

# TMV弱毒DN60-3的诱变及其对番茄花叶病的保护效果试验\*

郑 贵 彬

(陕西省西安市农业科学研究所, 西安)

## 提 要

为获得TMV弱毒, 在选择轻症纯毒系的基础上, 以亚硝酸诱变处理30、40、50、60分钟, 得到了30个无症突变株, 经室内交叉保护试验, 其中DN60-3对TMV的重花叶株系、条斑株系和山东济南的坏疽型都有显著的干扰作用, 而对生产影响不大的黄色花叶株系和黄色环斑株系的干扰作用差。田间试验示范结果, 对保护地栽培的番茄花叶病(包括卷叶病)的防病增产效果明显。同时发现, 栽培技术差, 植株长势弱, 则保护效果减低。

由于弱毒的保护作用属于特异性免疫, 因此, 在弱毒应用上, 对TMV和CMV混发地区的露地番茄无保护作用。随着抗TMV番茄品种的全面推广, 弱毒的利用将会失去重要性, 目前一些中小城市番茄品种正处于更新时期, 弱毒仍可发挥一定作用。

利用TMV弱毒防治番茄花叶病是近代生物防治中的一条新途径。六十年代中期开始, 一些国家就已开展此项研究工作, 其中效果显著的有荷兰Rast(1972)、日本大岛(1966), 他们分别以亚硝酸和热处理诱变获得TMV弱毒MII-16和L<sub>11</sub>A, 后者已在生产中有效地用于防治番茄花叶病<sup>[9,6]</sup>; 1978年大岛分离的L11A237可保护具有抗TMV基因(Tm-1/+ )的番茄品种不被强毒CH<sub>2</sub>侵染<sup>[8]</sup>。国内张秀华、田波等(1978)用亚硝酸诱变得到对强毒(条斑株系)干扰作用明显的TMV弱毒N<sub>11</sub>和N<sub>14</sub>, 并经有关省市协作单位田间试验确定了防效<sup>[1,3,4]</sup>。我们于1979年采用同样的化学诱变处理, 获得三个TMV弱毒分离物在温室、田间番茄上进行对强毒的干扰作用和防治效果试验。

## 材 料 和 方 法

**一、TMV试材的选择** 1977年6月发病盛期, 自西安市郊区七个蔬菜队采集番茄花叶病田间症状轻斑驳花叶和无症株, 接种在心叶烟和感病品种红牛心番茄苗上, 将确定为TMV的21个番茄病毒标样, 保留毒源于防虫温室内。

诱变处理前, 先进行严格的单株与群体筛选, 前者侧重于轻症的选择, 后者注意干

本文1986年5月15日收到

\*我所符云华同志及西北农业大学植保系82级李玉娥、园艺系82级李经文同学曾参加本课题部分实验

扰效果。具体做法是用心叶烟枯斑分离，约30个枯斑，各接种一株番茄苗，通过每个单株的系统症状表现，淘汰重症株，选择轻症的纯毒系；然后将入选的轻症纯毒系单株，接种于一定数量（20—30株）的番茄苗上来扩大病株群体，取其半数以上的植株再接强毒（TMV的条斑和重花叶两株系的混合汁液），以便于观察比较群体间的差别，根据干扰作用的强弱，从中选优去劣，如此自78年春至79年夏连续三次在室内、田间进行选择和分离。

**二、化学诱变处理和TMV无症突变株的分离** 将入选的TMV轻症试材，摘取病叶，冰冻12小时，研碎榨取汁液，低速离心（3000r/min）进行粗提纯，然后取汁液2份，加4mol/L亚硝酸钠1份和1mol/L醋酸缓冲液（pH4.0）1份，处理30、40、50、60分钟，再分别用1/15mol/L的磷酸缓冲液（pH7.0）稀释成1/100浓度，接种心叶烟上，待产生枯斑后，剪取枯斑，每一枯斑转接一株番茄苗（红牛心品种）上，各个时间处理分别接枯斑50个，一份TMV轻症试材共接枯斑200个以上，然后观察症状，显症的全部淘汰，无症的再接种心叶烟上，留取无症带毒的突变单株。

**三、TMV无症突变株的室内交叉保护试验** 1979年8月—11月重点对发生普遍的强毒TMV重花叶株系做交叉保护试验。

1980年6月—7月选留对TMV重花叶株系有干扰作用的弱毒，进而做另一强毒TMV条斑株系及其它有关株系的保护试验。

番茄品种是加拿大八号，在防虫温室内盆栽，当幼苗2—3片真叶时，将弱毒接种第一片真叶上，10—15天后接强毒于第二片真叶上，同时设仅接强毒和弱毒及不接毒的做对照，各处理均为三株，接强毒TMV条斑株系、重花叶株系及坏疽型的重复四次；接黄环斑株系、黄花叶株系、轻花叶株系的重复两次。另外还接种CMV黄化皱缩株系及矮缩坏死型（暂定），也是重复两次，观察其交叉保护作用。

**四、TMV弱毒DN60-3对保护地栽培番茄花叶病的保护试验** 1. 温室番茄花叶病的保护试验：在郊区工农大队试验站温室试验。番茄品种杂六，元月11日播种，2月26日结合分苗用1份弱毒汁液与5份1%磷酸缓冲液混合，浸根30分钟接弱毒，4月10日定植温室内，5月9日盛花期时接强毒。每间温室三畦（面积120平方尺），弱毒区5畦，设三个重复；对照区3畦，设两重复插于弱毒区间。各处理选择10株分期记载各层花序的开花数、座果数、座果率。结合采收随机取样25个以上单果，求平均果径。并统计病情和产量。各处理在发病初期取样100株，盛期接50株，记载发病率和病情指数。

病情分级标准：0级—无症；1级—轻微斑驳花叶；2级—花叶明显、叶畸形；3级—严重疱斑花叶畸形、矮化。

2. 早熟复盖番茄花叶病的保护试验：在郊区五一大队一队试验。面积0.32亩，其中弱毒区0.06亩，对照区0.04亩。三次重复。供试品种加拿大八号，元月10播种，2月14日温室第一次分苗时，做弱毒汁液浸根接种，第二次分苗于营养钵里，3月21日定植，中棚复盖，5月11日去膜。4月13日初现蕾时，在上部第二或第三叶片汁液摩擦接种强毒。以仅接强毒的做对照。产量、病情记载标准同前。调查卷叶株率和指数的分级标准：0级—全株无卷叶；1级—第一层果下部全部卷叶；2级—第二层果下部全部卷叶；3级—全株卷叶。并进行生育情况如株高、果径、各层花序座果数、座果率（方法

同前)的调查;发病盛期,每个处理任择5株,摘取上部第3叶片,计算叶面积。

3.3 TMV弱毒DN60-3防治番茄花叶病的多点示范:1982年分别在南郊白庙大队、西郊红星大队、工农大队和五大队进行TMV弱毒防治番茄花叶病的多点示范。面积6.6亩,均为早熟复盖栽培番茄。结合分苗(5—6片真叶期)采用浸根接弱毒,以不接弱毒的为对照。定植后,盛花期时在上部第2叶接强毒。同时加强田间各项栽培管理技术。防病增产效果调查同前。

## 试验结果

### 一、TMV无症突变株的诱变和分离

诱变处理前,经室内和田间连续三次选择和枯斑分离,原采集保留的21份TMV病毒标样中,仅选留两个TMV标样(77-20、77-9)的四份TMV轻症试材:77-20-17-1(代号A)、77-20-17-11(代号B)、77-0-14-21(代号C)、77-9-4-14(代号D),前两者在番茄上症状轻斑驳花叶或无症,后两者为花叶、轻畸形,且前期抑制生长。

这四份TMV轻症试材,各经不同时间(30、40、50、60分钟)的亚硝酸处理,再分别用磷酸缓冲液稀释,接种心叶烟,共做827个单斑分离,单斑接种于番茄苗上,15—30天后,根据新叶症状,淘汰显症(多为花叶、畸形)和无毒株。最后得到30个在番茄和三生烟上表现无症的TMV突变株(表一)。

表1 亚硝酸诱变处理获得的TMV无症突变株

Table 1 The symptomless mutants of TMV obtained by the mutagenic treatment with nitrous acid

TMV轻症试材	代号	TMV无症突变株
77-20-17-17-1	A	60-3、50-1、50-3、50-5、50-7、50-9 50-11、50-21、50-26、50-30、50-31、50-35 50-27、40-2、40-6、40-13、40-21、40-26
77-20-17-11	B	60-6、60-14、63-46、40-4、30-4、
77-0-14-21	C	60-1、40-1、40-6、40-7
77-9-4-14	D	60-1、60-3、50-7

### 二、交叉保护作用的测定结果

接种强毒TMV重花叶株系后,诱变的30个TMV无症突变株中绝大多数没有或仅有微弱的干扰作用,一般地接强毒7—10天后番茄新叶相继出现花叶、扭曲、疱斑畸形症状;有的仅有短暂的1—3天干扰作用。如AN50-27、AN50-31等。初筛结果只有三个弱毒(DN60-3、DN60-1、CN40-1)对强毒TMV重花叶株系表现显著的干扰作用。在此基础上进而测定对其它有关强毒的干扰作用(表二)。

DN60-3连续两次试验,结果均一致,能够完全抑制强毒TMV重花叶株系的症状表现,自苗期至结果期一直保持较强的干扰作用。该弱毒对西安的TMV条斑株系和济南的TMV坏疽型这两个导致番茄减产的毒源具有显著的干扰作用。但对在生产上影响不大。

表2 TMV 弱毒的交叉保护试验

Table 2 The cross protection test of the attenuated strains of TMV

供试弱毒	TMV 强毒						CMV	
	条斑 株系	坏疽型 (济南)	重花斑 株系	轻花叶 株系	黄环叶 株系	黄花叶 株系	黄化缩 缩型	矮缩坏 死型
DN60-3	0/12	0/12	0/12	0/6	1/6	6/6	6/6	6/6
DN60-1	12/12	0/12	0/12	0/6	0/6	0/6	6/6	6/6
CN40-1	0/12	0/12	0/12	0/6	0/6	0/6	6/6	3/6
对照(不接毒)	0/12	0/12	0/12	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
对照(弱毒)	0/12	0/12	0/12	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
对照(强毒)	12/12	12/12	12/12	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

的TMV黄色花叶和黄环斑两株系干扰作用差。

DN60-1接种强毒TMV重花叶株系同样具有显著的干扰作用，只是在番茄进入盛花期，有的显现出退绿斑驳。这一弱毒对济南的强毒TMV坏疽型有干扰作用，而对西安的强毒TMV条斑株系则无。不同于DN60-3的是该弱毒对黄环斑株系和黄花叶株系有干扰作用。

CN40-1的最大特点是接种TMV各株系，它都有恒定的干扰作用。唯该弱毒在番茄苗期阶段表现黄绿斑驳花叶，并轻度抑制生长；初现蕾时，花叶的系统症状才逐渐消失，全株无症。

以上三个TMV弱毒对CMV均无干扰作用。

### 三、弱毒DN60-3对保护地番茄花叶病的保护试验结果：

1. 温室栽培番茄的效果：接种强毒后，弱毒区基本未出现症状，个别显症的植株仅是轻微的斑驳症状；接强毒的对照区多为严重的花叶畸形；在座果率和产量方面也有明显的差别，故增产比较显著（表三）。

表3 温室番茄接弱毒后对番茄花叶病的防治效果

Table 3 The effect of attenuated virus on controlling tomato mosaic disease in greenhouse

试验处理	座果情况			花叶病发生情况				产量情况	
	平均 花数	平均 座果数	平均座果 率%	病株率 %	病 情 指 数	较对照增 减%	每间温室平均 产量(公斤)	较对照增 减%	
弱毒区	4.7	2.1	45.9	2.6	0.9	-97.5	39.6	+25.8	
对照区	3.7	1.0	29.5	82.0	37.0	—	29.4	—	

2. 露地早期复盖番茄的效果：试验的开始阶段，即番茄在两次分苗和定植时，都遇到连阴雨和低温天气，采用浸根接毒的番茄苗，遭受不同程度的立枯病危害，发根迟缓，生长受阻，至4月16日接强毒第三天调查，平均株高仅25.4厘米，对照已是30.1厘米。两周以后情况开始变化，弱毒区叶形、叶色一直正常，而对照区番茄新叶花叶扭曲畸形，色黄绿，叶片大部卷曲，尤以接强毒后的第3、4两周，对照区株高仅增9%，弱毒区却是20.5%，5月14日番茄株高已超过对照52.1厘米的高度，达到55.4厘米。由于

对照病毒症状迅速加剧，导致番茄座果数、座果率显著下降，果实变小，产量减低。相反弱毒区即使早期出现根病，影响了番茄前期生长发育，但自定植缓苗后，植株恢复正常，虽然强毒攻击，但直至采收时，番茄始终长势健壮，病情轻，同对照比较，病情减轻77.5%，增产16.9%，因而显示该弱毒对防止番茄花叶病有较突出的作用（见表四及表五）。

#### 四、弱毒DN60-3防治番茄花叶病大田示范

各示范点的发病趋势是，对照区病情发展均快，弱毒处理区病情发展缓慢，从各示范点结果看，发病轻重的差异是极其显著的，弱毒处理区花叶病病情减轻70%以上，最高的达92.6%。因此增产效果也比较明显，同对照比较，早期产量增加5.8—13.1%。总产量增加4.6—13.1%（见表六）。

表4 弱毒接种后对番茄生育的影响

Table 4 The influence of inoculating the attenuated virus on the growth and development of tomato

试验处理	株 高 (cm)	第三叶平均叶 面积 (mm <sup>2</sup> )	果 径 (mm)	各层花序座果数					各层花序座果率%				
				1	2	3	4	均平	1	2	3	4	平均
弱毒区	61.4	47.04	63.5	2.6	2.9	2.9	2.4	2.7	54.4	52.4	56.3	51.7	53.6
对照区	53.2	25.73	59.1	1.9	2.3	2.2	1.7	2.0	33.2	45.1	46.7	35.6	40.1

表5 弱毒接毒后对番茄花叶病卷叶病的防治效果

Table 5 The protective effects of inoculating the attenuated virus on tomato mosaic disease and leaf-curling

试验处理	花叶病病情指数					卷 叶 情 况			产 量 情 况		
	30/4	29/5	2/6	平均	较对照增 减%	病株率 %	病 情 指 数	较对照增 减%	平均亩产 (公斤)	较对照增 减%	
弱毒区	0.86	11.3	28.9	13.7	-77.5	62.7	23.6	-67.4	4679.2	+16.9	
对照区	47.3	55.6	79.8	60.9	—	99.3	71.6	—	3886.9	—	

表6 弱毒对番茄花叶病的防病增产效果

Table 6 The effect of inoculation with attenuated virus on the tomato yield and the protection from mosaic disease

试 验 基 点	品 种	处 理	发 病 情 况			产 量 (公斤/亩)			
			发 病 率 %	病 情 指 数	较 对 照 减 轻 %	早 期 产 量	较 对 照 增 减 %	总 产 量	较 对 照 增 减 %
白庙大队	杂六	弱毒区	16.87	8.62	-70.9	3797	+ 8.7	5078.2	+ 8.0
		对照区	86.15	29.63	—	3444.5	—	4670.0	—
红星大队	瓦尔特	弱毒区	3.37	4.93	-92.6	3601.6	+13.1	5865.0	+10.9
		对照区	31.58	26.12	—	3184.4	—	5313.1	—
工农大队	杂九	弱毒区	31.86	12.45	-76.9	2611.0	+ 5.8	6594.8	+ 4.6
		对照区	81.28	53.88	—	2467.6	—	6297.8	—
五一大队	加八	弱毒区	8.67	3.57	-72.4	—	—	5040.9	+13.1
		对照区	29.64	12.97	—	—	—	4380.0	—

## 讨 论

为充实现有防治番茄花叶病(TMV)的各项措施,更有效地控制病害,我们从人工免疫这一途径着手进行研究,这就必须先获得无症的TMV弱毒,这种弱毒还应具有高度恒定的干扰作用,以保护作物免受强毒的侵染。经亚硝酸化学诱变处理,共获得30个无症突变株,但评价一个弱毒有无实用价值,重要的是对强毒是否有高度恒定的交叉保护作用<sup>[2]</sup>。日本的L11A对强毒TMV-L系统和美国的TMV俄亥俄Ⅲ系统有完全的保护作用<sup>[6]</sup>,随后分离的L11A237又有效地保护具有抗TMV基因( $Tm-1/+$ )的番茄品种不被强毒CH<sub>2</sub>侵染<sup>[8]</sup>,它们都能抑制强毒引起的花叶症状和防止植株矮缩。荷兰的MⅡ-16对五个TMV自然株系测定结果,对黄色株系的交叉保护要比绿色株系更有效<sup>[9]</sup>。中国科学院微生物研究所的N<sub>11</sub>和N<sub>14</sub>对TMV条斑株系有明显的保护作用<sup>[3, 4]</sup>,通过测定,我们分离的30个无症突变株中,只有DN60-3、DN60-1和CN40-1三个TMV弱毒对造成番茄减产的TMV条斑和重花叶两个株系,大都具备同样的保护作用。

关于TMV弱毒的田间应用,国外的L11A和MⅡ-16除主要用于温室防止番茄花叶病外,L11A还用于番茄大田防治。81年兰州市农科所引进我所弱毒DN60-3(即弱<sub>1</sub>)和微生物所的N<sub>14</sub>,进行番茄花叶病的防治对比试验,结果两弱毒的防病增产效果相近。从我们连续数年的试验结果看,TMV弱毒DN60-3对温室番茄的增产效果可达25%以上;对早期复盖番茄增产4—15%;但对露地番茄,特别是TMV与CMV混发的中近郊,结果是成效甚微,甚至免疫效果全无,这一点经我们多次试验得到了证实,原因是弱毒的保护作用属于特异性免疫,它只能干扰同类型病毒的强毒侵染,对其它类型的病毒则无能为力。故查清当地番茄病毒类型是很重要的,否则盲目引用,会徒劳无益。在两类病毒复合感染区采用TMV弱毒,也必须局限在保护地栽培的温室、大棚或早期复盖的中、小棚番茄中应用,主要是薄膜复盖栽培能有效地压低有翅蚜飞迁传毒,减少CMV的侵染,可使TMV弱毒达到较理想的保护效果。

近几年随着抗TMV番茄品种的全面迅速推广,对病区控制TMV的发生危害起了积极的作用。在荷兰弱毒已失去重要性,因为菜农栽培的几乎全是抗病品种,采用遗传抗病品种是一个比较实际、经济和可靠的解决办法,我国亦然,抗病品种已大面积普及,不久TMV弱毒的利用将被取而代之。但目前各地正处于抗、感品种的交替阶段,个别地区仍栽培有一定面积的感病品种,同时,不少中小城市品种仍未更新,因此,在这一过渡时期应充分利用和发挥TMV弱毒的保护作用,以保护现有未被淘汰而产量不稳定的感病品种,从促进生育、减轻病情、增加产量(特别是早期产量)、提高品质等方面显示它的突出效果。

另外弱毒的具体应用技术有两点值得商榷:一、结合分苗采用浸根法接种弱毒,固然节省投资、操作简便、易于掌握、生产者容易接受<sup>[5]</sup>,但我们的试验表明,它也存在着损伤根系、抑制生长,在此期间若遇寒流降温,又易被立枯病菌侵染,并难于排除污染等缺点。故认为应与番茄工厂化育苗密切结合,以压力喷枪苗期接种,会收到更好的效果。二、弱毒在田间的保护效果与栽培管理有关。在同一试验条件下,发现花叶严重的地段,前期曾延误整枝打权、侧枝疯长,植株匍匐地面,对照区发病100%,弱毒区

也达30%；管理及时的地段极轻。看来，田间管理技术水平的高低、植株长势的强弱，似乎与抑制或增进弱毒的增殖有关。若仅仅依赖单一的弱毒攻坚，不考虑其它综合措施的配合，也会造成弱毒在田间的防效大大减低。

### 参 考 文 献

- [1] 张秀华等; 1980, 植物病理学报, 10(1) : 49—54.
- [2] 裴维蕃, 1964, 植物病毒学, 农业出版社.
- [3] 田波等; 1980, 植物病理学报, 10(2) : 109—112.
- [4] 张秀华等; 1981, 中国农业科学, 6 : 78—80.
- [5] 谭增亮等; 1981, 植物病理学报, 12(2) : 59—61.
- [6] 大岛信行; 1974, 植物防卫, 28(5) : 184—190.
- [7] 大岛信行; 1976, 植物病害, 30(1) 33—35.
- [8] 大岛信行等; 1973, 植物病理学会报, 44 : 504—508.
- [9] A.Th.B.Rast, 1975, *Agric.Res.Rept.*, 47—61, Wageningen.

## THE MUTAGENESIS OF ATTENUATED STRAIN OF TMV DN60-3 AND THE PROTECTIVE EFFECT ON TOMATO MOSAIC DISEASE

Zheng Gui-bin

(Xian Institute of Agriculture, Xian)

For the purpose of obtaining attenuated strain of TMV, pure virus isolated from tomato plants with mild symptom were treated with nitrous acid for 30, 40, 50, 60 minutes, as a result, 30 symptomless mutants had been obtained.

In cross protection tests on tomato, the attenuated virus DN60-3 interfered more strongly with the severe mosaic strain, the streak strain and the necrosis strain occurred in Jinan (Shandong), whereas interfered weakly with the yellow mosaic strain and the yellow ringspot strain, both did lesser damage to tomato production. In a greenhouse, the inoculation of tomato by DN60-3 resulted in the good control of mosaic disease (including leaf-curling) and an higher yield, while the effect of the attenuated virus much decreased with the poor quality of cultivation and the decline of tomato plants.

Since the interference of the attenuated virus is one of the particular immunity, the protective effect of the attenuated strain of TMV will be lost in the exposed tomato field where TMV and CMV occurred with complexion. As the TMV-resistant tomato cultivars widely extended, the application value of attenuated strain of TMV will become more and more subordinate. But recently, this attenuated strain of TMV can be used in some of the middle or smaller cities where the tomato cultivars are changing.