

陕西杨凌番茄褪绿病毒的分子检测

王志荣¹, 李晓东², 朱 玉¹, 黄泽军¹,
高建昌¹, 国艳梅¹, 杜永臣¹, 王孝宣^{1*}

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 西安金鹏种苗有限公司, 西安 710018)

摘要 近年来在陕西番茄生产区出现了一种新病害, 病株表现为叶片褪绿, 叶脉颜色变深及叶片增厚, 果实变小发白, 严重影响番茄产量及经济效益, 2016 年发病极为严重, 部分产区甚至绝收。该病疑似由番茄褪绿病毒 *Tomato chlorosis virus* (ToCV) 引起。利用 ToCV 特异引物对感病番茄样品进行 RT-PCR 检测, 结果从所采集的 4 份病样中均检测到 ToCV 预期大小的特异片段。对 ToCV 外壳蛋白 *CP* 基因和类热激蛋白 *HSP70h* 基因进行克隆与序列分析, ToCV-YL1 *CP* 基因 774 个核苷酸序列与已报道的 ToCV *CP* 基因有较高的一致性, 与山东青岛和山西晋中分离物同源性为 100%。ToCV-YL1 *HSP70h* 基因 1 665 个核苷酸序列与已报道的 ToCV *HSP70h* 基因有较高的同源性, 与中国、韩国、日本、美国、希腊分离物同源性达到 99% 以上。研究表明 ToCV 已传播至陕西地区。

关键词 番茄; 番茄褪绿病毒病; *CP* 基因; *HSP70h* 基因

中图分类号: S 436.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017240

Molecular detection of *Tomato chlorosis virus* in Yangling, Shaanxi

WANG Zhirong¹, LI Xiaodong², ZHU Yu¹, HUANG Zejun¹, GAO Jianchang¹,
GUO Yanmei¹, DU Yongchen¹, WANG Xiaoxuan¹

(1. *Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*;
2. *Xi'an Jinpeng Seedling Limited Company, Xi'an 710018, China*)

Abstract In recent years, a new disease on tomato has occurred in tomato production area of Shaanxi Province. The diseased tomato plants showed chlorotic leaves, dark greening veins and leaf thickening occurred in the diseased tomato plants, and the fruits became partial white and small, which seriously affected the yield and economic benefits. The disease is extremely serious, leading to total yield loss in part of the producing areas in 2016. The symptom of infected tomatoes is similar to *Tomato chlorosis virus* (ToCV). The expected DNA fragments were amplified from all 4 infected samples with specific markers of ToCV by RT-PCR. The coat protein gene (*CP*) and heat shock protein 70 (*HSP70h*) gene of ToCV were cloned and analyzed, respectively. The nucleotide sequence of the *CP* gene of ToCV-YL1 was the same as those of the previously reported ToCV isolates in Qingdao and Jinzhong. The nucleotide sequence of the *HSP70h* gene of ToCV-YL1 shared the highest identity (up to 99%) with those of the ToCV isolates from China, South Korea, Japan, USA and Greece. These results confirmed that ToCV had spread to Shaanxi.

Key words tomato; *Tomato chlorosis virus*; *CP*; *HSP70h*

番茄褪绿病毒 *Tomato chlorosis virus* (ToCV) 属于长线形病毒科 *Closteroviridae* 毛形病毒属 *Crinivirus*。ToCV 基因组含有两条正义单链 RNA, 是一种 RNA 病毒, 其中 RNA1 有 8 594 个核苷酸, RNA2 有 8 242 个核苷酸。ToCV 是韧皮部病毒不能通过机械摩擦接种传播^[1-2]。在自然条件下,

ToCV 只能依靠媒介昆虫烟粉虱传播^[3], B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* biotype B、Q 型烟粉虱 *B. tabaci* biotype Q、A 型烟粉虱 *B. tabaci* biotype A、温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*、银叶粉虱 *B. argentifolii* 和纹翅粉虱 *T. abutilonea* 等介体均可传播 ToCV^[4], 该病毒是唯一能通过 4 种分属于两个

收稿日期: 2017-06-23

修订日期: 2017-08-06

基金项目: 国家自然科学基金(31372070, 31672153); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-23-A10)

* 通信作者 E-mail: wangxiaoxuan@caas.cn

属的粉虱传播的病毒^[5-6]。ToCV 寄主范围广泛,可以侵染茄科 Solanaceae、菊科 Compositae、藜科 Chenopodiaceae、苋科 Amaranthaceae、番杏科 Aizoaceae、夹竹桃科 Apocynaceae 及白花丹科 Plumbaginaceae 等 7 科 25 种植物。其中,茄科寄主数最多,如番茄 *Solanum lycopersicum*、辣椒 *Capsicum annuum*^[7-8]、马铃薯 *Solanum tuberosum*^[4]、普通烟 *Nicotiana tabacum*、本生烟 *N. benthamiana* 等多种烟草^[9-10]。

番茄褪绿病毒病最早于 1989 年在美国佛罗里达州温室栽培番茄上出现,1998 年在美国佛罗里达州该病原首次被鉴定为番茄褪绿病毒 ToCV^[1]。该病毒现已蔓延至世界各地,可危害多种作物^[4,8,11-12],在北美洲、南美洲、欧洲、非洲和亚洲^[13-17]均有报道。我国最早于 2004 年在台湾地区发现 ToCV^[14],2013 年后在北京、江苏、山东、河北、天津、河南、辽宁、广东等地区陆续有关于 ToCV 的报道^[18-23]。2016 年在陕西杨凌番茄主产区发现番茄疑似感染 ToCV,感病面积较大,表现为番茄整株褪绿黄化,果实变小发白,严重影响番茄生长并造成很大经济损失,部分产区绝收。本研究对采集的感病番茄样品进行了分子检测与鉴定,并对 ToCV 外壳蛋白 CP 基因和类热激蛋白 *HSP70h* 基因进行克隆与序列分析,以探讨引起该病害的原因,并对其进行有效防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集

2016 年 11 月在陕西省杨凌番茄生产区的感病区采集 4 份感病番茄材料叶片,编号为 ToCV-YL1~ToCV-YL4,同时采集该产区非感病区健康番茄叶片作为对照。

1.1.2 生化试剂和菌株、载体

RNA 提取试剂盒 EasyPure® Plant RNA Kit、反转录试剂盒 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、FastPfu DNA 聚合酶、凝胶回收试剂盒 EasyPure® Quick Gel Extraction Kit、克隆载体 pEASY® -Blunt Zero Cloning Kit、Trans1-T1 感受态细胞均由北京全式金生物技术有限公司提供。分子量标准 DNA Marker IV 由天根生化科技有限公司提供,2×DNA Taq PCR Mix 由北京依联轩科技有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄叶片总 RNA 的提取及检测

使用 RNA 提取试剂盒提取番茄叶片总 RNA。取番茄编号为 ToCV-YL1~ToCV-YL4 和健康番茄样品的叶片 0.1 g,依照试剂盒提取说明步骤提取总 RNA,最终将 RNA 溶解于 40.0 μ L RNase free-water 中。保存于一 80℃ 用于后续试验。以番茄叶片总 RNA 作为模板,使用反转录试剂盒反转录 RNA 合成 cDNA。反应体系 20.0 μ L 及具体试验步骤如下:RNA 5.0 μ L,0.5 μ g/ μ L Anchored Oligo (dT)18 Primer 1.0 μ L,RNase free-water 2.0 μ L;65℃ 变性 5 min,迅速冰浴 2 min。再加 2×TS Reaction Mix 10 μ L,TransScript® RT/RI Enzyme Mix 1.0 μ L,gDNA Remover 1.0 μ L,42℃ 孵育 30 min,80℃ 加热 5 min 失活 TransScript® RT 与 gDNA Remover。利用 RT-PCR 技术对番茄褪绿病毒进行检测,以 cDNA 为模板利用引物 ToCV-F/R 进行 RT-PCR 扩增。反应体系为:cDNA 1.0 μ L,上下游引物各 0.2 μ L,Mix 5.0 μ L,灭菌水 3.6 μ L,总体积为 10.0 μ L。PCR 反应程序:预变性 94℃ 4 min;变性 94℃ 30 s,退火 52℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,32 个循环;终延伸 72℃ 5 min。PCR 产物经 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 ToCV 特异引物设计

根据 NCBI 网站上已公布的北京分离物 ToCV 基因组序列设计了 4 对特异引物(表 1)。ToCV-F/R 是根据 ToCV-BJ RNA1(登录号:KC887998)序列设计的特异引物,CP-1-F/R、HSP-2-F/R、HSP-3-F/R 是根据 ToCV-BJ RNA2(登录号:KC887999)序列设计的特异引物。CP-1-F/R 能扩增 CP 基因的 774 bp 序列,HSP-2-F/R、HSP-3-F/R 扩增序列进行拼接得到 1 665 bp 的 *HSP70h* 基因序列。

1.2.3 ToCV 的 CP 基因及 *HSP70h* 基因扩增、序列克隆及测序

RT-PCR 扩增体系 50.0 μ L,包括 cDNA 2.0 μ L,2×TransStart FastPfu Mix 25.0 μ L,上下游引物各 1.0 μ L,灭菌水 21.0 μ L。PCR 反应程序:预变性 95℃ 3 min;变性 95℃ 30 s,退火 56℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,40 个循环;终延伸 72℃ 5 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用凝胶回收试剂盒回收目的谱带,回收产物克隆到 Blunt Zero 载体上。转化到大肠杆菌 Trans1-T1,经验证每对引物均得到 5 个阳性克隆后,再分别选取 3 个阳性克隆送北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

表 1 本试验中用到的引物信息
Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence	引物中基因组中的位置 Location of primer in the genome	产物大小/bp Size
ToCV-F	TGTCTCAATTGCCGAAACTCAG	451—689 bp	239
ToCV-R	CGATTTCCTCGAGAGATTTTCCAC		
CP-1-F	GGATCTTTTAGAAGCTTTGGTTTA	4 301—5 139 bp	839
CP-1-R	GATCCTCATAGATTTTCATTTTCATC		
HSP-2-F	CTGTATTCTTGTCTTTTGTATTATGAG	711—1 511 bp	801
HSP-2-R	GTCTCTTCCTTTATAGACGCTAAC		
HSP-3-F	CTAGATAAAGCCATATCGAAATTCAT	1 420—2 427 bp	1 008
HSP-3-R	CAGTACTAAACAACTAACATAACAGACC		

1.2.4 序列分析

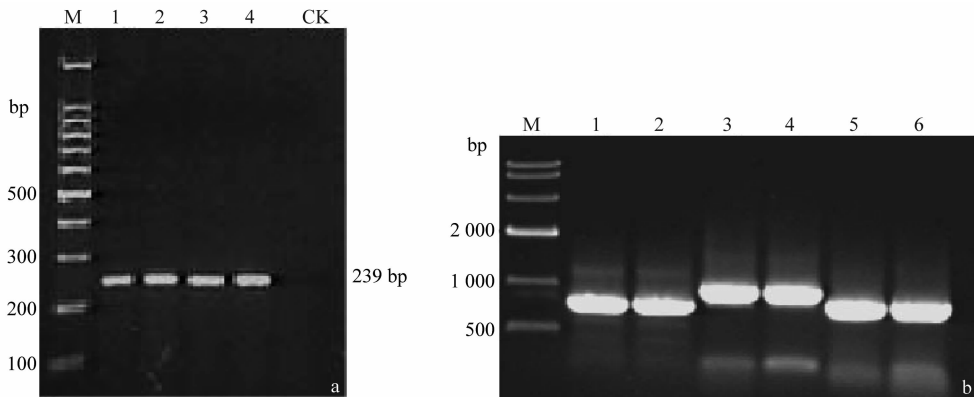
将得到的 *CP* 基因序列和 *HSP70h* 基因序列在 NCBI 网站中进行分析比对,根据比对结果,再选取 NCBI 上已发表的 ToCV 分离物的 *CP* 基因完整序列 51 份和 *HSP70h* 基因完整序列 42 份(表 2~3)。利用 DNASTar 中的 DNAMAN 软件对选定的序列进行同源性比对,利用 Mega6. 0 软件的 Clustal W 法进行多序列比对分析以及邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,系统进化树中各分支置

信度(bootstrap)进行 1 000 次重复分析。

2 结果与分析

2.1 ToCV RT-PCR 检测结果

利用 ToCV 特异标记 ToCV-F/R 进行 RT-PCR 分析,4 份感病番茄材料均能检测到与预期大小一致的 239 bp 特异片段,而健康番茄样品中未检测到目的片段(图 1a),结果表明陕西杨凌出现的新病害为番茄褪绿病毒病。



a: 引物ToCV-F/R的扩增结果。M: 100 bp DNA Ladder; 1~4: 感病番茄样品ToCV-YL1~ToCV-YL4; CK: 阴性对照。b: ToCV *CP* 和 *HSP70h* 基因的扩增结果。M: DNA Marker IV; 1~2: 引物CP-1-F/R; 3~4: 引物HSP-2-F/R; 5~6: 引物HSP-3-F/R
a: Amplified products with ToCV-F/R. M: 100 bp DNA Ladder; 1~4: Diseased tomato samples ToCV-YL1 - ToCV-YL4; CK: Negative control. b: Amplified products of *CP* and *HSP70h*. M: DNA Marker IV; 1-2: Amplified products with CP-1-F/R; 3-4: Amplified products with HSP-2-F/R; 5-6: Amplified products with HSP-3-F/R

图 1 番茄样品 ToCV RT-PCR 检测结果及 ToCV *CP* 和 *HSP70h* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 Detection of tomato samples by using RT-PCR and PCR amplification of *CP* and *HSP70h* genes of ToCV

2.2 ToCV *CP* 基因序列分析

利用 ToCV *CP* 基因的特异引物 CP-1-F/R 进行 RT-PCR 分析,从感病材料中扩增出 839 bp 片段,利用 NCBI 网站中 BLAST 功能对所得分离物的扩增序列进行比对,扩增产物包括完整 *CP* 基因(774 个核苷酸),与预期结果相符,初步证明陕西杨凌番茄新病害是由番茄褪绿病毒的危害所致。*CP* 基因的 3 个阳性克隆测序结果一致。

将 ToCV-YL1 *CP* 基因全长 774 个核苷酸(GenBank 登录号:MF346383)与在 NCBI 上收集的来自亚洲、欧洲、北美洲、南美洲的 9 个国家的 51 份 ToCV *CP* 基因序列进行同源性分析及进化树构建。结果表明 ToCV-YL1 *CP* 基因序列与山东青岛 ToCV-SDQD(KT809400)和山西晋中 ToCV-SXJZ(KX853540)序列同源性达到 100%,与国内其他地区及日本、韩国、美国地区的同源性在 99%以上,而

与希腊、巴西、以色列、西班牙等地样品基因序列同源性在 97%~99%。这些结果表明,ToCV *CP* 基因序列在不同地区存在一定差异,ToCV-YL1 *CP* 基因与国内其他地区及亚洲地区 *CP* 基因具有较高同源性,相比之下,ToCV-YL1 *CP* 基因与欧洲地区分离物 *CP* 基因同源性较低(表 2)。

从构建的 *CP* 基因序列进化树可以看出,ToCV-

YL1 *CP* 基因与山东青岛和山西晋中分离物 ToCV-YL1 *CP* 基因在一个小分支上,亲缘关系一致。中国的 23 份材料的 *CP* 基因序列聚集在一个大的分支上。不同地区的 ToCV *CP* 基因序列存在一定差异,同一国家的 ToCV *CP* 基因序列亲缘关系较近,亚洲与欧洲 ToCV *CP* 基因亲缘关系相对较远(图 2)。

表 2 用于序列比较和进化分析的 ToCV CP 基因序列信息

Table 2 Information of ToCV CP gene for sequence comparison and phylogenetic analysis							
病毒分离物 Virus isolate	GenBank 登录号 Accession no.	地理来源 Geographic origin	同源性/% Identity	病毒分离物 Virus isolate	GenBank 登录号 Accession no.	地理来源 Geographic origin	同源性/% Identity
ToCV-SDQD(CP)	KT809400	中国	100.00	ToCV-Zhengzhou(CP)	KR150986	中国	99.10
ToCV-SXJZ(CP)	KX853540	中国	100.00	ToCV-NGXJZ(CP)	KX272755	中国	98.97
ToCV-HNAYHX(CP)	KP264983	中国	99.61	ToCV-HBLF(CP)	KP217199	中国	98.97
ToCV-Tochigi(CP)	AB513443	日本	99.61	ToCV-TJ6(CP)	KP219722	中国	98.97
ToCV-HS(CP)	KP137099	韩国	99.61	ToCV-To-Se2042(CP)	HG380086	希腊	98.97
ToCV-HP(CP)	KP114537	韩国	99.61	ToCV-To-Il1857(CP)	HG380088	希腊	98.97
ToCV-JN1(CP)	KP114536	韩国	99.61	ToCV-To-Il1970(CP)	HG380085	希腊	98.97
ToCV-JJ5(CP)	KP114534	韩国	99.61	ToCV-To-Rh1933(CP)	HG380084	希腊	98.97
ToCV-YG(CP)	KP114528	韩国	99.61	ToCV-IS29(CP)	KP114529	韩国	98.97
ToCV-JJ3(CP)	KP114533	韩国	99.61	ToCV-IS17(CP)	KP114525	韩国	98.97
ToCV-14HD-12(CP)	KP335046	中国	99.61	ToCV-HBSJZ(CP)	KP217200	中国	98.84
ToCV-15-PG-9(CP)	KT751008	中国	99.61	ToCV-To-Il2002(CP)	HG380089	希腊	98.84
ToCV-HBHS(CP)	KP217196	中国	99.61	ToCV-To-Il2010(CP)	HG380090	希腊	98.84
ToCV-SDLCL(CP)	KC812622	中国	99.48	ToCV-To-Rh1835(CP)	HG380087	希腊	98.84
ToCV-HNZZZM1(CP)	KP264984	中国	99.48	ToCV-Gr-535(CP)	EU284744	希腊	98.71
ToCV-SDSG(CP)	KC709510	中国	99.48	ToCV-ToC-Br2(CP)	JQ952601	巴西	98.58
ToCV-Nanjing(CP)	KJ815045	中国	99.48	ToCV-IS(CP)	DQ234673	以色列	98.45
ToCV-BJ(CP)	KC311375	中国	99.48	ToCV-BR(CP)	KY569401	巴西	98.32
ToCV-LNDL(CP)	KU204707	中国	99.35	ToCV-Pl-1-2(CP)	KJ200309	西班牙	97.80
ToCV-JLCC(CP)	KU306111	中国	99.22	ToCV-JJ(CP)	KP137101	韩国	97.67
ToCV-SDZB(CP)	KR072213	中国	99.22	ToCV-Fr(CP)	EU625350	法国	97.67
ToCV-HBCZ(CP)	KP217195	中国	99.22	ToCV-MM8(CP)	KJ200307	西班牙	97.55
ToCV-Florida(CP)	AY903448	美国	99.22	ToCV-AT80/99-IC(CP)	KJ740257	西班牙	97.29
ToCV-Florida(CP)	NC_007341	美国	99.22	ToCV-AT80/99(CP)	DQ136146	西班牙	97.16
ToCV-HNZZZM2(CP)	KP264985	中国	99.10	ToCV-2.5(CP)	KJ200305	西班牙	97.16
ToCV-NMHHHT(CP)	KU204709	中国	99.10				

2.3 ToCV HSP70h 基因序列分析

RT-PCR 扩增结果表明,HSP-2-F/R 扩增出 801 bp 片段,HSP-3-F/R 扩增出 1 008 bp 片段,与预期结果相符。分别将这两个扩增片段的 3 个阳性克隆进行测序拼接得到 3 个 1 851 bp 片段,该片段包括完整 *HSP70h* 基因(1 665 个核苷酸),使用 DNAMAN 软件对这 3 个 1 665 bp 片段进行比对,序列结果一致,重复性较好。

将陕西省杨凌分离物 ToCV-YL1 *HSP70h* 基因全长 1 665 个核苷酸(GenBank 登录号:MF346384)与在 NCBI 上收集的来自亚洲、欧洲、北美洲、南美洲的 7 个国家的 42 份 ToCV *HSP70h* 基因序列进行同源性分析及进化树构建。结果表明,ToCV-

YL1 *HSP70h* 基因与中国大部分地区、日本、韩国大部分地区、美国、巴西分离物 ToCV *HSP70h* 基因同源性在 99%以上,与西班牙的 5 个地区分离物 ToCV *HSP70h* 基因同源性在 98%以上,而与中国广东分离物 ToCV *HSP70h* 基因同源性最低,为 80.37%(表 3)。从构建的 *HSP70h* 基因序列进化树可以看出,ToCV-YL1 分离物 *HSP70h* 基因与中国大部分地区 *HSP70h* 基因在一个分支上。不同地区的 ToCV *HSP70h* 基因序列存在一定差异,同一国家的 ToCV *HSP70h* 基因序列亲缘关系较近,亚洲地区的 ToCV *HSP70h* 基因亲缘关系较近,亚洲与欧洲 ToCV *HSP70h* 基因亲缘关系相比较远(图 3)。这个结果与 ToCV-YL1 的 *CP* 基因有相似之处。

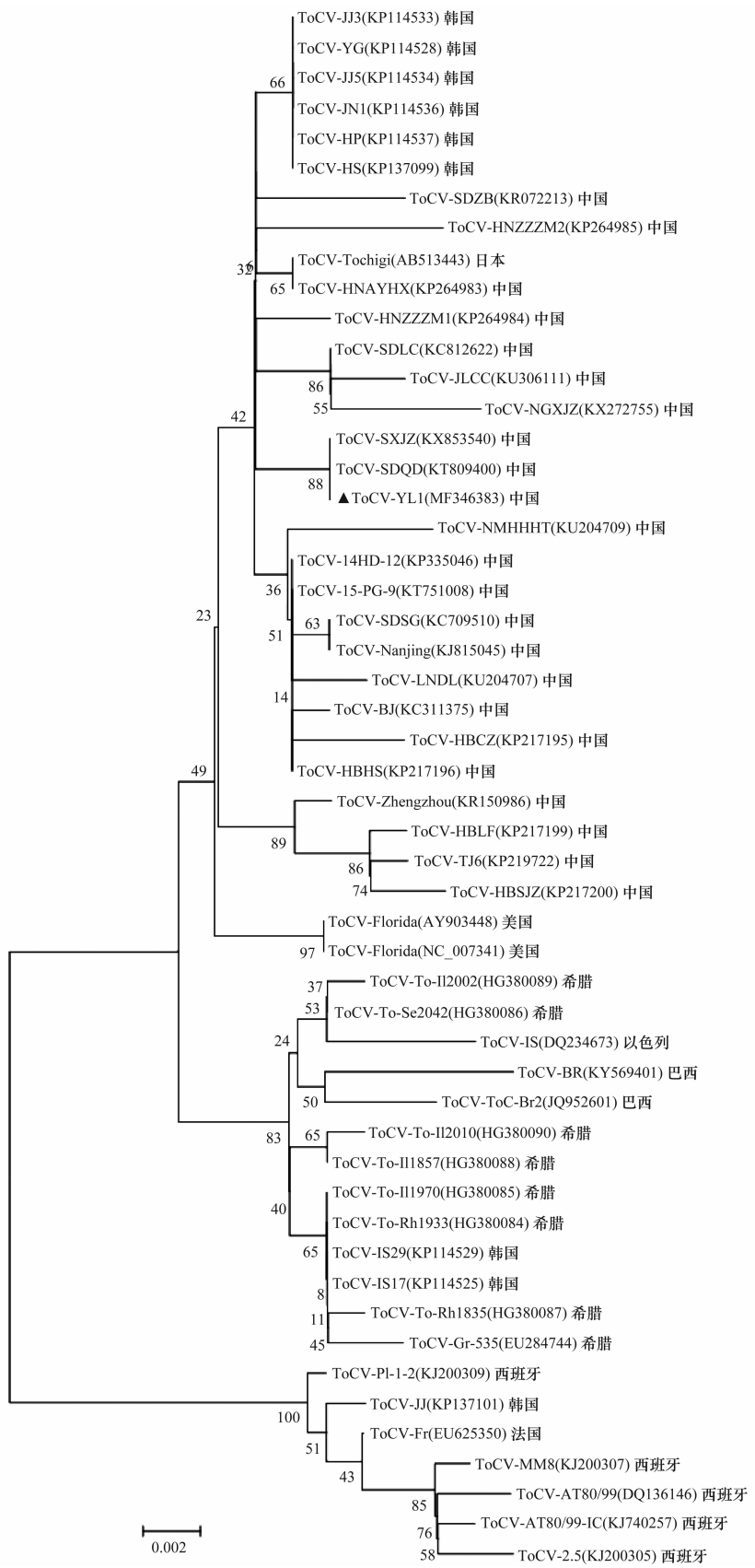


图 2 基于 CP 基因核苷酸序列构建的 ToCV-YL1 与其他 51 个地区分离物 ToCV CP 基因的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of ToCV-YL1 and other 51 ToCV isolates based on the nucleotide sequences of CP gene

表 3 用于序列比较和进化分析的 ToCV 类
热激蛋白 70 基因序列信息

Table 3 Information of ToCV *HSP70h* for sequence
comparison and phylogenetic analysis

病毒分离物 Virus isolate	GenBank 登录号 Accession no.	地理来源 Geographic origin	同源性/% Identity
ToCV-HP	KP114537	韩国	99.70
ToCV-Tochigi	AB513442	日本	99.70
ToCV-HS	KP137099	韩国	99.64
ToCV-YG	KP114528	韩国	99.64
ToCV-JN1	KP114536	韩国	99.64
ToCV-JJ3	KP114533	韩国	99.64
ToCV-JJ5	KP114534	韩国	99.64
ToCV-HBCZ	KP217201	中国	99.58
ToCV-SDSG	KC709510	中国	99.58
ToCV-JLCC	KX880384	中国	99.52
ToCV-SDT AFC	KC812625	中国	99.52
ToCV-Handan	KM655829	中国	99.52
ToCV-SDLC	KC812626	中国	99.52
ToCV-SDT AMZ	KC812627	中国	99.52
ToCV-HBHS	KP217197	中国	99.46
ToCV-SDT ADP	KC812624	中国	99.46
ToCV-Florida	NC_007341	美国	99.40
ToCV-HNZZM2	KP264988	中国	99.40
ToCV-HNAYHX	KP264986	中国	99.40
ToCV-LNDL	KU204708	中国	99.40
ToCV-ToCV-BJ	KC887999	中国	99.40
ToCV-Florida	AY903448	美国	99.40
ToCV-zb	KR072214	中国	99.34
ToCV-HNZZM1	KP264984	中国	99.28
ToCV-SXJZ	KX853539	中国	99.28
ToCV-NMHHHT	KU204710	中国	99.28
ToCV-Nanjing	KJ815045	中国	99.28
ToCV-HBLF	KP217202	中国	99.22
ToCV-HBSJZ	KP217198	中国	99.22
ToCV-Br2	JQ952601	巴西	99.22
ToCV-ToCV-TJ6	KP226698	中国	99.16
ToCV-IS29	KP114529	韩国	99.16
ToCV-IS17	KP114525	韩国	99.16
ToCV-Gr-535	EU284744	希腊	99.10
ToCV-Tianjin	KP893120	中国	99.04
ToCV-JJ	KP137101	韩国	98.80
ToCV-AT80/99-IC	KJ740257	西班牙	98.50
ToCV-AT80/99	DQ136146	西班牙	98.44
ToCV-Pl-1-2	KJ200309	西班牙	98.38
ToCV-2.5	KJ200305	西班牙	98.38
ToCV-MM8	KJ200307	西班牙	98.38
ToCV-GD01	KT962275	中国	80.37

3 讨论

本研究对西北地区陕西杨凌番茄疑似感病株进

行 ToCV 分子检测,确定该地区番茄已经感染 ToCV,而且有扩大的趋势。提醒西北地区番茄生产者注意该病毒病的危害,加强防控,减少经济损失。本研究对陕西省杨凌分离物 ToCV-YL1 的外壳蛋白 *CP* 基因(GenBank 登录号:MF346383)和类热激蛋白 *HS70h* 基因(GenBank 登录号:MF346384)片段进行克隆与序列分析,*CP* 基因序列与中国各地区 ToCV 分离物同源性较高,和山东青岛、山西晋中 ToCV 分离物 *CP* 基因同源性达到 100%,相比之下,与欧洲其他国家同源性较低。*HSP70h* 基因与中国各地区及亚洲地区的韩国、日本 ToCV 分离物同源性较高,而与欧洲国家 ToCV 分离物 *HSP70h* 基因同源性较低。由此可见,番茄褪绿病毒在不同地区其基因组保守区域有一定差异性,该差异是否影响其对作物的侵染作用尚不清楚。

近几年,番茄褪绿病毒病传播迅速,寄主范围也进一步扩大,除目前报道的茄科植物外,在国外有研究表明野生萝卜、芝麻菜(garden rocket)、龙葵、苦苣菜、反枝苋、藜等植物都是番茄褪绿病毒的寄主植物^[24],但和番茄相比其传播病毒的效率较低,目前受该病毒危害最严重的仍是番茄^[24]。番茄褪绿病毒的传播介体主要是烟粉虱,而 Q 型烟粉虱是粉虱中传毒效率较高的传播载体^[25]。另外,番茄褪绿病毒还会和番茄黄化曲叶病毒一起复合侵染番茄,导致番茄严重减产甚至绝收。在我国番茄褪绿病毒目前分布在东北、华北、华中、华东和华南地区均有分布^[18-23],现已蔓延至西北地区。该病害在我国迅速传播的原因可能是带毒种苗的运输以及带毒烟粉虱的传播。番茄褪绿病毒病具有暴发性和流行性,较难防治。针对番茄褪绿病毒对番茄的侵害,在保护地中育苗和定植后利用 60 目以上的网纱进行物理隔离,并从播种、定植至采收的全过程喷施杀虫剂可防止各类烟粉虱对 ToCV 的传播,从而达到控制 ToCV 的目的。在栽培管理方面,适当调整播种和定植期,高温、干燥的气候条件对粉虱的发生、繁殖及传播有利,各种种植基地根据具体情况可适当提前或延迟定植时间,尽量避开粉虱的活动高峰期,选择无虫、无毒健苗定植,严禁将带虫、带毒苗移入棚室^[10]。防治 ToCV 的最好手段是利用抗病番茄品种,而国内外目前尚未有抗病品种育成的报道,因此培育抗 ToCV 番茄品种将是未来番茄育种的重点。

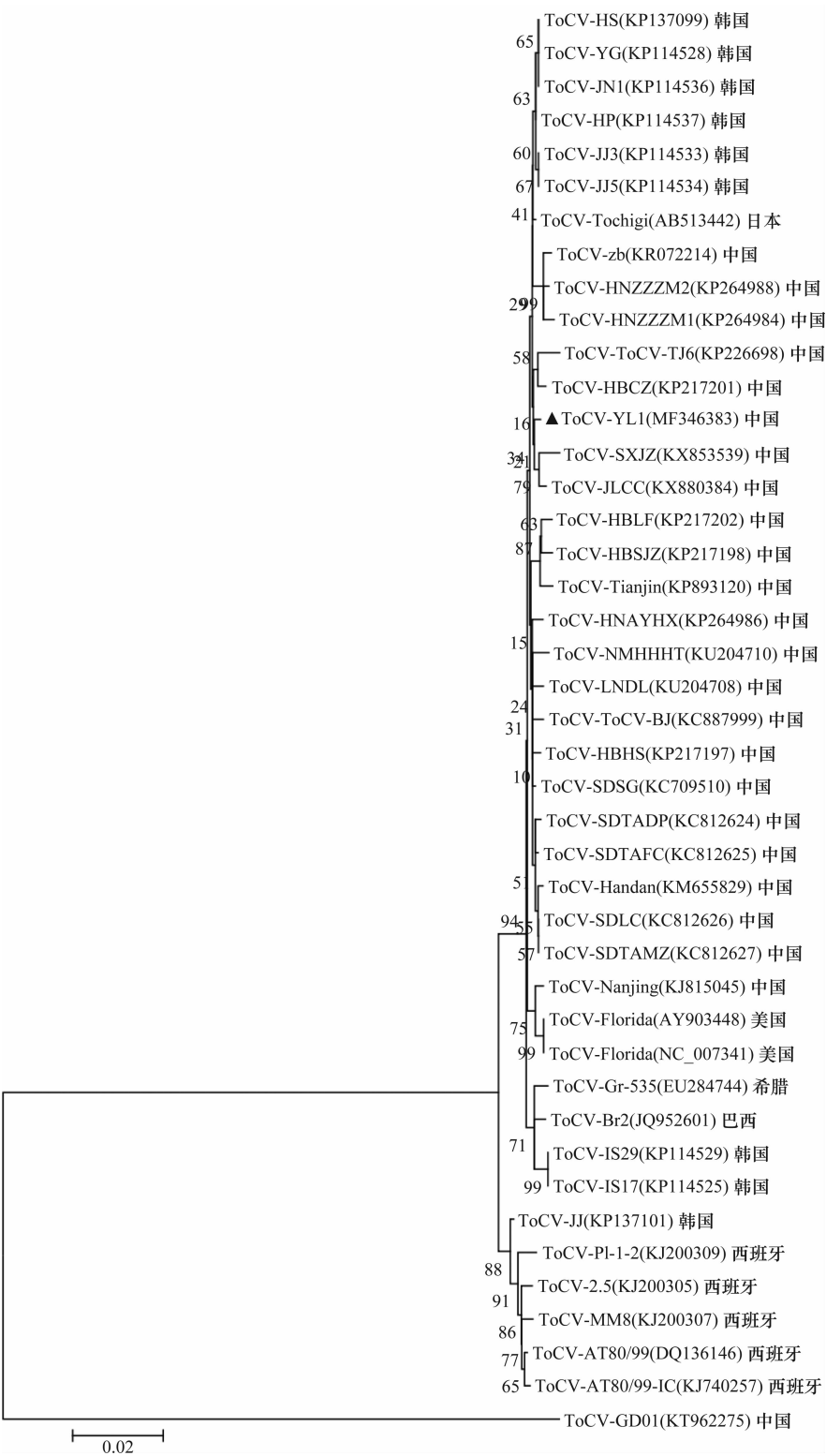


图 3 基于 *HSP70h* 基因核苷酸序列构建的 ToCV-YL1 与其他 42 个地区 ToCV 分离物的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of ToCV-YL1 and other 42 ToCV isolates based on the nucleotide sequences of *HSP70h* gene

参考文献

[1] WISLER G C, LI R H, LIU H Y. Tomato chlorosisvirus; a

new whitefly transmitted, phloem limited, bipartite closterovirus of tomato [J]. Phytopathology, 1998, 88(5): 402 - 409.
[2] WISLER G C, DUFFUS J E, LIU H Y, et al. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses [J]. Plant

- Disease, 1998, 82(3): 270–280.
- [3] 王富, 李文丽, 王辉. 番茄褪绿病毒病与黄化曲叶病毒病的区别及防控[J]. 长江蔬菜, 2016(5): 45–46.
 - [4] 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.
 - [5] WINTERMANTEL W M, WISLER G C, ANCHIETA A G, et al. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus* [J]. Archives of Virology, 2005, 150: 2287–2298.
 - [6] KATAYA A, STAVRIDOU E, FARHAN K, et al. Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of *Tomato chlorosis virus* [J]. Plant Pathology, 2008, 57(5): 819–824.
 - [7] GARCÍA-CANO E, NAVAS-CASTILLO J, MORIONES E, et al. Resistance to *Tomato chlorosis virus* in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression [J]. Phytopathology, 2010, 100: 582–592.
 - [8] LANDEO-RÃ-OS Y M, NAVAS-CASTILLO J, MORIONES E, et al. Genetic diversity and silencing suppression activity of the p22 protein of *Tomato chlorosis virus* isolates from tomato and sweet pepper [J]. Virus Genes, 2015, 51: 283–289.
 - [9] WINTERMANTEL W M, WIDER G C. Vector specificity, host range and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus* [J]. Plant Disease, 2006, 90(6): 814–819.
 - [10] 王志荣, 王孝宣, 杜永臣, 等. 番茄褪绿病毒病研究进展[J]. 园艺学报, 2016, 43(9): 1735–1742.
 - [11] ISABEL M. FORTES, JESÚS NAVAS-CASTILLO. Potato, an experimental and natural host of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 134: 81–86.
 - [12] 周涛, 杨普云, 赵汝娜, 等. 警惕番茄褪绿病毒在中国的传播和危害[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 196–199.
 - [13] 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.
 - [14] WINTERMANTEL W M, POLSTON J E, ESCUDERO J, et al. First report of *Tomato chlorosis virus* in Puerto Rico [J]. Plant Disease, 2001, 85(2): 228.
 - [15] 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.
 - [16] 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.
 - [17] LETT J M, HOAREAU M, REYNAUD B, et al. First report of *Tomato chlorosis virus* in tomato on Mauritius Island [J]. Plant Disease, 2009, 93 (1): 111.
 - [18] 高利利, 孙国珍, 王勇, 等. 天津地区番茄褪绿病毒的分子检测和鉴定[J]. 华北农学报, 2015, 30(3): 211–215.
 - [19] 孙国珍, 高利利, 陆文利, 等. 河北省设施番茄褪绿病毒分子检测和鉴定研究[J]. 北方园艺, 2015(9): 95–98.
 - [20] ZHAO Liming, LI Gang, GAO Ying, 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.
 - [21] 汤亚飞, 何自福, 余小曼, 等. 侵染广东番茄的番茄褪绿病毒分子鉴定[J]. 植物保护, 2017, 43(2): 133–137.
 - [22] 王翠琳, 冯佳, 竺晓平, 等. 北方四省区番茄褪绿病毒的分子鉴定[J]. 植物保护, 2017, 43(2): 141–145.
 - [23] 胡京昂, 万秀娟, 李自, 等. 河南番茄褪绿病毒的分子鉴定[J]. 中国蔬菜, 2015(12): 25–28.
 - [24] BOITEUX L S, FONSECA M E N, REIS A, et al. Wild radish (*Raphanus* spp.) and garden rocket (*Eruca sativa*) as new Brassicaceae hosts of *Tomato chlorosis virus* in South America [J]. Plant Disease, 2016, 10(5): 1027.
 - [25] ORFANIDOU C G, PAPPIS P G, EFTHIMIOU K E, et al. Transmission of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) by *Bemisia tabaci* biotype Q and evaluation of four weed species as viral sources [J]. Plant Disease, 2016, 100(10): 2043–2049.

(责任编辑: 田 喆)