

天津地区番茄褪绿病毒的分子检测和鉴定

高利利¹,孙国珍¹,王 勇²,高 苇²,张春祥²,张安胜³,竺晓平¹

(1. 山东农业大学 植物保护学院,山东 泰安 271018;2. 天津市植物保护研究所,天津 300381;

3. 山东省农业科学院 植物保护研究所,山东 济南 251000)

摘要:为明确 2014 年夏天在天津番茄种植区采集到疑似感染番茄褪绿病毒的番茄样品的侵染病原,利用 ToCV 外壳蛋白和热激蛋白的特异引物进行反转录 PCR (RT-PCR)检测,分别扩增得到特异核苷酸片段。序列分析表明,HSP70 核苷酸序列与已登录的番茄褪绿病毒日本分离物 Tochigi (AB513442)相似性为 99.5%,CP 氨基酸和核苷酸序列与已登录的番茄褪绿病毒日本分离物 Tochigi (AB513443)相似性分别为 99.2%和 99.3%,表明天津地区的番茄受到 ToCV 侵染,且天津与日本 ToCV 分离物序列相似性最高。由于调查地区番茄黄化曲叶病毒发生普遍,针对 ToCV 阳性样品利用 TYLCV 特异性引物进行了分子检测,扩增产物序列与 TYLCV 以色列株系分离物的相似性均在 99.0%以上,表明 2 种病毒在田间发生复合侵染,该研究首次明确天津地区的番茄受到 ToCV 侵染和 ToCV 与 TYLCV 的复合侵染。

关键词:番茄褪绿病毒;番茄黄化曲叶病毒;复合侵染;分子检测

中图分类号:S436.412.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)03-0211-05

doi:10.7668/hbxb.2015.03.036

Molecular Detection and Identification of *Tomato chlorosis virus* in Tianjin

GAO Li-li¹,SUN Guo-zhen¹,WANG Yong²,GAO Wei²,ZHANG Chun-xiang²,
ZHANG An-sheng³,ZHU Xiao-ping¹

(1. College of Plant Protection,Shandong Agricultural University,Tai'an 271018,China;2. Tianjin Institute of Plant Protection,Tianjin 300381,China;3. Institute of Plant Protection,Shandong Academy of Agricultural Sciences,Jinan 251000,China)

Abstract:In the summer of 2014,tomato plants showed suspected symptoms caused by *Tomato chlorosis virus* (ToCV) infection collected in greenhouse in Tianjin. In order to clarify the Pathogen of tomato plants,specific primer pairs of ToCV coat protein (CP) and heat shock protein 70 (HSP70) were used for reversing transcription PCR (RT-PCR) detection,specific fragments were obtained and sequenced. HSP70 nucleotide sequences obtained 99.5% similarity with ToCV isolate Tochigi (AB513442),CP amino acid and nucleotide sequences obtained shared 99.2% and 99.3% similarity with ToCV isolate Tochigi (AB513443),indicating the tomato was infected by ToCV in Tianjin,the sequences of ToCV isolate between Tianjin and Japan with a highest similarity. As *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) were widespread in survey areas,the ToCV positive samples were also tested for TYLCV by specific primers. The result was positive and gene sequence analysis showed that the similarity between amplification products and TYLCV-IL isolates was more than 99.0%,indicating mixed infections in the field. It is the first report that ToCV infect tomato,ToCV and TYLCV mixed infections tomato in Tianjin.

Key words:*Tomato chlorosis virus*; *Tomato yellow leaf curl virus*; Mixed infections; Molecular detection

番茄褪绿病毒(*Tomato chlorosis virus*, ToCV)为长线形病毒科(Closteroviridae)毛形病毒属(*Crinivirus*)成员,由于其侵染番茄后引起的褪绿黄化症状非

常类似于“缺素症”,最初被作为缺素症对待,后经分子鉴定为 ToCV 侵染所致。该病害初次被发现是在美国,随后在意大利、法国、墨西哥、古巴、巴西、苏

收稿日期:2014-12-14

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201303028);山东省科技发展计划项目(2014GNC111008)

作者简介:高利利(1991-),女,山东德州人,在读硕士,主要从事植物病理学方面的研究。

通讯作者:王 勇(1971-),女,山东栖霞人,研究员,硕士,主要从事植物病害及其生物防治研究。

竺晓平(1966-),男,江苏六合人,教授,博士,主要从事植物病理学方面的研究。

丹、以色列、土耳其及日本等地相继被发现^[1-10]。我国首先于 2004 年在台湾地区被发现,随后在北京、南京及山东有 ToCV 的相关报道^[11-15]。该病毒通过 4 种粉虱以半持久方式传播,其中以 B 型烟粉虱(*Bemisia tabaci biotype B*)和纹翅粉虱(*Trialeurodes abutilonea*)传播病毒效率较高,其他 2 种粉虱为温室白粉虱(*T. vaporariorum*)和银叶粉虱(*B. argentifolii*)。设施蔬菜产区烟粉虱危害普遍,该病毒病害近几年呈蔓延流行趋势,正逐渐成为番茄生产的重要限制因素^[16]。

对 ToCV 进行诊断,除症状观察外还可结合普通 RT-PCR 检测、Real-time PCR 检测和 LAMP 检测等分子生物学检测方法^[11-18]。此外,血清学检测技术也可应用于 ToCV 的检测,但目前尚未在国内应用^[19]。

2014 年夏季在天津地区采集到疑似 ToCV 感染症状的番茄样品,用 ToCV 三对特异性引物对样品进行了检测和鉴定。由于田间番茄黄化曲叶病发生普遍,为明确 ToCV 和 TYLCV 复合侵染情况,对已确定有 ToCV 侵染的样品同时采用 TYLCV 特异引物进行进一步复合侵染的检测。

1 材料和方法

1.1 样品的采集

2014 年 8 月在天津番茄种植区共采集到疑似感染 ToCV 的番茄样本 36 份,其中武清区 16 份,静海县 20 份,将采集到的样品置于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2 菌株、载体和生化试剂

RNA 和 DNA 植物基因组提取试剂盒由北京天根生物技术有限公司提供;Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Trans 2K plus DNA Marker 均由北京全式金生物技术有限公司提供;凝胶回收试剂盒由北京 AXYGEN 生物技术有限公司提供;Escherichia coli 菌株(DH5 α)由山东农业大学园艺病害研究室留存;pMD18-T 克隆载体和反转录试剂 RNase Inhibitor、RTase M-MLV 由宝生物工程(TaKaRa)有限公司提供。

1.3 感病样品总 DNA 和 RNA 的提取及病毒基因扩增

分别称取寄主植物叶片 0.1 g,加液氮研磨成粉末,用 Harrison 等^[20]的 CTAB 法提取叶片总 DNA,总 RNA 采用 TRIzol 法提取。利用 ToCV 特异引物 ToCV-F (5'-GAAATTCTACTCTGCCTGAT-3')/ToCV-R (5'-GCTAAATCAACGGGAAAC-3') (RNA2: 4 195 ~ 5 226 bp,序列包括外壳蛋白基因及其侧翼

上下游序列)进行反转录 PCR (RT-PCR)扩增。除外壳蛋白(Coat protein, CP)基因外,ToCV 的热激蛋白(Heat shock protein 70, HSP70)基因常被用作分子鉴定的依据,利用热激蛋白特异性引物 HSP1-F/HSP1-R 和 HSP2-F/HSP2-R^[10]进行 HSP70 上、下游序列的 RT-PCR 扩增。TYLCV 的检测采用特异引物 TY3-R/TY3-F^[21]进行 PCR 扩增。所用引物均由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。

反转录和 PCR 扩增体系参考文献[21]进行。PCR 扩增条件:预变性 94 ℃ 3 min;变性 94 ℃ 30 s,退火(TY3-R/TY3-F 52 ℃、ToCV-F/ToCV-R 50 ℃、HSP1-F/HSP1-R 49 ℃、HSP2-F/HSP2-R 51 ℃)45 s,延伸 72 ℃ 1 min 10 s,共 30 个循环;终延伸 72 ℃ 10 min。

取 20 μ L PCR 扩增产物与 2.5 μ L 6 \times Loading Buffer 混合于 1% 的琼脂糖凝胶上检测并拍照记录试验结果。参照试剂盒说明回收目的条带并与 pMD18-T 连接,再转化 DH5 α ,挑取单斑过夜培养,阳性克隆经检测后,送往上海铂尚生物科技有限公司测序。

1.4 序列比对分析

利用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)对所得分离物的病毒序列进行分析比较,分别选取 NCBI 上已发表的 ToCV 代表性分离物的 CP 和 HSP70 基因序列及 TYLCV 的基因序列,对所选定的序列利用 DNASTar 中的 MegAlign 软件进行同源性比对,利用软件 Mega 5.05 的 Clustal W 法进行多序列比对分析以及邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树,系统进化树中各分支置信度(Bootstrap)进行 1 000 次重复分析。所用序列信息见表 1。

2 结果与分析

2.1 番茄病株的田间症状

疑似感染 ToCV 植株感病症状呈现从下部叶片向上部叶片发展的趋势。下部叶片首先出现叶脉间褪绿黄化,部分区域变红,叶片变脆,同时叶片边缘轻微卷曲,局部出现红褐色坏死小斑点,叶脉始终呈绿色等典型的 ToCV 症状。初步统计有此类症状的病株率在保护地中达 20% ~ 30%;部分显症植株同时在顶部或侧面枝叶上表现叶片变小、变厚、有褶皱、向上卷曲、变形、叶片边缘至叶脉区域黄化等疑似 TYLCV 的症状。怀疑存在 ToCV 和 TYLCV 复合侵染情况,初步统计保护地中伴随此类症状的病株率为 5%。

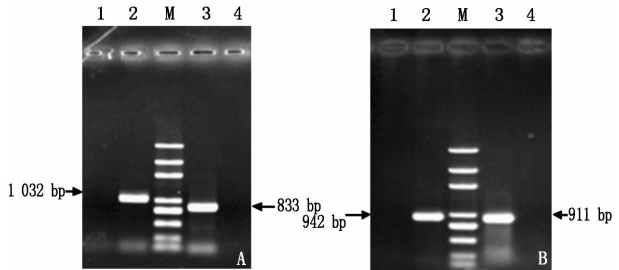
2.2 病毒基因扩增和序列测定

利用 ToCV CP 特异引物 ToCV-F/ToCV-R 对上述疑似样本进行 RT-PCR 扩增,仅在武清区 1 份样品中得到 1 032 bp 左右的条带(图 1),选择武清区的阳性样品进行序列测定,CP 基因 774 个核苷酸,定名该天津番茄分离物为 ToCV-TJ6 (GenBank 登录号:KP219722)。用 HSP70 特异性引物 HSP1-F/HSP1-R 和 HSP2-F/HSP2-R 进行 RT-PCR 扩增得到 942,911 bp 左右的条带,分别包含 HSP70 的上、下游及其侧翼序列。测序后利用软件 DNAMAN 进行 HSP70 全长序列的拼接和裁剪,ToCV-TJ6 分离物的 HSP70 全长为 1 665 个核苷酸(GenBank 登录号:KP226698)。对 ToCV 阳性样品用 TYLCV 的特异性引物 PCR 扩增得到特异性条带,测序结果确定为 833 个核苷酸。

2.3 序列分析

利用 MegAlign 软件,将天津 ToCV 分离物 ToCV-TJ6 的 CP 核苷酸序列及氨基酸序列分别与 GenBank 中已登录的有代表性的 ToCV 分离物及其他毛型病毒属分离物的 CP 基因序列进行相似性比较。结果表明,该样本与日本、山东和美国等报道的 ToCV 分离物的 CP 核苷酸序列的相似性在 97.7% ~ 99.3%,与日本分离物 Tochigi (AB513443) 的相似性最高,为 99.3%,而与同一属的番茄侵染性褪绿病毒(*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) 的核苷酸序列相似性则为 30.5%。ToCV-TJ6 分离物 CP 的

氨基酸序列与其他代表性 ToCV 分离物的相似性在 97.3% ~ 99.2%,与日本分离物 Tochigi (AB513443) 的相似性最高,为 99.2%,与同属的 TICV 的氨基酸相似性仅为 5.1% (表 1)。同时比对 HSP70 核苷酸序列,发现 ToCV-TJ6 分离物的 HSP70 与日本、山东和北京等地的 HSP70 的相似性在 98.4% ~ 99.5%,并且与日本分离物 Tochigi (AB513442) 的相似性最高,为 99.5%,而与 TICV 的相似性则为 64.4% (表 1)。针对扩增得到的 TYLCV 序列,发现天津番茄分离物与以色列株系分离物核苷酸序列的相似性均在 99.0% 以上,属于 TYLCV 以色列株系 (TYLCV-IL)。



A:1,4. 阴性对照;2. 引物 ToCV-F/ToCV-R RT-PCR 扩增;3. 引物 TY3-F/TY3-R RT-PCR 扩增;B:1,4. 阴性对照;2. 引物 HSP1-F/HSP1-R RT-PCR 扩增;3. 引物 HSP2-F/HSP2-R RT-PCR 扩增;M. Trans 2K Plus DNA Marker。
A:1,4. Negative control;2. RT-PCR amplification using ToCV-F /ToCV-R,3. RT-PCR Amplification using TY3-F/TY3-R;B:1,4. Negative control;2. RT-PCR amplification using HSP1-F/HSP1-R,3. RT-PCR Amplification using HSP2-F/HSP2-R;M. Trans 2K Plus DNA Marker.

图 1 ToCV 和 TYLCV 检测结果

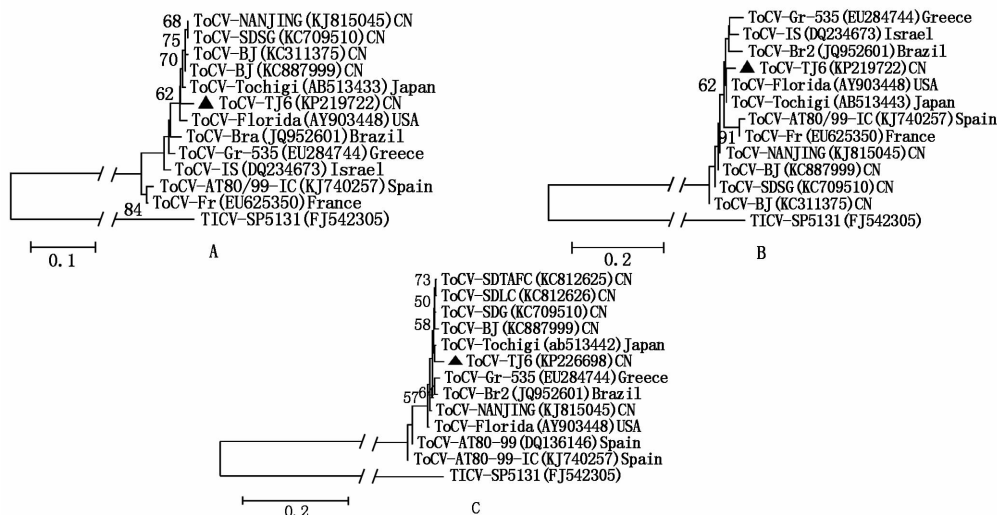
Fig.1 Detecion results of ToCV and TYLCV

表 1 用于序列比较和进化分析的病毒信息及一致性的比较

Tab.1 Virus information and consistency for sequence comparison and phylogenetic analysis

登录号 Accession No.	分离物名称 Isolates name	分离地点 Location	一致性/% Consistency		
			CP 核苷酸序列 Sequence of CP	CP 氨基酸序列 Protein sequece of CP	HSP70
KP219722	ToCV-TJ6	中国	100.0	100.0	
KP226698	ToCV-TJ6	中国			100.0
AB513443	ToCV-Tochigi	日本	99.3	99.2	
AB513442	ToCV-Tochigi	日本			99.5
KJ740257	ToCV-AT80-99-IC	西班牙	97.7	97.3	98.4
DQ136146	ToCV-AT80-99	西班牙			98.4
KC709510	ToCV-SDSG	中国	99.2	98.8	99.4
KC812625	ToCV-SDTAFC	中国			99.3
KC812626	ToCV-SDLC	中国			99.3
AY903448	ToCV-Florida	美国	99.2	99.2	99.1
KC311375	ToCV-BJ	中国	99.2	98.8	
KC887999	ToCV-BJ	中国	99.3	98.8	99.3
KJ815045	ToCV-NANJING	中国	99.2	98.8	99.1
EU625350	ToCV-Fr	法国	98.0	97.7	
JQ952601	ToCV-ToC-Br2	巴西	98.7	97.7	99.1
EU284744	ToCV-Gr-535	希腊	98.8	97.7	99.0
DQ234673	ToCV-IS	以色列	98.6	98.1	
FJ542305	ToCV-TICV SP5131	西班牙	30.5	5.1	64.4

系最近;从构建的系统进化树可以看出,ToCV 分离物的簇集与地理位置关系不大,其中天津地区分离物的基因序列均与日本分离物亲缘关系最近,与中国、日本、美国处于一个大分支上,与以色列、希腊的距离稍远。序列分析表明,扩增得到的 TYLCV 序列与以色列株系分离物亲缘关系最近。



A. ToCV 天津番茄分离物与世界其他地区分离物的 CP 核苷酸序列系统进化树; B. ToCV 天津番茄分离物与世界其他地区分离物的 CP 氨基酸序列系统进化树; C. ToCV 天津番茄分离物与世界其他地区分离物的 HSP70 核苷酸序列基因系统进化树。
A. Phylogenetic relationships between ToCV Tianjin isolates and other ToCV isolates from the world based on sequences of the CP nucleotide sequence; B. Phylogenetic relationships between ToCV Tianjin isolates and other ToCV isolates from the world based on sequences of the CP amino acid sequence; C. Phylogenetic relationships between ToCV Tianjin isolates and other ToCV isolates from the world based on sequences of the HSP70 nucleotide sequence.

Fig.2 Phylogenetic relationships based on selected sequences of the ToCV CP and HSP70 genes

3 结论与讨论

而传入的。

国际上尚未发现抗 ToCV 的番茄品种,也没有针对性药剂,培育高抗栽培品种及研发高效的药剂已经刻不容缓,由于 ToCV 与 TYLCV 均由烟粉虱传播,发病规律相似,而且在田间常发生复合侵染,ToCV 和 TYLCV 的复合侵染在国内外均有报道^[5,21],可以参考防治 TYLCV 的措施来防治该病害,首要任务是加强对烟粉虱的防控,其次是加强栽培管理^[11],增强通风与及时补光增强番茄抗病力^[27-28]。天津地区番茄种植区的 ToCV 病害目前处于零星发生阶段,加强该病害的检测和预防以避免大面积的流行成灾非常必要。

参考文献:

- [1] Wisler G C, Li R H, Liu H Y, *et al.* *Tomato chlorosis virus*: A new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato[J]. *Phytopathology*, 1998, 88 (5) : 402 - 409.
- [2] Accotto G P, Vaira A M, Vecchiati M, *et al.* First report of *Tomato chlorosis virus* in Italy[J]. *Plant Disease*, 2001, 85 (11) : 1208.

全球蔬菜种植区除大洋洲目前未见 ToCV 的报道外,其余各洲均报道有 ToCV 发生,国内大陆地区先后在北京、南京、山东报道了该病毒病害的发生,2012 年以来更是在山东蔬菜种植区大面积发生和流行,造成了严重损失^[15]。ToCV 除侵染番茄^[13,22-23]外,在甜椒^[24]、马铃薯^[25]等作物上也发现该病毒。ToCV 主要通过粉虱传播,国内在番茄种植区采集的烟粉虱上已经检测到 ToCV^[26],天津样品采集地烟粉虱发生普遍,因此,侵染天津番茄的 ToCV 有可能是通过烟粉虱或种苗调运从其他地区

- [3] Dalmon A, Bouyer S, Cailly M, *et al.* First report of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in tomato crops in France[J]. *Plant Disease*, 2005, 89(11): 1243 – 1243.
- [4] Alvarez-Ruiz P, Jimenez C G, Leyva-López N E, *et al.* First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Sinaloa Mexico[J]. *Plant Pathology*, 2007, 56(6): 1043.
- [5] Martínez-Zubiaur Y, Fiallo-Olivé E, Carrillo-Tripp J, *et al.* First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato in single and mixed infections with *Tomato yellow leaf curl virus* in Cuba[J]. *Plant Disease*, 2008, 92(5): 836.
- [6] Barbosa J C, Teixeira A P M, Moreira A G, *et al.* First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil[J]. *Plant Disease*, 2008, 92(12): 1709.
- [7] Fiallo-Olivé E, Hamed A A, Moriones E, *et al.* First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato in Sudan[J]. *Plant Disease*, 2011, 95(12): 1592.
- [8] Segev L, Wintermantel W M, Polston J E, *et al.* First report of *Tomato chlorosis virus* in Israel[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(10): 1160.
- [9] Cevik B, Erkiş G. First report of *Tomato chlorosis virus* in Turkey[J]. *Plant Pathology*, 2008, 57(4): 767.
- [10] Hirota T, Natsuaki T, Murai T, *et al.* Yellowing disease of tomato caused by *Tomato chlorosis virus* newly recognized in Japan[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2010, 76(2): 168 – 171.
- [11] Tsai W S, Shih S L, Green S K, *et al.* First report of the occurrence of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in Taiwan[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(3): 311.
- [12] Zhao R N, Wang R, Wang N, *et al.* First report of *Tomato chlorosis virus* in China[J]. *Plant Disease*, 2013, 97(8): 1123.
- [13] Karwitha M, Feng Z, Yao M, *et al.* The complete nucleotide sequence of the RNA1 of a Chinese isolate of *Tomato chlorosis virus*[J]. *Journal of Phytopathology*, 2014, 162(6): 411 – 415.
- [14] Zhao L M, Li G, Gao Y, *et al.* Molecular detection and complete genome sequences of *Tomato chlorosis virus* isolates from infectious outbreaks in China[J]. *Journal of Phytopathology*, 2014, 162(10): 627 – 634.
- [15] 刘永光, 魏家鹏, 乔 宁, 等. 番茄褪绿病毒在山东暴发及其防治措施[J]. *中国蔬菜*, 2014(5): 67 – 69.
- [16] 周 涛, 杨普云, 赵汝娜, 等. 警惕番茄褪绿病毒在我国的传播和危害[J]. *植物保护*, 2014, 40(5): 196 – 199.
- [17] Papayiannisa L C, Harkoua I S, Markoua Y M, *et al.* Rapid discrimination of *Tomato chlorosis virus*, *Tomato infectious chlorosis virus* and co-amplification of plant internal control using real-time RT-PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 176: 53 – 59.
- [18] Zhao L M, Li G, Gao Ying, *et al.* Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Tomato chlorosis virus*[J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 213: 93 – 97.
- [19] Jacquemond M, Verdin E, Dalmon A, *et al.* Serological and molecular detection of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in tomato[J]. *Plant Pathology*, 2009, 58: 210 – 220.
- [20] Harrison B D, Liu Y L, Khalid S, *et al.* Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan[J]. *Annals of Applied Biology*, 1997, 130(1): 61 – 75.
- [21] 赵黎明, 李 刚, 刘永光, 等. 番茄褪绿病毒与番茄黄化曲叶病毒复合侵染的分子鉴定[J]. *中国蔬菜*, 2014, 12: 15 – 20.
- [22] Wintermantel W M, Wisler G C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*[J]. *Plant Disease*, 2006, 90(6): 814 – 819.
- [23] 赵黎明, 李 刚, 刘永杰, 等. 侵染番茄的番茄褪绿病毒山东泰安分离物的分子鉴定和序列分析[J]. *植物保护*, 2014, 40(5): 34 – 39.
- [24] 赵汝娜, 王 蓉, 师迎春, 等. 侵染甜椒的番茄褪绿病毒的分子鉴定[J]. *植物保护*, 2014, 40(1): 128 – 130.
- [25] Freitas D M S, Nardin I, Shimoyama N, *et al.* First report of *Tomato chlorosis virus* in potato in Brazil[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2012, 134(1): 81 – 86.
- [26] 李 洁, 李 慧, 丁天波, 等. 胶东半岛地区番茄褪绿病毒的快速检测与鉴定[J]. *山东农业科学*, 2015, 47(2): 86 – 89.
- [27] 孙 娜, 李 岩, 魏 珉, 等. 补光对日光温室越冬番茄生长及产量品质的影响[J]. *天津农业科学*, 2014, 20(3): 91 – 93, 96.
- [28] 郝永娟, 王万立, 金凤媚, 等. 天津市番茄黄化曲叶病毒病的发生与防治[J]. *天津农业科学*, 2010, 16(2): 48 – 50.