

Detection and Analysis of Soil Toxicity and Transmission of Tobacco Mosaic Virus

Chuanfu Kuang¹, Shichao Liu², Xianchao Sun², Dexin Chen³

¹Hunan Tobacco Company Chenzhou Company, Chenzhou Hunan

²Southwest University, Chongqing

³Institute of Tobacco, China Academy of Agricultural Sciences Tobacco Research Institute, Qingdao Shandong
Email: kcf601@163.com

Received: Sep. 8th, 2017; accepted: Sep. 22nd, 2017; published: Sep. 27th, 2017

Abstract

The method of molecular biology was used to detect the soil samples and corresponding tobacco plants in the TMV often occur in Guiyang county, Hunan province. Laboratory tests were also carried out. The results showed that the detection rate of TMV was 71.43% among 35 soil samples. The transmission rate of TMV with toxic soil was 88.0%. Laboratory test showed that the transmission rate of TMV with toxic soil was 83.33%. The result shows that in the tobacco field, soil TMV virus is an important route of transmission road of tobacco TMV.

Keywords

Soil, Tobacco Mosaic Virus, Toxicity and Transmission

烟草普通花叶病土壤带毒与传播的检测与分析

匡传富¹, 刘世超², 孙现超², 陈德鑫³

¹湖南省烟草公司郴州市公司, 湖南 郴州

²西南大学, 重庆

³中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛
Email: kcf601@163.com

收稿日期: 2017年9月8日; 录用日期: 2017年9月22日; 发布日期: 2017年9月27日

摘要

用分子生物学的方法对湖南省桂阳县烟区TMV常发地田间土壤样品及对应烟株进行了TMV检测, 同时进

行了实验室试验。结果表明：35个土壤样品中，有25个检测出TMV，TMV检出率为71.43%；相对应的烟株，带毒土壤TMV的传播率为88.0%。实验室试验表明：带毒土壤TMV的传播率为83.33%。由此说明，田间土壤中烟草TMV带毒是烟株TMV发病的重要传播途径。

关键词

土壤，烟草普通花叶病，带毒与传播

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

明确烟草病毒病的传播途径是控制烟草病毒病害的重要环节。TMV 主要靠病汁液侵染微伤口传播，在农事操作中沾染病株汁液的手或工具通过接触幼苗的微伤口的侵入[1]。种子带毒[2]，混有病残体的肥料、土壤和田间带病的其他植物及野生植物，丢弃在烟田的带病烟顶、烟杈、烟根、烟叶等都可以成为病害的初侵染源。有研究指出，在漂浮育苗过程中，被 TMV 污染的漂浮盘、基质和营养液不是 TMV 在漂浮育苗期间传播的主要途径，但却是病毒病传播的主要初侵染源[3]。这些初侵染源及移入大田的带病烟苗，通过各种摩擦接触引起再侵染，使病害在田间大面积发生。另外，地下害虫危害严重的烟田病毒病发生相对严重。土壤中的病残体传播病毒一直被视为转播 TMV 的途径之一，但至今鲜有试验明确证明这一途径的存在，也没有关于土壤病残体传播 TMV 效率的报道。本文通过田间试验和室内试验充分证实土壤病残体可以传播 TMV，并分析了其传播效率。对今后采取合理的控制烟草普通花叶病毒病措施提供了借鉴。

2. 材料与方法

2.1. 供试品种

云烟 87。

2.2. 供试试剂

琼脂糖(Sangon)，DNA 纯化试剂盒(BioFlux)，DNA marker (BioFlux)，pGEM-T easy Vector system (Promega)，限制性内切酶(Promega)，Ex-Taq DNA 聚合酶(Takara)，Taq DNA 聚合酶(Takara)，DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒(Tiangen)，EASY spin 植物 RNA 快速提取试剂盒(Aidlab)，E. Z. N. A. TMSoil RNA Kit (OMEGA)，pGEM-T 载体(TIANGEN)，反转录试剂盒(TaKaRa)，引物(大连宝生物)，LB 培养基，氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)：100 mg/mL 水溶液，-20℃保存，X-Gal：20 mg 的 x-gal 溶解于 1 mL 二甲基甲酰胺中，-20℃避光保存，大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 。

2.3. 主要器材

高速冷冻台式离心机 5417R (Eppendorf)，高速常温台式离心机 5415D (Eppendorf)，紫外分光光度计 UV-2201 (Bio-RAD)，PCR S1000TM Thermal cycler (Bio-RAD)，电泳仪 DYY-6C (北京六一)，恒温摇床，电子天平，超净工作台，恒温水浴锅，SZ-1 快速混匀器。

2.4. 试验场所

试验在湖南省郴州市桂阳县梧桐村汪山组郴州市烟草公司实验基地和西南大学植物保护学院温室进行。

2.5. 田块及烟苗选择

选择土壤肥力中等，远离村庄，周围无其他作物种植，前一年烟草 TMV 发病严重的田块，清除田间、田边杂草及烟草残留物；选用由当地烟农温室大棚培育的，长势均匀、良好，且无毒的云烟 87 烟苗。

2.6. 小区设计

设计制作 10 个防虫网；烟草还苗期过后，对部分烟苗喷施杀蚜虫的药剂，喷施药剂后，罩上防虫网，每个防虫网罩 3 株，共 30 株，作为一个实验组(如图 1)，分别是：A1-1、A1-2、A1-3；B1-1、B1-2、B1-3；C1-1、C1-2、C1-3；D1-1、D1-2、D1-3；E1-1、E1-2、E1-3；A2-1、A2-2、A2-3；B2-1、B2-2、B2-3；C2-1、C2-2、C2-3；D2-1、D2-2、D2-3；E2-1、E2-2、E2-3。另设 5 株不罩防虫网作对照(A3、B3、C3、D3、E3)。

实验室设 3 个处理，处理 1：带毒土壤上种植 6 株烟；处理 2：不带毒土壤上种 7 株烟；处理 3：不带毒土壤上种 6 株烟。

2.7. 样品采集

于 3 月下旬，加网之前，采集袋收集每株烟根基 10~15 cm 土壤编号，带回实验室用于分子检测；

于 4 月中旬，当地烟草病毒病高发期，加网之后，采集叶片，叶片样品采集编号，带回实验室进行分子检测。

2.8. 样品检测

取少许采集到的土壤样品，盛放在培养皿中，25℃ 恒温培养箱烘干，每隔一小时上下翻动一次，直至土样完全干燥。称取 0.2 g 干燥土壤，液氮中快速充分研磨至细粉末状，盛放在 15 mL 的离心管中，按照 E.Z.N.A.™ Soil RNA Kit 操作步骤提取土壤总 RNA；叶片样品用 EASY spin 植物 RNA 快速提取试剂盒，提取得到 RNA；



Figure 1. Field pest control network Settings
图 1. 田间防虫网设置

用反转录试剂盒(TaKaRa): 1.5 × Prime Script Buffer(for Real Time)*, 2 ul → Prime Script RT Enzyme Mix I*, 0.5 ul → OligodT Primer (50 μM), 0.5 ul → Random 6 mers (100 μM), 0.5 ul → Random 6 mers (100 μM), 0.5 ul → 5. RNase Free dH₂O, 4 ul → RNA 模板, 2.5 ul, 将上步中所得土壤 RNA 反转录, 得到 cDNA。

高速常温台式离心机离心后, PCR 仪中 37°C~15 min, 85°C~20 s, 15°C 停止保存, 得到 cDNA;

以反转录得到的 cDNA 为模板, 采用根据 TMV 外壳蛋白设计的引物 TMVR\F, 体系及反应条件如下: 取以无菌 PCR 管(0.2 ml), 依次加入下列试剂后, 加双蒸水(ddH₂O)至 25 ul。

PCR 反应试剂及用量: 10 × Taq buffer, 2.5 ul; dNTP mix 1.5 ul; MgCl₂, 1.5 ul; cDNA, 1 ul; 上游引物, 0.5 ul; 下游引物, 0.5 ul; Ex Taq 酶, 0.25 ul; ddH₂O, 17.25 ul。

实验操作中 PC 反应条件见表 1, 反应结束后, 取 5 ul 反应产物, 1%琼脂糖凝胶, 水平电泳仪, 电泳 35 min, 检测扩增结果。

2.9. 分子克隆

2.9.1. PCR 产物的回收纯化

实验准备 50°C 恒温水浴锅、65°C~70°C 恒温水浴锅、刀片、酒精灯、镊子

(1) 将吸附柱 CB2 放入收集管中, 向吸附柱中加入 500 μL 平衡液 BL, 高速常温台式离心机, 12,000 rpm (~13400 g), 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放入收集管中。处理过的柱子要确保当天使用;

(2) 用刀片将单一的 DNA 片段, 从琼脂糖凝胶中切下, 尽量切除多余部分, 用镊子夹取放入干净的离心管中, 放到电子天平中称取重量;

(3) 向胶块中加入 PC 溶液, 一般已没过胶块为止, 天平称量, 确保等量; 若胶块过大, 可将胶块切成碎块。将离心管放入 50°C 恒温水浴锅放置 10 min 左右, 在此期间不断轻缓的上下翻转离心管, 确保胶块充分溶解;

(4) 将(3)中得到的溶液加入处理过的吸附柱中(吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm (~13,400 g), 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放入收集管中;

(5) 向吸附柱 CB2 中加入 600 μL 漂洗液 PW, 室温静置 2~5 min, 漂洗液在使用之前, 注意检查是否已加入无水乙醇, 12,000 rpm (~13,400 g), 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放入收集管中;

(6) 重复操作步骤(5)

(7) 将吸附柱放入收集管中, 12,000 rpm (~13,400 g), 离心 2 min, 尽量洗去漂洗液。将吸附柱室温放置数分钟, 直至彻底晾干;

Table 1. PC reaction conditions
表 1. PC 反应条件

反应温度	反应时间
1. 94°C	3 min
2. 94°C	45 s
3. 56°C	45 s
4. 72°C	1.5 min
5. 2~4 进行 29 个循环	
72°C	10 min
16°C	Forever

(8) 将吸附柱 CB2 放入一个经过高压蒸汽灭菌的干燥的离心管中, 向吸附柱中间吸附膜的中间位置悬空滴加不少于 30 μL 的 ddH₂O (ddH₂O 需在 65 $^{\circ}\text{C}$ ~70 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅提前预热), 室温放置 2 min, 12,000 rpm (~13,400 g), 离心 2 min;

(9) 吸出离心管中的液体, 重新悬空滴加到吸附膜的中心位置, 室温静置 2 min, 12,000 rpm (~13,400 g), 离心 2 min, 收集 DNA 溶液。

2.9.2. PCR 产物的连接

去无菌 PCR 试管(0.2 ml), 一次加入下列试剂后, 离心机中混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温冰箱中过夜。实验操作中 PCR 产物的连接试剂及用量见表 2。

2.9.3. PCR 回收产物的转化

准备工作: LB + Amp 固体培养基, LB 液体培养基, 100 μL 感受态细胞, 42 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅, 超净工作台, 冰。

(1) 将 100 μL 感受态细胞放置于冰上, 待完全解冻, 轻摇试管至细胞均匀悬浮;

(2) 将 5 μL 连接液加入 50 μL 感受态细胞中, 用枪头轻轻将其混匀, 冰上放置 30 min;

(3) 42 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅热击 90 s, 冰上放置 3~5 min;

(4) 取出 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内盛装 LB 液体培养基三角瓶, 瓶口放置在酒精灯的火焰上方微热, 向试管中加入 500 μL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床, 225 rpm, 60 min;

(5) 摇菌的过程中, 将 16 μL 的 IPTG 诱导物、40 μL 的 X-gal 显色底物(黄色)(两种试剂均放置-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存), 均匀涂抹在 LB + Amp 固体培养基平板上;

(6) 菌液摇好后, 3500 rpm, 离心 5 min, 倒掉上清液, 留 100 μL 液体, 将留下的液体混匀, 均匀的涂抹在 LB + Amp 固体培养基平板上;

(7) 平板 LB + Amp 固体培养基用封口膜封口, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱, 正向放置 1 h, 然后倒置过夜培养 10~12 h。

2.9.4. 挑选单克隆

(1) 取出过夜培养过后的平板, 平板上会显示蓝白斑, 如若蓝白斑显示不明显, 可先将平板放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 数小时, 待蓝白斑显示明显; 如若蓝白斑较小, 需继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养, 直至蓝白斑适中为止;

(2) 超净工作台(超净工作台使用前紫外灯开启灭菌 20 min 左右), 向灭菌的干燥的 2 mL 离心管中加入 1 mL 的 LB + Amp 液体培养基;

(3) 超净工作台, 用白色枪头挑取平板上白色单斑, 挑斑时, 要确保斑是白色的, 且为单个斑; 将枪头打入(2)中 2 mL 离心管中, 密封;

(4) 将(3)中离心管包扎好, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 225 rpm, 5~6 h;

(5) 待菌液浑浊, 即可取出离心管, 按照前文 PCR 体系及条件, 进行菌液检测;

Table 2. Connection reagents and dosage of PCR products
表 2. PCR 产物的连接试剂及用量

试剂	用量(μL)
2 \times Rapid ligation buffer	4
pGEM-T Easy	1
PCR 纯化产物	4
T4 DNA ligase	1

2.10. 室内温室实验

(1) 实验温室的条件参数设置：玻璃加 PC 板温室，跨度：9.6 m/10.8 m/12 m/定制；肩高：4 m~5 m；顶高：5.5 m~6.5 m；开间：4 m/8m，配套系统：喷灌系统/内遮阳系统/升温系统/湿帘风机系统//侧开窗系统//苗床系统等

(2) 选用无毒、包衣、云烟 87 种子，实验室内，用无菌土培育烟苗；

(3) 待烟苗长出 3 片叶时，移栽到实验室用小盆中，一盆一株，根据土壤的不同，设置 3 组实验：处理 1：从实验基地采集的，检测出带有 TMV 的土壤；处理 2：从基地采集的，检测出带有 TMV 的土壤，经过高温高压灭菌后作为烟苗种植土壤；处理 3：用实验室无菌土作为烟草种植土壤。

(4) 温室内生长 2 个月后，采集每株叶片，检测 TMV

(5) 叶片 RNA 的提取

准备工作 56℃ 恒温水浴锅、70℃~80℃ 恒温水浴锅、无水乙醇、1.5 mL 离心管、高速冷冻台式离心机(4℃)、超净工作台

称取 0.1~0.2 g 烟叶样品，放入已高温高压灭菌过的研钵中，加入液氮，充分研磨至细粉末状；

将 500 μ L RLT 和 50 μ L RLANT aid 加入 1.5 mL 离心管中；

将粉末状的样品加入离心管内，用快速混匀器剧烈震荡 20 s，然后放入 56℃ 恒温水浴锅 3 min；

水浴后，涡旋 30 s；

放入高速冷冻台式离心机(4℃)中，13000 rpm，10 min，离心后，将上清液转移至一新离心管中，向离心管中加入 0.5 体积的无水乙醇；

将离心管中液体吸出，加入吸附柱中(小于 750 μ L)，高速冷冻台式离心机(4℃)，13,000 rpm，2 min，弃废液；

向吸附柱中加入 700 μ L 去蛋白液 RW₁，室温放置 30 s，高速冷冻台式离心机(4℃)，13,000 rpm，30 s，弃废液；

向吸附柱中加入 500 μ L 漂洗液 RW(使用前注意检查是否已添加过无水乙醇)，高速冷冻台式离心机(4℃)，12,000 rpm，30 s，弃废液；

重复一次上一步骤；

将吸附柱放入收集管中，高速冷冻台式离心机(4℃)，13,000 rpm，2 min，弃废液；

将吸附柱放入一新 1.5 mL 离心管中，室温放置 1 min，向吸附膜上悬空滴加 30~50 μ L RNase free water(提前放置到 70℃~80℃ 水浴锅中)，高速冷冻台式离心机(4℃)，12,000 rpm，1 min；

将离心管中液体吸出，重新滴加至吸附膜上，重复操作一次；

弃吸附柱，收集样品，去 2 μ L 样品，电泳检测。

(1) 反转录按照前文所述步骤，以 RNA 为模板进行反转录，得到 cDNA

(2) PCR 按照前文所述步骤，以 cDNA 为模板，进行 PCR 反应

(3) PCR 反应结束后，进行电泳检测

(4) 统计分析实验结果

3. 结果与分析

3.1. 田间样品检测结果

(1) 提取的土壤(见图 2)、叶片(见表 3)RNA 经反转录，TMV 特异性引物 PCR 扩增后，1%的琼脂糖凝胶电泳，成像后，图片中的大小 750 bp 的特异性条带，清晰明亮，与目标片段大小一致，阳性条带清

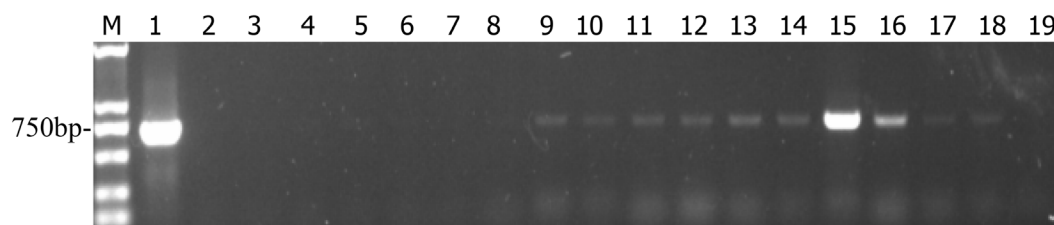


Figure 2. BM2000; 1: positive; 2 - 18: sample; 19: negative

图 2. BM2000; 1: 阳性; 2~18: 样品; 19: 阴性

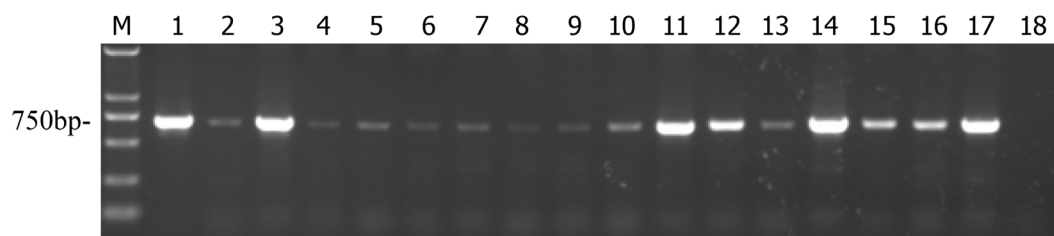


Figure 3. BM2000; 1: positive; 2 - 17: sample; 18: negative

图 3. BM2000; 1: 阳性; 2~17: 样品; 18: 阴性

晰，阴性无条带。

(2) 经过对 35 个土壤样品, 以及每个土壤样品相对应的 35 株烟叶片检测(见表 3)。35 个土壤样品中, 有 25 个检测出 TMV, 其中罩防虫网的 22 个, 不罩防虫网 3 个, TMV 检出率为 71.43%, 土壤带毒率较高。相对应的烟株, 罩防虫网 30 个样中有 22 个样品检测出 TMV, 有 19 株为根基土壤带毒植株; 不罩网处理的 5 个样中, 有 4 个样品检测出 TMV, 其中有 3 株对应根部土壤带毒, 有 1 株为根基土壤不带毒, 以 25 株土壤根基带毒为总体, 则带毒土壤传播 TMV 的传播率为 88.0%。另外 10 株根基土壤不带毒的, 有 4 株也携带有 TMV 病毒, 分别是 C1-3、A2-2、C2-2、C3, 可能为植株之间相互摩擦而传播的。也有 3 株根基土壤带毒, 而烟株不带毒, 分别是 E1-1、C2-1、D2-3, 可能个体烟株抵抗力强或未造成伤口而未感染病毒。经过样品的检测结果认为, 土壤携带 TMV 后, 对烟株有较高比例的传播率。

3.2. 温室试验样品检测结果

为了进一步印证田间试验所得的结果, 还进行了实验室试验。本实验对温室内处理 1 (见图 4), 处理 2 (见图 5), 处理 3 (见图 6), 植株叶片进行 RT-PCR 检测, 电泳图结果显示, 处理 1 带毒土壤中试验组 6 株植株, 有 5 株检测出 TMV 目标条带, 传播率 83.33%; 处理 2 (不带毒土壤) 7 株植株, 有 2 株显示出 TMV 目标条带; 处理 3 (不带毒土壤) 6 株植株, 有 2 株显示 TMV CP 目标条带; 实验均在温室内进行, 隔绝外界传播条件的干扰, 只有处理 1 的土壤中含有 TMV 毒源, 由实验结果可以看出处理 1 传毒很明显; 处理 2、3 虽均有植株检测出 TMV, 但发病率较低, 分别只有 2 株。分析原因, 可能是其他人员进行温室实验的时候, 有碰到过该植株叶片, 摩擦传播, 或昆虫传播。

综合大田、温室内试验结果, 可以得出, 土壤带 TMV 毒源对 TMV 有较高传播率。

4. 结论与讨论

(1) 董红红[4]研究认为除 TMV 和 CMV 可以通过土壤传播外, PVY 也可以通过土壤传播, 仅 TMV 存活时间最长, TMV 在土壤中至少可以存活 5 个月, 而 CMV 和 PVY 在土壤中的存活时间相对较短。TMV 可以通过土壤传播与研究结论一致。

Table 3. Samples of field soil and corresponding tobacco plant TMV test results
表 3. 田间土壤样品及对应烟株 TMV 检测结果

样品编号	土壤	烟叶
	TMV	TMV
A1-1	+	+
A1-2	+	+
A1-3	+	+
B1-1	+	+
B1-2	+	+
B1-3	+	+
C1-1	+	+
C1-2	+	+
C1-3	-	+
D1-1	-	-
D1-2	-	-
D1-3	-	-
E1-1	+	-
E1-2	+	+
E1-3	+	+
A2-1	+	+
A2-2	-	+
A2-3	+	+
B2-1	+	+
B2-2	+	+
B2-3	+	+
C2-1	+	-
C2-2	-	+
C2-3	-	-
D2-1	-	-
D2-2	+	+
D2-3	+	-
E2-1	+	+
E2-2	+	+
E2-3	+	+
A3	+	+
B3	-	-
C3	-	+
D3	+	+
E3	+	+

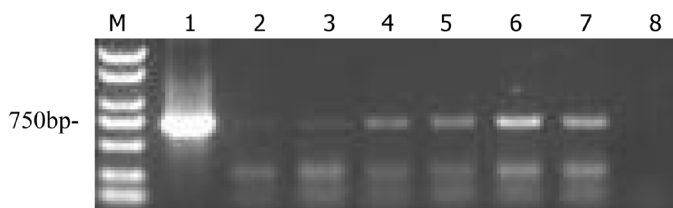


Figure 4. BM2000; 1: positive; 2 - 7: sample; 8: negative

图 4. BM2000; 1: 阳性; 2~7: 样品; 8: 阴性

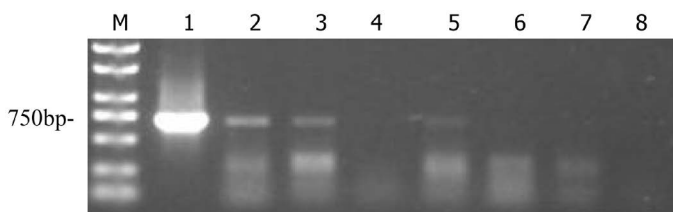


Figure 5. BM2000; 1: positive; 2 - 7: sample; 8: negative

图 5. BM2000; 1: 阳性; 2~7: 样品; 8: 阴性

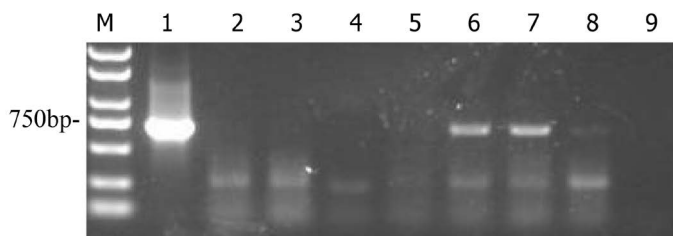


Figure 6. BM2000; 1: positive; 2 - 8: sample; 9: negative

图 6. BM2000; 1: 阳性; 2~8: 样品; 9: 阴性

(2) 用分子生物学的方法对烟草 TMV 常发土壤及对应烟株进行了 TMV 检测, 并明确了土壤是 TMV 传播途径, 对 TMV 是否会由土壤传播得出了肯定的依据, 为生产实际中防控 TMV 有现实的指导意义。

基金项目

湖南省烟草公司重点科研项目(项目编号: 14-16ZDAa02)。

参考文献 (References)

- [1] 朱贤朝, 等, 主编. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] 杨松. 烟草种传烟草花叶病毒(TMV)的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [3] 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(10): 54-56.
- [4] 董红红. 烟草种子和土壤携带三种病毒对烟苗的侵染分析[D]: [硕士学位论文]. 广州: 华南农业大学, 2016.