

云南食用百合病毒病的发生与检测*

王连春, 孔宝华**, 赵丹, 陈海如, 李凡**
(云南农业大学 云南省植物病理重点实验室, 云南昆明 650201)

摘要: 通过田间调查、血清学技术、电镜技术、RT-PCR 技术对侵染云南食用百合的主要病毒进行调查和研究, 结果表明, 食用百合病毒病的症状类型多为花叶, 斑驳或者无症状等类型。病毒种类主要是黄瓜花叶病毒 (CMV), 百合无症状病毒 (LSV) 和百合斑驳病毒 (LMoV)。其中通过 ELISA 检测, CMV 的检出率达到 53.3%, LSV 的检出率达到 46.7%; 通过 RT-PCR 检测, CMV 的检出率达到 60%, LSV 的检出率达到 50%, LMoV 的检出率达到 30%。

关键词: 食用百合; 黄瓜花叶病毒 (CMV); 百合无症状病毒 (LSV); 百合斑驳病毒 (LMoV)
中图分类号: S 436.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X (2009) 04-0518-04

Occurance and Detection of Viruses Infecting Yunnan Edible Lily

WANG Lian-chun, KONG Bao-hua, ZHAO Dan, CHEN Hai-ru, LI Fan

(Key Laboratory for Plant Pathology of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The main viruses infecting the Yunnan edible lily were studied by field investigation, ELISA, Electron microscopy and RT-PCR experiments. The result showed that the main symptoms types of these viruses were mostly mosaic, mottled symptomless and other symptoms. The main kinds of virus were *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Lily symptomless virus* (LSV) and *Lily mottle virus* (LMoV). The results of ELISA showed that the positive rates of CMV and LSV were about 53.3% and 46.7%, respectively. The result of RT-PCR showed the positive rate of CMV, LSV and LMoV were 60%, 50% and 30%, respectively.

Key words: edible lily; *Cucumber mosaic virus* (CMV); *Lily symptomless virus* (LSV); *Lily mottle virus* (LMoV).

食用百合是我国广受欢迎的高档蔬菜, 我国生产、栽培历史悠久。过去只有零星栽培, 随着经济的发展和水平的提高, 种植面积不断扩大, 目前我国形成了规模化生产的格局。生产的大量百合鳞茎, 除内销外, 每年还向日本、东南亚等国出口, 效益十分显著^[1]。云南以姚安、南涧等地为主要食用百合产区, 食用百合产业已经成为当地农民增收致富的主要创收项目。但是,

食用百合以鳞茎留种繁殖, 由于病毒侵染, 导致植株严重矮化, 叶片和茎秆畸形生长, 鳞茎变小, 产量下降, 品种变劣, 病毒在鳞茎中不断积累, 种质明显退化, 导致食用百合品质、产量严重下降, 病毒病问题已经成为制约百合产业的主要问题。全国百合产区病毒病发生范围广泛、危害严重。云南、福建、江苏、陕西等百合产区病毒病的自然发生率一般在 20%~30%, 有的达到 70%

收稿日期: 2008-05-06 修回日期: 2008-06-05

* 基金项目: 云南省科技攻关项目 (2003NG03); 云南省自然科学基金重点项目 (2004C0007Z)。

作者简介: 王连春 (1982-), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事百合病毒的研究。

E-mail: wlcwlc123@163.com

** 通讯作者 Corresponding author: 孔宝华, 女, 教授。E-mail: kongbhkm@126.com。李凡, 男, 教授。

E-mail: fanlikm@126.com

以上, 严重者可达到 80% ~ 90%^[2]。病毒病的问题给百合生产造成了巨大的经济损失, 严重地限制了食用百合产业化发展。

关于百合病毒病的研究, 迄今为止国内外已报道侵染百合的病毒有 20 余种^[2,3]。其中分布广的危害严重的是百合斑驳病毒 (*Lily mottle virus*, LMoV), 百合无症状病毒 (*Lily symptomless virus*, LSV) 和黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)^[4]。国外报道侵染食用百合的病毒有百合 X 病毒 (*Lily virus X*, LVX), 郁金香碎色病毒 (*Tulip breaking virus*, TBV), 还有一些未知的线状病毒^[5,6]。我国仅有邹一平、赵彦杰、赵祖世等^[7,8,9] 研究报道食用百合枯萎病、茎腐病等真菌病害外, 食用百合的病毒病国内尚无系统研究报道。为了发展云南的百合产业, 提高病害管理水平, 有必要研究调查鉴定食用百合的病毒种类, 明确其发生规律, 以便采取合理措施, 控制病毒病的危害。为大规模规范化栽培提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

食用百合品种为川百合, 病株采自云南省昆明、玉溪、南涧、姚安、富源等地。抗血清为 Agdia® 产品, pGEM-T easy vector 试剂盒为 Promega 公司产品, PCR 片段回收试剂盒和限制性内切酶均为 Takara 公司产品, *E. coli* DH5 α 菌株为云南农业大学云南省植物病理重点实验室保存。

1.2 电子显微镜检测

1 g 感病百合叶片加 1 mL PB (pH 7.0), 研磨成粗汁液, 用 3% 的磷钨酸负染液进行常规负染, 日本日立 1200EX 投射电子显微镜观察。

1.3 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)

采用黄瓜花叶病毒抗血清、百合隐症病毒抗血清, ELISA 检测采用双抗体夹心法 (DAS-ELISA)。以试剂盒提供的阳性作为阳性对照, 以健康百合叶片 (于温室内繁殖, 生长期经 ELISA 检测确认未携带病毒的植株) 作阴性对照。实验步骤参考试剂盒说明。

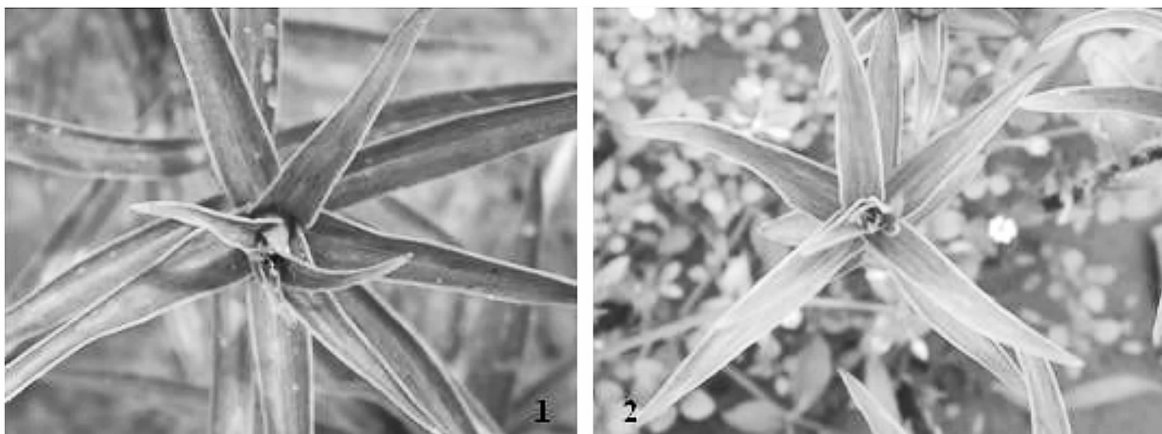
1.4 总 RNA 的提取和 RT-PCR 扩增

采用 Trizol 法, 提取食用百合病株总 RNA。根据 genbank 登录号 AM048875 LMoV 全序列设计 LMoV 引物, 上游 5' CATACCGAAACTTGAACC 3', 下游 5' TAGACACCAACAAGGAGC 3', CMV 和 LSV 分别采用赵丹、孙健^[4,10] 设计的引物, 反转录后进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 症状类型

对百合病毒病的田间调查发现, 病毒侵染百合的田间症状多样, 主要体现在叶、花、茎上。百合病毒侵染形成的主要田间症状类型有花叶、斑驳。绿色和黄色相间的花叶症状主要表现在系统侵染后新长出的叶片上, 严重时百合叶片上会出现疱状花叶、绿岛等。斑驳主要是黄绿相间, 但是黄绿界限模糊, 症状表现较轻如 (图 1)。有时则隐症, 带病毒而不表现症状。



1. CMV 侵染食用百合的症状; 2. LMoV 侵染食用百合的症状
1. symptom of edible lily infected by CMV; 2. symptom of lily infected by LMoV.

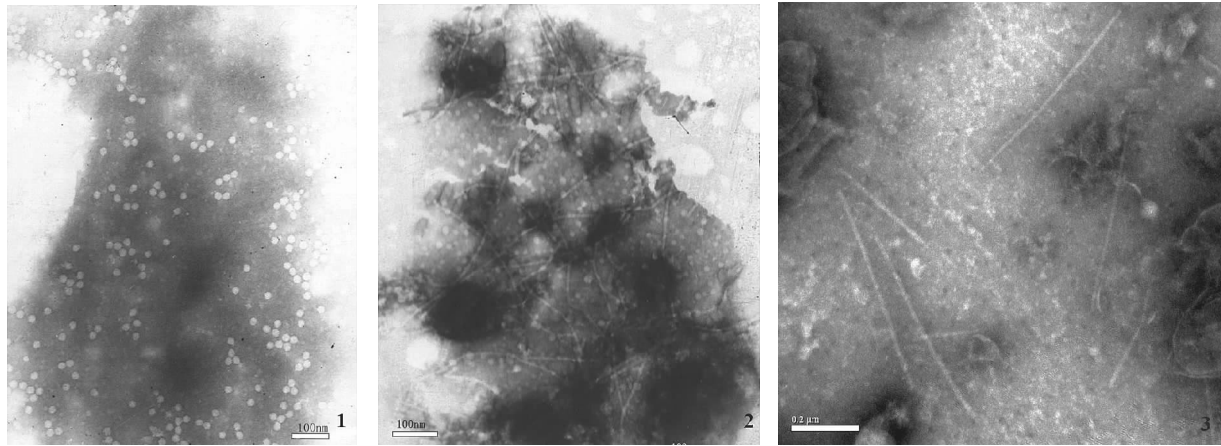
图 1 CMV 和 LMoV 侵染食用百合的症状

Fig. 1 Symptom of CMV and LMoV

2.2 病毒粒子形态

用 2% 的磷钨酸 (PTA) 负染后, 进行电镜

观察, 电镜下观察到主要病毒粒子形态 (图 2), 以线状、球形为主, 偶尔发现杆状病毒粒子。



1. 黄瓜花叶病毒的病毒粒子; 2. 百合无症病毒的病毒粒子; 3. 百合斑驳病毒的病毒粒子
1. CMV virions; 2. LSV virions; 3. LMoV virions

图 2 侵染食用百合的各种病毒粒子形态

Fig. 2 Virions under electronic microscope with negative stain

2.3 ELISA 检测结果

采用双抗夹心法 (DAS - ELISA), 对来自田间的 120 个食用百合样品进行 CMV 和 LSV 抗血清的检测, 抗原、抗体各稀释 200 倍。检测结果表明 120 个样品中有 64 株与 CMV 抗体呈阳性反应, 检出率为 53.3%; 56 株与 LSV 抗体呈阳性反应, 检出率为 46.7%。同时与 CMV 抗体和 LSV 抗体呈阳性反应的有 24 株, 复合侵染率为 20%。(表 1)。

表 1 利用 ELISA 检测百合上发生的 2 种主要病毒

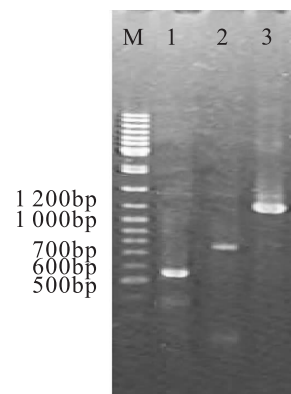
Tab. 1 Detection of Lily main viruses by ELISA

病毒种类 type of virus	受侵染株数/株 number of infected plants	检测株数/株 number of detecting plants	检出率/% positive rate
黄瓜花叶病毒 CMV	64	120	53.3%
百合无症病毒 LSV	56	120	46.7%
黄瓜花叶病毒 + 百合无症病毒 CMV + LSV	24	120	20%

2.4 RT-PCR 检测结果

采用 RT-PCR 方法, 对来自田间的 60 个食用百合样品进行 CMV, LSV 和 LMoV 3 种主要病毒的检测, 电泳后分别得到了 550 bp, 750 bp 和 1 200 bp 左右的核酸目的条带 (图 3)。3 种病毒

分别检测出 36 株, 30 株和 18 株。检出率分别为 60%, 50% 和 30%。



M. DNA Marker; 1. CMV 的 RT-PCR 产物;
2. LSV 的 RT-PCR 产物; 3. LMoV 的 RT-PCR 产物。

M. DNA Marker; 1. RT-PCR product of CMV;
2. RT-PCR product of LSV; 3. RT-PCR product of LMoV.

图 3 CMV, LSV 和 LMoV 侵染食用百合的 RT-PCR 检测结果

Fig. 3 Detection CMV, LSV and LMoV from edible lily by RT-PCR

3 讨论与结论

云南食用百合栽培和产业发展很快, 但是病毒病问题已经成为制约食用百合栽培和产业发展的根本问题。本研究明确了侵染云南食用百合的优势病毒种类主要是 CMV 和 LSV, 而 LMoV 发生较少。CMV 和 LSV 复合侵染发生比较普遍。

CMV 可侵染 36 科双子叶植物和 4 科单子叶

植物约124种植物,可通过蚜虫和摩擦传播,有60多种蚜虫可传播该病毒。LSV 归属为香石竹潜隐病毒属,叶片上一般不产生任何特殊病斑,常与黄瓜叶病毒复合侵染,云南省各百合栽培基地普遍发生,可通过汁液、桃蚜和百合西圆蚜传播^[11],发病率40%~50%。LMoV 只侵染百合属和郁金香属的植物,主要通过汁液和蚜虫传播,其中桃蚜最为主要,鳞茎也能传递病毒。几种主要病毒都能通过接触传播,在鳞茎中积累,因此,在防治食用百合病害的措施和策略上可以选用健株的鳞茎繁殖,设立无病留种地,使用种苗健康检测,使用健康种苗。发现病株及时拔除,有病株的鳞茎不得用于繁殖。在百合生长期及时喷洒10%吡虫啉可湿性粉剂1500倍液或50%抗蚜威超微可湿性粉剂2000倍液,控制传毒蚜虫,减少病毒病的传播蔓延^[12]。这些措施对有效控制食用百合病毒病,确保食用百合的健康生长和丰产都有重要的意义。

观赏百合上也存在 LMoV, CMV 和 LSV, 但是,病毒来源不同,观赏百合主要来自进口,而本地百合在云南种植历史悠久,百合在多年生的鳞茎中不断繁殖、积累,这势必引起病毒的变异,观赏百合与食用百合分子变异的差别,致病性的差别值得深入研究和探讨。

[参考文献]

- [1] 王燕. 我国百合产业现状及其发展对策 [J]. 湖南农业科学, 2007, (5): 150-152, 156.
- [2] 王继华, 唐开学, 张仲凯, 等. 百合病毒及脱毒检测进展 [J]. 北方园艺, 2004, (6): 73-75.
- [3] ASJES C J. Control of aphid-borne Lily symptomless virus and Lily mottle virus in Lilium in Netherlands [J]. Virus Research, 2000, (21): 23-32.
- [4] 赵丹. 云南百合病毒病发生特点和主要病毒 CP 基因的序列分析 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2007.
- [5] HAGITA T, SASAKI J, MUKOHARA M. Lily Virus X Isolated from Necrosis of the Edible Lily, *Lilium leichtlinii* var. *Maximowiczii* Baker [J]. Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan, 2000, (51): 98-103.
- [6] HAGITA T, SASAKI J. Occurrence of Necrosis of Edible Lily (*Lilium leichtlinii* var. *Maximowiczii* Baker) Caused by Mixed Infection of Tulip Breaking Virus (TBV) and Unidentified Filamentous Virus in Hokkaido [Japan] [J]. Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan, 1994, 45: 67-71.
- [7] 邹一平, 晏文武, 周蓉. 食用百合枯萎病综合防治研究 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33 (12): 2294-2295.
- [8] 赵彦杰. 食用百合茎腐病的发生规律及综合防治 [J]. 中国蔬菜, 2005, (8): 50-51.
- [9] 赵祖世, 高丽萍, 李兴芳. 兰州食用百合无公害标准化生产技术 [J]. 长江蔬菜, 2003, (11): 18-19.
- [10] 孙健. 侵染百合的主要病毒的检测及其分子生物学的研究 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2006.
- [11] 王继华, 瞿素萍, 孔宝华, 等. 百合无症病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2004, 19 (2): 148-173.
- [12] 孔宝华, 蔡红, 陈海如, 等. 花卉病毒病及防治 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 167-173.