

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2022.03.009

重庆市奉节县烟田秸秆腐殖质所含病毒 及其传毒效率检测

金亚波¹, 何伟光², 王振国³, 陈天才³, 罗建钦¹,
黄崇峻¹, 陈海涛⁴, 冉茂⁴, 孙现超²

1. 广西中烟工业有限责任公司, 南宁 530001;
2. 西南大学植物保护学院, 重庆 400715;
3. 中国烟草总公司重庆市公司奉节分公司, 重庆 奉节 404600;
4. 重庆烟草科学研究所, 重庆, 400715

摘要: 明确烟田腐殖质携带病毒种类及其传播效率, 对于烟田腐殖质处理防治病毒病传播至关重要. 本研究采用 RT-PCR 技术, 检测重庆市奉节地区烟田腐殖质中携带病毒种类, 并种植健康无毒苗于腐殖质中, 检测烟苗带毒情况, 明确腐殖质传毒能力. 结果表明, 重庆市奉节地区腐殖质中烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒带毒率为 100.00% 和 66.67%, 高温待腐熟腐殖质烟草花叶病毒传毒率为 66.67%, 高温腐熟烟草花叶病毒传毒率为 0, 高温待腐熟和高温腐熟黄瓜花叶病毒传播率为 0. 综上所述, 本研究首次明确腐殖质能携带烟草花叶病毒和黄瓜花叶病毒, 且高温腐熟腐殖质能有效抑制烟草花叶病毒传播, 高温能有效抑制黄瓜花叶病毒传播, 为烟田腐殖质处理抑制病毒传播提供科学依据.

关键词: 烟田; 腐殖质; 病毒; 传毒效率

中图分类号: S154.3

文献标志码: A

文章编号: 2097-1354(2022)03-0061-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Virus in Humus of Tobacco Field and Its Transmission Efficiency in Fengjie, Chongqing

JIN Yabo¹, HE Weiguang², WANG Zhenguo³, CHEN Tiancai³,
LUO Jianqin¹, HUANG Chongjun¹, CHEN Haitao⁴,

收稿日期: 2021-11-17

基金项目: 广西中烟工业有限责任公司项目(2021450000340029); 中国烟草总公司重庆市公司科技项目(A20201NY02-1306, B20212NY2312, B20211-NY1315).

作者简介: 金亚波, 高级农艺师, 博士, 主要从事烟草栽培研究.

通信作者: 孙现超, 研究员, 博士.

共同通信作者: 冉茂, 硕士.

RAN Mao⁴, SUN Xianchao²

1. China Tobacco Guangxi Industry Corporation Limited, Nanning 530001, China;

2. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

3. Fengjie Branch of Chongqing Tobacco Company, Fengjie Chongqing 404600, China;

4. Chongqing Tobacco Science Research Institute, Chongqing 400715, China

Abstract: To clarify the types of viruses carried by humus in tobacco fields and their transmission efficiency is very important for the treatment of humus in tobacco fields to prevent the spread of viral diseases. In this study, RT-PCR technology was used to detect the types of viruses carried in the humus of tobacco fields in Fengjie, Chongqing. The healthy virus-free seedlings were planted in the humus to detect the infection status of tobacco seedlings and determine the ability of humus to transmit viruses. The results showed that the detection rate of tobacco mosaic virus (TMV) and cucumber mosaic virus (CMV) in the humus in tobacco fields of Fengjie, Chongqing was 100.00% and 66.67%, respectively. The detection rate of TMV in the humus pre-compost under high temperature was 66.67%. The transmission rate of TMV in the high-temperature composted humus was 0. The transmission rates of CMV in the humus pre-compost under high-temperature and high-temperature composted humus were zero. In conclusion, this study is the first report to confirm that humus can carry TMV and CMV, and high temperature composted humus can effectively inhibit the spread of TMV, high temperature can effectively inhibit the spread of CMV. The findings of this study provided a scientific basis for humus treatment in tobacco field to inhibit the spread of virus.

Key words: tobacco field; humus; virus; infection efficiency

烟草是我国重要经济作物之一。国内有 26 个省(自治区、直辖市)种植了烟草, 长江中下游各个省份均有一定的种植面积^[1]。烟草从种子到成株生长、烟叶加工至烟制品储藏, 都可能受到不同程度的生物和非生物胁迫, 严重影响烟草的质量和品质, 造成巨大的经济损失^[2-3]。烟草病毒病是危害烟叶生产的重要病害, 其中烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV)和马铃薯 Y 病毒(Potato Virus Y, PVY)是危害烟叶生产的三大最主要病毒^[4]。目前烟草病毒病已经严重影响我国烟草生产的发展, 对烟草病毒病的防治已经成为生产上迫切需要处理的问题^[5]。烟草病毒病发生遍及世界各地, 特别是西欧烟区发生更为严重, 中国各大烟区病害发生较重的省份是黑龙江、吉林、辽宁、河南、山东、安徽、四川、广东等, 烟田发病率在 5%~20%, 损失严重^[6]。目前烟草病毒病尚无有效单一防治的措施, 因此针对烟草病毒病的防治应当遵循“预防为主, 综合防治”的重要植保方针, 重点在于减少病毒传染或切断传染途径, 同时运用多种防治方法相互配合共同防治^[7]。曲平治等^[4]、佟英等^[8]研究表明, 病残体是烟草病毒病的主要初侵染源, 但对于烟田腐殖质、土壤等对烟草病毒病的传播没有详细的研究。

多项研究表明病毒传播与土壤生态存在一定关联。荷兰球形装潢作物(Ornamental Bulbous Crops)的土传病毒病害与烟草脆裂病毒(Tobacco Rattle Virus, TRV)、烟草坏死病毒(Tobacco Necrosis Virus, TNV)、南芥菜花叶病毒(Arabis Mosaic Virus, AMV)、烟草环斑病毒(Tobacco Ringspot Virus, TRSV)相关, 并且怀疑与 TMV 也有关。其中 TRV、TNV、AMV 的传播载体为土壤, TRSV 和 TMV 的传播载体还有待确定^[9]。此外, CMV 和 PVY 主要靠蚜虫传播, 但也有研究表明杂草、病残体等也有可能为其传播介体^[10]。了解病毒病的传播途径对于病毒病的防控及防控策略的制订至关重要。

本研究对重庆市奉节地区烟田秸秆腐殖质进行病毒种类检测,并对腐殖质传毒效率进行了分析,明确了高温、腐熟对于腐殖质传毒能力的影响,以为烟田秸秆腐殖质的处理防控病毒病传播提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

2018年8月于重庆市奉节县对烟草秸秆腐殖质进行采集,主要有3个种类:高温腐熟3个、高温待腐熟3个和原料3个.经75%酒精消毒后的无毒健康本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)苗种植于西南大学植物保护学院植物免疫与病害生态防控实验室温室.

1.2 试验方法

1.2.1 RNA快速提取

土壤总RNA的提取采用新型土壤总RNA快速提取试剂盒(离心柱型)(RP7002,百泰克),具体步骤参考试剂盒说明书.植物总RNA采用Trizol提取法(9753A, TaKaRa),具体步骤参考试剂盒说明书.将提取的总RNA进行核酸电泳检测,取9 μL RNA和1 μL 10 \times Loading Buffer,采用北京六一水平电泳系统进行检测.之后,取1 μL RNA,使用Thermo NanoDropOne进行RNA质量评价.

1.2.2 聚合酶链式反应(RT-PCR)

CMV的特异性引物引自杨会房^[11]和潘亚男等^[12]的文献;根据GenBank中已登录的TMV和PVY相应核苷酸序列设计特异性引物如下(表1),引物由华大基因(深圳)合成.

表1 用于RT-PCR扩增的引物序列

引物	引物序列(5'-3')	序列参考
CMV-CPo-F	5'-TCTCATGGATGCTTCTCCGCG-3'	[13]
CMV-CPo-R	5'-GCTCGATGTGACATGAAGT-3'	
TMV-CPo-F	5'-ATGTCTTACAGTATCACTACTCC-3'	KC572629
TMV-CPo-R	5'-TCAAGTTGCAGGACCAGAG-3'	
PVY-CPo-F	5'-GCAAATGACACAATTGATGCAG-3'	AY742733
PVY-CPo-R	5'-TCACAGGTTCTTGACTCCAAG-3'	

采用反转录试剂盒(PrimeScriptTM RT reagent Kit, TaKaRa)对提取的总RNA进行反转录.逆转录PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)反应体系(10 μL): 5 \times PrimeScript Buffer 2.0 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL , Oligo dT Primer 0.5 μL (0.5 mol \cdot L⁻¹), Random 6 mers 0.5 μL (0.25 mol \cdot L⁻¹), RNase Free dd H₂O 4.0 μL , RNA模板 2.5 μL . RT反应程序: 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 合成的cDNA保存在-20 $^{\circ}\text{C}$, 后续用于PCR扩增. PCR反应体系(20 μL): 10 μL 2 \times MasterMix, 0.5 μL Forward primer(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 μL Reverse primer(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1 μL cDNA, 8 μL ddH₂O. PCR反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, T_m 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 循环 34次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 取10 μL PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 带毒率及传毒效率的计算

$$\text{腐殖质带毒率}(\%) = \frac{\text{检测含病毒样品数}}{\text{总的土壤检测样品数}} \times 100\%$$

$$\text{传毒效率}(\%) = \frac{\text{检测含病毒盆栽数}}{\text{总的盆栽数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 腐殖质中主要病毒病原检测

为明确腐殖质的携带病毒情况, 将采集到的腐殖质进行总 RNA 的提取, 并将得到的 RNA 进行核酸电泳以检测其完整性. 试验结果表明, 从土壤中提取的 RNA 质量较完整, 具备 28 S 和 18 S 条带. 之后, 对 RNA 结果进行质量评价, 发现 $A_{280}/A_{260} = 2.16$, 说明 RNA 纯度较佳, 可用于下步试验(图 1).

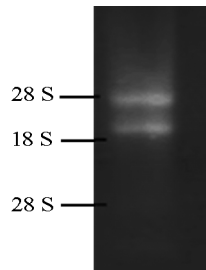
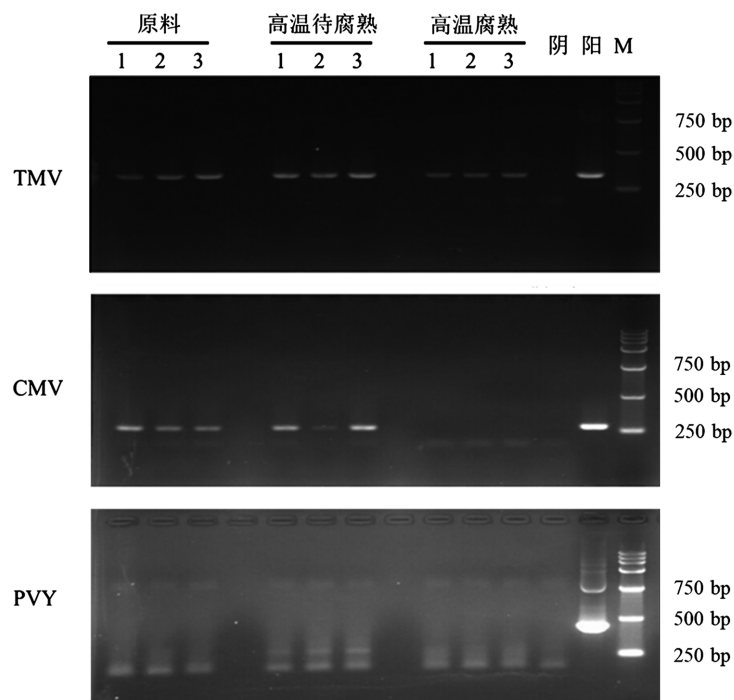


图 1 RNA 质量检测

利用 RT-PCR 检测病毒含量. 在本次检测中, 共从奉节采样了 9 个腐殖质样, 其中秸秆原料中 TMV 检出率为 100%, CMV 检出率为 100%, PVY 检出率为 0. 高温待腐熟样品中, TMV 的检出率为 100%, CMV 的检出率为 100%, 而 PVY 的检出率为 0. 高温腐熟样品中, TMV 的检出率为 100%, CMV 和 PVY 的检出率为 0(图 2). 结果表明, 秸秆原料中不含 PVY, 高温腐熟能抑制 CMV.



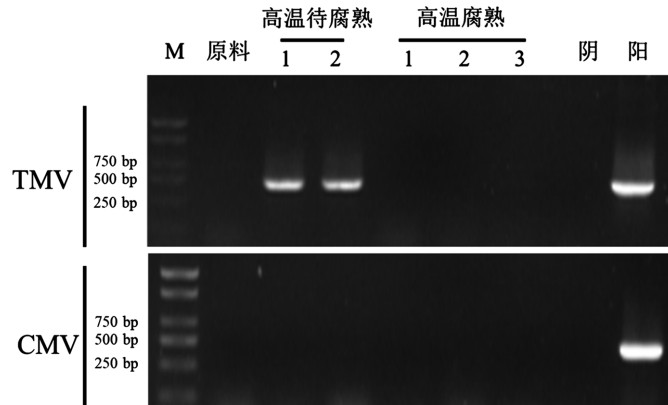
M: Marker 2 000+; 阴: 阴性对照; 阳: 阳性对照.

图 2 腐殖质中 TMV, CMV 和 PVY 检测

2.2 腐殖质传毒效率检测

为进一步确认腐殖质的传毒能力, 选取上述腐殖质样品中的 6 份用于室内盆栽试验, 分别

是原料 1, 高温待腐熟 1,2, 高温腐熟 1,2,3. 在这 6 份腐殖质样品中栽种健康无毒的本氏烟苗, 待烟苗生长至 6 叶期后, 取第二叶位叶片提取总 RNA, 利用 RT-PCR 检测烟苗中 TMV 和 CMV 病毒携带率. 试验结果显示, 从上述盆栽的烟样中检测到有 2 个样品被 TMV 侵染, 即高温待腐熟 1 和 2 号(图 3). 高温待腐熟传毒效率 66.67%, 而高温腐熟传毒效率 0. 共检测的 6 个烟样中均不含 CMV, 表明腐殖质中 CMV 传毒率为 0, 揭示高温待腐熟不能消除 TMV, 而高温腐熟能消除腐殖质中 TMV 病毒.



M: Marker 2 000+; 阴: 阴性对照; 阳: 阳性对照.

图 3 腐殖质盆栽烟中 TMV 和 CMV 检测

对腐殖质带毒及传毒率进行统计, 由结果可知, 奉节地区腐殖质中主要含有 TMV, 并且高温待腐熟和高温腐熟不能消除腐殖质中的 TMV. 腐殖质中含有 CMV, 并且高温腐熟能消除其中的 CMV, 奉节地区腐殖质中不含 PVY. 高温待腐熟腐殖质能传播 TMV, 而高温腐熟不能传播 TMV, 腐殖质高温能抑制 CMV 的传播(表 2).

表 2 腐殖质带毒及其传毒率

检测对象	腐殖质病毒检出率			土壤传毒率		%
	TMV	CMV	PVY	TMV	CMV	
	原料	100	100	0	—	
高温待腐熟	100	100	0	66.67	0	
高温腐熟	100	0	0	0	0	

3 结论与讨论

病毒病的发生流行, 与气候条件、作物品种、农事操作、传播介质等均有密切的关系^[14]. TMV 作为主要的烟草病毒病原, 主要通过烟草植株上的微伤口传播, TMV 本身具有很强的抗逆性, 能侵染寄主环境的植物繁多, 传播性很强, 容易大面积发生^[15], 而 CMV 和 PVY 主要靠蚜虫传播, 但农事操作等同样易造成病毒传播. 因此, 明确烟田病毒的来源至关重要. 通过对重庆奉节地区腐殖质进行病毒种类检测, 发现奉节地区腐殖质中 TMV 的携带率为 100%, 高温待腐熟传毒效率 66.67%, 而高温腐熟传毒效率 0. 奉节地区腐殖质中 CMV 的携带率为 66.67%, 传毒率为 0, 说明高温待腐熟和高温腐熟均不能传播 CMV. 在重庆市奉节地区烟草秸秆腐殖质未检测到 PVY.

从结果可以看出, 重庆奉节地区腐殖质中 TMV, CMV 的含量较高, 不含有 PVY, 说明奉节地区烟草病毒病并非 PVY 引起. 腐殖质中 TMV 的传毒效率因腐殖质的处理方式不同而有

所不同,高温待腐熟处理的传毒效率最高,高温腐熟传毒效率最低,说明高温腐熟手段可有效降低腐殖质中 TMV 的含量.而 CMV 在高温腐熟和高温待腐熟条件下均不可传播,说明奉节地区高温待腐熟腐殖质中的 TMV 是田间传播 TMV 病毒的重要来源,而腐殖质并非是 CMV 的传播方式.

烟田病毒病发生后,会被烟叶带入土壤,带入土壤中的病毒成为下一年烟叶病毒病的病毒来源.本研究对重庆市奉节地区烟田腐殖质进行 RT-PCR 检测其中的 TMV,CMV 和 PVY 含量,并使用无毒本氏烟对其土壤传毒率进行测定.考虑到腐殖质中检测到的病毒可能为非活性病毒,接下来对这些腐殖质的室内传毒率进行测定,发现室内高温待腐熟腐殖质传 TMV 的效率 66.67%,而高温腐熟腐殖质传 TMV 效率为 0,说明高温腐熟可降低土壤中 TMV 传播效率.

刘世超等^[6]的研究指出植烟土壤中的病原真菌、细菌、病毒均能传播病害.关于烟田土壤 TMV 的传播效率问题,至今还未有人进行详细的研究,只是从理论上认为其有传毒功能,并无详细的数据分析为支撑^[16].本研究以数据为支撑,通过详细的试验,发现烟田腐殖质具有一定的传播病毒能力.以重庆市奉节地区为例,发现烟田腐殖质中 TMV 和 CMV 带毒率较高,但传毒率由腐殖质种类不同而不同.这一研究发现提示在综合防治烟草病毒病发生时,应充分考虑土壤因素,及时对土壤进行消毒处理,从根本上遏止病毒病的传播源.

据在多地烟区考察发现,普遍存在烤烟长期连作现象,烤烟长期连作,烟苗根系分泌物积累,残根及植株腐烂分解化感物质,使烟苗生长发育受到抑制,烟苗生长发育迟缓,各项代谢功能下降^[17],同时病毒等大量病原物聚集,使得土壤病残体携带的病毒等病原物更易侵染烟苗,造成严重损失.因此,土壤对烟田烟苗生长至关重要,我们在进行综合防治之时应充分考虑土壤因素对烟苗生长的影响.本研究明确了烟田腐殖质可能作为烟叶病毒病来源之一,同样发现高温腐熟腐殖质能有效降低烟田 TMV 传播,高温腐殖质能有效降低 CMV 传播,为今后烟叶生产腐殖质的处理提供参考.

参考文献:

- [1] 侯明生,黄俊斌.农业植物病理学[M].北京:科学出版社,2006.
- [2] 陈瑞泰,朱贤朝,王智发,等.全国16个主产烟省(区)烟草侵染性疾病调研报告[J].中国烟草科学,1997,18(4):1-7.
- [3] 王承福,赵爽,葛永辉,等.烟草综合利用及研究进展[J].贵州农业科学,2016,44(11):37-41.
- [4] 曲平治,宋娟,丁伟,等.烟草病毒病的主要种类及防治方法[J].植物医生,2014,27(5):48-50.
- [5] ZHOU B G, WANG F, ZHANG X S, et al. Sequencing and Phylogenetic Analysis of Tobacco Virus 2, a Poliovirus from *Nicotiana Tabacum*[J]. Archives of Virology, 2017, 162(7): 2159-2162.
- [6] 刘世超,匡传富,陈德鑫,等.建立并优化检测土壤中病残体中 TMV 的 LAMP 技术[C]//中国植物病理学会学术年会,2015.
- [7] 王秀敏.陕西省烟草病毒病病毒源的鉴定及种群区系的分布[D].杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [8] 佟英,鲁世军,张务水.烟草病毒感染机理及其综合防治[J].中国烟草学报,2003,9(2):39-42.
- [9] ASJES C J. Soil-Borne Virus Diseases in Ornamental Bulbous Crops and Their Control in the Netherlands[J]. Agriculture and Environment, 1974, 1(3): 303-315.
- [10] 朱虹.烟草病毒病检测方法的研究现状[J].科技创新与应用,2019(35):140-141.
- [11] 杨会房.重庆烟草病毒病病原种类鉴定及快速检测技术研究[D].重庆:西南大学,2013.
- [12] 潘亚男,韩剑,吴海波,等.新疆哈密瓜病毒的 DAS-ELISA 检测和分子鉴定[J].园艺学报,43(6):1107-1116.
- [13] 黎建,袁木林.烟草病毒病及其检测鉴定技术[J].南方农业(园林花卉版),2011,5(5):73-75.
- [14] CHEN-CHARPENTIER B, JACKSON M. Optimal Control of Plant Virus Propagation[J]. Mathematical Methods in the Applied Sciences, 2020, 43(14): 8147-8157.
- [15] VAN M M. Impact of Abiotic Stresses on Plant Virus Transmission by Aphids[J]. Viruses, 2020, 12(2): 216.
- [16] 刘世超.土壤中 TMVLAMP 检测技术的建立及土壤传播 TMV 的效率研究[D].重庆:西南大学,2016.
- [17] 李凡,王钰丽,吴德喜,等.烤烟漂浮育苗中普通花叶病的主要传播途径[J].烟草科技,2006,39(10):53-55.