

番茄斑萎病毒系统侵染我国大蒜

宋晓宇¹, 刘勇^{1,2}, 陈建斌¹, 史晓斌^{1,2*}, 张德咏^{1,2*}

(1. 湖南大学研究生院隆平分院, 长沙 410125; 2. 湖南省农业科学院植物保护研究所, 长沙 410125)

摘要 番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) 是严重危害世界经济作物的一种病毒, 寄主范围广泛。我们在研究中发现番茄斑萎病毒能侵染我国大蒜 *Allium sativum* L.。利用摩擦接种法将 TSWV 接种到健康大蒜上, 结果显示: 接种 14 d 后大蒜新生叶片出现褪绿和白色斑点症状。ELISA 检测显示大蒜叶片汁液与 TSWV 的单克隆抗体产生血清学反应, 采用 TSWV N 基因的引物对大蒜叶片总 RNA 进行 RT-PCR, 结果扩增出约 800 bp 的条带, 在 NCBI 上 BLAST 显示与 TSWV YN5576 的同源性最高, 为 98.52%。这些数据表明番茄斑萎病毒系统侵染我国大蒜。

关键词 番茄斑萎病毒; 大蒜; 鉴定; RT-PCR

中图分类号: S 436.33 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018266

Systemic infection of Chinese garlic by *Tomato spotted wilt tospovirus*

SONG Xiaoyu¹, LIU Yong^{1,2}, CHEN Jianbin¹, SHI Xiaobin^{1,2}, ZHANG Deyong^{1,2}

(1. Longping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha 410125, China;

2. Plant Protection Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) causes severe damages to economic crops worldwide, and it can infect a wide range of plant hosts. To determine whether TSWV infect Chinese garlic, the extracts of *Nicotiana benthamiana* leaves that were infected with TSWV were rub-inoculated to garlic plants. Garlic plants showed chlorotic and white spot symptoms on new leaves at 14 d post inoculation. Then the garlic leaves were detected by ELISA and RT-PCR. Positive results were obtained in the Dot-ELISA of the garlic leaf extracts with monoclonal antibody of TSWV. Furthermore, the target fragments of 800 bp were obtained from all infected garlic leaves by RT-PCR using the specific primers for N gene of TSWV. The sequence of the RT-PCR products from infected garlic leave was analyzed at NCBI, and the results showed that it shared 98.52% of nucleic acids with TSWV YN5576 isolate. Therefore, our results showed that Chinese garlic could be infected by TSWV.

Key words *Tomato spotted wilt tospovirus*; garlic; identification; RT-PCR

番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) 属于番茄斑萎病毒科 *Tospoviridae*, 番茄斑萎病毒属 *Orthotospovirus*, 是世界上最具有经济危害性的十种病毒之一^[1]。TSWV 病毒粒子为直径 80~100 nm 的球形^[2], 基因组由 3 个单链 RNA 组成, 根据分子量的大小从大到小分别为 L RNA(8.9 kb)、M RNA(4.8 kb) 和 S RNA(2.9 kb)^[3-4]。TSWV 可以感染 84 个科 1 090 种植物, 其中包括辣椒、番茄、茄子等农作物, 对农业生产造成严重威胁^[5]。感染 TSWV 的植物症状包括: 叶片叶面皱缩、出现圆环状斑点,

严重者叶片坏死脱落; 根部和茎秆坏死; 植株矮小等^[6]。TSWV 通过蓟马传播, 主要通过西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 以持续循环增殖的方式传播。蓟马在 1 龄若虫时期获毒, 成虫时期传毒^[2]。

大蒜 *Allium sativum* L. 属于百合科 Liliaceae 葱属 *Allium*。我国是世界上最大的大蒜生产国和出口国, 现在大蒜主要分布在山东、河南、云南、四川、江苏等省。已报道的侵染大蒜的病毒主要属于 3 个病毒属, 分别是马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus*、香石竹潜隐病毒属 *Carlavirus* 和青葱 X 病毒属 *Allexivirus*,

且多为复合侵染,国外已有报道表明 TSWV 能够侵染大蒜^[7],但能否侵染中国大蒜尚未有报道。

我们在研究中发现番茄斑萎病毒能侵染中国大蒜。为了确定 TSWV 确实能感染中国大蒜,我们通过汁液摩擦接种的方式对大蒜进行接种,观察其症状,进而通过免疫学、分子生物学的方法对其进行研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大蒜:播种在温室中,温度控制在 $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $75\% \pm 5\%$ 、光照周期 L/D=16 h/8 h,不喷洒农药且保持无病虫害状态。待植株 10 cm 高(约两周)时供试。

TSWV 病毒:2009 年从云南番茄上分离并鉴定,经本氏烟 *Nicotiana benthamiana* 传代。

1.2 汁液摩擦接种

采用人工汁液摩擦接种的方法接种番茄斑萎病毒(TSWV):选取发病明显的本氏烟植株,取顶部发病叶片约 1 g,加入 10 mL 接种缓冲液($0.1 \text{ mol/L Na}_2\text{HPO}_4$, $0.1 \text{ mol/L NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0),研磨充分,在大蒜叶片顶端撒上金刚砂粉末(约 500 目),用棉签蘸取配好的接种液顺着叶脉伸展方向轻轻摩擦叶片,过约 10 min 用清水将摩擦过的叶片清洗干净,共接种 10 株大蒜,以摩擦接种缓冲液作为对照。过 2~3 周观察发病状况。

1.3 TSWV 的 ELISA 检测

选取发病明显的 4 株大蒜,从顶部新叶叶片取 0.1 g 组织,加入 PBS 缓冲液 $500 \mu\text{L}$,旋涡振荡 40 s, 4°C 下 $8\,000 \text{ g}$ 离心 3 min,取上清液。采用上海恒远生物科技有限公司 TSWV ELISA Kit 进行检测。对照设置:取感染 TSWV 的本氏烟叶片作为阳性对照,接种缓冲液的健康大蒜为阴性对照。

1.4 TSWV 的分子生物学鉴定

选取发病明显的 4 株大蒜,从顶部新叶叶片取 0.1 g 组织,采用 TRIzol 法提取总 RNA。取 $5 \mu\text{L}$ RNA 作为模板,采用诺唯赞生物技术公司两步法 RT-PCR/qPCR 试剂盒合成 cDNA。体系 $20 \mu\text{L}$: RNAase-free ddH₂O $2 \mu\text{L}$, RNA 模板 $5 \mu\text{L}$, Random hexamers $1 \mu\text{L}$, $2 \times \text{RT Mix}$ $10 \mu\text{L}$, HiScript II Enzyme Mix $2 \mu\text{L}$ 。反应程序: 50°C 45 min; 85°C 2 min。

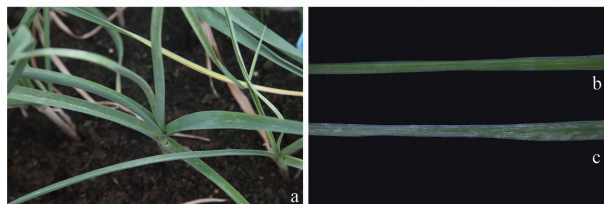
以扩增 TSWV N 基因的特异引物 TSWV-

NF2037: $5' \text{---CTGCTTTTYAAGCAAGTTCTGC---3'}$ 与 TSWV-NR2825: $5' \text{---ATCATCATGTCTAAG---GTTAAGCTC---3'}$ 对 TSWV 的核衣壳蛋白 N 基因进行扩增^[8]。PCR 反应体系 $50 \mu\text{L}$: cDNA $1 \mu\text{L}$, ddH₂O $33 \mu\text{L}$, $5 \times \text{SF Buffer}$ $10 \mu\text{L}$, dNTPs $1 \mu\text{L}$, 上下游引物各 $2 \mu\text{L}$, Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase $1 \mu\text{L}$ 。反应条件为 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 10 s, 50°C 退火 30 s; 72°C 延伸 50 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。取 $5 \mu\text{L}$ PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。根据凝胶成像仪的结果,用 OMEGA 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收,并送生工生物工程(上海)有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 接种 TSWV 后症状观察

摩擦接种约两周后,大蒜叶片背部出现褪绿和白色斑点症状,而用接种缓冲液的对照植株无任何异常症状(图 1)。



a: 发病大蒜植株; b: 接种缓冲液 14 d 后的对照大蒜叶片; c: 用携带 TSWV 的本氏烟汁液摩擦接种 14 d 后表现症状的大蒜新生叶片
a: Infected garlic; b: Leaves of garlic inoculated by buffer at 14 d post inoculation; c: New leaves of garlic inoculated by TSWV at 14 d post inoculation

图 1 大蒜病叶症状

Fig. 1 Symptoms of the infected garlic leaves

2.2 TSWV 的 ELISA 检测

如表 1 所示,经空白对照调零后,阳性对照孔平均值 ≥ 1.00 ; 阴性对照孔平均值 ≤ 0.10 ; 说明试验有效。大蒜样品满足 OD 值高于临界值(CUT OFF)(临界值=阴性对照孔平均值+0.15)和 I/H 值 > 2.5 ,表明检测的 4 株大蒜的叶片均呈现阳性。以上数据说明该样品可能被 TSWV 侵染。

2.3 TSWV 的 RT-PCR 检测

采用 TSWV N 基因的特异性引物对 4 株 ELISA 呈现阳性的大蒜叶片进行 RT-PCR,产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳后,显示接种 TSWV 的大蒜叶片扩增出大约 800 bp 的条带,而接种缓冲液的对照大蒜没有扩增出条带。

表 1 大蒜样品中 TSWV 的 ELISA 检测结果
Table 1 ELISA results of TSWV in garlic samples

参数 Parameter	大蒜样品 Garlic sample				阳性对照 Positive control	阴性对照 Negative control
	1	2	3	4		
OD 平均值 Average OD value	0.327	0.280	0.390	0.354	3.326	0.097
I/H 值 I/H value	3.37	2.89	4.02	3.65		

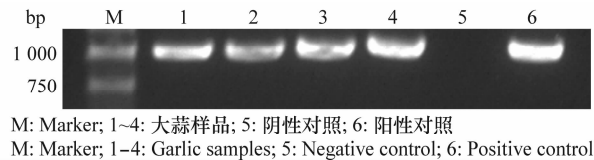


图 2 大蒜样品中 TSWV 的 RT-PCR 检测结果
Fig. 2 RT-PCR results of TSWV in garlic samples

将 PCR 产物割胶回收送上海生工生物工程有限公司测序,结果显示 RT-PCR 扩增产物的长度为 790 bp,在 NCBI 上 BLAST,结果显示,扩增产物与 TSWV 有很高的同源性,其中与云南分离物 YN5576 (GenBank 登录号为:KY495612.1)相似度最高,为 98.52%。说明感染大蒜的病毒为 TSWV。

3 讨论

我国的大蒜产量在全世界居于首位^[9],大蒜也是我国创汇最多的蔬菜产品^[10]。病毒病是影响农作物生产的重要因素,目前尚未有根治病毒病的有效方法,主要还是以预防为主。大蒜主要采取无性繁殖的生殖方式,更容易造成病毒的积累和继代传播,对病毒的抗性逐步降低,最终造成蒜种的严重退化^[11],进而影响大蒜的产量与质量。病毒病现已成为影响我国大蒜生产的重要因素。因此确定侵染大蒜的病毒种类对大蒜病毒病的防治和提高大蒜产量尤为重要。

TSWV 主要通过西花蓟马传播,TSWV 的扩散与西花蓟马的分布密切相关^[12]。我国大部分地区都适宜西花蓟马生存^[13],我国自 2013 年首次在北京地区发现西花蓟马后^[14],山东、吉林、湖南、贵州等地接连报道发现西花蓟马^[15-18]。1986 年在我国南方的花生上首次发现了 TSWV^[19]。随着西花蓟马在我国迅速传播,TSWV 也随着蓟马的传播而迅速扩张至全国,同时 TSWV 对我国农作物危害的面积和程度也在增加。到目前为止,TSWV 在四川、广东、北京、山东^[20-23]等地区均有发现,这与大蒜的主产区高度重合。TSWV 寄主十分广泛,包括辣椒、番茄、花生、马铃薯等农作物。由于我国的地形

与气候特点,我国蔬菜生产主要集中在华北地区、长江中下游地区、四川盆地、华南地区,因此大蒜主产区往往也广泛种植有 TSWV 的寄主农作物,极易造成 TSWV 的跨物种传播。西花蓟马又是为害大蒜的主要害虫,我们检测到 TSWV 可以感染中国大蒜,因此存在 TSWV 在自然条件下通过蓟马跨物种感染中国大蒜的可能。我们的结论可为大蒜病毒病的监测和防治提供参考。

参考文献

[1] TURINA M, KORMELINK R, RESENDE R O. Resistance to tospoviruses in vegetable crops: Epidemiological and molecular aspects [J]. Annual Review of Phytopathology, 2016, 54 (1): 347 - 371.

[2] ROTENBERG D, JACOBSON A L, SCHNEWEIS D J, et al. Thrips transmission of tospoviruses [J]. Current Opinion in Virology, 2015, 15: 80 - 89.

[3] ADKINS S. Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success [J]. Molecular Plant Pathology, 2010, 1(3): 151 - 157.

[4] DE HAAN P, KORMELINK R, DE OLIVEIRA RESENDE R, et al. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase [J]. Journal of General Virology, 1991, 72(9): 2207 - 2216.

[5] 董家红,尹跃艳,徐兴阳,等. 番茄斑萎病毒在云南的发生为害 [C]//吴孔明. 公共植保与绿色防控. 北京:中国农业科学技术出版社,2010:765.

[6] GERMAN T L, ULLMAN D E, MOYER J W. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships [J]. Annual Review of Phytopathology, 1992, 30: 315 - 348.

[7] STANKOVIĆ I, BULAJIĆ A, VUCUROVIĆ A, et al. First report of Tomato spotted wilt virus infecting onion and garlic in Serbia [J]. Plant Disease, 2012, 96(6): 918.

[8] 李洁,迟胜起,杨勤民,等. 山东烟台地区发生番茄斑萎病毒病危害 [J]. 植物保护, 2017, 43(1): 228 - 232.

[9] 管正学,王建立,张学矛. 我国大蒜资源及其开发利用研究 [J]. 资源科学, 1994, 16(5): 54 - 59.

[10] 刘学忠. 我国大蒜国际竞争力的比较分析 [J]. 国际贸易问题, 2007(6): 55 - 61.

[11] BLOCK E. Garlic and other alliums: The lore and the science [M]. Angewandte Chemie International Edition, 2010.

β -tub作为拟盘多毛孢属的辅助条形码,对于个别较难以鉴别的种类,可采取 ITS+ β -tub+EF1- α 序列组合建立分子系统发育树对拟盘多毛孢属物种进行识别。本研究利用 ITS 序列构建病原菌株及相关真菌的系统发育树能很好地将 *P. microspora* 与其他菌株区分开。

传统的拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 分类多数以 Guba^[10] 的检索表为依据,但该检索表存在形态特征重叠严重,种间区别不够明确等不足之处^[11]。拟盘多毛孢属真菌在培养时也会出现同种菌株在不同培养基上的分生孢子长度、顶端附属丝长度、基部附属丝长度等形态指标有明显差异的现象^[12],不同的研究者对同一个种的描述也有差别。在拟盘多毛孢属真菌的分类和鉴定中,应统一培养基和培养条件从而对拟盘多毛孢属真菌进行形态特征的比较并结合形态特征和分子特征进行正确鉴定。迄今为止,国内外未见有小孢拟盘多毛孢 *P. microspora* 引起岗梅枝枯病的报道,该发现为岗梅枝枯病的防治提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] 曾坤,陈良华,丘琴,等. 岗梅根的研究进展[J]. 中国民族民间医药,2012,21(18):28-29.

[2] 黄锦茶,陈丰连,陈海明,等. 岗梅根的化学成分研究[J]. 中草药

~~~~~

(上接 151 页)

[12] NAGATA T, INOUE-NAGATA A K, SMID H M, et al. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for *Tomato spotted wilt tospovirus* [J]. Journal of General Virology, 1999, 80 (1): 507-515.

[13] 程俊峰,万方浩,郭建英. 西花蓟马在中国适生区的基于 CLIMEX 的 GIS 预测[J]. 中国农业科学,2006,39(3):525-529.

[14] 张友军,吴青君,徐宝云,等. 危险性外来入侵生物——西花蓟马在北京发生危害[J]. 植物保护,2003,29(4):58-59.

[15] 郑长英,刘云虹,张乃芹,等. 山东省发现外来入侵有害生物——西花蓟马[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2007,24(3):172-174.

[16] 刘若思,刘燕,王军,等. 重要外来入侵害虫西花蓟马在吉林省部分地区的首次发现[J]. 北京农学院学报,2015,30(2):24-27.

[17] 刘佳,张林,卢焰梅,等. 湖南外来入侵害虫西花蓟马初步调查[J]. 安徽农业科学,2010(25):13800-13801.

药,2012,43(8):1475-1478.

[3] 袁勤峰,郑露,刘浩,等. 广东岗梅枝枯病病原鉴定及生物学特性研究[C]//中国植物病理学会 2015 年学术年会论文集. 北京:中国农业出版社,2015:188.

[4] 何凌冰,吴惠萍,游春平,等. 岗梅枝枯病病原鉴定[J]. 广东农业科学,2017,44(1):111-114.

[5] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社,1998:46.

[6] CHI M H, PARK S Y, KIM S, et al. A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host [J/OL]. PLoS Pathogens, 2009, 5(4): e1000401.

[7] WHITE T J, BRUNS T, LEE S B. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR protocols: A guide to methods and application. San Diego, California, New York: Academic Press Co, 1990: 315-322.

[8] 韦继光. 罗汉松科、山茶科和红豆杉科植物内生拟盘多毛孢的多样性及拟盘多毛孢属分子系统学研究[D]. 杭州:浙江大学,2004.

[9] 宋利沙. 拟盘多毛孢属的分类及分子系统学和分子条形码研究[D]. 南宁:广西大学,2016.

[10] GUBA E F. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia* [M]. U. S. A. : Harvard University Press, 1961: 54-250.

[11] 韦继光,徐同,潘秀湖,等. 拟盘多毛孢属的分类学研究进展[J]. 广西农业生物科学,2006,25(1):78-85.

[12] 韦继光,徐同,郭良栋. 拟盘多毛孢属形态稳定性及分类学意义[J]. 莱阳农学院学报(自然科学版),2006,23(4):280-284.

(责任编辑: 杨明丽)

[18] 袁成明,邹军锐,郑珊珊,等. 西花蓟马在贵阳地区发生危害调查研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2010,35(1):142-145.

[19] 许泽永,REDDY D V R, RAJESHWARI R,等. 我国南方花生发生一种由蕃茄斑萎病毒引起的新病害[J]. 病毒学报,1986,2(3):80-83.

[20] 苏大昆,袁宣泽,谢永红,等. 成都、渡口两市番茄中检出番茄斑萎病毒[J]. 植物病理学报,1987,17(4):255-256.

[21] 饶雪琴,刘勇,李媛媛,等. 广东番茄上检测到 *Tospovirus* 病毒[J]. 植物病理学报,2010,40(4):430-432.

[22] 李飞,吴青君,徐宝云,等. 北京地区发现番茄斑萎病毒[J]. 植物保护,2012,38(6):186-188.

[23] 李洁,迟胜起,杨勤民,等. 山东烟台地区发生番茄斑萎病毒病危害[J]. 植物保护,2017,43(1):228-232.

(责任编辑: 杨明丽)