

河北省番茄黄化曲叶病毒和番茄褪绿病毒复合侵染及分布

张爱红¹, 杨菲¹, 潘阳², 孙祥瑞³, 张尚卿⁴, 苗洪芹¹, 邸垫平^{1*}, 孙茜^{1*}

(¹河北省农林科学院植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 华北北部作物有害生物综合治理重点实验室, 保定 071000; ²河北农业大学, 保定 071000; ³邢台现代职业学校, 邢台 054000; ⁴唐山市农业科学研究院, 唐山 063001)

摘要:番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)及番茄褪绿病毒(*Tomato chlorosis virus*, ToCV)是危害番茄的主要病毒。2016~2017年,在河北省18个番茄主产区调查番茄病毒病危害情况,采集262份植株矮化、叶片黄化、褪绿、卷曲的番茄样品,利用分子生物学技术对病原进行鉴定。结果表明:2016~2017年河北省番茄病毒病发生普遍,所检样品中TYLCV的侵染率为68.66%,其中与ToCV复合侵染率为19.5%;除栾城、滦南、乐亭、永年4地样品暂未检测到ToCV外,其他14个采样点的样品均检测到ToCV,侵染率为19.5%,且全部表现为与TYLCV复合侵染,河北省番茄主产区暂未发现ToCV单独侵染的样品。

关键词:番茄黄化曲叶病毒;番茄褪绿病毒;复合侵染

Identification and distribution of mixed infections of *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato chlorosis virus* in Hebei Province, China

ZHANG Ai-hong¹, YANG Fei¹, PAN Yang², SUN Xiang-rui³, ZHANG Shang-qing⁴, MIAO Hong-qin¹, DI Dian-ping^{1*}, SUN Qian^{1*} (¹Plant Protection Institute of Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences/IPM Center of Hebei Province/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture, Baoding 071000, China; ²Agricultural University of Hebei Province, Baoding 071000, China; ³Xingtai Modern Occupation School, Xingtai 054000, China; ⁴Tangshan Academy of Agricultural Sciences, Tangshan 063001, China)

Abstract: *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato chlorosis virus* were two major virus diseases in China. During 2016-2017, 262 leaf samples, which showed symptoms of stunting, yellowing, curling, chlorosis and rolling were collected from 18 main tomato-producing regions. Molecular and biological methods detection were used to detect TYLCV and ToCV. The results showed that virus diseases occurred in all the tomato-cultivated areas throughout the Hebei province. The symptoms of tomato virus disease in filed were complex. The infection rates of TYLCV, detected in every sampling site, were 68.66%, where the mixed infection rates with ToCV were 19.5%, and the rest were singly infected. ToCV was detected in all regions except for Luan cheng, Luan nan, Le ting and Yong nian. The infection rate of ToCV was 19.5%, and all the positive samples were mixed-infected with TYLCV. No single infection of ToCV on tomato was found.

Key words: *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV); *Tomato chlorosis virus* (ToCV); mixed infections

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)02-0271-05

收稿日期: 2018-06-06; 修回日期: 2018-08-14; 网络出版时间: 2018-09-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20180925.1441.009.html>

基金项目: 河北省农科院现代农业科技创新工程项目(F18C10001); 河北省现代农业产业技术体系(HBCT20180302)

通讯作者: 邸垫平, 博士, 研究员, 主要从事植物病毒研究; E-mail: chmrdrv@163.com

孙茜, 研究员, 主要从事果蔬病虫害研究; E-mail: sunrq512@163.com

第一作者: 张爱红, 硕士, 副研究员, 主要从事植物病毒研究; E-mail: zhangaihong08@163.com。

番茄病毒病是一类严重威胁番茄安全生产的病害。番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)属于双生病毒科(*Geminiviridae*)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*), 2006年在我国首次报道, 通过烟粉虱传播, 该病害扩展迅速, 危害严重, 可导致绝产、毁种^[1-3], 自2008年在河北省发生后, 在全省番茄主产区广泛流行^[4-6]。番茄褪绿病毒(*Tomato chlorosis virus*, ToCV)是由烟粉虱传播的另一种植物病毒, 该病毒为长线型病毒科(*Closteroviridae*)毛形病毒属(*Crinivirus*), 2014年在河北省保定等地设施番茄大棚被检测到, 主要症状表现为下部叶片叶脉间褪绿、黄化, 与缺素症类似, 病害发生严重时可减产50%左右^[7-9]。

TYLCV在河北省发生后, 本实验室对该病害在河北省的发生、分布进行了调查, 并通过筛选抗病品种, 使用防虫网等一系列抗病防虫的应急措施, 有效地遏制了病害的流行, 显著降低了病害对生产的损失^[10]。2016~2017年, 对番茄病毒病的常规调查发现, 河北省露地及棚室番茄病毒病再度爆发, 大部分表现为心叶发病, 叶片沿叶脉褪绿, 并伴随心叶黄化、曲叶等症状。这些症状既与番茄黄化曲叶病毒和番茄褪绿病毒的症状类似, 又与2种病毒的典型症状有所区别。田间症状的复杂性, 给病害的诊断带来较大的困难。针对这一情况, 笔者采集典型发病植株, 对病原进行鉴定, 并对2种病毒复合侵染情况进行调查。

1 材料与与方法

1.1 病害调查及样品采集

2016年1月~2017年12月, 在河北省番茄主产区调查番茄病毒病发生情况, 采集表现心叶发黄、叶片褪绿、卷曲、花叶、植株矮化等症状的叶片, 分别装在采集袋中, 标明采集时间、地点、品种、症状, 保存于-70℃冰箱。



Fig. 1 Symptoms of suspected virus-infected tomato

A: Smaller leaves, yellowing; B: Chlorosis along leaf vein; C: Rolling; D: Curling.

1.2 番茄病毒病病原鉴定及序列分析

对采集的番茄样品进行室内分子生物学检测, 番茄样品总DNA提取参照TIANGEN公司快捷型植物基因组DNA提取系统说明进行, 番茄总RNA提取参照TRIzol Reagent RNA提取试剂盒说明书进行, 以健康的番茄叶片作为阴性对照。

1.2.1 TYLCV的鉴定 根据已报道的TYLCV全序列设计鉴定引物, 引物信息为: TYLCV F, 5'-CTGAGGCTGTAATGTCGTCCTCAA-3', TYLCV R, 5'-CCAATAAGGCGTAAGCGTGTAG-3', 产物长度为304 bp。根据鉴定结果, 选择典型样品参照Du等^[11]的方法对TYLCV进行全序列分析。扩增反应参照说明书进行。扩增结束后, 取5 μL PCR产物于1.0%琼脂糖凝胶电泳中检测扩增产物, 并用G: BOX SYNGENE全自动凝胶成像系统记录结果, 取部分扩增产物送上海生物工程有限公司测序, 所得测序结果用DNAMAN进行拼接和分析。

1.2.2 ToCV的鉴定 根据已报道的ToCV CP蛋白设计特异引物序列: ToCV CP F, 5'-CCTCAAAGAGCTAAACTGGAC-3', ToCV CP R, 5'-CATCACCGGAACCCAAAGTCAC-3', 扩增目的基因长度为970 bp^[8]。PCR扩增反应参照说明书进行。扩增结束后, 取5 μL PCR产物于1.0%琼脂糖凝胶电泳中检测扩增产物, 并用G: BOX SYNGENE全自动凝胶成像系统记录结果, 取部分扩增产物送上海生物工程有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 田间症状调查

田间调查发现, 2016~2017年河北省番茄病毒病发生严重, 棚室及露地番茄病毒病主要有4种症状表现: ①心叶缩小、丛生, 叶片边缘黄化, 植株矮化, 早期感病植株矮化明显, 表现明显的番茄黄化曲叶病毒侵染后的症状(图1-A); ②心叶变小, 叶

片沿叶脉褪绿、边缘黄化不明显,植株矮化不明显(图 1-B);③叶缘上卷、叶片增厚,变脆易碎,植株明显矮化(图 1-C);④植株矮化,叶缘严重上卷,心叶缩小(图 1-D),在以上 4 种症状的样品中均能检测到 TYLCV 与 ToCV 的复合侵染。

2.2 番茄样品病原鉴定

对采自河北省 18 个番茄主产区的 262 份番茄样品进行 PCR 检测,所有样品中均能扩增到约 304 bp 的特异性条带。对河北省保定市博野县采集的阳性样品进行序列分析表明,该序列全长为 2 781 bp(GenBank accession No. MH703582),具有典型的双生病毒基因组结构,与 GenBank 中 TYLCV 的基因组序列基本一致。对采集的所有样品进行 RT-PCR 检测,其中 14 个番茄产地的样品扩增出 970 bp(GenBank accession No. 2139846)的特异性条带,比对结果表明,该序列为 ToCV-CP 序列,与 GenBank 中 ToCV-HS CP 蛋白序列的相似性高达 99.48%。以上检测结果表明:河北省番茄病毒病主要种类为 TYLCV 和 ToCV,病毒病发生普遍,18 个采样点均能检测到 TYLCV,14 个采样点能检测

到 ToCV。

2.3 TYLCV 和 ToCV 的复合侵染及在河北省的发生和分布

病原鉴定结果(表 1)可知,2016~2017 年采集的样本中 TYLCV 发生率 68.66%,与 ToCV 复合侵染率为 19.5%,其余为 TYLCV 单独侵染;ToCV 侵染率 19.5%,全部为与 TYLCV 复合侵染,本次调查未发现 ToCV 单独侵染。在所检的番茄样品中,各调查点均能检测到 TYLCV,说明该病毒在番茄主产区发生普遍。本次调查中,石家庄栾城、唐山滦南、乐亭、永年 4 地的所有样品均检出 TYLCV,且侵染率高达 100%,但 4 地未检出 ToCV+TYLCV 混合侵染的样品,其余 14 个采样点均存在 2 种病毒复合侵染的情况。调查表明,目前河北省番茄病毒病以 TYLCV 单独侵染或 ToCV+TYLCV 复合侵染为主。

3 讨论

我国番茄褪绿病毒病最早于 2004 年在台湾报道,2011 年在山东寿光发现后,在山东省大面积

Table 1 Pathogenic identification of tomato virus disease in Hebei

Sample origin	Sample quantity	Infections of ToCV/%	Infections of TYLCV/%	Mixed infection of ToCV+TYLCV/%
Gaoyi, Hebei	10	50.00	50.00	50.00
Gaocheng, Hebei	20	40.00	40.00	40.00
Luancheng, Hebei	2	0.00	100.00	0.00
Dingzhou, Hebei	15	40.00	60.00	40.00
Qingyuan, Hebei	33	19.65	57.13	19.65
Dingxing, Hebei	20	20.00	65.00	20.00
Xiong'an, Hebei	18	5.56	38.89	5.56
Luannan, Hebei	4	0.00	100.00	0.00
Fengnan, Hebei	24	4.17	95.80	4.17
Leting, Hebei	27	0.00	100.00	0.00
Xianxian, Hebei	20	5.00	85.00	5.00
Suning, Hebei	16	25.00	62.50	25.00
Raoyang, Hebei	29	13.79	37.93	13.79
Yongnian, Hebei	7	0.00	100.00	0.00
Feixiang, Hebei	3	25.00	50.00	25.00
Lincheng, Hebei	4	50.00	50.00	50.00
Xingtai, Hebei	10	33.30	75.00	33.30
Total	262	19.50	68.66	19.50

爆发^[12]。2012 年在北京发现了感染该病的番茄和甜椒植株^[13,14]。目前 ToCV 已扩展到天津、河北、河南、山西、内蒙古、辽宁、大连等地^[12~16]。河北省最早于 2013 年在唐山、保定的设施番茄中发现 ToCV^[9], 2015 年扩展至河北省 7 个地区^[8], 2017 年 ToCV 已在河北省 13 个番茄主产区检测到。

2 种或多种病毒的复合侵染在自然界中存在普遍。复合侵染的病毒可能会发生干扰或协生作用。干扰作用可以导致 2 种病毒的复制和寄生均受到一定的影响, 协生作用可能会使病害症状加重, 使寄主丧失抗病性或改变病毒的致病性^[17]。本次调查暂未发现同一番茄品种复合侵染的植株症状加重, 但发现一些番茄抗病毒病品种表现出不同程度的抗性降低情况(结果未发表)。自然条件下植株被病毒侵染后, 受番茄品种、植株的生育期、环境温度等影响, 症状的严重度会有所差别, 环境条件也会影响抗病品种抗病基因的表达, 因此 TYLCV 和 ToCV 复合侵染的作用方式还需要进一步系统研究。

2016~2017 年调查发现, ToCV 的发病率低于 TYLCV 且 ToCV 均和 TYLCV 复合侵染, 暗示河北省番茄产区, 烟粉虱同时携带这 2 种病毒, 并已在田间扩散传播。病毒复合侵染产生的协生作用与传毒介体的互作可能会导致 2 种病毒中的一种病毒或者 2 种病毒介体的获毒及传毒率提高, 亦或复合侵染能够影响传毒介体的偏好型和其他生物学特性。如蚜取食小麦线条花叶病毒 (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) 或小麦属花叶病毒 (*Triticum mosaic virus*, TriMV) 复合侵染的植株后的传毒效率显著高于单独感染^[18]。蚜虫在传播植物病毒时更喜欢在复合侵染的植株取食, 这可能是复合侵染的植株在外观或气味上更能刺激蚜虫的视觉和嗅觉^[19]。番茄的复合侵染是否会影响烟粉虱对 2 种病毒的传毒特性和传播效率, 是否会对烟粉虱的取食、产卵等行为产生影响, 需要进一步深入细致的研究。

参考文献

- [1] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, *et al.* Virus taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [R]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [2] Wu J B, Dai F M, Zhou X P. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in China [J]. *Plant Disease*, 2006, 90(10):1359.
- [3] Tian P, Ai P F, Song J J, *et al.* The progress of sequence analysis, spread and distribution of whitefly-transmitted geminivirus in tomato in China (in Chinese) [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2013, 29(1):60-64.
- [4] Di D P, Gong H R, Zhang S M, *et al.* *Tomato yellow leaf curl virus* disease-new tomato disease in Hebei Province (in Chinese) [A]. Annual Conference of China Society of Plant Protection [C]. (Beijing: China Agricultural Science and Technology Press), 2009: 207-209.
- [5] Zhang A H, Zhang S M, Liu S, *et al.* Occurrence and distribution of *Tomato yellow leaf curl disease* in Hebei Province (in Chinese) [J]. *Plant Protection* (植物保护), 2010, 36(4):127-129.
- [6] Zhou Y, Li X H, Liu J H, *et al.* Molecular identification of *Tomato yellow leaf curl virus* in Hebei (in Chinese) [J]. *Plant Protection* (植物保护), 2010, 36(1):60-64.
- [7] King A M Q, Lefkowitz E, Adams M J, *et al.* Virus taxonomy: The ninth report of the International committee on taxonomy of viruses [R]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011.
- [8] Sun G Z, Gao L L, Lu W L, *et al.* Molecular detection and identification of *Tomato chlorosis virus* infecting greenhouse grown tomato plants in Hebei Province (in Chinese) [J]. *Northern Horticulture* (北方园艺), 2015, (9):95-98.
- [9] Zhou T, Yang P Y, Zhao R N, *et al.* Alarming the transmission and damage of *Tomato chlorosis virus* in China (in Chinese) [J]. *Plant Protection* (植物保护), 2014, 40(5):196-199.
- [10] Zhang A H, Zhao C N, Di D P, *et al.* Identification of the resistance of tomato varieties to TYLCV in Hebei Province (in Chinese) [J]. *Plant Protection* (植物保护), 2011, 37(5):148-150.
- [11] Du K T, Wang Z J, Yong R Q, *et al.* Molecular identification and full-length sequence analysis of *Tomato*

- yellow leaf curl virus* on sweet pepper in China (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2016, 46(3): 425-428.
- [12] Liu Y G, Wei J P, Qiao N, *et al.* *Tomato chlorosis virus* outbreaks in Shandong and prevention measures (in Chinese) [J]. *China Vegetables* (中国蔬菜), 2014, (5): 67-69.
- [13] Zhao R N, Wang R, Shi Y C, *et al.* Molecular identification of *Tomato chlorosis virus* on sweet pepper (in Chinese) [J]. *Plant Protection* (植物保护), 2014, 40(1): 128-130.
- [14] Zhao L M. The establishment of the molecular identification, complete genome sequence analysis, and detection technique of *Tomato chlorosis virus* (in Chinese) [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University (泰安: 山东农业大学), 2015.
- [15] Wang C L, Feng J, Sun X H, *et al.* Molecular identification of *Tomato chlorosis virus* from four provinces or autonomous region in northern China (in Chinese) [J]. *Plant Protection* (植物保护), 2017, 43(2): 141-145.
- [16] Hu J A, Wan X J, Li Z J, *et al.* Molecular identification of *Tomato chlorosis virus* in Henan Province (in Chinese) [J]. *China Vegetables* (中国蔬菜), 2015(12): 25-28.
- [17] Fondong V N, Pita J S, Rey M E C, *et al.* Evidence of synergism between *African cassava mosaic virus* and a new double-recombinant *geminivirus* infecting cassava in Cameroon [J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 287-297.
- [18] Tatineni S, Graybosch R A, Hein G L, *et al.* Wheat cultivar-specific disease synergism and alteration of virus accumulation during co-infection with *Wheat streak mosaic virus* and *Triticum mosaic virus* [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(3): 230-238.
- [19] Srinivasan R, Alvarez J M. Effect of mixed viral infections (*Potato virus Y-Potato leafroll virus*) on biology and preference of vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2007, 100(3): 646-655.

责任编辑: 于金枝