

宁夏番茄黄化曲叶病毒病分子鉴定及防控措施

沙 龙, 高 艳 明, 李 建 设

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以番茄品种“安娜”、“欧盾”和樱桃番茄品种“KH-1”为试材,采用 PCR 技术对从宁夏采集的 6 份番茄黄化曲叶病样品进行分子鉴定。结果表明:6 份样品全部被番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)侵染。并指出应选用抗性品种、严控烟粉虱发生,以控制番茄黄化曲叶病毒病的发生。

关键词:番茄黄化曲叶病毒病;发生;防治措施

中图分类号:S 436.412.1⁺1(243) **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0119-03

近年来,随着塑料大棚和日光温室在宁夏地区的大面积推广,番茄的种植面积在不断扩大,已成为菜农增收的主要来源之一。据统计,截至 2011 年 5 月,宁夏设施番茄的种植面积已达 1.60 万 hm²,占宁夏设施农业总面积的 15.9%。而病毒病作为影响番茄种植的主要因素,长期限制着番茄产业的发展。自 2011 年在宁夏贺兰县发生番茄黄化曲叶病毒病以后,2012 年永宁县、青铜峡市、中卫市等地也相继发生了该病害,现已蔓延全区,对宁夏的番茄生产造成了重大影响。番茄黄化曲叶病毒病是一种毁灭性病害,该病害是由双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)的番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)引起的,并通过烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播^[1]。最早发现于 1939 年的以色列约旦河一带,1964 年被正式命名为番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)^[2],此后,该病迅速扩散,现已蔓延到中东、地中海沿

岸、东亚、南亚、非洲、欧洲、美国、中美洲、澳大利亚等众多国家和地区^[3-4]。自 1998 年报道我国广西南宁市发现番茄黄化曲叶病害后,在我国上海、浙江、广东、广西、云南、江苏、河南、福建、海南和台湾等地相继发现番茄黄化曲叶病,并且呈由南向北的发展趋势^[5]。该试验着重介绍了该病毒病的发生情况、为害症状、鉴定结果和防治措施,以期对宁夏番茄生产提供指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1 号和 2 号番茄黄化曲叶病样品采自宁夏贺兰园艺产业园科研开发区 2 号温室,番茄品种为“安娜”;3 号、4 号和 5 号番茄黄化曲叶病样品采自宁夏银川市永宁县李俊镇位团村 6 队温室,番茄品种为“欧盾”;6 号番茄黄化曲叶病样品采自宁夏贺兰园艺产业园 C17 号温室,番茄品种为“KH-1”(樱桃番茄)。

Taq DNA 聚合酶购自 MBI 公司。DNA 提取试剂盒购自 Tiangen 公司。克隆载体、感受态细胞等购自 Takara 公司。凝胶回收试剂盒购自 Biotake 公司。其它常规试剂为化学分析纯产品。

1.2 试验方法

番茄叶片总 DNA 提取:采用 Tiangen DNA 提取试剂盒,按照操作说明进行提取。引物设计:检测 TYLCV 病毒的引物参照 GeneBank 上已发表的 TYLCV 病毒的基因组序列设计,预期片段 541 bp。PA:TAATATTAC-

第一作者简介:沙龙(1988-),男,宁夏青铜峡人,硕士,现主要从事设施蔬菜栽培研究工作。E-mail:lantianslong@163.com.

责任作者:李建设(1963-),男,河北藁城人,博士,教授,现主要从事设施蔬菜栽培和生理方面研究工作。E-mail:jslincn@yahoo.com.cn.

基金项目:国家星火计划资助项目(2012GA880002);宁夏科技攻关资助项目。

收稿日期:2013-03-04

Abstract: Taking ‘Xintaimici’ cucumber as material, the strains were separated from vegetable rhizosphere soil and cucumber leaves collecting areas around Xinjiang, and the bio-control agents on cucumber powdery mildew were screened by the method of control effect test in greenhouse and field. The confront culture of bio-control agents and pathogenic fungi was determined by the broad spectrum of bio-control agents. The results showed that a total of 5 strains that control effect on cucumber powdery mildew in field were more than 50%, only 3 strains had certain fungicide broad-spectrum of the 5 strains, among them A-13 and C-1 had the best effect.

Key words: cucumber powdery mildew; bio-control agents; screening; broad spectrum

CKGWKGVCSC; PB: TGGACYTTTRCAWGGBCCT-TCACA; K=G or T, W=A or T, V=A or G or C, S=G or C, Y=T or C, R=A or G, B=G or C or T。引物合成于南京金斯特公司。聚合酶链式反应(PCR):各 PCR 反应程序为:94℃预变性 3 min 后,设 30 个循环,每 1 个循环包括 94℃变性 30 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 1 min。循环结束后 72℃延伸 10 min 以保证获得全长产物。产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外透射仪下观察 DNA 的条带,于 UVP 凝胶成像系统中进行凝胶成像。目标片段克隆与测序:将目标片段割胶之后,采用 Biotake 凝胶回收试剂盒回收,按操作说明进行。目标片段的连接采用 Takara 公司 PMD18-T 载体连接试剂盒将片段连接到 PMD18-T 载体,按操作说明进行。进一步转化大肠杆菌,涂板后 37℃过夜培养。挑取单克隆检测,阳性菌液送上海生工公司测序。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system

试剂名称	试剂用量/ μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶/ $2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	0.2~0.5
正义引物/10 mM	2
反义引物/10 mM	2
DNA 模板	1
10×PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl_2	2
10 mM dNTPs	1.5
ddH ₂ O	补足 25

2 结果与分析

2.1 发生情况与为害症状

因番茄黄化曲叶病毒病的传播途径主要是烟粉虱,而烟粉虱在温暖的条件下活动较为频繁,所以在夏、秋季的发病情况要比在其它季节严重。2011 年夏季,在宁夏贺兰园艺产业园区的日光温室中发现疑似番茄黄化曲叶病毒病的病株,并对部分温室造成毁灭性灾害,以致减产或绝产。2012 年 7 月,通过听取当地农户和技术人员的反映,分别对贺兰县习岗镇经济桥村和新平村设施农业示范园区、永宁县李俊镇位团村、青铜峡市大坝镇蒋南村、中卫市镇罗镇设施蔬菜示范园区进行了调查,发现上述地区都不同程度的遭受了番茄黄化曲叶病毒病的侵害,且为害区域有逐步扩大的趋势,对当地的番茄生产造成了严重损失。发病率一般在 30% 左右,严重的高达 100%。至今,宁夏各设施番茄主栽区域已大面积发生了该病害,对设施番茄的生产和广大菜农的经济效益造成了直接影响。

番茄黄化曲叶病毒病在番茄的开花期、坐果期以及成熟期各阶段都有发病的可能,一般烟粉虱刺吸为害传毒到植株显症的潜伏期在 20~28 d,潜伏期内植株无明显

病征。发病初期表现为植株生长缓慢,矮化情况明显,节间长变短。植株上部比下部变化明显,顶部生长点处叶片皱缩、褪绿发黄、变小,生长点以下叶片向上卷曲、厚度增加、变得脆硬、叶片边缘至叶脉间颜色开始逐渐变黄。发病后期,坐果节位减少,坐果率降低以至减产,果实品质也受到一定影响。

2.2 分子鉴定结果

采用 Tiangen DNA 提取试剂盒提取植物组织 DNA 后琼脂糖凝胶电泳检测。所得植物总 DNA,条带清楚,降解现象不严重,说明 DNA 质量较好,可直接用于 PCR 扩增。以提取的总 DNA 为模板,按照上述 PCR 反应体系进行扩增。每样本同时扩增 2 管。经琼脂糖凝胶电泳检测,6 份样品在紫外灯下都可见目标条带(图 1)。目标条带克隆后测序结果进一步确认 6 份样品全部被番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)侵染。

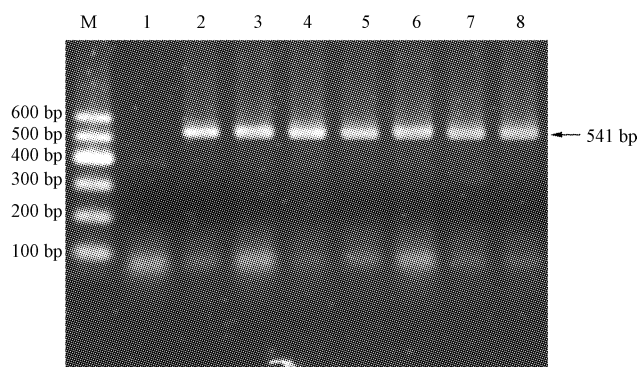


图 1 6 个样品 PCR 扩增结果电泳图

Fig. 1 PCR amplification results electrophoresis pattern of 6 samples

2.3 发生规律

番茄黄化曲叶病毒病作为一种毁灭性病害,具有很强的突发性和为害性,并且传播迅速,难以防治。在自然条件下,该病害不能通过种子、汁液、土壤以及其它害虫传播,只能由烟粉虱传播^[6]。烟粉虱繁殖能力和传播能力都非常强。它的生命周期为 25 d 左右,1 个烟粉虱能产 60 个左右的卵,成虫吸叶汁 1 d 后就具有了传播能力,而每个烟粉虱能感染 300 棵左右的番茄。在设施番茄生产中,番茄黄化曲叶病毒病可在全年发生。而发生的情况与烟粉虱有着很大关系,当气温逐渐升高时,烟粉虱的活动也会逐渐增加。每年春夏茬和夏秋茬发病情况最为严重,7~8 月份为发生盛期。

2.4 防控措施

2.4.1 选用抗病品种 选用抗病品种是防治番茄黄化曲叶病毒病的最经济有效的措施。2012 年在宁夏贺兰园艺产业园区进行了引种栽培试验,选取了国内外 30 多个抗番茄黄化曲叶病毒病的品种,对番茄的生长状况

和产量及品质进行了对比试验,确定了 10 个适宜在宁夏地区栽培的抗 TY 番茄新品种。粉果品种有“卓粉 226”、“卓粉 225”、“欧官”、“库克”、“阿粉达”;红果品种“卓抗 236”、“T-5054”、“阿依莎”、“齐达利”;樱桃番茄“千粉 1106”。以上品种在试验中都表现出了良好的抗病性,春茬最高产量可达 9 500 kg/667m²,并且生长旺盛,果形好,可以在病情严重的地区进行推广。

2.4.2 严控烟粉虱发生 培育无病虫壮苗:苗床的选址一定要远离大田作物,育苗前,要对育苗基质和苗床进行消毒处理,并将苗床周围的杂草、虫子等清除干净。在苗床周围的通风处,要安装防虫网(以 40~60 目为宜)。加强田间管理:第一,定植前,要在上下通风口处安装防虫网,并用药剂对棚室内进行杀虫杀菌处理。第二,及时清除种植区域周围的杂草、病死植株、叶片等,保持周围的清洁环境,减小烟粉虱的寄生可能。第三,适时倒茬轮作,在病毒病发病较严重地区,可以改种一些烟粉虱不喜食的作物,如芹菜、大葱等。第四,在种植区域内可张挂黄板,黄板上端与植株顶部持平时诱杀烟粉虱效果最好。第五,种植时应当避开烟粉虱高发期,以秋茬或冬春茬为宜。另外,如果在植株 3 穗果以上时发病,可将植株顶部发病部位摘除,对番茄生产的影响相对较小。化学防治:移栽前可用 25%阿克泰(噻虫嗪)水分散粒剂 2 000 倍液灌根或移栽时蘸根防治烟粉虱成虫、若虫,发生初期可选用 70%艾美乐 6 000 倍、25%阿

克泰 4 000 倍、0.5%海正三令乳油 1 000 倍、10%吡虫啉 1 000 倍,发生盛期混用 5%锐劲特悬浮剂 1 000 倍防治。要坚持每 7 d 防治 1 次,连续防治 3~4 次。另外,在整个生育期内,可用烟雾剂异丙威·啉螨灵每 7 d 熏 1 次棚室,每 667 m² 用量 200~400 g,也可根据发病的情况适当加减量,苗期酌情减量。用药时,为避免烟粉虱产生抗药性,不同类型的药剂混用要比用单一药剂效果好。

参考文献

- [1] Rybick E P, Briddon R W, Brown J K, et al. Family gemini-viridae[C]// VAN REGE-NMORTELMHV. Virus taxonomy: seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. New York: Academic Press, 2000: 285-297.
- [2] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses[J]. Elsevier, San Diego, 2005: 359-367.
- [3] Boulton M I. Geminiviruses major threats to world agriculture[J]. Annals of Applied Biology, 2003(2): 142-143.
- [4] Moriones E, Navas-Castillo J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide[J]. Virus Research, 2000, 71: 123-134.
- [5] 刘玉乐,蔡健和,李冬玲,等. 中国番茄黄化曲叶病毒—双生病毒的一个新种[J]. 中国科学: C 辑, 1998, 28(2): 148-153.
- [6] 周雪平. 侵染我国番茄双生病毒种类鉴定及致病性分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.

Molecular Identification and Control Suggestion of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) Disease in Ningxia

SHA Long, GAO Yan-ming, LI Jian-she

(College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking tomato varieties ‘Anna’, ‘Oundun’ and cherry tomato variety ‘KH-1’ as materials, the molecular identification of 6 tomato yellow leaf curl disease samples collected from Ningxia were done using PCR technology. The results showed that all the tested tomato varieties were infected by tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). In order to control the tomato yellow leaf curl virus disease, through the selection of resistant varieties and control the whitefly *Bemisia tabaci*, tomato yellow leaf curl virus disease could be controlled.

Key words: tomato yellow leaf curl virus (TYLCV); occurrence; control suggestion