

# 番茄黄化曲叶病毒(TY)侵染性克隆接种鉴定方法研究

张少丽, 邵景成, 胡志峰

(甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 采用 YEP1 和 YEP2 培养基培养番茄黄化曲叶病毒侵染性克隆 pBinPLUS-1.7A+2 $\beta$ , 并用固体菌落、液体菌液浓度 OD<sub>600</sub>≈0.6、液体菌液浓度 OD<sub>600</sub>≈1.0 对感病番茄品种 MM、中蔬 4 号、98-B1 在 4~6 叶苗期进行接种处理。结果显示, 2 种液体培养基的液体菌液浓度为 OD<sub>600</sub>≈0.6 时接种处理发病率较高, 并初步确立了无 TY 发病地区侵染性克隆接种鉴定方法。

**关键词:** 番茄; 黄化曲叶病毒病; 侵染性克隆; 抗性鉴定

**中图分类号:** S436.412.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2014)10-0016-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2014.10.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2014.10.006)

## Study on Inoculated Identification Techniques for Infectious Clones to Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TY)

ZHANG Shao-li, SHAO Jing-cheng, HU Zhi-feng

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

**Abstract:** The pBinPLUS-1.7A+2 $\beta$  was nourished in two species medium, and set up three different treatments respectively, such as colonies, the two concentration of agrobacterium is about OD<sub>600</sub>≈0.6 or OD<sub>600</sub>≈1.0. The 4~6 leaves seedlings were inoculated in susceptible tomato varieties MM, Zhongshu 4, and 98-B1. The results shows that it was higher TY incidence when the two concentration of agrobacterium is about OD<sub>600</sub>≈0.6. The techniques of pBinPLUS-1.7A+2 $\beta$  inoculation identification is established preliminarily in the areas, where the TY has not happened.

**Key words:** Yellow leaf curl virus; Infectious clones; Resistance evaluation

番茄已成为我国种植面积最大的蔬菜作物之一, 但由于番茄黄化曲叶病毒病(TY)的大面积爆发, 严重制约了番茄产业的进一步发展。据各地植保部门的不完全统计, 我国番茄 TY 的年发生面积超过 6.7 万 hm<sup>2</sup>, 年经济损失至少 20 亿元<sup>[1~2]</sup>。TY 一旦发生, 防治效果较差。预防该病最有效的措施是培育抗病品种, 而抗病品种的选育, 从抗源材料的筛选、后代分离群体的选择, 直到品种的推广, 都离不开抗病性鉴定。

目前对 TY 鉴定方法有分子标记检测、带毒烟粉虱侵染、发病环境下自然接种、含 TY-DNA 的侵染性克隆注射接种等。虽然分子标记简单易行, 但由于其与抗病基因间存在一定的遗传距离, 检测结果与实际抗病性间很难达到 100%吻合, 需要结合其它方法做进一步的验证。在没有自然发病

的地区利用带毒烟粉虱侵染、发病环境下自然接种的方法, 生态风险很大, 采用 TY-DNA 的侵染性克隆注射接种法可弥补以上不足<sup>[3]</sup>。甘肃省兰州市尚未发现 TY 的发生, 我们开展了 TY-DNA 侵染性克隆接种鉴定方法研究, 初步确立了一套无发病区采用侵染性克隆接种鉴定番茄黄化曲叶病毒抗性的方法, 以期对抗 TY 番茄品种的选育和防止 TY 的发生提供有效手段。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料

供试番茄品种为感 TY 番茄品种 MM、中蔬 4 号(由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供)和鲜食番茄杂交组合 98-B1 (由甘肃省农业科学院蔬菜研究所提供)。

用于苗期接种的 TY-DNA 侵染性克隆 pBin-

收稿日期: 2014-085-29

基金项目: 甘肃省农业科学院农业科技创新专项(2012GAAS15-16)部分研究内容

作者简介: 张少丽(1978—), 女, 山东蓬莱人, 副研究员, 博士, 主要从事番茄育种与生物技术研究工作。联系电话: (0931)7614531。E-mail: shaolizh@163.com

通讯作者: 邵景成(1963—), 男, 甘肃秦安人, 研究员, 主要从事番茄育种与栽培研究工作。联系电话: (0931)7614531。E-mail: shaojc1963@163.com

PLUS-1.7A+2 $\beta$ (农杆菌)引自浙江大学周雪平教授实验室。

## 1.2 实验方法

1.2.1 育苗 实验材料于 2014 年 5 月 12 日播种于 50 孔的育苗穴盘中, 置育苗温室中培养, 4~6 叶时进行苗期接种。

1.2.2 培养基配制 液体培养基配制: YEP1—牛肉膏 1%, 酵母提取液 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0; YEP2—胰蛋白胨 1%, 酵母提取液 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0。固体培养基是在上述液体培养基中分别加入 0.8% 的琼脂即可。

1.2.3 农杆菌的培养 将配制好的培养基在 120 °C 下灭菌 30 min, 取出晾至 37 °C 左右, 加入利福平 (50 mg/L) 和卡那霉素 (50 mg/L)。在液体培养基中接入农杆菌菌种, 200 r/min、28 °C 过夜摇菌, 进行活化。将活化好的农杆菌接种于固体培养基中 28 °C 倒置暗培养, 得到固体菌落。挑取单菌落, 接种于液体培养基中培养, 培养至菌液浓度为 OD<sub>600</sub> ≈ 0.6、OD<sub>600</sub> ≈ 1.0。共得到 6 种不同状态的含

TY-DNA 的农杆菌, 即 YEP1 固体菌落、YEP1 液体菌液浓度 OD<sub>600</sub> ≈ 0.6、YEP1 液体菌液浓度 OD<sub>600</sub> ≈ 1.0; YEP2 固体菌落、YEP2 液体菌液浓度 OD<sub>600</sub> ≈ 0.6、YEP2 液体菌液浓度 OD<sub>600</sub> ≈ 1.0。

1.2.4 接种 于 2014 年 6 月 18 日 (番茄 4~6 叶苗龄) 时进行接种。菌液接种时采用韧皮部 (距根部 1~2 cm 处) 人工注射接种<sup>[3]</sup>, 每株 0.5 mL 左右, 每品种每处理各接种 10 株。固体菌落接种时, 用牙签戳破韧皮部 (距根部 1~2 cm 处), 刮取固体菌落, 涂抹于伤口, 每品种接种 10 株, 对照 (不接种) 为 10 株。接种后 20、30、45 d 观察植株发病症状, 统计发病率。

## 2 结果与分析

### 2.1 番茄 TY 的发病过程

对接种植株观察发现, 接种后 20 d 内植株不表现发病症状。接种后 30 d 时, 大部分接种植株上部叶片出现轻微黄化, 各处理间发病程度无差异, 但品种间发病程度不同, 具体发病程度由高到低依次表现为 MM、中蔬 4 号、98-B1 (见图 1)。

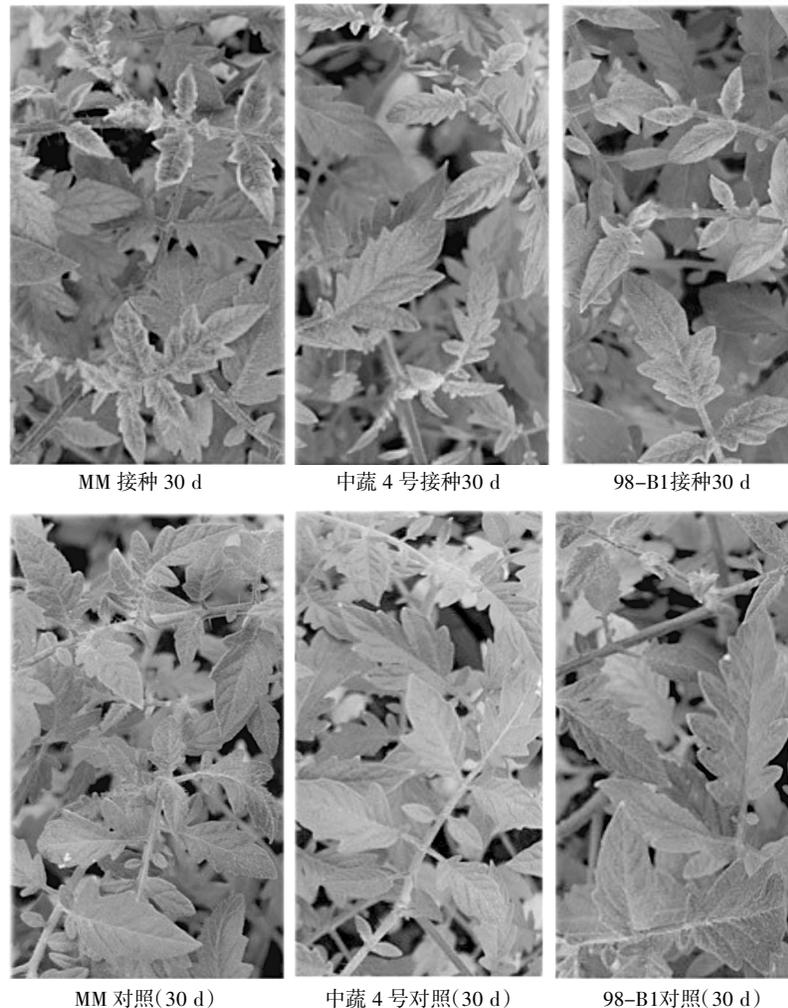


图 1 MM、中蔬 4 号、98-B1 接种 30 d 植株发病情况 (以 YEP2 液体菌液浓度 OD<sub>600</sub> ≈ 0.6 接种为例)

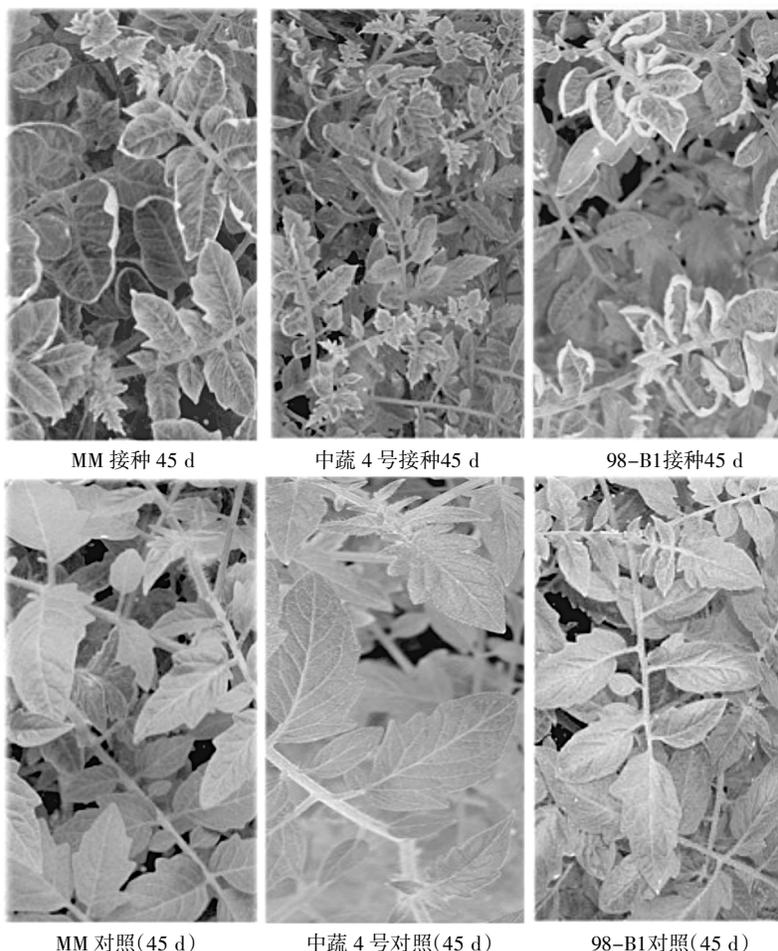


图 2 MM、中蔬 4 号、98-B1 接种 45 d 植株发病情况(以 YEP2 液体菌菌液浓度  $OD_{600} \approx 0.6$  接种为例)

接种后 45 d 时, 接种植株明显生长缓慢或停滞, 上部叶边缘上卷、黄化、皱缩, 表现为充分感病, 各处理间及品种间发病程度差异均不明显(见图 2)。

## 2.2 植株发病情况

接种 45 d 后, 所有接种植株已充分发病, 而同一穴盘的对照植株完全正常, 说明该病不会通过土壤、水分传播, 也表明育苗室内不存在传毒媒介烟粉虱。处理发病率统计结果(表 1)表明, 处理间差异不明显, 固体菌落接种以 YEP2 固体菌落接种的发病率效果较高, 液体菌菌液接种以 YEP1 液体菌菌液浓度  $OD_{600} \approx 0.6$  和 YEP2 液体菌菌液浓度  $OD_{600} \approx 0.6$  接种的发病率效果较好。综合考虑认为, 当液体菌(无论 YEP1 还是 YEP2)菌液浓

表 1 接种植株发病率调查结果

菌处理	发病率(%)		
	MM	中蔬4号	98-B1
YEP1 固体菌落	80	100	100
YEP1 液体菌菌液浓度 $OD_{600} \approx 0.6$	100	100	100
YEP1 液体菌菌液浓度 $OD_{600} \approx 1.0$	90	100	80
YEP2 固体菌落	100	90	100
YEP2 液体菌菌液浓度 $OD_{600} \approx 0.6$	100	90	100
YEP2 液体菌菌液浓度 $OD_{600} \approx 1.0$	100	100	80

度为  $OD_{600} \approx 0.6$  时, 发病效果较好。

## 3 小结与讨论

1) 利用含 TY-DNA 的侵染性克隆进行注射接种, 无论是被用做番茄转基因研究的常用品种 MM、中蔬 4 号, 还是鲜食番茄杂交组合 98-B1, 都能正常发病, 发病程度也无太大差异, 预示该方法有一定的广适性。

2) 根据研究结果初步判定, 各处理间差别不明显。相比之下, 当 2 种液体培养基菌液浓度为  $OD_{600} \approx 0.6$  时发病率较高。但采用固体菌落接种操作简单, 易于掌握, 适合大量材料的鉴定。

3) 从环境安全方面考虑, 侵染性克隆接种方法具有很大优势, 不会带来生态风险。另外, 该方法能够比较客观的反应材料的真实抗病性, 大大降低了自然接种下不同年份环境因素的干扰及带毒烟粉虱的喜食偏好等因素的影响。

4) 本实验对 2 种不同培养基培养的固体菌落及不同浓度的菌液进行了接种比较, 初步确立了一套无发病区采用侵染性克隆接种鉴定番茄黄化曲叶病毒抗性的方法, 为今后的抗 TY 番茄品种的选育奠定了基础。

# 甘肃省测土配方施肥推荐系统的设计与应用

董博<sup>1</sup>, 江晶<sup>2</sup>, 张东伟<sup>1</sup>, 郭天文<sup>1</sup>, 董青松<sup>3</sup>, 曾骏<sup>1</sup>

(1. 甘肃省农业科学院旱地农业研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学资源与环境学院, 甘肃兰州 730070; 3. 甘肃省智慧农业工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 采用C#语言, 以 Microsoft .NET Framework 为开发环境, 利用微软Access 建立数据库, 数据访问与存取采用 ADO.NET 技术, 开发了一套甘肃本土化的测土配方施肥推荐系统。该系统集成配方施肥和病虫害防治查询功能, 系统界面简洁、实用, 可为农户提供科学合理的推荐施肥量。

**关键词:** 测土配方施肥系统; 设计; 甘肃省

**中图分类号:** S143 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2014)10-0019-02

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2014.10.007

## Design and Application of Soil Testing and Fertilizer Recommendation System in Gansu

DONG Bo<sup>1</sup>, JIANG Jing<sup>2</sup>, ZHANG Dong-wei<sup>1</sup>, GUO Tian-wen<sup>1</sup>, DONG Qing-song<sup>2</sup>, ZENG Jun<sup>1</sup>

(1. Institute of Agriculture Dryland, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. College of Resources and Environment, Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** The measured soil fertilizer recommendation system has been developed based on the Microsoft .NET Platform and the character of C# language, using access to build up database, and the data visiting technology is adopted in ADO.NET. The system integration formula fertilization and pest control query function, the system interface is simple and practical, and can provide scientific and reasonable recommendations for farmers fertilizer rate.

**Key words:** Soil testing and fertilizer recommendation system; Design; Gansu

甘肃省测土配方施肥工作已取得显著成效<sup>[1-4]</sup>, 但如何选择合理的方式向广大农户推荐施肥成为一个亟需解决的问题。目前国内主要通过“明白纸”、“施肥专家系统”等方式推广。调查发现, 困扰农户使用的主要问题为推荐系统运行不稳定、操作复杂、农户不会正确选择参数以及操作模式单一、后期维护成本高等。我们采用C#语言, 以 Microsoft .NET Framework 为开发环境, 利用微软 Access 建立数据库, 数据访问与存取采用 ADO.NET 技术, 开发设计了一套理论清晰、使用方便的触摸屏专家施肥系统。该系统对农户文化程度要求低, 可方便查询出地块施肥量、肥料种类以及作物病虫害防治方法, 对推动测土配方施肥工作进展具有重要意义。

### 1 系统设计

#### 1.1 设计目标

根据测土配方施肥试验的成果, 采用养分平衡法、丰缺指标法、土壤检测值与最佳施肥量函数法推算地块推荐施肥量, 提供施肥方法和肥料用量, 并可打印施肥建议卡。

#### 1.2 开发环境

操作系统: windows XP x86 或者 windows 7 32bit

数据库: Office access 2003

软件框架: Microsoft .net framework 4.0

开发语言: Microsoft Visual C#

#### 1.3 数据库结构

系统数据库用来存储推荐施肥所需的各种地

收稿日期: 2014-09-10

基金项目: 甘肃省科技支撑计划“旱作农田精确施肥技术研究”(1104NKCA093)部分内容

作者简介: 董博(1981—), 男, 山东聊城人, 助理研究员, 主要从事数字农业工程、旱地农田水肥调控方面的研究。联系电话: (0931)7611161。E-mail: dongbobby@163.com

### 参考文献:

- [1] 龚一帆, 杜永臣, 谢丙炎, 等. 威胁番茄生产的新病害——番茄黄化曲叶病毒病[J]. 中国蔬菜, 2009(21): 1-4.
- [2] 胡志峰, 邵景成. 甘肃省设施番茄黄化曲叶病毒病的

发生与防治[J]. 甘肃农业科技, 2014(1): 54-56.

- [3] 陶小荣. 中国番茄黄化曲叶病毒致病分子机理及其卫星DNA诱导的基因沉默研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.

(本文责编: 郑立龙)