

番茄黄化曲叶病毒病抗性材料的筛选鉴定

田兆丰¹, 卢向阳¹, 厚凌宇¹, 罗晨¹, 柴敏²

1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097
2. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097

摘要 为评估新培育番茄栽培品种对番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)的抗性水平,更全面地了解这些品种的抗病性差异,以金棚1号和金曼为感病对照,采用带毒烟粉虱自然传毒方式,对各品种的发病时间、发病率及病情指数等参数进行比较,结合PCR及ELISA对TYLCV的检测结果,综合分析了18个番茄品种对番茄黄化曲叶病毒的抗病性。结果表明,不同品种对TYLCV的抗性差异较大。金棚1号和金曼两份材料发病率都达到100%,病情指数在65.2以上,属于典型的感病品种;秋光15-6、PC-88和秋光69号3份材料发病率和病情指数均为0,属于抗性较高的品种;其他13份材料的发病率和病情指数分别在5.6%~45.2%和2.6~18.0之间,分别表现了不同程度的抗、耐病水平。

关键词 番茄品种;番茄黄化曲叶病毒;抗性鉴定

中图分类号 S432.41

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.12.004

Screening and Identification of Tomato Anti-virus Variety Against Tomato Yellow Leaf Curl Virus

TIAN Zhaofeng¹, LU Xiangyang¹, HOU Lingyu¹, LUO Chen¹, CHAI Min²

1. Institute of Plant & Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture & Forestry Sciences, Beijing 100097, China
2. Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture & Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract To assess the resistance level of the new anti-virus tomato variety against tomato yellow leaf curl virus, the time of the virus affection, the disease incidence and the disease index of 18 tomato varieties are recorded in the field by the natural transmission with Jinpeng 1 and Jinman as the susceptible control. The resistance level is evaluated by PCR and ELISA. It is shown that the resistance varies significantly among the 18 tomato varieties. Two cultivars of Jinpeng1 and Jinman are very susceptible, the disease incidences both reach 100% and the disease indices are both above 65.2. Three cultivars of Qiuguang 15-6, PC-88, and Qiuguang 69 show a high level resistance, the disease incidences and the disease indices are all 0. The rest 13 cultivars show different degrees of resistance levels, the disease incidences and the disease indices are between 5.6% and 45.2%, and 2.6 and 18.0, respectively.

Keywords tomato varieties; tomato yellow leaf curl virus; resistance identification

番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)属于双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*),因该属病毒在自然条件下只能由烟粉虱(*Bemisia tabaci*)以持久方式传播,又被称为粉虱传双生

病毒^[1,2]。番茄黄化曲叶病毒是热带和亚热带地区普遍发生且危害严重的侵染性病害,目前已在地中海、美国、日本等众多国家和地区发生^[3-5]。番茄黄化曲叶病毒1991年在中国广西南宁市郊已有零星发生^[6]。近年来,由于气候变暖和农业

收稿日期:2014-01-27;修回日期:2014-02-25

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201003065);北京市自然科学基金项目(6122017);现代农业产业技术体系北京市创新团队建设专项(blvt-13)

作者简介:田兆丰,副研究员,研究方向为植物病毒及其防治,电子信箱:zhaofengtian2000@yahoo.com;罗晨(通信作者),研究员,研究方向为植物病虫害

及其防治,电子信箱:luochen1010@yahoo.com.cn;柴敏(通信作者),研究员,研究方向为番茄新品种培育,电子信箱:chaimin@nercv.org

引用格式:田兆丰,卢向阳,厚凌宇,等.番茄黄化曲叶病毒病抗性材料的筛选鉴定[J].科技导报,2014,32(12):31-35.

种植结构及耕作制度的改变,烟粉虱在中国北方地区大规模暴发^[6-8],导致番茄黄化曲叶病毒由南至北逐步扩展蔓延开来,危害日益严重^[9,10]。

番茄黄化曲叶病毒病具有发病率高、危害大、防治难、传播效率高等特点^[11,12],选育和使用抗病品种是控制烟草病毒病最经济有效的方法。抗病性强的品种,番茄黄化曲叶病毒病的发病症状轻,对番茄产量和质量的影响显著低于非抗病品种。因此,选育和推广抗(耐)病性较强的优良品种是番茄黄化曲叶病毒病防控的重要措施之一,而抗病性鉴定是番茄新品种选育过程中不可缺少的步骤^[13,14]。

目前,在抗病育种研究方面,国外已经有一些杂交或转基因抗病研究的报道^[15-19]。中国发生番茄黄化曲叶病毒病的时间相对较晚,故开展番茄黄化曲叶病毒病抗病育种研究的时间较短,但目前已经挖掘出了丰富的抗病材料并培育出了一批优良抗病品种^[20]。为更全面地了解这些品种的抗性,本课题组于2012年采用烟粉虱自然接种鉴定的方法,对北京市农林科学院蔬菜研究中心选育和提供的18个番茄品种的抗病性水平进行了综合评价,旨在为抗病品种的利用与合理布局提供科学依据,同时为番茄抗病毒育种的亲本选择提供抗性资源信息。

1 材料与方法

1.1 材料

供试番茄:18个品种,分别为金棚1号、金曼、春展82、棚42、棚55、棚97、秋展126-1、秋展33、秋展32、秋展127-1、秋展128-1、秋展115-2、秋展115-1、秋展115-3、秋光47、秋光15-6、秋光69、PC-88,均由北京市农林科学院蔬菜研究中心番茄育种课题组提供。其中金棚1号和金曼为感病对照,其他品种均为对番茄黄化曲叶病毒病有一定抗性的品种。

DNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;TAS-ELISA检测试剂盒购自安德珍生物技术(北京)有限公司;PCR特异性引物序列根据GenBank的TYLCV基因组保守序列设计,该序列在NCBI的登记号为GU084381,由北京三博远志生物技术有限公司合成。Multiskan MK3-353酶联仪由赛默飞世尔科技有限公司生产。

1.2 番茄的培育及病毒病的传播

实验地点为北京市朝阳区蟹岛蔬菜生产基地。所有实验材料于2012年6月底采取穴盘育苗方式播种于设有30~40目防虫网的日光温室,待幼苗生长至3~4叶期,于2012年7月底移栽于大棚露地,每品种移栽80株左右。番茄移栽后按常规方法施肥和管理,定期观察大棚内外烟粉虱的发生情况,检测了解粉虱带毒情况,同时定时观察和检测TYLCV在番茄上的发生情况。实验在自然虫口密度条件下进行,取样观察期间不使用化学农药。

1.3 PCR对TYLCV的定期检测

番茄幼苗移栽3周后,部分幼苗初显发病症状。因此,分

别在幼苗移栽3、4、5周后对各品种的显症株进行PCR检测:首先提取植物基因组总DNA作为PCR反应体系的模板,提取方法按DNA提取试剂盒的操作步骤进行。PCR引物序列为:TYLCV-R:5'-CCAATAAGGCGTAAGCGGTAGAC-3';TYLCV-F:5'-ACGCATGCCTCTAATCCAGTGTA-3';PCR扩增体系:DNA模板<1 μg,10 μmol/L引物TYLCV-R 1 μL,10 μmol/L引物TYLCV-F 1 μL,2×Master Mix 12.5 μL,加ddH₂O至终体积为20 μL。PCR反应程序:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸30 s,32个循环;72℃延伸10 min,4℃保存。反应完毕后,从PCR产物中取5 μL,以含有核酸荧光染料Gold View的1.0%琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统上观察结果,合成序列大小为543 bp。

1.4 病情调查与分析

幼苗移栽4、5周后对各品种所有植株的发病症状进行病级调查。症状严重程度分为0、0.5、1、3、5、7、9共7个等级,分级标准为:0级:不发病,无症状;0.5级:新叶叶缘轻微黄化或轻花叶;1级:新叶叶缘明显黄化,约1/3叶片黄化,叶变小;3级:1/3~1/2叶片黄化,顶梢叶片进一步变小(约1/2正常叶),病株比健株矮约1/3;5级:1/2~2/3叶片黄化,顶梢叶片细小(约1/3正常叶),病株比健株矮约1/2;7级:整个植株叶片黄化、变小,病株比健株矮约1/2~3/4;9级:植株枯死。由调查结果计算发病率及病情指数。病情指数= $\frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{该病级值})}{\text{调查总株数} \times \text{最高病级数}} \times 100$ 。

1.5 不同番茄品种带毒量的测定

幼苗移栽5周后,对番茄所有品种进行病毒含量水平的酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测,确定TYLCV在不同品种中增殖情况的差异,作为判断各品种抗、耐病程度的指标。

ELISA检测的具体步骤参照TAS-ELISA试剂盒说明书并稍作修改进行,使用酶联检测仪在405 nm下读取吸光值 OD_{405} 。

2 结果与分析

2.1 病情调查及TYLCV的PCR检测

幼苗移栽3周后部分番茄样品PCR检测结果如图1所示。金棚1号、秋展128-1、春展82及金曼4个样品中,秋展128-1只有非常微弱的条带,说明该品种病毒含量低或处于病毒初感染阶段。

幼苗移栽3周后,金棚1号、金曼、春展82、棚42、棚55、棚97、秋展126-1、秋展33、秋展127-1最先检测到感染TYLCV;4周后,秋展32、秋展128-1、秋展115-2、秋光47、秋光15-6检测到病毒的感染;5周后,秋展115-1、秋展115-3、PC-88、秋光69也检测到了病毒的感染(表1)。感染病毒的时间顺序也基本反应了品种对病毒的易感程度。

金棚1号、金曼发病率和病情指数都明显偏高,5周后的发病率达到了100%,病情指数在65.2以上;春展82、棚42、棚

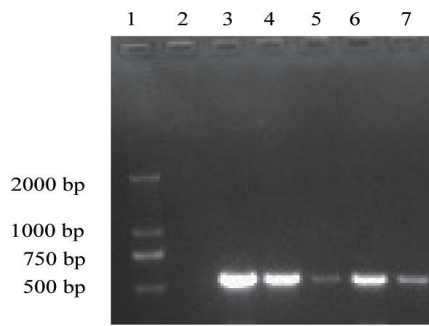


图1 部分番茄品种中TYLCV的PCR检测结果

Fig. 1 PCR results of TYLCV in some tomato varieties

注: 1, DNA marker; 2, 健康对照; 3, 阳性对照; 4, 金棚1号;
5, 秋展128-1; 6, 春展; 7, 金曼

55、棚97、秋展126-1、秋展33、秋展32、秋展127-1、秋展128-1、秋展115-2、秋展115-1、秋展115-3、秋光47于5周后

的发病率在45.2%~5.6%之间,病情指数在18.0~0之间;其余3个品种,秋光15-6、PC-88、秋光69几乎未表现发病症状,发病率和病情指数接近或等于0(表1)。

由幼苗移栽4周和5周后的调查数据可见,各番茄品种的病情发展速度不一致,有些品种的病情指数均有所上升,另外一些品种的病情指数却有所下降(表1)。在最后一次调查中,发病率或病情指数只有轻微上升、甚至有所下降的品种抗、耐病性较强。

综合分析表明,金棚1号、金曼感染病毒的时间早,且最终发病率和病情指数均较高,两者与其他品种的差异明显,是十分典型的感病品种;秋光15-6、PC-88、秋光69这3个品种在PCR检测中都检测到了病毒感染,但获毒明显延迟,而且一直没有表现明显的发病症状,是抗、耐病性较强的高抗品种;春展82、棚42、棚55、棚97、秋展126-1、秋展33、秋展32等13个品种的发病率或病情指数轻于感病品种,表现了一定的抗、耐病性。

表1 不同时期番茄品种病情调查及PCR检测结果

Table 1 PCR results and disease degrees of tomato varieties at different times

品种	果型	PCR反应			发病率/%		病情指数	
		3周	4周	5周	4周	5周	4周	5周
金棚1号	大果	+	+	+	88.6	100	60.5	68.9↑
金曼	小果	+	+	+	78.4	100	53.3	65.2↑
春展82	大果	+	+	+	43.5	45.2	15.5	18.0↑
棚42	大果	+	+	+	36.3	38.8	14.6	15.7↑
棚55	大果	+	+	+	30.8	33.5	10.0	11.6↑
棚97	大果	+	+	+	26.5	30.6	8.3	9.2↑
秋展126-1	大果	+	+	+	25.0	28.4	7.5	5.8↓
秋展33	小果	+	+	+	23.5	23.8	6.6	4.5↓
秋展32	小果	-	+	+	18.0	20.2	6.5	3.9↓
秋展127-1	大果	+	+	+	16.0	18.5	6.5	4.8↓
秋展128-1	大果	-	+	+	15.0	16.2	6.0	4.5↓
秋展115-2	大果	-	+	+	10.5	15.0	5.1	4.3↓
秋展115-1	大果	-	-	+	9.0	13.8	4.0	3.5↓
秋展115-3	大果	-	-	+	5.0	10.0	3.0	2.6↓
秋光47	小果	-	+	+	5.0	5.6	1.0	0↓
秋光15-6	小果	-	+	+	0	0	0	0
PC-88	小果	-	-	+	0	0	0	0
秋光69	小果	-	-	+	0	0	0	0

注: PCR检测样品为3个植株的混合样品。“+”代表检测结果为阳性(带毒);“-”代表检测结果为阴性(不带毒)。

2.2 番茄品种的带毒量

ELISA检测结果如图2所示。金棚1号、金曼病毒含量最

高,说明病毒在这两个品种的植株中增殖较快,结合病情指数分析,这两个为典型的感病品种;秋光47、秋光15-6、PC-

88、秋光 69 品种植株中病毒的含量接近阴性水平,对 TYLCV 表现出较强的抗病性;其余各番茄品种的带毒量介于感病品

种和抗性较强的品种之间,表现了一定程度的抗病性。

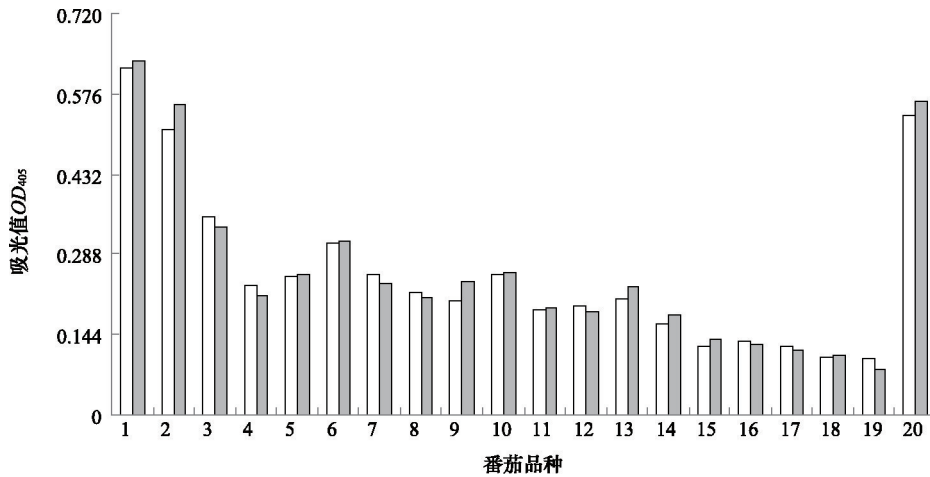


图2 各番茄品种中TYLCV的ELISA检测结果

Fig. 2 ELISA results of TYLCV for each tomato variety

注:图中灰色和白色柱子分别为各个品种的2次检测结果。1~20分别为:金棚1号、金曼、春展82、棚42、棚55、棚97、秋展126-1、秋展33、秋展32、秋展127-1、秋展128-1、秋展115-2、秋展115-1、秋展115-3、秋光47、秋光15-6、PC-88、秋光69、阴性对照、阳性对照

3 讨论

系统、综合地鉴定和评价抗源材料是抗病育种研究工作的重要环节,实验通过带毒烟粉虱自然传毒的方式,明确了18个番茄品种对番茄黄化曲叶病毒的抗病性。鉴定结果表明,不同番茄品种对TYLCV的抗病性存在一定差异。其中,多数小果番茄品种的抗病性比大果番茄的抗病性强。目前,番茄黄化曲叶病毒病在中国发生严重,抗病品种又较为缺乏,对这些品种资源抗病性的了解和鉴定,为综合性状优良的番茄品种的推广和应用提供了必要的依据。

毒源植物、病毒类群、虫媒种类及数量可以直接或间接地影响到番茄的综合抗病性。中国地域辽阔,气候多样,外在环境因子的变化可以影响到番茄内在抗性基因的表达,所以,同一品种在不同省份和不同气候区域的抗病性常表现出一些差异。本实验通过对不同番茄品种的发病时间、发病率、病情指数等参数的比较,结合PCR及ELISA对TYLCV的检测,对18个番茄品种的抗病性进行了综合评价,使鉴定结果更加客观、真实、可靠。

PCR检测的灵敏度较高,可以在病毒感染初期确定不同番茄品种对TYLCV的易感程度。ELISA检测的灵敏度稍低,但可以检测到病毒在植株体内增殖的水平,是抗病品种选育过程中对病毒进行定量检测的有效工具^[21]。实验中,结合PCR及ELISA检测,感病品种感染病毒的时间早,病毒相对含量也较高,抗病品种病毒感染的时间较晚,病毒相对含量也较低。病毒初侵染时间、病毒浓度和植株症状严重性有一定的正相关。几个抗病性较强的品种,秋光15-6、PC-88、秋光

69,虽然检测到病毒的感染,但病毒感染时间最晚,病毒增殖的量也很低,而且没有表现发病症状,属于带毒不显症。

研究发现,TYLCV在感病品种上的症状非常典型,多表现为叶片从外缘向内黄化和卷曲,而多数抗病品种症状轻微,只呈现脉间失绿或轻花叶,有些抗病品种在气候转凉时症状还会消失。另外需要指出的是,大多数抗病品种在不同气候条件下的抗病性是稳定的,但也有一些品种在不同的气候条件下抗病性会有较大差异,这可能是由于某些气候因子会影响番茄抗性基因的表达。

4 结论

通过比较病毒病的发病时间、发病率及病情指数等参数,结合PCR及ELISA对TYLCV的检测结果,对18个番茄品种的抗病性进行了综合评价。

1) 秋光15-6、PC-88和秋光69三份番茄材料发病率和病情指数均为0,属于高抗材料;春展82、棚42、棚55、棚97、秋展126-1、秋展33、秋展32、秋展127-1、秋展128-1、秋展115-2、秋展115-1、秋展115-3、秋光47发病率或病情指数轻于感病品种,感染病毒的时间较晚,病毒含量相对较低,表现了一定的抗、耐病水平。

2) 病毒初侵染时间、病毒在番茄植株内增殖的浓度和植株发病症状的严重性呈一定的正相关。

3) 由病毒初侵染时间、病毒在番茄植株内增殖的浓度以及植株的发病时间、发病率及病情指数等参数对番茄品种抗病性进行综合评价,可以使鉴定结果更加客观、真实、可靠。

参考文献 (References)

- [1] Goodman R M. Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus[J]. *Virology*, 1977, 83(1): 171-179.
- [2] Czosnek H, Ghanim M, Ghanim M. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*: Insights from studies with tomato yellow leaf curl virus[J]. *Annals of Applied Biology*, 2002, 140: 215-231.
- [3] Polston J E, Anderson P K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere[J]. *Plant Disease*, 1997, 81(12): 1358-1369.
- [4] Polston J E, McGovern R J, Brown L G. Introduction of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato[J]. *Plant Disease*, 1999, 83(11): 984-988.
- [5] Wu J B, Dai F M, Zhou X P. First report of Tomato yellow leaf curl virus in China[J]. *Plant Disease*, 2006, 90(10): 1359.
- [6] 张芝利, 罗晨. 我国烟粉虱的发生危害和防治对策[J]. *植物保护*, 2001, 27(2): 25-30.
Zhang Zhili, Luo Chen. Occurrence and control countermeasures of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China[J]. *Plant Protection*, 2001, 27(2): 25-30.
- [7] 周雪平, 崔晓峰, 陶小荣, 等. 双生病毒——一类值得重视的植物病毒[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(6): 487-492.
Zhou Xueping, Cui Xiaofeng, Tao Xiaorong, et al. Geminiviruses: An emerging threat for crop production[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33(6): 487-492.
- [8] 蔡健和, 秦碧霞, 朱桂宁, 等. 番茄黄化曲叶病毒病在广西爆发的原因和防治策略[J]. *中国蔬菜*, 2006(7): 47-48.
Cai Jianhe, Qin Bixia, Zhu Guining, et al. Outbreak causes and prevention strategies of tomato yellow leaf curl virus disease in Guangxi China Vegetables, 2006(7): 47-48.
- [9] 孙海霞, 季英华, 熊如意, 等. 2008年侵染江苏省番茄的粉虱传双生病毒发生分布[J]. *江苏农业学报*, 2009, 25(6): 1278-1281.
Sun Haixia, Ji Yinghua, Xiong Ruyi, et al. Trend of whitefly-transmitted geminivirus on tomato from Jiangsu Province in 2008[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 25(6): 1278-1281.
- [10] 张爱红, 张书敏, 刘帅, 等. 2009年河北省番茄黄化曲叶病毒病发生危害和分布[J]. *植物保护*, 2010, 36(4): 127-129, 137.
Zhang Aihong, Zhang Shumin, Liu Shuai, et al. Occurrence and distribution of tomato yellow leaf curl disease in Hebei Province[J]. *Plant Protection*, 2010, 36(4): 127-129, 137.
- [11] 丁铭, 岳宁, 董家红, 等. 侵染番茄的中国番茄黄化曲叶病毒致病性相关分子的遗传多样性[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2008, 30(S1): 63-68.
Ding Ming, Yue Ning, Dong Jiahong, et al. Genetic diversity of tomato yellow leaf curl China virus associated satellites DNA β infecting *Solanum lycopersicon*[J]. *Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition*, 2008, 30(S1): 63-68.
- [12] Garcia-Andres S, Accotto G P, Navas-Castillo J, et al. Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin[J]. *Virology*, 2007, 359(2): 302-312.
- [13] 周涛, 师迎春, 陈笑瑜, 等. 北京地区番茄黄化曲叶病毒病的鉴定及防治对策[J]. *植物保护*, 2010, 36(2): 116-118, 132.
Zhou Tao, Shi Yingchun, Chen Xiaoyu, et al. Identification and control of tomato yellow leaf curl virus disease in Beijing[J]. *Plant Protection*, 2010, 36(2): 116-118, 132.
- [14] Rubio L, Herrero J R, Sarrio J, et al. A new approach to evaluate relative resistance and tolerance of tomato cultivars to begomoviruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain[J]. *Plant Pathology*, 2003, 52(6): 763-769.
- [15] Vidavsky F, Czosnek H. Tomato breeding lines resistant and tolerant to tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*[J]. *Phytopathology*, 1998, 88(9): 910-914.
- [16] Picó B, Sifres A, Elia M, et al. Searching for new resistance sources to tomato yellow leaf curl virus within a highly variable wild *Lycopersicon* genetic pool[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2000, 22(3): 344-350.
- [17] Ji Y F, Scott J W, Schuster D J. Toward fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato[J]. *Hortscience*, 2009, 44(3): 614-618.
- [18] Ji Y F, Schuster D J, Scott J W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato[J]. *Molecular Breeding*, 2007, 20(3): 271-284.
- [19] Kunik T, Salomon R, Zamir D, et al. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus[J]. *Bio/Technology*, 1994, 12(5): 500-504.
- [20] 叶青静, 杨悦俭, 王荣青, 等. 番茄抗黄化曲叶病毒种研究进展[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(4): 1230-1242.
Ye Qingjing, Yang Yuejian, Wang Rongqing, et al. Progress in research on TYLCD-resistant breeding of tomato[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(4): 1230-1242.
- [21] Wu J X, Shang H L, Xie Y, et al. Monoclonal antibodies against the whitefly-transmitted tomato yellow leaf curl virus and their application in virus detection[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012, 11(2): 263-268.

(责任编辑 王媛媛)

《科技导报》“卷首语”栏目征稿

“卷首语”栏目每期邀请一位中国科学院院士和中国工程院院士就重大科技现象、事件,以及学科发展趋势、科学研究热点和前沿问题等,撰文发表个人的见解、意见和评论。本栏目欢迎院士投稿,每篇文章约2000字,同时请提供作者学术简历、工作照和签名电子文档。投稿邮箱:kjdbjb@cast.org.cn。