, 马志卿, 陈安良, 张兴 [关中地区番茄病毒病毒原种类调查及药剂防治试验](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#)2003, 12(4)
2. 王爱武, 皇甫自起 [番茄病毒病的症状、病原与药剂防治](#)[期刊论文]-[长江蔬菜](#)2010(3)
3. 孙书娥, 朱春晖, 张德咏 [番茄病毒病为害症状及防治方法](#)[期刊论文]-[长江蔬菜](#)2010(7)
4. 何自福, 虞皓, 毛明杰, 罗方芳, 林奕韩, 王穗涛, HE Zi-fu, YU Hao, Mao Ming-jie, LUO Fang-fang, Lin Yi-han, Wang Sui-tao [中国台湾番茄曲叶病毒侵染引起广东番茄黄化曲叶病](#)[期刊论文]-[农业生物技术学报](#)2007, 15(1)
5. 张新宇, 向本春, 黄家凤 [新疆加工番茄病毒病害的调查](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#)2007, 35(18)
6. 赵璇, ZHAO Xuan [番茄病毒病的发生规律及无公害综合治理](#)[期刊论文]-[河北农业科学](#)2008, 12(2)
7. 杜建珍, 江延朝, 刘剑锋, 徐金兰 [菌克毒克防治番茄病毒病试验研究](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#)2000, 16(2)
8. [写给作者的话](#)[期刊论文]-[中国蔬菜](#)2001(3)
9. 吴永汉, 张纯胄, 许方程, 李芳芳, 陈为康, 卢启强, 夏万青 [温州地区番茄曲叶病毒病发生与防治](#)[期刊论文]-[中国蔬菜](#)2007(5)
10. 宋建军, 孙茜, 艾鹏飞, 韩璇璇 [河北省番茄黄化曲叶病毒病的发生与分子诊断](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2009, 37(36)

引证文献(6条)

1. 文朝慧, 何苏琴, 王军平, 庞博 [一例向日葵病毒病的检测与诊断](#)[期刊论文]-[中国植保导刊](#) 2012(10)
2. 林星华, 胡小敏, 王云虎, 陈太春, 李晶, 耿伟华, 安德荣 [捕杀特·黄板对大棚番茄桃蚜及蚜传病毒病的防治效果](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2011(3)

3. [文朝慧](#), [刘志杰](#), [张丽萍](#), [刘箐](#), [王军平](#), [刘雅莉](#), [宋葵](#), [施颖波](#), [侯健雄](#) [甘肃省河西地区辣\(甜\)椒病毒病毒原鉴定](#)[期刊论文]-[中国蔬菜](#) 2010(16)
4. [李芳功](#), [杨芳](#), [冯振群](#), [卢清](#) [4%新奥霉素水剂防治番茄花叶病毒病的田间药效](#)[期刊论文]-[河南农业科学](#) 2013(8)
5. [文朝慧](#), [南志标](#) [甘肃省张掖地区苜蓿花叶病病原的检测](#)[期刊论文]-[草业学报](#) 2015(4)
6. [文朝慧](#), [南志标](#) [甘肃省张掖地区苜蓿花叶病病原的检测](#)[期刊论文]-[草业学报](#) 2015(4)

引用本文格式: [甘肃河西地区番茄病毒病病原种类鉴定](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2009(6)