

加工番茄上 CMV 与 BBWV 的 ELISA 检测及相关性分析

许文博, 阮涛, 黄家凤* (石河子大学绿洲农作物病害防控重点实验室, 新疆石河子 832003)

摘要 [目的] 探讨加工番茄上 2 种病毒的侵染方式及其积累量的相关性。[方法] 以黄瓜花叶病毒(CMV)和蚕豆萎蔫病毒(BBWV)为研究对象,用针对 CMV 和 BBWV 的单克隆抗体对田间表现病毒病症状的 115 个加工番茄自然病株进行间接 ELISA 检测,通过复合侵染病株上 2 种病毒的积累量分析两者之间的相关性。[结果] CMV 和 BBWV 在加工番茄上的侵染率分别为 73.0% 和 59.1%, 并且 2 种病毒常复合侵染,复合侵染率达 53.9%。BBWV 单独侵染率很低,其侵染方式主要是与 CMV 复合侵染。CMV 和 BBWV 在病株上的带毒量分析结果表明,2 种病毒在病株上的积累是相互影响的,为正相关关系。[结论] 该研究为病毒互作机制研究提供了理论基础。

关键词 加工番茄;CMV;BBWV;复合侵染;ELISA

中图分类号 S436.412 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)13-06030-02

Virus Detection by ELISA and Correlation Analysis on CMV and BBWV in Processed Tomato

XU Wen bo et al (The Key Laboratory for Prevention and Control of Oasis Gop Disease, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract [Objective] The aim was to discuss the infection way of 2 viruses in the processed tomato and the correlation of their accumulation. [Method] With Cucumber mosaic virus (CMV) and Broad bean wilt virus (BBWV) as studied objects, 115 natural diseased plants of processed tomato showing virus disease symptom were detected by indirect ELISA using monoclonal antibodies against CMV and BBWV, and the correlation between the 2 viruses was analyzed through their accumulation in the diseased plants with mixed infection. [Result] The infection rate of CMV and BBWV in the processed tomato were 73.0% and 59.1%, respectively, the 2 viruses often mixed infect and the co-infection rate was 53.9%. The single infection rate of BBWV was low and its infection way was mainly mixed infection with CMV. The analysis result on virus carried amount of CMV and BBWV in the diseased plants showed that the accumulation of the 2 viruses in the diseased plant was interactional and had positive correlation. [Conclusion] The research laid the theoretical foundation for the study on the mechanism of interaction of virus.

Key words Processed tomato; CMV; BBWV; Mixed infection; ELISA

新疆是我国最大的加工番茄种植和加工基地,占全国生产能力的 90% 以上。近年来,由于病毒病危害,严重影响了加工番茄的品质和产量。在新疆奎屯、石河子、玛纳斯等产区,每年 6~8 月份病毒病发生普遍,严重的地块发病率高达 100%。据报道,危害新疆加工番茄的主要病原是烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)、番茄花叶病毒(Tomato mosaic virus, ToMV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)和马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY),并且均有不同程度的复合侵染^[1-2]。病毒复合侵染时有多种作用方式,包括干扰作用、交叉保护作用、协生作用等。协生作用是指 2 种异源病毒相互作用,产生比其中任何一种病毒单独侵染更加严重的症状^[3-4]。植物病毒协生现象在自然界广泛存在,至少存在于 16 个病毒属 34 种病毒中^[5]。笔者以近年加工番茄上日益严重的病毒性坏死条斑病中分离到的 CMV 和蚕豆萎蔫病毒(Broad bean wilt virus, BBWV)为研究对象,利用针对 CMV 和 BBWV 的单克隆抗体通过 ELISA 检测对田间自然发病的坏死条斑病株进行大量测定,通过复合侵染病株上 2 种病毒的积累量分析两者之间的相关性,为病毒互作机制提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 毒源和品种 2007 年 8 月从石河子大学实验站种植的不同品种的自然发病田,随机采集感病程度不同的坏死条斑型症状的病株。所用品种或材料有:新番 4 号、石番 20B、AS9081、美国世纪红、里格 87-5、屯河 34、Q027、石番 3、石番 4、石番 8、石番 9 和石番 98-1。

1.2 供试抗血清 CMV、BBWV 的单克隆抗体由浙江大学

基金项目 教育部“春晖计划”项目(Z2005-2-83004);石河子大学高层次人才科研启动基金(RCZX200516)。

作者简介 许文博(1980-),男,宁夏西吉人,硕士研究生,研究方向:植物病毒及其病害。* 通讯作者,副教授。

收稿日期 2009-02-19

生物技术研究所周雪平教授惠赠。辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司;酶联免疫板(costar 3590)购自美国 Corning 公司;ELISA 检测仪为日本 HIO RAD Model 550。

1.3 抗原制备 将田间采集到的病株叶片在研钵中磨碎,用 0.1 ml/L 的磷酸缓冲液按 1:10 的比例稀释,4 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液备用;同时制备防虫温室播种的不同品种的健康加工番茄的提取液作阴性对照。

1.4 ELISA 操作步骤 采用间接 ELISA 方法,用稀释的待测抗原包被微量反应板 16~18 h,封闭后,加适量稀释的被测抗原的单克隆抗体,反应后再加适当浓度的酶标抗体,经 TMB 底物反应显色,加 2 ml/L 硫酸终止。然后在 HIO RAD Model 550 酶联免疫检测仪上,于 490 nm 处,以空白对照孔调零后测各孔 OD 值,以 $P/N > 2.0$ 作为阳性判断标准(P 为待测样品 OD 值, N 为阴性对照 OD 值)。每个样品设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 CMV 和 BBWV 的带毒率检测 分别用 CMV 和 BBWV 的单克隆抗体对田间自然发病的加工番茄病样进行了 ELISA 带毒检测。对供试的 115 个病株的检测结果表明,CMV 的侵染率为 73.0%,BBWV 的侵染率为 59.1%,CMV 与 BBWV 2 种病毒的复合侵染率为 53.9%,CMV 和 BBWV 的单独侵染率分别为 19.1% 和 5.2%。由此说明,复合侵染在田间自然病株上发生普遍,BBWV 单独侵染率很低,其侵染方式主要是与 CMV 复合侵染。从不同供试品种或材料的带毒情况看(表 1),CMV 和 BBWV 2 种病毒在屯河 34 上的复合侵染率最高,为 100%;在石番 8 上的复合侵染率最低,为 20%。除了石番 3 外,在其他品种或材料上,BBWV 侵染方式主要是与 CMV 复合侵染。

2.2 复合侵染病毒之间的关系 从不同品种复合侵染病株的带毒量($P/N > 2.0$)检测结果发现,CMV 带毒量高,则 BBWV 带毒量也高,反之,亦然(图 1)。为了更好地反映复合侵染病

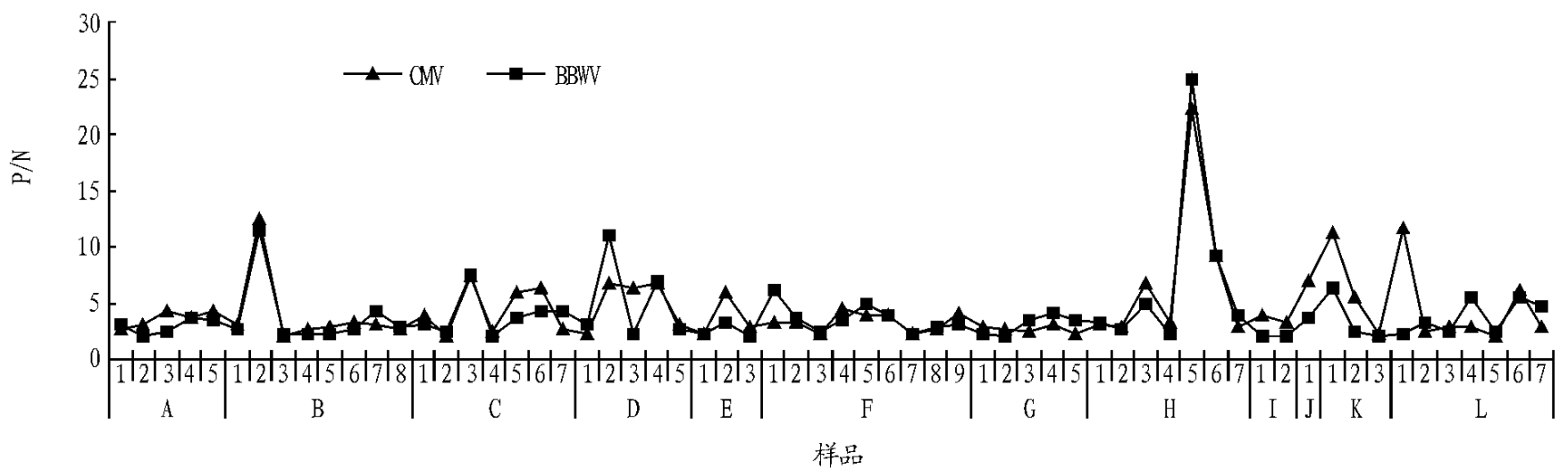
株上CMV 和BBW 2 种病毒之间的相互关系,运用Eviews3.0 分析2 种病毒间的数量关系,借助加权最小二乘法(WLS),以

表1 样品带毒率及混合侵染率

Table 1 The viruliferous rate and mixed infection rate of samples

%

样品名称 Name of samples	BBW	CMV	混合侵染率 Mixed infection rate	样品名称 Name of samples	BBW	CMV	混合侵染率 Mixed infection rate
新番4 号 Xrfan 4	62.5	87.5	62.5	Q027	55.6	77.8	55.6
石番20B Shifan 20B	61.5	61.5	61.5	石番3 Shifan 3	75.0	66.7	58.3
AS9081	87.5	100	87.5	石番4 Shifan 4	25.0	75.0	25.0
美国世纪红 Red certury	63.6	45.5	45.5	石番8 Shifan 8	20.0	40.0	20.0
里格87-5 Liger 87-5	42.8	85.7	42.8	石番9 Shifan 9	42.8	57.1	42.8
屯河34 Tunhe 34	100	100	100	石番98-1 Shifan 98-1	50.0	77.8	38.9



注:A. 新番4 号;B. 石番20B;C. AS9081 ;D. 美国世纪红;E. 里格87-5;F. 屯河34;G. Q027 ;H. 石番3 ;I. 石番4 ;J. 石番8 ;K. 石番9 ;L. 石番98-1 .

Note : A, Xrfan 4 ;B, Shifan 20B ;C: AS9081 ;D, Red certury ;E, Liger 87-5 ;F, Tunhe 34 ;G: Q027 ;H, Shifan 3 ;I, Shifan 4 ;J, Shifan 8 ;K, Shifan 9 ;L, Shifan 98-1 .

图1 BBW 和CMV 在加工番茄不同品种上的带毒量情况

Fig.1 The viruliferous amount of BBW and CMV on different cultivars of processing tomato

复合侵染病株上BBW 与CMV 之间的数据模型为:

$$BBW = 0.244167 + 0.862225CMV$$

$$(7.010454) \quad (72.39981)$$

$$\bar{R}^2 = 0.999286, F = 5241.733$$

式中,括号内的数字是各参数的t 检验值。从各参数的t 检验值 \bar{R}^2 值及F 值可以看出,方程拟合得非常好,可信度很高。由于所选用的样本属于大样本,根据2 倍t 法则(当样本30 时,只要计算的参数的t 值大于2,则该参数是显著的),CMV 和BBW 之间的影响是显著的,是可信的。模型中的BBW 是因变量,CMV 为自变量,当CMV 增加(减少)一单位时,BBW 增加(减少)0.862225 单位。由此可知,BBW 与CMV 之间是相互有影响的,为正相关关系,这与图1 中反映出来的关系相一致。

3 结论与讨论

通过EISA 检测结果表明,CMV 和BBW 是引起新疆加工番茄病毒病的2 种主要病原,并且常以复合侵染的方式危害植株。通过软件分析发现,复合侵染病株上CMV 和BBW 之间为正相关关系,即2 种病毒在病株间的作用是协生作用。协生作用的结果主要表现在病害症状加重,如PVY 和PVX 的复合侵染与单独侵染相比使烟草植株症状明显加重^[6-7]。该研究拟合的数据模型以量化的形式从宏观上说明CMV 和BBW 2 种病毒相互协生,是造成田间新疆加工番茄坏死条斑型病毒病的主要原因,这与田间所表现的坏死条斑型症状是危害最重的致病类型相一致。

目前有关复合侵染病毒之间发生协生作用的分子机制

是,病毒编码的基因沉默抑制子(suppressors) 抑制了植物的抗病机制。植物本身具有天然的抗病毒能力,其机制是通过转录后基因沉默(PTGS) 降解侵入寄主植物体内的病毒RNA。PVX 和PVY 复合侵染烟草时,PVY 在复合侵染植株中的浓度与在单独侵染植株中相比,没有明显的变化,而PVX 在复合侵染植株中的浓度明显高于在单独侵染植株中的浓度^[6-7]。其作用机制是PVY 的HC pro 蛋白是PTGS 的抑制子,PVY 的提前侵染可能抑制了PTGS,使植物丧失了天然抗病毒的能力,当随后的PVX 再侵染时就可迅速而大量地繁殖^[8-9]。同理,CMV 编码的2b 蛋白也是基因沉默抑制子^[10],当CMV 和BBW 复合侵染加工番茄时,2b 蛋白抑制了寄主的基因沉默,使得BBW 在寄主体内迅速积累起来,从而使BBW 在田间的复合侵染远远高于单独侵染。

参考文献

- [1] 姜玉霞, 向本春, 安仙丽, 等. 新疆加工番茄上番茄花叶病毒的分子鉴定[J]. 新疆农业科学, 2008, 45(3): 484-489.
- [2] 常波, 向本春, 刘升学, 等. 新疆加工番茄条斑坏死病原黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的克隆和序列分析[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2006, 24(4): 410-414.
- [3] DINGS W, SH BJ, II WX, et al. Anirtespecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 7470-7474.
- [4] WANG Y, LEE KC, GABA V, et al. Breakage of resistance to Cucumber mosaic virus by co-infection with Zucchini yellow mosaic virus: enhancement of CMV accumulation independent of symptom expression[J]. Virology, 2004, 149(2): 379-396.
- [5] 鲁瑞芳, 李为民, 彭学贤. 植物病毒协生作用及其分子机理[J]. 中国病毒学, 2001, 16(3): 195-201.

(下转第6041 页)

表1 田园卫生与发病程度的关系

Table 1 Relationship between the field sanitation and incidence degree

处理 Treatment	发病时间 Time of incidence	病情指数 Disease index		
		06-28	07-28	08-28
清理田园卫生并喷药 Clearing field sanitation and spraying insecticide	06-11 ~07-13	3.2	32.8	51.8
清理田园卫生 Clearing field sanitation	06-06 ~06-09	12.7	52.4	60.6
不清理田园卫生 (CK) Without clearing field sanitation	06-01 ~06-03	38.4	63.2	65.9

表2 种植密度与发病程度的关系

Table 2 Relationship between the planting density and incidence degree

密度 株/m ² Density	发病率 % Incidence of disease	病情指数 Disease index	防病效果 % Control effect
240	71.7	27.5	52.7
200	76.2	32.4	44.2
150	89.5	49.7	28.2
100(CK)	92.8	58.1	-

表3 遮阴与发病程度的关系

Table 3 Relationship between the shade and incidence level

栽培方式 Cultivation methods	发病率 % Incidence of disease	病情指数 Disease index	防病效果 % Control effect
盖遮阳网 Sunshade net	54.7	25.4	56.1
与玉米间作 Intercropping with corn	68.2	37.5	35.1
裸地栽培 (CK) Exposed cultivation	89.5	57.8	-

发生时间比清除病残体菌源的龙胆草畦床发病早5~10 d,而且发病程度也不同,其病情指数在发病初期相差较大,分别为38.4、12.7,而清除病残体菌源并喷药保护,初期病情指数仅为3.2。后期由于病原菌大量繁殖,没有喷药保护处理,发病程度与不清除病残体菌源的处理无区别。种植密度与发病程度的关系表现在密度越大,发病越轻,结果表明,以

(上接第6031页)

- [6] ROCHOW WF, ROSS A F. Virus multiplication in plants doubly infected by potato viruses X and Y[J]. *Virology*, 1955, 1: 10-27.
- [7] VANCE V B. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y[J]. *Virology*, 1991, 182: 486-494.
- [8] 郭兴启, 朱常香, 宋云枝. RNA 沉默与植物病毒[J]. *生命科学*, 2002, 14

240、200 株/m² 2 个处理发病较轻,但240 株/m² 处理的单根较细、轻,影响产量,不可取。原因是密度相对大些植株间有相互遮阴的效果,并且叶片相互交错可以阻挡地表病菌的飞溅和传播,从而达到防病的效果。试验中还观察到直播田500~600 株/m² 的密度时,发病较轻。粗糙龙胆草分布于东北三省东部山区,生于草甸、山坡、林缘及灌丛中,喜凉爽、湿润气候,怕干旱和烈日暴晒。因此,人工大面积栽培采取适当遮阴、与玉米间作等措施创造适宜的生长环境,从而提高抗病能力;另外,直射光可以促进分生孢子的形成,增加病原菌繁殖量。值得提出的是盖遮阳网虽然防效较高,但是需要部分费用购买木桩和铁丝等物品,而与玉米间作防效虽低,但种植较容易,比清种增产50%^[4]。根外追肥具有增强龙胆草抗性而减少斑枯病的作用。

表4 根外追肥与发病程度的关系

Table 4 Relationship between the foliage top dressing and incidence level

处理 Treatment	调查株数 株 Amount of investigated plants	发病率 % Incidence of disease	病情指数 Disease index	防病效果 % Control effect
根外追肥 The foliage top dressing	300	68.7	32.9	47.2
CK	300	86.9	62.3	-

(3) 采用适当的栽培防病措施具有一定减轻病害的作用,栽培因素还可以考虑不同土壤、不同品种等对龙胆草斑枯病的影响。当然,对于这类多循环地上部病害还必须结合用代森锰锌等保护性化学杀菌剂加以控制,才能达到理想的防治效果。

参考文献

- [1] 鄢洪海, 夏淑春, 于莉, 等. 龙胆草斑枯病的发生与病原菌鉴定[J]. *植物保护学报*, 1999, 26(4): 315-318.
- [2] 孙华, 张卫东, 李逢春, 等. 龙胆草斑枯病防治药剂筛选初报[J]. *特产研究*, 1995, 17(2): 25-26.
- [3] 孙立晨, 高郁芳, 刘志刚, 等. 防治龙胆草斑枯病药剂筛选试验[J]. *植物保护*, 2006, 32(6): 154-155.
- [4] 肖淑梅, 李润霞, 李秀莲, 等. 玉米与龙胆草间种栽培技术研究[J]. *吉林农业大学学报*, 1995, 17(2): 41-44.
- (1): 9-13.
- [9] JORGENSEN R A, ATKINSON R G, FORSTER R L S, et al. An RNA based information superhighway in plants[J]. *Science*, 1998, 279: 1486-1487.
- [10] LI H W, LUCY A P, GUO H S, et al. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(10): 2683-2691.