

马里兰烟病毒病症状类型、毒源种类及病毒侵染构型研究

许汝冰¹, 李锡宏^{1*}, 睢 韡², 文光红³, 刘圣高³, 黎妍妍¹, 侯明生²

(1.湖北省烟草科研所, 武汉 430030; 2.华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070;

3.宜昌市烟草公司, 湖北 宜昌 443000)

摘要: 湖北五峰县是中国唯一的马里兰烟种植区。2011年在湖北马里兰烟产区进行病毒病发生情况大田调查, 发现主要有花叶、畸形、脉坏死、蚀刻等4种症状类型, 并采用指示植物法对主要症状类型所含病毒的种类进行了鉴定; 对采集的57份病毒病样本采用DAS-ELISA进行病毒种类的鉴定。结果表明, 发生在马里兰烟上的烟草病毒种类包括TMV、CMV、PVX、PVY和TEV, TMV检出率最高, PVY次之; 以2种或2种以上病毒复合侵染方式为主, 其中TMV+PVY、TMV+CMV+PVY共存方式较为常见。

关键词: 马里兰烟; 烟草病毒病; 症状; 病毒种类鉴定; 病毒侵染构型

中图分类号: S572.08

文章编号: 1007-5119(2014)04-0085-03

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2014.04.016

Classification of Virus Disease Symptoms, Kinds of Virus Species and Types of Infection of Virus on Maryland Tobacco

XU Rubing¹, LI Xihong^{1*}, JU Wei², WEN Guanghong³, LIU Shenggao³, LI Yanyan¹, HOU Mingsheng²

(1. Tobacco Research Institute of Hubei Province, Wuhan 430030, China; 2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Yichang Tobacco Company of Hubei Province, Yichang, Hubei 443000, China)

Abstract: Wufeng county in Hubei province is the only Maryland tobacco planting area in China. Maryland tobacco virus diseases were investigated there in 2011. The symptom types of virus diseases could be divided into 4 main kinds, including mosaic, distortion, vein necrosis, etching, which were identified through indication plants for virus species. DAS-ELISA was applied to identify the virus species to the collected 57 samples. It demonstrated that the virus species which infected Maryland tobacco included TMV, CMV, PVX, PVY and TEV. The detection rate of TMV was maximal among all the tested samples, and PVY took the second place. Meanwhile it commonly occurred that two and more kinds of virus co-existed, and TMV+PVY, TMV+CMV+PVY were the main patterns.

Keywords: Maryland tobacco; tobacco virus disease; symptom; identification of virus species; types of infection of virus

马里兰烟是淡色晾烟, 属红花烟草, 因其填充力强, 具有阴燃性好和中等芳香的特点, 是低焦油混合型卷烟的重要原料, 有广阔的开发前景^[1]。在中国, 湖北五峰土家族自治县是全国唯一的马里兰烟原料基地, 在马里兰烟的种植、采收和晾晒等方面都享有相当独特的优势, 一直为“中南海”等混合型卷烟品牌提供优质原料支撑。

在烟叶生产实际中, 烟草病毒病的危害最为严重, 造成的经济损失占有所有烟草病害损失的一半以

上, 对马里兰烟的生产具有极大的威胁。因此, 了解和掌握马里兰烟区烟草病毒病症状类型、病毒种类及病毒侵染方式, 对于指导马里兰烟区烟草病毒病综合防治具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草病毒种类鉴定的样本于2011年采自宜昌五峰县有典型烟草病毒病危害的田块, 采用5点随

基金项目: 国家烟草专卖局项目“全国烟草有害生物调查研究”(110200902065); 湖北省烟草专卖局重大攻关项目“湖北烟草有害生物调查及综合预警网络平台体系建设”(027Y2010-32)

作者简介: 许汝冰, 男, 农艺师, 主要从事烟草植物保护。E-mail: kubingbing@163.com。*通信作者, E-mail: lxh885@126.com

收稿日期: 2013-07-15

修回日期: 2013-12-03

机取样法,品种为马里兰烟 MD609,共采集病毒样本 57 份。

指示植物普通烟 (*Nicotiana tabacum* cv. NC89)、心叶烟 (*N. glutinosa*)、白肋烟 (*N. tabacum* cv.)、黄瓜 (*Cucumis sativus*)、洋酸浆 (*Physalis floridana*)、豇豆 (*Vigna sinensis*)、昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*)、辣椒 (*Capsicum frutescens*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、甜瓜 (*Cucumis melo*)。

抗血清 TMV、CMV、PVX、PVY、TEV 购自安德珍生物技术(北京)有限公司,包被缓冲液、洗脱缓冲液(PBST)、常规提取缓冲液、酶标缓冲液、底物缓冲液按照安德珍生物技术(北京)有限公司提供的配方配制。

1.2 方法

1.2.1 病毒保存 将症状明显的新鲜发病叶片去除大叶脉后,用剪刀剪成细条,经无水氯化钙快速干燥以后,转入装有变色硅胶的试管中,密封后于 4 °C 保存^[2]。

1.2.2 病毒摩擦接种 取少量病毒干燥样品置于研钵中,加入适量接种缓冲液用研棒充分研磨,左手托住待接种叶片,右手用研棒头蘸取研磨后汁液轻轻在喷了金刚砂的叶片上均匀涂抹,观察症状。

1.2.3 病毒种类鉴定 采用双抗体夹心法(DAS-ELISA)^[3]。具体步骤为包被缓冲液稀释包被结合物,每孔加 100 μL,37 °C 孵育 4 h, PBST 洗板 3 次,加研磨样本 100 μL(设置阴性对照和阳性对照),4 °C 过夜, PBST 洗板 3 次,加酶标缓冲液稀释的酶标结合物 100 μL,37 °C 放置 1 h, PBST 洗板 4 次,底物缓冲液加入 pNPP 使终浓度为 1 mg/mL,每孔加 100 μL,放置 1 h,观察颜色变化。若样本颜色与阴性对照一致或浅于阴性对照,则为阴性反应,若深于阴性对照,则为阳性反应。

2 结果

2.1 马里兰烟病毒病症状类型及毒源种类推测

对采集的 57 份病毒病样品症状进行归类,主要分为花叶、畸形、脉坏死、蚀刻等 4 种类型,分别为花叶 47 份,畸形 29 份,脉坏死 8 份,蚀刻 11 份,其他不常见的症状如明脉、闪电斑、疱疹等症状的样本 11 份,分别占采集样本总数的 82.46%、50.88%、14.04%、19.30%、19.30%,并以 2 种或 2 种以上症状的复合表现为主。

用指示植物法对花叶、畸形、脉坏死、蚀刻等主要 4 种症状进行病毒种类鉴定,花叶型和畸形在指示植物上的症状表现基本相同,脉坏死型和蚀刻型在烟草上症状表现差异较大,在其他寄主植物上的症状表现相似(表 1)。根据结果,参照文献[4-5],推断可能含有的病毒种类有 TMV、CMV、PVY、TEV。

表 1 不同类型烟草病毒病样本在鉴别寄主上的症状
Table 1 The symptoms of different kinds of tobacco virus diseases on the identification hosts

鉴别寄主	花叶型	畸形	脉坏死型	蚀刻型
普通烟	M, VC	M, Dis	M, VC, VN	M, E
心叶烟	LN	M, LN	LN	LN
白肋烟	M, LN	M, VC	M, VN	M, ChL
黄瓜	Dis	Dis	NS	NS
洋酸浆	M	M, ChL	LN	NS
豇豆	LN	LN	NS	LN
昆诺藜	LN	LN	LN	LN
辣椒	M, ChL, Dis	M, Dis	M, ChL	M, Wi
番茄	M	M, Dis	NS	NS
甜瓜	M	M	M	NS
推测病毒种类	TMV+CMV	TMV+CMV	TMV+PVY	TMV+TEV

注: M 表示花叶, VC 表示明脉, VN 表示叶脉坏死, LN 表示局部枯斑, ChL 表示褪绿, Dis 表示畸形, E 表示蚀刻, Wi 表示萎蔫, NS 表示无症状。

2.2 病毒种类 DAS-ELISA 鉴定

采用双抗体夹心法(DAS-ELISA)对五峰马里兰烟烟草病毒病样本进行病毒种类鉴定(表 2)。结果表明,在采集的五峰马里兰烟病毒病样本中,检出的病毒种类包含 TMV、CMV、PVX、PVY 和 TEV,其检出率分别为 100%、29.8%、36.8%、94.7%、21.1%, TMV 为优势毒源, PVY 为次优势毒源。

2.3 病毒侵染构型分析

根据病毒种类鉴定结果,对病毒侵染构型进行统计(表 3)。在病毒侵染构型上,具有单一侵染和复合侵染 2 种方式,在采集的病毒病样本中,单一

病毒侵染的样本比例很小, 仅 1 例, 占总样本数的 1.75%, 复合侵染的样本有 56 份, 占总样本数的 98.25%; 在病毒复合侵染方式上, 分为 TMV + PVY、TMV + PVX、TMV + CMV + PVY、TMV + PVX +

PVY、TMV + PVY + TEV、TMV + CMV + PVX + PVY、TMV + PVX + PVY + TEV, 共 7 种, 占总检测样本数的比例分别为 29.82%、3.51%、21.05%、14.04%、10.53%、8.77%、10.53%。

表 2 马里兰烟病毒病病毒源种类 DAS-ELISA 结果

Table 2 The identification results of DAS-ELISA of kinds of tobacco virus diseases of Maryland tobacco

总样本数/个	TMV		CMV		PVX		PVY		TEV	
	样本数/个	检出率/%								
57	57	100	17	29.8	21	36.8	54	94.7	12	21.1

表 3 马里兰烟病毒病侵染构型

Table 3 The types of infection of virus diseases of Maryland tobacco

总样本数/个	TMV		TMV + PVY		TMV + PVX		TMV + CMV + PVY		TMV + PVX + PVY		TMV + PVY + TEV		TMV + CMV + PVX + PVY		TMV + PVX + PVY + TEV	
	样本数/个	%	样本数/个	%	样本数/个	%	样本数/个	%	样本数/个	%	样本数/个	%	样本数/个	%	样本数/个	%
57	1	1.75	17	29.82	2	3.51	12	21.05	8	14.04	6	10.53	5	8.77	6	10.53

注: “%” 为占检测总样本数的比例。

3 讨论

我国自 80 年代初引进马里兰烟, 曾在吉林、河南、安徽、湖北等省试种, 湖北省五峰县试种成功, 并常年种植 500 hm² 左右^[1]。目前, 五峰县是我国唯一的马里兰烟生产基地, 积极开发马里兰烟的生产, 对烟草病害, 尤其是烟草病毒病的普查尤为重要。2011 年对五峰县马里兰烟区大田调查, 发现烟草病毒病症状典型, 表现多样, 以花叶、畸形症状最为常见, 且多伴随脉坏死、蚀刻、明脉、疱疹等病状, 随后采用指示植物法对出现最多的花叶型、畸形、脉坏死型和蚀刻型可能所含的病毒种类进行了鉴定, 推断可能含有的病毒种类为 TMV、CMV、PVY 和 TEV; 在室内对采集的 57 份病毒病样本进行了血清学检测 (选用 DAS-ELISA), 检测出的病毒种类有 TMV、CMV、PVX、PVY 和 TEV 5 种, TMV 检出率最高, 复合侵染检出率达 98.25%, 共有 7 种复合侵染类型。

近年来随着烟草连作障碍的影响, 烟草病毒病发病情况愈发复杂, 病毒病的危害逐渐加重, 症状表现复杂化^[6]。要针对性制定马里兰烟区病毒病综合防治策略, 除了增加检测样本的数量, 将指示植物法、血清学检测、电子显微技术、分子生物学等病毒检测手段有机结合, 保证检测结果的准确和高

效^[7], 还需要从病毒侵染循环、介体传播方式等方面进行深入研究。

4 结论

对湖北五峰马里兰烟区烟草病毒病的发生情况进行大田调查, 初步明确马里兰烟区烟草病毒病的症状类型、病毒种类及病毒侵染方式, 并在马里兰烟上首次检测出了省级检疫病毒——烟草蚀纹病毒, 为今后马里兰烟区烟草病毒病综合防治措施的制定提供更多的理论依据。

参考文献

- [1] 蒋予恩, 戴培刚, 赵传良, 等. 开发马里兰烟, 促进低焦油卷烟发展[J]. 中国烟草科学, 2000, 21 (2): 47-48.
- [2] 熊克娟, 李天宪, 陈绳亮, 等. 常见植物病毒冷冻干燥方法的改进与效果观察[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18 (2): 151-153.
- [3] 郑世玲. 贵州 3 种马铃薯病毒的 DAS-ELISA 检测及分子鉴定[D]. 贵阳: 贵州大学, 2007.
- [4] 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 4-9.
- [5] 王劲波, 王凤龙, 钱玉梅, 等. 山东烟区主要病毒的株系鉴定[J]. 中国烟草学报, 1998 (4): 24-32.
- [6] 刘联仁. 烟草病虫害防治[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [7] 翟玉俊, 刘红海, 李星亮, 等. 烟草病毒检测技术研究进展[J]. 农产品加工学刊, 2009 (4): 83-88.