

# 烟草蚀纹病毒对玉米矮花叶病防治效果的研究

马 琼<sup>1</sup>, 吴云锋<sup>1</sup>, 杨 艳<sup>2</sup>, 王秀敏<sup>1</sup>, 郝兴安<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 植保学院与陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2 西安市园林局, 陕西 西安 710032)

**[摘 要]** 为了研究烟草蚀纹病毒(*Tobacco etch virus*, TEV)对玉米矮花叶病(病原为甘蔗花叶病毒(*SCMV*))的预防效果,在防虫网室内,采用人工摩擦接种病毒的方法进行生物学试验,并用 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 技术对预防效果进行了检测。结果表明,经过 TEV 保护接种后再接种 SCMV 的植株长势明显优于只接种 SCMV 的植株,其叶长、叶宽和株高的差异均达到显著水平( $P < 0.05$ );在只接种 SCMV 全部发病 10 d 后,有 13.8% 经保护接种的植株叶片开始轻微褪绿,极大地延迟了花叶症状的发生;攻击接种 50 d 后,经 TEV 保护接种后再接种 SCMV 的玉米植株,体内 SCMV CP 基因表达量为只接种 SCMV 玉米的 0.113 4 倍。说明,SCMV 能够有效地减轻玉米矮花叶病的发生及危害。

**[关键词]** 烟草蚀纹病毒;甘蔗花叶病毒;玉米矮花叶病;荧光定量 PCR 检测

**[中图分类号]** S435.131.4<sup>+</sup>9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)11-0115-05

## Study on tobacco etch virus against maize dwarf mosaic disease

MA Qiong<sup>1</sup>, WU Yun-feng<sup>1</sup>, YANG Yan<sup>2</sup>, WANG Xiur-min<sup>1</sup>, HAO Xing-an<sup>1</sup>

(1 Plant Virology Lab, Shaanxi Key Laboratory for Agriculture Molecular Biotechnology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Xi'an Garden Bureau, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

**Abstract:** The aim of the study is to understand the effect of *Tobacco etch virus* (TEV) on maize dwarf mosaic disease. In the net house, an experiment is carried out by means of artificial inoculation. It is found that the pre-inoculated plants with TEV grow much better than those inoculated with SCMV only, and there is significant difference. Only 13.8% of maize pre-inoculated with TEV turns chlorosis while CK plants all show the symptom for ten days. RT-PCR and Real-time PCR are also used to detect. The result shows that 11.34% of SCMV CP is left in the pre-inoculated maize 50 days later, which indicates that maize dwarf mosaic disease can be alleviated through this method.

**Key words:** TEV; SCMV; maize dwarf mosaic disease; real-time PCR detection

玉米是世界三大谷物之一,我国每年种植面积约 2 447 万  $\text{hm}^2$ ,已形成北方、黄淮平原和西南丘陵三大玉米生产区。玉米矮花叶病(Maize dwarf mosaic)是一种严重的玉米病毒病,其病原为甘蔗花叶病毒(*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)。我国自 1968 年河南新乡首次报道发生玉米矮花叶病以来,该病害在我国北部和西北部地区均大面积发生,导

致玉米减产 20%~80%,成为制约我国玉米生产的主要病害之一<sup>[1-2]</sup>。Mckinney 在 1929 年发现了植物病毒株系之间存在交互保护作用<sup>[3]</sup>,此后日本、欧洲和我国的许多研究者开展了这方面的研究工作,但大都是研究同种病毒不同株系间的交互保护,而对不同种病毒间的研究很少。本试验借鉴病毒株系间的交互保护原理,研究了烟草蚀纹病毒(*Tobacco*

†收稿日期: 2006-09-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30270876);教育部回国人员科研基金项目(2004-5-27)

[作者简介] 马 琼(1983-),女,陕西绥德人,在读硕士,主要从事植物病毒学研究。E-mail: mq0630@yahoo.com.cn

[通讯作者] 吴云锋(1960-),男,陕西乾县人,教授,主要从事植物病毒学研究。E-mail: wuyf@nwsuaf.edu.cn

etch virus, TEV)对玉米矮花叶病的防治效果,以期对玉米矮花叶病的防治寻求一种安全、有效、绿色环保的方法,试验取得了一些重要结果,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

玉米品种为掖单 19,购于杨凌种子公司。

SCMV 毒源采自陕西玉米矮花叶病田,TEV 毒源采自陕西泾阳烤烟田。

主要试剂及仪器:M-MLV 反转录酶、dNTP (Promega 公司产品),RNase 抑制剂(TOYOBO 公司产品),Premix Ex Taq™ 酶(TaKaRa 公司产品),Taq DNA 聚合酶(晶美生物公司产品),DL-2000 DNA Marker(大连 TaKaRa 公司产品),BIO-RAD PCR 仪(东胜创新公司生产),TL998A 荧光定量 PCR 仪(天隆科技公司生产)。

### 1.2 TEV 对玉米矮花叶病的防治试验

在防虫网室的花盆中播种玉米掖单 19,出苗后用纱网罩住,将其分为 A、B、C、D 4 个组,每组重复 3 次,每重复 20 株。待玉米长至三叶期时,采用人工摩擦方法按不同处理接种病毒(病毒液质量浓度为 100 g/L),接种面积为 5 mm × 20 mm。处理方法为:A 组保护接种 TEV 7 d 后,攻击接种 SCMV;B 组接种 SCMV(阳性对照组);C 组接种 TEV;D 组不接种病毒(健康植株)。接种后观察各处理玉米植株的发病情况及其生物学性状,并于攻击接种 50 d 后各组分别随机取 30 株调查叶长、叶宽、株高、发病率和病情指数,并采样备用。数据的统计分析采用 SPSS 10.0 软件进行。

### 1.3 玉米 SCMV 外壳蛋白基因的 RT-PCR 扩增及电泳分析

1.3.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 上发表的 SCMV 外壳蛋白(CP)基因的保守序列,设计上游引物,其序列为:5'-GGAGAA TTCACCA TCAACTG-3'。下游引物为马铃薯 Y 科通用引物 M4,其序列为:5'-GTTTTCCCA GTCACGAG-3'。引物由北京赛百盛公司合成。

1.3.2 玉米叶片总 RNA 的提取及 SCMV CP 基因的 RT-PCR 扩增 参考于翠<sup>[4]</sup>的方法提取玉米叶片总 RNA,并反转录。以反转录后的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。PCR 反应体系为:cDNA 模板 2 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,10 × Taq buffer(Mg<sup>2+</sup> free)2.5 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 μL,10 mmol/L dNTP 2.5 μL,Taq DNA 聚合酶 0.2

μL,超纯水 23.6 μL,共 25 μL。扩增程序为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 1 min,50 °C 1 min,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶(含有 0.5 μg/mL EB)、1 × TAE 缓冲体系中电泳,每孔上样 3 μL,电泳后在紫外灯下观察并摄影记录。以健康玉米植株 cDNA 和无菌双蒸水为阴性对照,以只接种 SCMV 的玉米病株 cDNA 为阳性对照。

### 1.4 SCMV CP 基因的实时荧光定量 PCR 检测

1.4.1 引物及探针的设计与合成 SCMV CP 基因引物序列为:上游引物 5'-CATGCCAA GAT-ACGGTCTTCA G-3',下游引物 5'-CTGGTGT-GCGCGAA GTCA T-3';其探针序列为:5'-AGAAATCGAAA GCATACCGCGCTAA GCT -3',5'端以 FAM 标记,3 端以 TAMRA 标记。内参 18sRNA 引物序列为:上游 5'-ATGATAACTCGACGGATCGC -3',下游 5'-CTTGATGTGGTAGCCGTTT-3';其探针序列为:5'-ACCGCCCGTCGCTCCTACCG-3'。引物及其探针均由上海基康生物技术有限公司设计合成。

1.4.2 Real-time PCR 扩增 对经保护接种玉米(A 组)和未经保护接种玉米(B 组)cDNA 进行定量,采用 25 μL 反应体系:Premix Ex Taq™ 酶(2 ×)12.5 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL,10 μmol/L 荧光探针溶液 0.5 μL,cDNA 模板 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 9 μL。将反应体系混匀离心后,置于定量 PCR 仪上进行 PCR 反应,以水为空白对照。设置扩增条件如下:95 °C 10 s,95 °C 5 s,60 °C 20 s,45 个循环。内参 18sRNA 的扩增同步进行,其反应体系及条件与目的基因相同,只需改用 18sRNA 的引物和探针即可。实时定量 PCR 计算基因表达的相对变化采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法<sup>[5-6]</sup>,其中 Ct 代表目标扩增产物达到设定阈值所经历的循环次数。

## 2 结果与分析

### 2.1 TEV 对玉米矮花叶病的预防效果

试验结果表明,经 TEV 保护接种后再接种 SCMV 的玉米,株高与健康玉米基本一致;在阳性对照全部发病 10 d 后,经保护接种的植株有 13.8% 开始轻微褪绿,呈花叶症状;阳性对照玉米较保护接种玉米植株明显矮化(图 1),接种 30 d 后叶片从中部开始出现褪绿,随后向叶尖和叶基部扩展,44 d 后植株 100% 发病,褪绿斑沿叶脉形成严重的花叶症状(图 2)。可见,TEV 对 SCMV 的侵染表现出明显的预防作用,延迟了花叶症状的发生。



图 1 未保护接种与保护接种玉米长势的比较

左边为只接种 SCMV 的植株;  
右边为先接种 TEV 再接种 SCMV 的植株

Fig. 1 Comparison of growth between plants without pre-inoculation and pre-inoculated plants  
Left is plants inoculated by SCMV ;  
Right is plants inoculated by TEV ,and then by SCMV

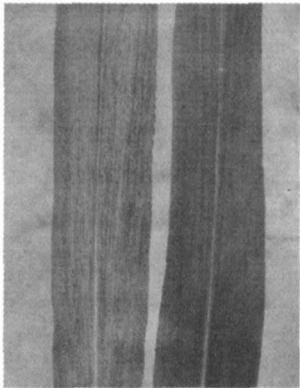


图 2 未保护接种与保护接种玉米叶片的症状

左边为只接种 SCMV 的玉米叶片;  
右边为先接种 TEV 再接种 SCMV 的玉米叶片

Fig. 2 Symptoms of maize leaves  
Left is the leaf inoculated by SCMV ;  
Right is the leaf inoculated by TEV and then by SCMV

表 1 不同处理玉米的生物学参数

Table 1 Biological index of different treatments

| 处理<br>Treatment | 叶长/ cm<br>Leaf length | 叶宽/ cm<br>Leaf width | 株高/ cm<br>Plant height | 发病率/ %<br>Disease incidence | 病情指数<br>Disease index |
|-----------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| A               | 45.3 ±2.59 a          | 3.11 ±0.14 a         | 49.0 ±4.73 a           | 13.8                        | 17.3                  |
| B               | 30.3 ±1.90 b          | 2.05 ±0.55 b         | 37.9 ±5.25 b           | 100                         | 96.5                  |
| C               | 45.8 ±2.01 a          | 3.10 ±0.11 a         | 48.6 ±4.82 a           | 0                           | -                     |
| D               | 45.9 ±2.00 a          | 3.13 ±0.12 a         | 49.3 ±4.70 a           | 0                           | -                     |

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。  
Note:Different small letters in same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

从表 1 可以看出,经过 TEV 保护接种的植株 (A 组)长势明显优于只接种 SCMV 的植株(B 组),其叶长、叶宽和株高的差异均达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。表 1 证明,利用 TEV 可以有效降低玉米矮花叶病的发生。

2.2 SCMV CP 基因的 RT-PCR 检测结果

由图 3 可见,只接种 SCMV 玉米的扩增片段长度约为 1.1 kb,为 SCMV CP 基因;先接种 TEV 再接种 SCMV 植株中同样检测到该基因,但条带较弱,需进一步用定量的方法才能判断预接种是否起作用以及作用大小;而健康植株及双蒸水对照均未出现特异扩增带。

2.3 SCMV CP 基因实时荧光定量 PCR 检测结果

对经保护接种和未经保护接种的玉米同时进行实时荧光定量 PCR 检测,结果显示,经保护接种的玉米 Ct 值较阳性对照大(图 4),其平均  $\Delta Ct$  值为  $8.88 \pm 0.15$ ,较对照 ( $5.83 \pm 0.18$ ) 高  $3.05 \pm 0.15$ 。由  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法可知,经过 TEV 保护接种的玉米体内

SCMV CP 基因表达量,明显低于只接种 SCMV 的玉米,是其 0.113 4 倍。

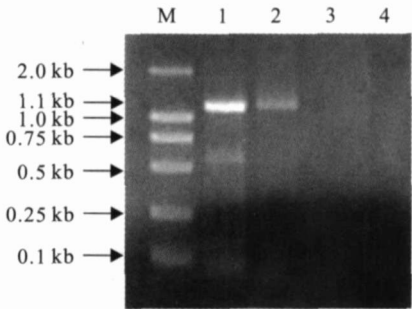


图 3 SCMV CP 基因的 RT-PCR 扩增结果

M. DNA 标样;1. 接种 SCMV 的玉米;2. 先接种 TEV 再接种 SCMV 的玉米;3. 健康玉米;4. 双蒸水

Fig. 3 RT-PCR analysis of the SCMV CP gene  
M. DL-2 000 DNA Marker ;1. Maize inoculated by SCMV ;  
2. Maize that inoculated TEV and then SCMV ;3. Healthy maize without inoculation ;4. Double distilled water

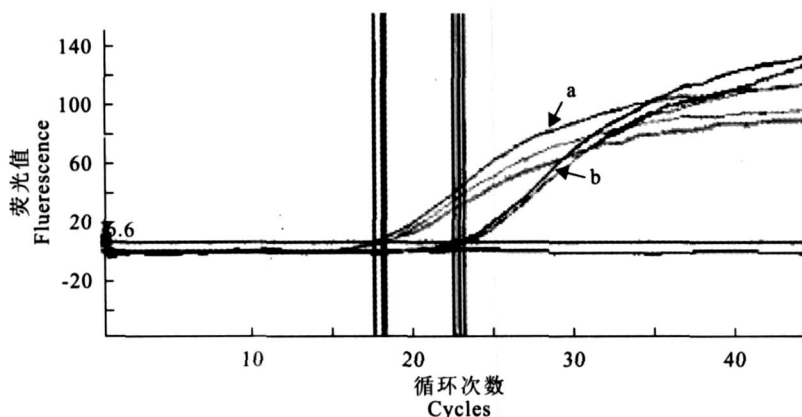


图 4 SCMV CP 基因实时荧光定量 PCR 的检测结果

a. 接种 SCMV 的玉米; b. 先接种 TEV 再接种 SCMV 的玉米

Fig. 4 Real-time PCR detection

a. Maize inoculated by SCMV; b. Maize inoculated by TEV and then by SCMV

### 3 讨 论

玉米矮花叶病于 1965 年首次在美国报道,我国于 1968 年首次在河南新乡、安阳报道<sup>[7]</sup>,1973 年确证了病原物,当时称为玉米矮花叶病毒 (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV),现在称为甘蔗花叶病毒<sup>[8]</sup>。

本研究采用同属马铃薯 Y 科的另一种病毒——烟草蚀纹病毒,对病毒源量大、传播途径广、危害颇深的玉米矮花叶病进行预防,结果表明预接种 TEV 能够有效控制该病害的发生,从而将甘蔗花叶病毒给农业生产带来的损失降到最低。

本试验采用荧光定量 PCR 技术检测 SCMV CP 基因的表达量,该技术结合了 PCR 技术和探针技术,克服了常规 PCR 定性检测的一些不足,极大地提高了检测的敏感性和特异性<sup>[9]</sup>。另外,由于荧光探针经去羟基化处理后,不会在 *Taq* 酶作用下发生延伸,只有与待测模板完全匹配时,才会发生荧光报告基团的切割,产生荧光的消长,从而使由于引物的非特异性扩增而导致的假阳性问题得以解决。该技术结果由电脑分析读数,避免了产物后处理过程所致的污染,较常规 PCR 更为客观、灵敏、准确<sup>[10]</sup>。

历史上,同一种病毒弱株株系对强毒株系的交互保护作用已被广泛认可<sup>[11]</sup>。随着分子生物技术的发展,越来越多的证据表明,这种交互保护作用极有可能是病毒诱导的基因沉默现象<sup>[12-16]</sup>。因此,可以推测,不同种病毒之间的交互保护现象也有可能是基因沉默所导致,但其具体机制还需通过 Northern Blot 等方法进一步深入研究。

### [参考文献]

- [1] 王升吉,尚佑芬,赵玖华,等. 山东省玉米矮花叶病毒的生物学特性及基因组全序列测定[J]. 病毒学报,2003,19(2):159-163.
- [2] Marie-Jeanne V, loos R, Peyre J, et al. Differentiation of poaceae potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis[J]. Journal of Phytopathology, 2000,148(3):141-151.
- [3] 王秀敏. 烟草蚀纹病毒 CP、HC-Pro 基因克隆及与甘蔗花叶病毒之间交互保护作用的研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2006.
- [4] 于 翠. 番茄花叶病毒 (ToMV) 和黄瓜花叶病毒 (CMV) 单克隆抗体制备及 ToMV 在烟草上致病分子机理研究[D]. 浙江杭州:浙江大学,2004.
- [5] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 CT method[J]. Methods, 2001,25:402-408.
- [6] Niesters H G M. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation[J]. Methods, 2001,25:419-429.
- [7] 高文臣,魏宁生. 玉米矮花叶病研究进展[J]. 西北农业大学学报,2000,28(1):86-91.
- [8] 蒋军喜,李桂新,周雪平. 玉米矮花叶病毒研究进展[J]. 微生物学通报,2002,29(5):77-81.
- [9] Ales T, Michael W P, Andrea D. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR[J]. Molecular and Cellular Probes, 2003,17:5-10.
- [10] 江晓玲,李 明,徐伟文,等. 恶性疟原虫荧光定量聚合酶链反应检测方法的建立[J]. 中华检验医学杂志,2000,23(2):71-73.
- [11] 肖火根,范怀忠. 番木瓜环斑病毒株系间交互保护作用研究[J]. 病毒学报,1994,10(2):164-171.

- [12] 李人柯,饶雪琴.交互保护作用与蔬菜病毒病防治[J].中国蔬菜,1998(2):51-53.
- [13] 牛莉莉,安利佳.RNA 干扰机制的研究进展及植物学意义[J].分子植物育种,2004,2(3):429-435.
- [14] Wang Ming-Bo, Peter M W. Application of gene silencing in plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001, 5:146-150.
- [15] Goodwin J, Chapman K, Swaney S, et al. Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance[J]. Plant Cell, 1996, 8(1):95-105.
- [16] Ratcliff F, Martin Hernandez A M, Baulcombe D C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing[J]. Plant, 2001, 25(2):237-245.

(上接第 114 页)

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,1990:343-344.
- [2] 席与珪,孙明杰,李惟明.藜本化学成分的研究[J].中草药,1981,18(2):6-7.
- [3] 万传星.藜本杀虫抑菌作用初步研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [4] 张 静,马志卿,冯俊涛,等.细辛醚对家蝇和淡色库蚊的生物活性[J].农药学报,2005,7(1):85-87.
- [5] 张明发,沈亚琴,朱自平,等.藜本的抗炎和抗腹泻作用的实验研究[J].基层中药杂志,1999,13(3):3-5.
- [6] 慕立义.植物化学保护试验技术导论[M].北京:中国农业出版社,1994.
- [7] 吴文君.植物化学保护实验技术导论[M].西安:陕西科学技术出版社,1988:72-77.
- [8] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998:152-154.
- [9] 陈安良,廉应江,叶海洋,等.丙烷脒防治番茄灰霉病效果初报[J].中国农学通报,2005,21(11):301-303.
- [10] 陈蕙芳.植物活性成分辞典(第二册)[M].北京:中国医药科技大学出版社,2001:51-52.
- [11] Humberto R B, Da ́e L, Rodrigo V A, et al. Sarisan from leaves of piper affinis hispidinervum C. DC (long pepper) [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2001, 16(2):113-115.

## 《中国神经再生研究(英文版)》杂志征稿发行

NRR 是一本在神经再生研究领域具有国际水平的以国际通用语言英语为沟通平台的专业杂志。由卫生部主管、中国康复医学会主办,电子版由 Elsevier (Singapore) Pte Ltd. 出版,即时上传国际最大的学术数据库 SD 平台,与纸载体同步在全球范围内公开发行。CN 11-5422/R, ISSN 1673-5374, 月刊。

编委会具有学术权威性。国际编委 132 名,来自全球 25 个国家的专业学者。力求高质量、高时效出版(120-150 天)。NRR 具有良好的国际影响力及学科专业影响力,已被下列国际及国内的著名数据库收录:

- Elsevier 电子期刊全文数据库 ScienceDirect OnSite (SDOS) (文章出版后 1 周内可在线阅读)
- 美国《化学文摘》(CA)
- 荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)
- 波兰《哥伯尼索引》(IC)
- 中国英文版科技期刊数据库(统计源期刊)
- 中国科学引文数据库核心库(CSCD)
- 中国学术期刊文摘

NRR 2008 年 12 期出版重点:针灸后神经元变化的分子生物学研究、中医药治疗帕金森病效应的机制研究、中枢神经再生的相关因子研究、与神经再生相关的基因学研究、与神经再生相关的蛋白质组研究、神经免疫学研究、神经可塑性研究、缺血性脑损伤与脑内移植研究、神经干细胞与神经再生研究、脊髓神经损伤与神经再生研究、周围神经损伤与神经再生研究、中医药治疗运动神经元病的分子生物学研究。

通联方式:

咨询电邮:sjzs100@163.com 电话:+86 024 23381085

传真:+86 024 23394178 投稿电邮:sjzs101@163.com sjzs102@163.com

国内订阅邮发代号:8-585 本社订阅:辽宁省沈阳 1234 邮政信箱 邮编:110004

定价:15 元/册。更多信息详见 www.sjzsyj.com.