

# 河北省设施番茄褪绿病毒分子检测和鉴定研究

孙国珍<sup>1</sup>, 高利利<sup>1</sup>, 陆文利<sup>2</sup>, 王 勇<sup>3</sup>, 张安胜<sup>4</sup>, 竺晓平<sup>1</sup>

(1. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2. 山东农业大学 园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018;

3. 天津市植物保护研究所, 天津 300381; 4. 山东省农业科学院 植物保护研究所, 山东 济南 251000)

**摘 要:**以 2014 年夏季在河北 7 个县市设施番茄种植区田间采集的疑似番茄褪绿病毒(*Tomato chlorosis virus*, ToCV)感病植株为试材, 采用 RT-PCR 检测、BLAST 比对和 MEGA 5.0 系统树分析等方法, 研究河北设施番茄上 ToCV 的发生和分子鉴定以及 ToCV 与另一种严重发生的番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)复合侵染情况。结果表明:以 ToCV 外壳蛋白(Coat Protein, CP)和热激蛋白(Heat Shock Protein 70, HSP70)共 3 对特异引物对其中 4 个典型地区 ToCV 疑似样品进行检测, 分别扩增到约 1 032、943、911 bp 的特异条带, 同时针对 ToCV 阳性样品利用 TYLCV 特异引物从部分样品中扩增得到约 833 bp 的核苷酸序列, 4 个样品均确定为 ToCV 阳性, 样品与 ToCV 北京分离物(KC887999) CP 基因序列一致性最高, 为 99.7%, 同时确定田间存在 ToCV 和 TYLCV 复合侵染。

**关键词:**番茄褪绿病毒; HSP70; CP; RT-PCR 检测; 番茄黄化曲叶病毒; 复合侵染

**中图分类号:**S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)09-0095-04

番茄病毒病是番茄种植业的重要限制因素, 近几年番茄褪绿病毒(*Tomato chlorosis virus*, ToCV)病开始在国内设施番茄产区陆续发生和蔓延<sup>[1-3]</sup>, 2012 年更是在山东地区爆发而引起严重损失<sup>[2]</sup>。ToCV 属于长线形病毒科(Closteroviridae)毛形病毒属(*Crinivirus*), 基因组有 2 条正义单链 RNA(+ssRNA)组成, 由粉虱以半持久方式传播, 可侵染茄科、番杏科、夹竹桃科、藜科、菊科等多科植物<sup>[4]</sup>。其引发的褪绿黄化症状非常类似营养缺失, 常被作为缺素症对待, 导致诊断和防治的延误, 1998 年在美国佛罗里达州首次确定该病害由 ToCV 引起, 而后在法国、意大利、巴西、以色列等世界各地相继发现, 目前已蔓延至世界多地<sup>[5-8]</sup>。2004 年我国台湾地区首先报道了该病害的发生, 2013 年后在山东、北京、南京设施蔬菜产区陆续有该病毒病害的报道<sup>[2,4,9-12]</sup>, 目前其他地区尚鲜见报道。

2014 年 8 月在河北多个县市的番茄种植区调查期间, 发现了疑似 ToCV 症状的感病植株。该研究通过对

河北多个地区的番茄样品针对 ToCV 以及 ToCV 与另一种普遍发生的番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)的田间复合侵染情况进行了分子检测和鉴定, 以期明确 ToCV 这一国内新发现的病害在河北地区发生的为害情况, 为河北地区针对该番茄新流行病毒病害的防控提供预警。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 疑似病株样品的采集 2014 年 8 月, 在河北廊坊市(永清县、广阳区)、衡水市(饶阳县)、沧州市(肃宁县)、石家庄市(藁城县、无极县、定州市)等地 TYLCV 发生普遍的设施番茄种植区调查期间, 采集到疑似感染 ToCV 的番茄植株样品, 样品一部分直接提取总 RNA 和 DNA, 其余放入 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.1.2 菌株、载体和生化及分子生物学试剂 克隆载体 pMD18-T、RNase Inhibitor、RTase M-MLV(RNase H-)均购自 TaKaRa 公司; RNA、DNA 提取试剂购自天根公司; PCR 产物胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; PCR 试剂及 DNA 分子量标准购自北京全式金生物技术有限公司; 其它生化试剂及普通化学试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 感病番茄样品总 DNA、RNA 的提取及 RT-PCR 扩增 称取寄主植物叶片 0.1 g, 加液氮研磨成粉末, 按 Harrison 的 CTAB 法提取叶片总 DNA<sup>[13]</sup>, 叶片总 RNA 按 TRIzol 法提取, 用于后续试验。根据 ToCV 保守区域

**第一作者简介:**孙国珍(1989-), 女, 山东聊城人, 硕士, 研究方向为植物病理学。E-mail:178067433@qq.com.

**责任作者:**竺晓平(1966-), 男, 江苏六合人, 博士, 教授, 研究方向为植物病理学。E-mail:zhuxp@sdaa.edu.cn.

**基金项目:**国家公益性(农业)行业科研专项资助项目(201003065); 山东省科技发展计划资助项目(2014GNC111008); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2012CM032)。

**收稿日期:**2015-01-16

设计引物, ToCV-F(5'-GAAATTCTACTCTGCCTGAT-3')/ToCV-R(5'-GCTAAATCAACGGGAAAC-3'), 扩增片段对应于 ToCV RNA2(4 195~5 226 bp), 扩增片段全长为 1 032 bp, 覆盖 774 bp 的 CP 基因。除 CP 基因外, 保守的 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 ToCV HSP70 两对特异引物 HSP1-F/HSP1-R 和 HSP2-F/HSP2-R<sup>[14]</sup> 分段进行 HSP70 上、下游序列的扩增。TYLCV 的检测采用特异引物 TY3-R/TY3-F<sup>[15]</sup> 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[14]进行。PCR 扩增条件: 预变性 94℃ 3 min; 变性 94℃ 30 s, 退火(ToCV-F/ToCV-R 50℃、HSP1-F/HSP1-R 49℃、HSP2-F/HSP2-R 51℃、TY3-R/TY3-F 52℃) 45 s, 延伸 72℃ 1 min 10 s, 30 循环, 终延伸 72℃ 8 min。PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶上检测, 回收目的条带并与 pMD18-T 连接, 再转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 阳性克隆送交上海铂尚生物科技有限公司序列测定。

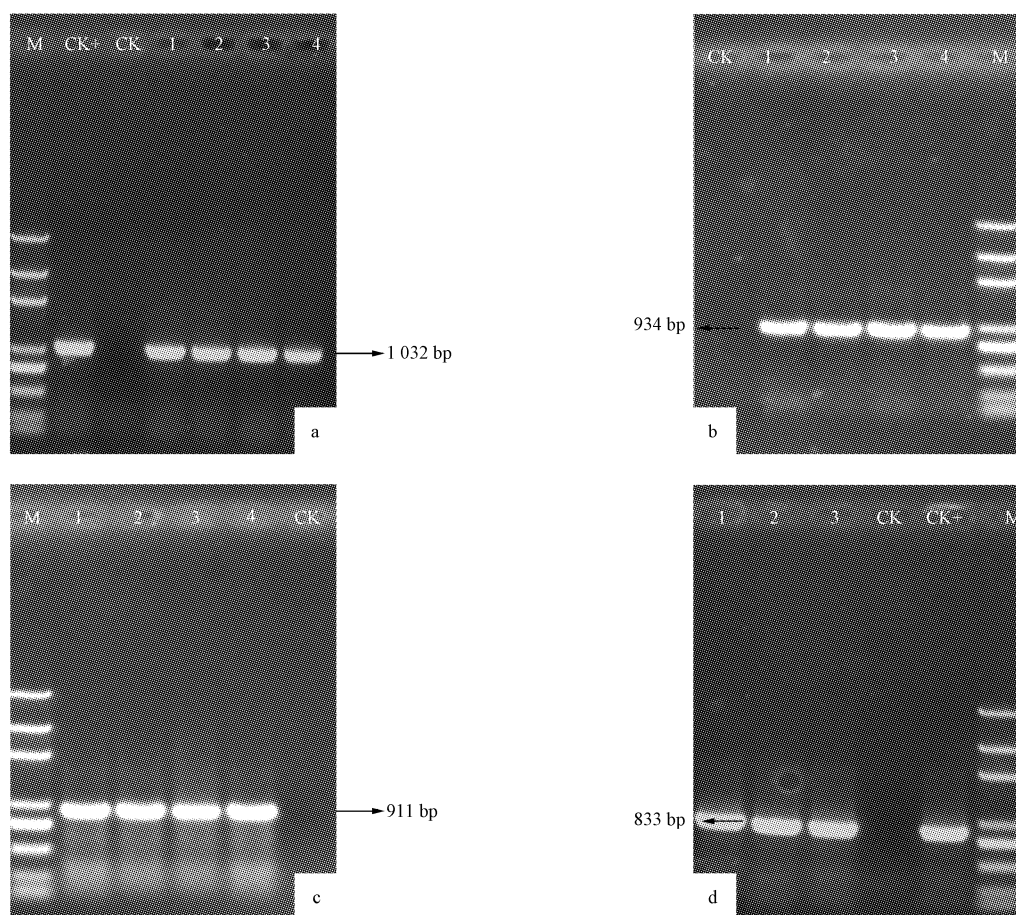
1.2.2 序列分析 登录 NCBI, 利用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行序列比对。再分别选取 NCBI 上典型毛型病毒属的 CP 和 HSP70 的序列, 以及 TYLCV 的序列, 用 DNASTar 软件中的 MegAlign 对所选定的序列进行相似性比较, 利用 Mega 4.0 进行多序列比较分析以及进化树的构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品的分子检测和病原鉴定

在河北 7 个县、区番茄种植区随机调查表现疑似感染 ToCV 症状的植株, 初步统计病株率达 40%~60%。选取有代表性的 4 个地区(廊坊、沧州、衡水、石家庄)田间样品进行了分子检测。

将来自廊坊(永清县)、沧州(肃宁县)、衡水(饶阳县)、石家庄(藁城县)4 个地区的疑似样品, 用 ToCV 特异引物 ToCV-F/ToCV-R 进行扩增均得到大小约为 1 032 bp 的特异性条带(图 1-a), 分别命名为 HBLF、



注:(a):引物 ToCV-F/ToCV-R 扩增结果;M: Trans 2K Plus DNA Marker;CK: 阴性对照;CK+: 阳性对照;下同;(b):引物 HSP1-F/HSP1-R 扩增结果;(c):引物 HSP2-F/HSP2-R 扩增结果;(d):引物 TY3-F/TY3-R 扩增结果。

Note:(a):The product by primers ToCV-F and ToCV-R;M: Trans 2K Plus DNA Marker;CK: Negative control;CK+: Positive control;the same below;(b):The product by primers HSP1-F and HSP1-R;(c):The product by primers HSP2-F and HSP2-R;(d):The product by primers TY3-F and TY3-R.

图 1 ToCV 和 TYLCV 扩增检测结果

Fig. 1 Detecion and amplification of ToCV and TYLCV

HBCZ、HBHS、HBSJZ, 序列测定后上传 GenBank, 登录号分别为 HBLF(KP217199)、HBCZ(KP217195)、HBHS(KP217196)、HBSJZ(KP217200)。BLAST 结果表明扩增产物核苷酸序列与 GenBank 中已登录的 ToCV 分离物的基因序列的相似性均超过 99%, 表明这些样品确系被 ToCV 感染。利用 HSP70 2 对特异引物扩增后分别得到 4 组大小约为 943、911 bp 的目的条带(图 1-b,c), 分别包含 HSP70 的上、下游及其侧翼序列, 序列测定和拼接后的 HSP 70 的全长为 1 665 bp, GenBank 登录号分别为 HBLF (KP217202), HBCZ (KP217201), HBHS (KP217197), HBSJZ(KP217198)。

通过 TYLCV 特异性引物对 4 个 ToCV 阳性样品疑似病样进行 TYLCV 的检测, 衡水样品未检出特异条带, 在廊坊、沧州、石家庄 3 个样品中扩增到大小约为 833 bp 的特异性条带(图 1-d), 测序后经 BLAST 比对, 上述河北分离物与 GenBank 上登录的 TYLCV 的核苷酸序列的相似性均达到 99.0% 以上, 因此, 明确河北地区番茄感病样品已被 ToCV 与 TYLCV 复合侵染。

## 2.2 序列分析

序列比对发现河北 4 个地区番茄样品的 ToCV CP 基因之间序列一致性最高达 99.7%, 与日本分离物(AB513443)和北京分离物(KC887999)2 个序列最高分别达到 99.5% 与 99.7%, 其 HSP70 基因核酸序列也与北京分离物(KC887999)和日本分离物(AB513442)同源性 2 个最高分别达 94.7% 和 94.8%。

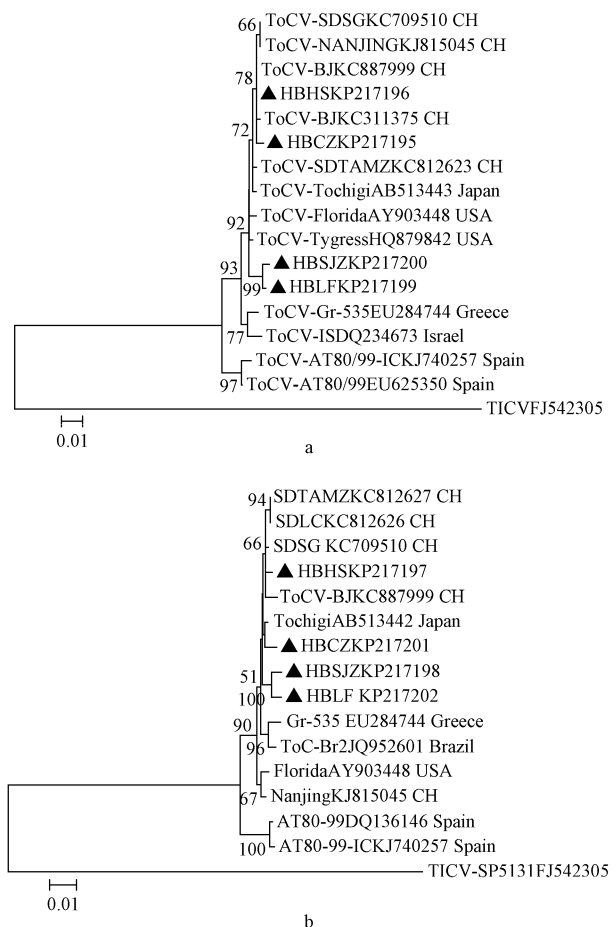
为了更好地分析其系统进化关系及其分类地位, 选取国内外不同地区有代表性的 ToCV 的 CP 及 HSP70 核苷酸序列分别构建系统进化树(图 2)。从构建的系统进化树可以看出, 河北地区分离物与中国、日本、美国分离物亲缘关系最近, 聚集为一个大的分枝, 与以色列、希腊的距离稍远, 来自于西班牙的 2 个分离物单独聚在一起。

从河北地区番茄样品中扩增得到的 TYLCV 的核酸序列与山东潍坊、寿光、河北保定、美国等地的分离物的番茄黄化曲叶病毒的一致性在 99.6%~99.9%, 并且与美国分离物 TYLCV-USA(EF539831)的相似性最高为 99.9%, 同属于以色列株系(TYLCV-IL)。

## 3 结论与讨论

该研究利用 ToCV 特异引物对河北番茄感病样品进行检测并鉴定, 明确了河北省番茄种植区中 ToCV 的发生, 同时确定田间番茄受到 ToCV 与 TYLCV 复合侵染。

ToCV 是从国外传入我国的一种烟粉虱传播<sup>[16-17]</sup>的新型病毒病, 可以侵染多种植物, 我国仅在番茄<sup>[1-3, 18-19]</sup>和甜椒<sup>[4]</sup>上发现了 ToCV, 其它寄主未见报道。虽然该病毒病在世界多地发生, 但目前国内仅在山东、北京、南京有报道<sup>[2, 4, 9-12]</sup>, 由于其传毒媒介烟粉虱各地发



注:a: ToCV 河北番茄分离物与世界其他地区分离物的 CP 基因系统进化树;b: ToCV 河北番茄分离物与世界其他地区分离物的 HSP70 基因系统进化树。

Note:a: Phylogenetic relationships between ToCV Hebei isolates and other ToCV isolates from the world based on sequences of the CP gene;b: Phylogenetic relationships between ToCV Hebei isolates and other ToCV isolates from the world based on sequences of the HSP70 gene.

图 2 番茄褪绿病毒 CP、HSP70 系统进化树

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

生普遍, 国内番茄种苗调运又非常频繁, 因此加强该病毒病害的检测和预警, 防止该病害的进一步扩散蔓延非常必要。从国内已报道的 ToCV 序列分析来看, 国内的 ToCV 基因序列相似性很高, 在进化树上聚在一起, 推断应该有共同的传播来源。目前针对 ToCV 的检测方法多采用 RT-PCR 等分子鉴定方法<sup>[3, 9, 19-20]</sup>, 常规的血清学检测方法由于缺少特异性的抗体, 目前在国内尚未有应用, 在一定程度上限制了该病毒病害检测技术的普及<sup>[21]</sup>。ToCV 与 TYLCV 的发生规律相近, 防治方法可以相互参照, 防治 TYLCV 有很多抗病品种可供利用, 但目前尚没有针对 ToCV 的抗病品种, 给病害的防治带来了困难, 同时该病害在国内种植模式下的发病规律也有待调查, 因此针对该病害还需要进一步开展深入研究。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [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): 1160-1160.
- [9] 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.
- [10] Zhao R, Wang R, Wang N, et al. First report of *Tomato chlorosis virus* in China[J]. Plant Disease, 2013, 97(8): 1123.
- [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] Karwitha M, Feng Z, Yao M, et al. The Complete Nucleotide Sequence of the RNA 1 of a Chinese Isolate of *Tomato chlorosis virus*[J]. Journal of Phytopathology, 2014, 6(162): 411-415.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 李刚,李现道,赵黎明,等. 山东烟草番茄黄化曲叶病毒的分子检测和序列分析[J]. 中国烟草科学, 2013, 34(6): 98-102.
- [16] 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(2): 86-89.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Zhao L M, Li G, Gao Y, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Tomato chlorosis virus*[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 213: 93-97.
- [20] Lambros C, Papayiannisa, Ivi S H, 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.
- [21] 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.

## Molecular Detection and Identification of *Tomato chlorosis virus* Infecting Greenhouse-grown Tomato Plants in Hebei Province

SUN Guo-zhen<sup>1</sup>, GAO Li-li<sup>1</sup>, LU Wen-li<sup>2</sup>, WANG Yong<sup>3</sup>, ZHANG An-sheng<sup>4</sup>, ZHU Xiao-ping<sup>1</sup>

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018; 2. College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018; 3. Tianjin Institute of Plant Protection, Tianjin 300381; 4. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 251000)

**Abstract:** Taking tomato samples showing symptom similar to that caused by *Tomato chlorosis virus* (ToCV) found and collected from 7 regions in Hebei Province in the summer of 2014 as material, using RT-PCR detection, BLAST alignment and phylogenetic analysis based on MEGA 5.0 as research methods to detect and identify ToCV occurrence and mixed infection on ToCV and another economic important virus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). The results showed that three pairs of specific primers targeting the ToCV coat protein (CP) and heat shock protein (HSP70) genes were used for detection, specific 1 032 bp, 943 bp and 911 bp fragments were amplified from the symptomatic samples, respectively. The ToCV positive samples were also tested for presence of TYLCV, specific primers of TYLCV were used and a 833 bp specific fragments were amplified and sequenced. Plant samples from Hebei were infected by *Tomato chlorosis virus*, the sequence analyses showed the nucleotide sequence of Hebei samples had the highest identity of 99.7% with a Beijing isolate of ToCV (KC887999). The mixed infection of ToCV and TYLCV occurred in the field was also confirmed.

**Keywords:** *Tomato chlorosis virus*; HSP70; CP; RT-PCR detection; *Tomato yellow leaf curl virus*; mixed infection