

烟草霜霉病检测技术研究概况

陈学军¹, 刘勇¹, 张谊寒¹, 戚龙君², 李永平^{1*}

(1. 云南省烟草农业科学研究院, 云南昆明 650021; 2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要 介绍了烟草霜霉病检测的必要性, 综述了烟草霜霉病的致病性检测、显微镜检查及 PCR 检测等检测技术的特点, 并对国外引种烟草霜霉病 PCR 技术的应用进行了展望。

关键词 烟草; 霜霉病; 检测技术

中图分类号 S572 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)05-01952-02

Review on Detection Method for *Paraspora Tabacina* in Tobacco

CHEN Xue-jun et al (Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650021)

Abstract The necessity of paraspora tabacina detection was introduced, the detection methods of TBM in tobacco was reviewed, including pathogenicity test, microscopic observation and PCR analysis. The future application of PCR detection for TBM in tobacco was described.

Key words Tobacco; *Paraspora tabacina*; Detection method

我国是世界上最大的烟叶生产国, 但不是烟草原产地, 目前种植的各种类型烟草都是从引种开始的, 因此, 从国外引进烟草种质资源对于我国烟草品种选育和生产具有重要意义^[1]。从国外引种可直接应用于生产, 并可在烟叶生产上成为主栽品种, 如 20 世纪 80 年代末由美国引进的烤烟品种 K326 等品种^[2]。另外, 强化包括国外引种在内育种科研工作也是满足卷烟工业对原料的多样化需求的重要措施之一。但随着引种工作力度的不断加大, 引进的烟草种质中可能存在的检疫性烟草霜霉病等病害传入与传播的风险也在增加^[3]。在特定设施内, 采用多种检测手段, 开展检疫性烟草霜霉病的检测, 并开展严格的隔离试种观察, 是烟草引种工作必不可少的重要环节。为此, 笔者综述了不同烟草霜霉病的检测方法, 以期能快速检测烟草霜霉病提供参考。

1 烟草霜霉病检测的必要性

烟草霜霉病菌(*Paraspora tabacina*)为卵菌纲真菌, 是一种专性寄生菌, 只能在活体组织上生长和繁殖。该病菌主要侵染烟草, 也可在辣椒、番茄及茄子等茄科作物上寄生^[4]。

1979 年之后, 烟草霜霉病成为北美烟叶产区的一种毁灭性病害(图 1)^[5], 在温度及湿度适宜的美国东南部烟叶主产区几乎每年都有发生^[6]。某些情况下, 霜霉病会有潜伏期, 潜伏期为接种后的 5~7 d。该病发病严重时, 常表现为系统感染症状(图 2): 整个烟株都受到病害侵袭, 症状表现为叶片卷曲、缺绿, 生长迟缓, 末端芽坏死^[5]。茎秆内形成层及韧皮部组织阻滞坏死等, 在该情况下叶片却无孢囊孢子等症。

目前, 美国、巴西及加拿大等世界主要烟叶生产大国均为烟草霜霉病疫区国家。烟草霜霉病是我国重要的检疫性

有害生物, 根据《中华人民共和国进出境动植物检疫法》等相关法规, 进口的烟草种子及烟叶等制品必须进行烟草霜霉病的检测才能用于科研及生产。

2 烟草霜霉病检测技术

2.1 致病性检测 烟草霜霉病菌是专性寄生菌, 迄今尚未见适宜的培养基进行扩繁的报道, 只能从病叶中接种, 会观察到典型的烟草霜霉病症状^[4]。而保存于液氮中的霜霉病孢囊孢子(含 20% 的二甲基亚砷)虽有较完整的孢囊(图 3), 但接种成功率很低^[5]。



图 1 重感霜霉病的烟草植株(下部叶片已无法烘烤)



图 2 系统感染霜霉病的烟草

2.2 显微镜检测 来自感霜霉病产区的各种加工类型烟叶及种子是进行烟草霜霉病显微镜检测的主要材料。

2.2.1 烟叶检查。 参照章正的方法^[3], 进行烟叶检测。近

基金项目 中国烟草总公司及云南省烟草公司科技项目(110201102003, 2010YN15, 2011YN05)。

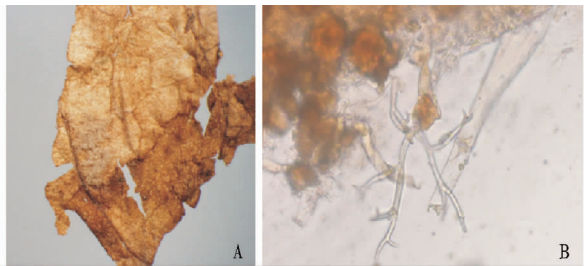
作者简介 陈学军(1970-), 男, 山西洪洞人, 副研究员, 从事烟草育种研究, E-mail: cxjkm@163.com。* 通讯作者, 研究员, 从事烟草遗传育种研究, E-mail: liyongping@yntsti.com。

收稿日期 2013-01-25

年来,上海出入境检验检疫局利用显微镜镜检每年都从土耳其等地中海国家进口的香料烟烟叶中检测出烟草霜霉病孢囊孢子(图4)。



图3 典型二杈分枝状烟草霜霉病



注:A.病叶;B.镜检结果。

图4 上海出入境检验检疫局检出的烟叶霜霉病孢囊孢子(2011年)

2.2.2 种子检测。参照相关的国家标准^[7],对引进的烟草种子进行洗涤法、萌芽法及生育期隔离种植,进行常规的显微镜镜检及隔离试种检测。

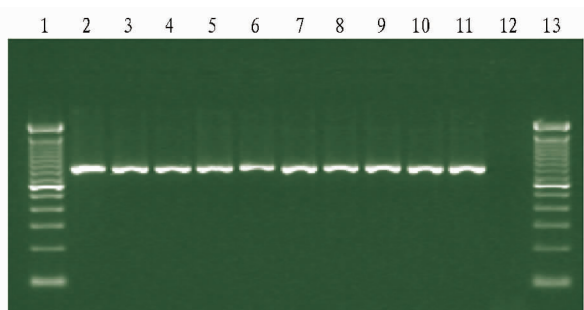


图5 10份含烟草霜霉病的叶片PCR检测结果(引物是PTAB和 内转录区区间4)

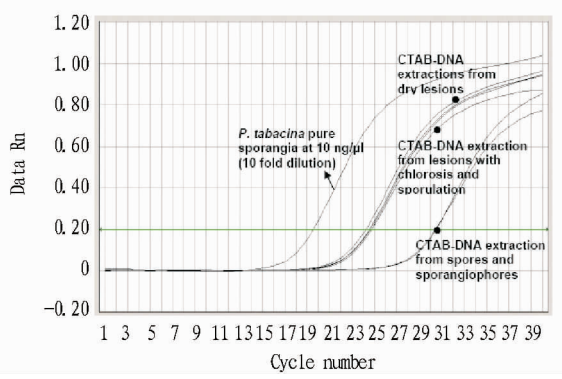


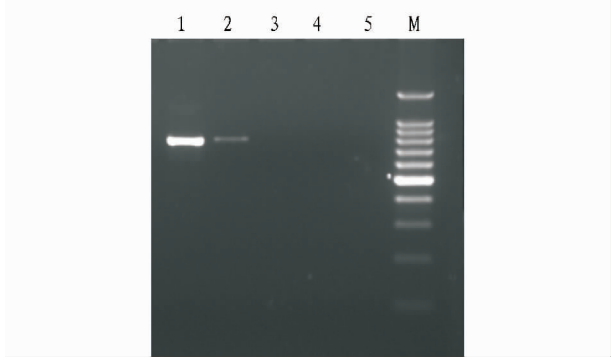
图6 不同来源烟草霜霉病实时定量PCR检测

2.3 PCR检测 常规的烟草霜霉病检测法耗时,存在检测

效率低及漏检的风险,尤其在发生霜霉病系统感染时,常规检测方法变得极为困难。分子生物学技术的运用很好地解决了这一问题^[8]。

2.3.1 常规PCR检测。美国北卡州立大学等研究机构率先利用PCR技术开展了烟草霜霉病快速检测研究(图5)^[9],在10份烟草霜霉病菌叶片中均扩增到大小为764bp的目标条带。

2.3.2 实时定量PCR检测。美国北卡州立大学已完成烟草霜霉病定量PCR检测研究(图6)^[10],为开展烟草霜霉病快捷检测提供了有利手段。目前,云南省烟草农业科学研究所与美国北卡州立大学、上海出入境检验检疫局合作,已初步掌握烟草霜霉病的PCR检测技术(图7)。



注:1. 肯塔基烟草霜霉病 DNA(美国北卡州立大学提供);2. 含烟草霜霉病的土耳其香料烟(上海出入境检验检疫局提供);3. NC71;4. PVH1452;5. 红大(国内品种);M. 100 bp 标准分子量。

图7 美国引进品种烟草霜霉病PCR检测结果

3 结语

随着我国国外引种步伐的加快,烟草霜霉病侵入和感染的风险也随之加大,掌握和应用包括PCR检测在内的烟草霜霉病检测技术,可有效开展烟草霜霉病的早期快捷诊断,对于提高国外引种霜霉病检测效率、防止烟草霜霉病的感染、加快国外优良品种引进步伐、促进烟叶生产可持续发展具有重要意义。

参考文献

[1] 杨铁钊. 烟草育种学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
[2] 胡荣海. 云南烟草栽培学[M]. 北京:科学出版社,2007.
[3] 章正. 烟草霜霉病[J]. 中国烟草学报,1995,2(3):1-10.
[4] 章正,戚龙君,吴品珊,等. 烟草霜霉病检疫病理学特性的研究[J]. 植物病理学报,1998,28(2):131-138.
[5] TODD F A. Flue-cured Tobacco-Producing A Healthy Crop[M]. North Carolina:Parker Graphic,1981:163-170.
[6] LUCAS G B. The war against blue mold[J]. Science,1990,210(10):147-153.
[7] 烟草总公司青州烟草研究所. 中华人民共和国国家标准. 烟草种子霜霉病检疫规程. GB15699-1995[S]. 北京:中国标准出版社,1995.
[8] LUCAS G B. Disease of Tobacco[M]. 3rd ed. Raleigh,NC:Biological Consulting Associates,1975:621.
[9] JEAN BEAGLE RISTAINO, ANDREA JOHNSON, MONICA BLANCO-MENESES, et al. Identification of the tobacco blue mold pathogen, Peronospora tabacina, by polymerase chain reaction[J]. Plant Disease,2007,91(6):685-691.
[10] MONICA BLANCO-MENESES. Population Biology and Detection of the Tobacco Blue Mold Pathogen, Peronospora tabacina[D]. Raleigh:North Carolina State University,2009.