

辣椒病毒病原种类检测初报

陈灵芝, 张 茹, 魏兵强, 王兰兰

(甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 针对甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒组育苗棚、试验地以及近郊辣椒种植田病毒病发病严重问题, 开展了病毒病原种类鉴定, 并比较了双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA)和简易试纸条对同一种病毒的检测结果。结果检测出了 TMV、PVV 和 PVS 3 种病毒, 其中 TMV 为优势种群, 侵染率高达 66.7%, 未发现 CMV 侵染。试验结果表明, DAS-ELISA 法和简易试纸条法对同一种病毒检测结果基本一致。

关键词: 辣椒; 病毒; 检测

中图分类号: S436.418.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)11-0017-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2017.11.006

A Preliminary Report on Detection of Pathogenic Species of Virus Disease in Pepper

CHEN Lingzhi, ZHANG Ru, WEI Bingqiang, WANG Lanlan

(Institute of Vegetables, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: We use DAS-ELISA method to identify the pathogenic virus and compare the result between DAS-ELISA and immunostrip. The result detects three virus: TMV, PVV, PVS, and TMV is the prevalent pathogenic virus, the detection rate is 66.7%. TMV is the dominant species, CMV isn't detected. The detection results between DAS-ELISA and immunostrip is almost accordance.

Key words: Pepper; Virus; Identification

辣椒病毒病是近年来危害辣椒生产的重要病害。植株一旦被病毒感染, 常表现为叶片皱缩、

收稿日期: 2017-06-13

基金项目: 甘肃省农业生物技术研究与应用项目(GNSW-2015-21)。

作者简介: 陈灵芝(1971—), 女, 甘肃靖远人, 研究员, 主要从事辣椒、茄子育种研究, 联系电话:(0931)7616788。E-mail: gschlzh38@sina.com。

数学回归模型: $y = 16.144 + 0.346x_1 + 0.621x_2 + 0.184x_3 + 0.345x_1x_2 + 0.288x_1x_3 - 0.299x_2x_3 - 1.043x_1^2 - 0.327x_2^2 - 0.459x_3^2$ 。通过模型的优化得出, 大肥蘑菇菌丝培养基质的最佳配方为葡萄糖 33.26 g/L、蛋白胨 4.24 g/L、矿物质添加剂用量 1.82 mL/L。采用此培养基, 28 °C 振荡培养 8 d, 菌丝干重可达 16.44 g/L。经过反复试验验证, 该配方正确可行。

参考文献:

- [1] 常 昕. 大肥蘑菇人工栽培关键因素及多糖提取工艺研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [2] 杨 琴, 杜双田, 郜小娟, 等. 博湖大蘑菇蛋白质营养价值评价[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 100-103.
- [3] 杨 琴, 杜双田, 张桂香. 大肥蘑菇矿物质、脂肪酸成分分析[J]. 食品科学, 2013(6): 231-233.
- [4] 吴学明, 王广民. 柴达木盆地野生大肥菇资源调查及人工驯化的研究[J]. 青海师范大学学报: 自然科学版, 1994(4): 49-54.
- [5] 高淑敏. 柴达木盆地野生大肥菇菌种培养基配方筛选

[J]. 园艺与种苗, 2011(2): 52-54.

- [6] 高淑敏. 青藏高原柴达木野生大肥蘑菇驯化研究初报[J]. 食用菌, 2010, 32(3): 14-15; 17.
- [7] LIAQAT M R, ALI M A, KHAN N A, *et al.* Influence of different casing materials on the growth and yield of thermo-tolerant strains of *Agaricus bitorquis*[J]. Pakistan Journal of Phytopathology, 2013, 55(3): 605-11.
- [8] 曾 伟, 宋思扬, 王泽生, 等. 双孢蘑菇及大肥菇的种内及种间多态性 RAPD 分析[J]. 菌物系统, 1999(1): 55-60.
- [9] 杨 琴, 杜双田, 张桂香. 大肥蘑菇营养生理研究[J]. 食用菌学报, 2012, 19(3): 63-68.
- [10] 王连臻, 杜小凤, 吴传万, 等. 应用二次回归正交旋转组合法进行小麦抗低温胁迫复配植物生长调节剂研发[J]. 中国农学通报, 2015(9): 63-67.
- [11] 彭晚霞, 张振巍. 二次正交旋转组设计法优化赤芍醇提工艺[J]. 中药材, 2010, 33(6): 991-994.

(本文责编: 陈 伟)

斑驳、黄化、花叶、坏死、畸形和植株矮化,且发病率极高,传播迅速,易造成严重减产,产量损失在20%~70%^[1]。近几年来辣椒病毒病由原来的次要病害逐渐上升为主要病害,危害逐年加重,严重影响了辣椒的产量、品质^[2-3]。据报道,至少有45种病毒可侵染辣椒和甜椒,且多数国家以烟草花叶病毒(*Tobacco mosaicvirus*, TMV)和黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)侵染最为普遍^[4-7]。在我国已鉴定出病毒种类有15种,多数地区以TMV及CMV为优势种群。甘肃省近年来辣椒病毒病危害日趋严重,已逐渐上升为辣椒生产上的主要病害,对病毒病进行准确的诊治是有效防控的前提。从2014年至今,我们在甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒组育苗棚、试验地以及近郊辣椒种植地均发现辣椒幼苗和成株疑似侵染病毒病,主要症状表现为幼苗从第1片真叶畸形,叶片皱缩、黄化,个别植株生长点坏死。此后,随着幼苗生长及定植,症状有所缓解,在9、10月份,辣椒采收后期,叶片皱缩、黄化、畸形症状加重。在甘肃省辣椒主产区白银、武威等地调研中也发现辣椒生产中有此类症状出现。

我们通过调查甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒育苗棚、试验地、近郊辣椒种植地病毒病发病情况,采集病样,针对CMV、TMV、PVX、PVY、PVV、PVS、PVM、PVA等8种病毒,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA)、简易试纸条进行检测和鉴定,以明确辣椒病毒病的种类及优势种群,为病害的诊断、抗病育种和综合防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病样采集

2015—2016年在甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒育苗棚、试验地和近郊辣椒种植地调查病毒病发生情况,并采集疑似病毒样品77份。样品保存于4℃冰箱中。

2015年3月在育苗棚采集病样25份,2016年3月和9月在育苗棚、试验地、近郊辣椒种植

地采集病样47份,健康样品5份,分别进行CMV、TMV、PVX、PVY、PVV、PVS、PVM、PVA双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA)检测和CMV、TMV简易试纸条检测。

1.2 检测方法

1.2.1 双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA)

用于DAS-ELISA检测的抗体及阳性、阴性对照样品为美国Agdia公司产品。取采集到的新鲜待测样品按0.1 g/mL加入样品抽提缓冲液中充分研磨,将样品、阳性对照及阴性对照分别加入到酶联板反应孔中,室温条件下于黑暗潮湿环境中孵育2 h。具体检测步骤参照产品说明书。

1.2.2 CMV、TMV简易试纸条检测

购自北京中检葆泰生物技术有限公司代理的美国Agdia产品。抽取2016年3、9月份在甘肃省农业科学院蔬菜研究所育苗棚、试验地采集的16份中的11份,其中9份为病样,2份无病症的样品作为阴性对照。具体检测步骤参照产品说明书。

2 结果与分析

2.1 症状表现

在甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒育苗棚、试验田、近郊辣椒种植地调查发现,辣椒病毒病普遍发生。苗期发病时期可提前至第1片真叶,表现为叶片上卷、畸形。随着苗龄的增大,症状有所缓解,植株4~5层新叶表现为健康。幼苗定植后,随着抗性的提高及采用防控措施,病毒病情进一步得到缓解。在采收后期,伴随虫害,病毒病发病严重,症状也复杂多样,诸如明脉、斑驳、花叶、皱缩、畸形、黄化、坏死和矮化等。

2.2 双抗体夹心酶联免疫吸附(CMV、TMV、PVX、PVY、PVV、PVS、PVM、PVA)法检测

在采集到的辣椒病样中检出TMV、PVV和PVS3种病毒,其中TMV的总检出率为66.7%,PVV为33.3%,PVS为10%,没有检出CMV。TMV和PVV复合侵染的检出率为16%,TMV、PVV和PVS复合侵染的检出率为3.6%。表明甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒育苗棚和近郊试验

表1 采集样品信息

样品编号	样品数	症状	采样地点	采样时间
1~25	25	畸形、皱缩、花叶	甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒组育苗棚	2015年3月
25~77	52	畸形、皱缩、花叶	甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒组育苗棚、试验地、近郊辣椒种植地	2016年3月、9月

地侵染辣椒的主要病毒为 TMV，为优势病毒种群。

2.3 简易试纸条检测

从表 2 看出，在 TMV 检测中，列出的 11 份样品中有 9 份病样 DAS-ELISA TMV 酶标仪读数均超过了阴性对照的 2 倍，且在酶标板上呈现出明显的显色反应，结果呈阳性。对 9 份病样进行简易试纸条检测，结果均呈阳性，9 份病样 DAS-ELISA 检测结果与简易试纸条检测的完全一致。2 份健康样品 I D7、m62 DAS-ELISA TMV 酶标仪读数分别为 0.509、0.06，酶标板上分别呈阳性和阴性，而简易试纸条检测结果均呈阴性，2 种检测方法对 I D7 的检测结果不一致。在 CMV 检测中，列出的 11 份样品中，DAS-ELISA TMV 酶标仪读数均为零，在酶标板上呈无色反应，结果呈阴性；对 11 份样品进行简易试纸条检测，结果均呈阴性，2 种检测方法检测的结果完全一致。

表 2 TMV、CMV DAS-ELISA 法与简易试纸条法检测结果^①

样品代号	TMV酶标仪读数	TMV试纸条检测	CMV酶标仪读数	CMV试纸条检测
I D1	1.749(+)	+	0(-)	-
II D5	1.657(+)	+	0(-)	-
I D7	0.509(+)	-	0(-)	-
I CK	1.787(+)	+	0(-)	-
II CK	1.598(+)	+	0(-)	-
m62	0.060(-)	-	0(-)	-
B2	0.952(+)	+	0(-)	-
B9	1.703(+)	+	0(-)	-
B51	1.504(+)	+	0(-)	-
B52	1.706(+)	+	0(-)	-
D14	1.727(+)	+	0(-)	-
阳性对照	2.879(+)		2.793(+)	
阴性对照	0.079(-)		0(-)	

① +表示检测结果为阳性；-表示检测结果为阴性。

以上结果表明，DAS-ELISA 和简易试纸条对同一种病毒检测结果基本一致。但二者的检测成本相差较大，据推算，进行 DAS-ELISA 检测时，检测 1 个样本的成本为 25 元，而用简易试纸条检测时，检测 1 个样本的平均成本为 40 元。

3 小结与讨论

对甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒育苗棚和近郊试验地病毒病病原种类进行了鉴定，其检测出 TMV、PVV 和 PVS 3 种病毒，其中 TMV 为优势种群，侵染率高达 66.7%，与文朝慧等^[8]检测的甘肃省河西地区病毒优势种群一致，但河西地

区 CMV 侵染率为 33.3%，而本试验未发现 CMV 侵染。PVV 和 PVS 是世界各地侵染马铃薯主要病毒之一，导致马铃薯种性退化、严重减产和品质降低，其侵染辣椒的报道较少。大多数病毒均可通过蚜虫传播，甘肃省近年来保护地蔬菜种植面积日益扩大，导致蚜虫发生量增加，加上种苗的异地运输等加速了植物病毒的传播。

血清学方法是检测病毒病原的首选技术，检测中使用最多的是 DAS-ELISA。ELISA 检测的灵敏度较高，可检测到浓度为 0.1 ~ 10 ng/mL 的病毒，而且检测的通量大，但存在操作步骤繁琐、耗费时间长等缺陷。利用简易试纸条检测病毒具有简单、快捷的优点，1 个样品的检测在 5 ~ 6 min 完成，适合田间即时检测。本试验比较了 CMV 和 TMV DAS-ELISA 法和简易试纸条法的检测结果，表明 DAS-ELISA 和简易试纸条对同一种病毒检测结果基本一致。以成本考虑，田间即时检测应采用简易试纸条法。

本试验采集样品有限，并且仅对 8 种病毒进行了检测，有些表现病毒病症状的样品还未确定毒原，样品中是否还存在其它侵染辣椒的病毒种类如 ToMV、TSWV、和 PMMoV 等仍需进一步鉴定。

参考文献：

- [1] 汪沛位, 汤琳菲, 雷 艳, 等. 辣椒病毒病研究进展[J]. 湖南农业科学, 2015(7): 151-154.
- [2] 姚玉荣, 陈国华, 冯兰香, 等. 北运蔬菜基地辣椒病毒病病原种类的分子检测[J]. 中国蔬菜, 2013(10): 84-89.
- [3] 王道花. 永登县日光温室辣椒病毒病综合防治技术[J]. 甘肃农业科技, 2010(6): 55-56.
- [4] 郭思瑶, 童 艳, 黄 娅, 等. 重庆辣椒病毒病原初步鉴定和分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(2): 263-270.
- [5] 潘亚南, 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, 2016, 43(6): 1107-1116.
- [6] 薛 林, 张 丹, 徐 亮, 等. 玉米抗粗缩病自交系种质的发掘和遗传多样性及其在育种中的应用[J]. 作物学报, 2011, 37(12): 2123-2129.
- [7] 秦 蕾, 梁 燕. 辣椒抗烟草花叶病毒相关基因研究进展[J]. 中国蔬菜, 2016(6): 14-19.
- [8] 文朝慧, 刘志杰, 张丽萍, 等. 甘肃省河西地区辣(甜)椒病毒病原鉴定[J]. 中国蔬菜, 2010(16): 74-78.

(本文责编: 陈 珩)