番茄褪绿病毒侵染黄瓜的首次报道

王天旗[1]， 史晓斌[2]， 郑立敏[2]， 刘 勇[2]， 张德咏[2]， 谭新球[2]， 周序国[1*]

(1. 湖南大学研究生院隆平分院，长沙 410125；2. 湖南省农业科学院植物保护研究所，长沙 410125)

摘要 番茄褪绿病毒 *Tomato chlorosis virus*(ToCV)是严重危害世界经济作物的一种病毒，寄主范围广泛。田间调查发现黄瓜 *Cucumis sativus* 表现出叶片黄化、脉间褪绿的疑似番茄褪绿病毒感病症状，同时叶片背面聚集了大量烟粉虱。采用 RT-PCR 方法对样品叶片和烟粉虱进行检测，ToCV 感染率为 65%，且发病叶片上烟粉虱携带 ToCV。为进一步确定黄瓜是否为番茄褪绿病毒的新寄主，室内利用农杆菌侵染性克隆接种健康黄瓜，结果显示：接种 30 d 的黄瓜新生叶片出现褪绿症状。采用 ToCV *HSP*70 基因的引物对田间黄瓜叶片、烟粉虱和室内黄瓜新生叶片进行 RT-PCR，扩增出约 450 bp 的条带，在 NCBI 上 BLAST 显示与 KC887999.1 的同源性最高，为 99%。这些数据表明黄瓜是番茄褪绿病毒的寄主。这是 ToCV 感染黄瓜的首次报道。

关键词 番茄褪绿病毒； 黄瓜； 烟粉虱； RT-PCR

中图分类号： S 436.421 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2019100

Cucumber (*Cucumis sativus*) is a new host for *Tomato chlorosis virus*

WANG Tianqi[1], SHI Xiaobin[2], ZHENG Limin[2], LIU Yong[2], ZHANG Deyong[2], TAN Xinqiu[2], ZHOU Xuguo[1*]

(1. *Long Ping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha* 410125, *China*;
2. *Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha* 410125, *China*)

Abstract *Tomato chlorosis virus* (ToCV) causes severe damage to crops worldwide, and it infects a wide range of plant hosts. In a field investigation, we found leaf etiolation, interveinal chlorosis of suspected symptoms of tomato chlorosis virus disease in cucumber (*Cucumis sativus*); meanwhile a large number of *Bemisia tabaci* gathered on the back of cucumber leaves. The leaves and *B. tabaci* were tested by RT-PCR. The results showed that the ToCV infection rate was 65%, and *B. tabaci* on the infected leaves carried ToCV. In order to further determine whether cucumber is the new host of tomato chlorosis virus, healthy cucumbers were inoculated with agrobacterium-infected clones indoors. The results showed that chlorosis appeared in new leaves of cucumbers 30 days after inoculation. The primers of ToCV *HSP*70 gene were used to perform RT-PCR on cucumber leaves, whiteflies and new leaves of indoor cucumber, and a band of 450 bp was amplified. BLAST on NCBI showed the highest homology (99%) with KC887999.1. These data indicate that cucumber is the host of tomato chlorosis virus. This is the first report of ToCV infection in cucumbers.

Key words *Tomato chlorosis virus*; *Cucumis sativus*; *Bemisia tabaci*; RT-PCR

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*，于 1998 年在美国佛罗里达州的温室番茄中首次报道[1]。自 2004 年首次在中国台湾发现以来，已在北京、山东、天津、海南、湖南和云南等多个地区发现并迅速蔓延，对番茄等蔬菜生产造成严重损失[2-7]。该病毒只能通过韧皮部侵染的方式，由媒介昆虫以半持久方式传播，其中以烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的传播能力最为高效。感染 ToCV 的植物一般是从中下部叶片出现症状并逐渐向上发展，中部叶片表现为叶脉间轻微褪绿黄化，底部叶片则出现明显的叶片褪绿黄化，叶脉深绿，感病叶片变脆且易折，叶片黄化疑似营养缺素症[8]。ToCV 可侵染茄科、十字花科、夹竹桃科、藜科和菊科等多科植物[9-11]。

黄瓜 *Cucumis sativus* 是我国重要的保护地栽培蔬菜之一。中国各地普遍栽培，且许多地区均有

收稿日期： 2019-03-04 **修订日期**： 2019-04-07
基金项目： 国家自然科学基金(31872932,31672003)；湖南省科技计划(2016RS2019)；国家大宗蔬菜产业技术体系(CARS-25-B-05)
* 通信作者 E-mail:xuguozhou@uky.edu

温室或塑料大棚栽培，广泛种植于温带和热带地区。感染黄瓜的病毒主要有西瓜花叶病毒（WMV）、番木瓜环斑病毒（PRSV）、黄瓜花叶病毒（CMV）、烟草花叶病毒（TMV）、黄瓜绿斑花叶病毒（CGMMV）和瓜类褪绿黄化病毒（CCYV）[12-14]。目前尚未有关于番茄褪绿病毒侵染黄瓜的报道。

2017 年 9 月在湖南省蔬菜研究所基地发现黄瓜表现疑似 ToCV 感染症状，同时在叶背面发现大量烟粉虱。采集症状明显的黄瓜叶片及烟粉虱并通过 ToCV 特异性引物进行鉴定，随后利用农杆菌侵染性克隆接种健康黄瓜进一步验证黄瓜能否感病，以期明确黄瓜的受害情况，为预防和控制流行病毒病提供预警。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2017 年 9 月，在湖南长沙蔬菜研究所基地发现大量黄瓜叶片褪绿黄化、叶脉仍然保持绿色。随机采集叶片 60 份，其中显症样品 50 份、无症状样品 10 份，保存于－80℃冰箱备用。同时，收集带有烟粉虱的显症黄瓜叶片，烟粉虱放入离心管，叶片放入保鲜袋后带回实验室，并在显微镜下观察烟粉虱形态特征并区分雌雄。随后从采集的烟粉虱中随机选取 12 头，进行多头烟粉虱的 RNA 提取，重复 3 次，以明确烟粉虱样本是否携带 ToCV[15]。并随机各选取雌雄性烟粉虱 20 头，分别鉴定烟粉虱的带毒率。采用以 ToCV *HSP*70 基因设计的特异性引物 ToCV-3（表 1）进行检测。

1.2 样品 RNA 提取、cDNA 的合成及 RT-PCR 扩增

1.2.1 植物和烟粉虱总 RNA 的提取

田间黄瓜 RNA 的提取采用北京华越洋生物公司多酚多糖植物 RNA 提取试剂盒，步骤依照试剂盒说明书操作。烟粉虱 RNA 的提取采用 TRIzol 法并稍作修改。

1.2.2 反转录合成 cDNA

体系步骤参照 Vazyme 生物公司 HiScript Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit（＋gDNA wiper）产品说明书进行。以提取的总 RNA 为模板，Random hexamers 为引物合成 cDNA，－20℃保存备用。

1.2.3 PCR 扩增和电泳检测

采用 ToCV *HSP*70 基因特异性引物 ToCV-3F/ToCV-3R（表 1）进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为：ddH_2O 8 μL，2×*Taq* Master Mix（Dye Plus）10 μL，ToCV-3R 0.5 μL（10 μmol/L），ToCV-3F 0.5 μL（10 μmol/L），cDNA 模板 1 μL。PCR 程序为：95℃ 5 min；95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min，30 个循环；72℃延伸 10 min，4℃保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测，在凝胶成像系统上观察并记录结果，产物纯化回收并连接于克隆载体 pGEM-T easy（Promega，USA），热激转化大肠杆菌 DH5α 后，挑取阳性克隆送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。利用 BLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）进行序列比对和分析。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	用途 Usage	引物序列（5′-3′） Primer sequence
ToCV-3 F	ToCV	AAACTGCCTGCATGAAAAGTCTC
ToCV-3 R	检测	GGTTTGGATTTTGGTACTACATTCAGT
WT-F	烟粉虱生	CTTGGTAACTCTTCTGTAGATGTGTGTT
WT-R	物型鉴定	CCTTCCCGCAGAAGAAATTTTGTTC

1.3 烟粉虱生物型鉴定

烟粉虱单头 DNA 的提取：取 3 μL 蛋白酶 K 于封口膜上，单头烟粉虱置于其中，研磨成匀浆后移至加入 20 μL 10 mg/mL 的树脂溶液 PCR 管中混匀，37℃孵育 1 h，96℃ 10 min。

以 WT-F 和 WT-R 为引物[16]，对提取的烟粉虱 DNA 进行 PCR 扩增。扩增体系为 20 μL：ddH_2O 7 μL，2×*Taq* Master Mix（Dye Plus）10 μL，WT-F 1 μL，WT-R 1 μL（表 1），模板 1 μL。PCR 程序：95℃ 5 min；95℃ 15 s，53℃ 45 s，72℃ 1 min，35 个循环；72℃延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

酶切体系：ddH_2O 7.5 μL，*Ase* Ⅰ 0.5 μL，缓冲液 3.1X buffer 2 μL，加入 10 μL PCR 产物混匀后置于 37℃孵育 2～3 h。酶切后取 5 μL 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。每次取 20 头烟粉虱检测，重复 3 次。

1.4 烟粉虱带毒情况的检测

从田间黄瓜上采集的烟粉虱中随机选取 12 头，进行多头烟粉虱的 RNA 提取，采用 ToCV *HSP*70 基因特异性引物 ToCV-3（表 1）进行检测，重复 3 次，以明确烟粉虱样本是否携带 ToCV。田

间黄瓜上烟粉虱中随机选取 20 头,进行单头烟粉虱的 RNA 提取,重复 3 次,统计雌雄烟粉虱的带毒率。

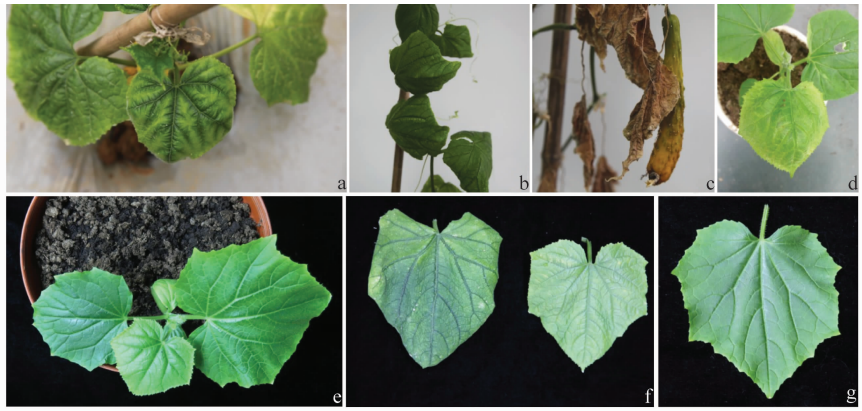
1.5　供试植物和接种病毒

供试植物:黄瓜(品种为'长春密刺')种植在 26℃±2℃,相对湿度 75%±5%、光照周期 L//D=16 h//8 h 的温室防虫笼中。为了确定 ToCV 能否系统感染黄瓜,将 0.5 mL 农杆菌侵染性 cDNA 克隆注射到三叶期的植物中[15]。共接种 20 株黄瓜,并以注射接种液作为对照。

2　结果与分析

2.1　田间样品症状

疑似感染 ToCV 的黄瓜主要表现为:叶片褪绿变黄,并随着症状的发展除了叶脉仍保持绿色外,几乎整个叶片全变黄色,叶片变脆且易折,同时还伴随部分叶片边缘卷曲等典型的 ToCV 症状(图 1 a~c)。这与山东地区报道的 ToCV 引起的番茄病害特征类似[17]。基于病害特征和烟粉虱的发生,初步推测此次发现的黄瓜病害是由 ToCV 引起的病毒病。



a~c: 田间黄瓜早、中、晚期感病症状; d: 接种ToCV 30 d后表现症状; e: 健康黄瓜植株; f: 感病叶片(左)与健康叶片(右); g: 健康黄瓜叶片
a–c: Early, middle and late symptoms of field cucumber; d: Symptoms 30 days after ToCV inoculation; e: Healthy cucumber plant; f: Susceptible (left) and healthy leaves (right); g: Healthy cucumber leaf

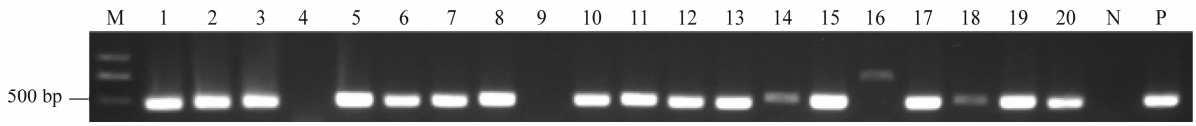
图 1　黄瓜感染 ToCV 的症状

Fig. 1　Symptoms of ToCV on cucumber plants

2.2　RT-PCR 检测结果

利用 ToCV *HSP*70 基因特异性引物对采集的黄瓜样本进行 RT-PCR 扩增,PCR 产物经电泳检测(图 2),60 份样品中有 39 份样品被鉴定为 ToCV 阳性,包括 37 份显症样品和 2 份未显症样品,检出率为 65%。产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳后,显示扩增出大约 450 bp 的清晰条带,而健康黄瓜叶片阴性对照未检测到条带。

将 PCR 产物纯化回收后,连接到克隆载体,转化大肠杆菌后,每个样本取 3 个克隆进行测序。结果显示 RT-PCR 扩增结果为 439 bp,在 NCBI 上进行 BLAST 比对,结果显示与 KC887999.1 的同源性最高,为 99%。说明感染黄瓜的病毒为 ToCV。



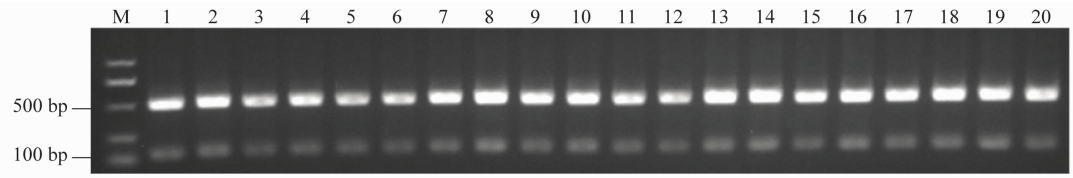
M: Marker; 1~20: 田间黄瓜样品; N: 阴性对照; P: 阳性对照
M: Marker; 1–20: Field cucumber samples; N: Negative control; P: Positive control

图 2　田间黄瓜样品的 RT-PCR 检测结果

Fig. 2　RT-PCR results of field cucumber samples

2.3　烟粉虱生物型鉴定

对田间黄瓜叶背面采集的烟粉虱进行生物型鉴定,提取单头烟粉虱总 DNA 并进行 PCR 扩增,产物经 *Ase* Ⅰ酶切后分别得到 500 bp 和 100 bp 的两条带(图 3),结果显示田间烟粉虱均为 MED (Q)烟粉虱。



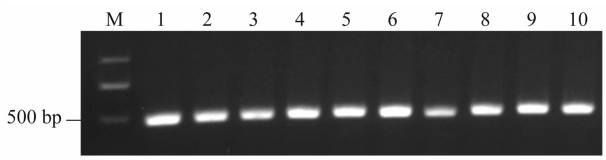
M: Marker; 1~20: 烟粉虱样品
M: Marker; 1-20: *B. tabaci* sampes

图 3 烟粉虱生物型鉴定结果

Fig. 3 Identification of *Bemisia tabaci* biotypes

2.4 烟粉虱带毒情况的检测

收集田间黄瓜叶背面的烟粉虱，每株黄瓜叶片随机选取 12 头进行多头烟粉虱的 RNA 提取，重复 3 次，进行 ToCV 的 RT-PCR 检测，PCR 扩增得到大小为 450 bp 左右的特异性条带，与目标片段大小一致(图 4)。此外，田间感病黄瓜上雌雄性烟粉虱随机各选取 20 头，采用 ToCV *HSP*70 基因特异性引物 ToCV-3(表 1)进行单头烟粉虱的 ToCV 检测，重复 3 次，统计得到雌性和雄性烟粉虱的平均带毒率分别为 83.5%和 61.5%，雌性感染率高于雄性(表 2)。



M: Marker; 1~10: 烟粉虱样品
M: Marker; 1-10: *B. tabaci* sampes

图 4 烟粉虱体内 ToCV 的 RT-PCR 检测结果

Fig. 4 RT-PCR results of ToCV in *Bemisia tabaci*

表 2 雌雄烟粉虱带毒率统计[1)]

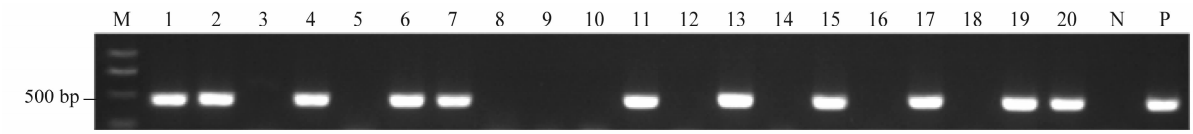
Table 2 Viruliferous ratio of the female and male whiteflies

性别 Sex	烟粉虱总数/头 Total number	带毒烟粉虱数/头 Viruliferous number	带毒率/% Viruliferous rate
雌性 Female	20	16.7	83.5
雄性 Male	20	12.3	61.5

1) 表中数据为平均值。
Data in the table are mean.

2.5 室内接种 ToCV 感染黄瓜

与室内健康黄瓜相比，接种 30 d 后黄瓜表现出叶片黄化、脉间开始褪绿及叶边缘卷曲等番茄褪绿病毒感病症状(图 1d)。对室内接种 30 d 后的黄瓜进行 RT-PCR 鉴定(图 5)，接种的 20 株黄瓜中有 11 株被鉴定为 ToCV 阳性，染毒率为 55%。将 PCR 产物纯化回收后，连接到克隆载体，转化大肠杆菌后，每个样本取 3 个克隆送公司进行测序。结果显示 RT-PCR 扩增结果为 439 bp，在 NCBI 上进行 BLAST 比对，结果显示与 KC887999.1 的同源性为 99%。初步验证了 ToCV 对黄瓜的侵染性。



M: Marker; 1~20: 实验室黄瓜样品; N: 阴性对照; P: 阳性对照
M: Marker; 1-20: Laboratory cucumber samples; N: Negative control; P: Positive control

图 5 实验室黄瓜样品的 RT-PCR 检测结果

Fig. 5 RT-PCR results of laboratory cucumber samples

3 讨论

本研究在湖南省蔬菜研究所基地黄瓜种植区采集叶片，利用 RT-PCR 方法检测疑似发病叶片，经序列分析比对，确认 ToCV 侵染黄瓜，这是 ToCV 侵染黄瓜的首次发现。自然条件下，多种植物病毒的复合侵染在田间作物上常有发生，很多重要的病毒病害也是多种病毒相互作用共同侵染导致的[18]。这些田间采集的黄瓜样品中，不排除其他病毒病原的存在，这也是导致室内接种 ToCV 的症状与田间症状有所出入的主要原因。此外，田间发病植株的带毒量较高，而室内接毒的病毒量较低，这也是造成室内接种与田间症状不符的原因。

在 ToCV 阳性的 37 份样品中，有 2 份无明显症状，表明黄瓜显症可能与 ToCV 的积累量或者浓度有关，或存在部分潜隐性侵染。ToCV 在湖南黄瓜

样品的检出率高达 65%,这一较高的发病率,一方面对于黄瓜种植存在威胁;另一方面由于 ToCV 可以通过烟粉虱传播,对其他经济作物造成潜在威胁。这与先前的报道一致[19-20]。因此,对烟粉虱的监测有利于预防和控制该病毒的发生,减少其带来的危害。

番茄褪绿病毒具有多种寄主,除感染番茄、辣椒、马铃薯和其他茄科植物外,还可感染 13 属 30 种植物[2,21-22]。本研究发现的新寄主黄瓜,在农业上设施栽培面积较大,番茄褪绿病毒病一旦暴发,将导致黄瓜品质变差、产量下降,造成的经济损失严重影响农户的种植积极性。此外,在室内对黄瓜接毒的过程中发现,在病毒侵染后,黄瓜表现症状较晚,而在表现症状之前已经能够检测到病毒,这提醒我们在田间黄瓜可以保存番茄褪绿病毒的毒源,不容易被发现,且更容易造成番茄褪绿病毒在其他寄主上的扩散,应该重视在黄瓜上对番茄褪绿病毒病的提前检测。生产上对番茄褪绿病毒的防治应采取联防联控、综合防治。田间考察发现病毒病对黄瓜栽培品种的危害很严重,但目前尚未有根治病毒病的有效方法,病毒病的防治主要还是以预防为主。因此,本研究对于 ToCV 的预防和防治具有重要意义。

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] 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.

[3] 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, 2015, 162(10): 627-634.

[4] 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.

[5] TANG Xin, SHI Xiaobin, ZHANG Deyong, et al. Detection and epidemic dynamic of ToCV and CCYV with *Bemisia tabaci* and weed in Hainan of China [J]. Virology Journal, 2017, 14(1): 169.

[6] 王雪忠, 张战泓, 郑立敏, 等. 番茄褪绿病毒在湖南省首次发生[J]. 中国蔬菜, 2018(8): 27-31.

[7] 刘微, 史晓斌, 唐鑫, 等. 云南番茄褪绿病毒和番茄黄化曲叶病毒复合侵染的分子鉴定[J]. 园艺学报, 2018, 45(3): 552-560.

[8] 金凤媚, 薛俊, 宋建, 等. 天津地区番茄褪绿病毒的分子检测与基因组部分序列分析[J]. 华北农学报, 2016, 31(2): 23-27.

[9] WISLER G C, DUFFUS J E, LIU H Y, et al. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses [J]. Plant Disease, 2007, 82(3): 270-280.

[10] ZHAO R N, WANG R, WANG N, et al. First report of *Tomato chlorosis virus* in China [J]. Plant Disease, 2013, 97(8): 1123.

[11] 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.

[12] 陈红运, 白静, 朱水芳, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒辽宁分离物外壳蛋白基因与 3′非编码区的序列分析[J]. 中国病毒学, 2006, 21(5): 516-518.

[13] GU Q S, LIU Y H, WANG Y H, et al. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in China [J]. Plant Disease, 2011, 95(1): 73.

[14] KABELKA E, GRUMET R. Inheritance of resistance to the *Moroccan watermelon mosaic virus* in the cucumber line tmg-1 and cosegregation with *Zucchini yellow mosaic virus* resistance [J]. Euphytica, 1997, 95(2): 237-242.

[15] ZHAO Rui, WANG Na, LIU Si, et al. P22 of *Tomato chlorosis virus*, an RNA silencing suppressor, is naturally expressed in the infected plant [J]. Acta Virologica, 2016, 60(4): 423-425.

[16] SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1994, 87(6): 651-701.

[17] 郑慧新, 夏吉星, 周小毛, 等. 警惕烟粉虱传播的番茄褪绿病毒病在我国快速扩散[J]. 中国蔬菜, 2016(4): 22-26.

[18] SYLLER J. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(2): 204-216.

[19] 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): 196-200.

[20] 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.

[21] FONT M I, JUAREZ M, MARTINEZ O, et al. Current status and newly discovered natural hosts of tomato infectious chlorosis virus and tomato chlorosis virus in Spain [J]. Plant Disease, 2004, 88(1): 82.

[22] FORTES I M, NAVAS-CASTILLO J. Potato, an experimental and natural host of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 134(1): 81-86.

(责任编辑: 田　喆)