

黄 狮, 纠 敏, 汪伦记, 等. 洛阳地区番茄黄化曲叶病的病原鉴定及防治策略[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 153-155.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.052

洛阳地区番茄黄化曲叶病的病原鉴定及防治策略

黄 狮¹, 纠 敏¹, 汪伦记¹, 尤晓颜¹, 李 萌², 王浩权¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471023; 2. 洛阳出入境检验检疫局, 河南洛阳 471003)

摘要:番茄黄化曲叶病(tomato yellow leaf curl disease, TYLCD)在洛阳地区普遍发生,但其病原尚不清楚。利用双生病毒简并引物 PA/PB 及番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)的特异性引物对表现黄化及曲叶症状的疑似样品进行 PCR 分子检测,结果发现 TYLCV 是引起洛阳地区大田番茄黄化曲叶病的病原。此外,对番茄黄化曲叶病病原类型及可能的来源途径进行了探讨,旨在提出相应的预防措施及防治策略。

关键词:番茄黄化曲叶病;番茄黄化曲叶病毒;防治策略

中图分类号:S436.412.1⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0153-03

番茄黄化曲叶病(tomato yellow leaf curl disease, TYLCD)是番茄最为严重的病害之一,具有暴发突然、扩展迅速、危害性强、治疗难度大的特点,是一种毁灭性的番茄病害^[1-4]。近年来,该病在我国由南向北迅速扩张,危害逐年加剧,造成番茄大面积减产甚至毁灭性灾害^[5]。该病的典型症状为叶片变小黄化、卷曲、边缘亮黄色,节间缩短,植株矮化,花朵减少,开花延迟,坐果少而小,成熟期果实转色不正常,且果实成熟不均匀^[6]。TYLCD 的病原十分复杂,已报道可侵染番茄的双生病毒全世界至少有 57 种,其中在中国有番茄黄化曲叶病毒、中国番茄黄化曲叶病毒、台湾番茄曲叶病毒、中国番木瓜曲叶病毒、烟草曲茎病毒和泰国番茄黄化曲叶病毒等多种双生病毒可侵染番茄引起黄化和曲叶症状^[5]。

自 2009 年以来, TYLCD 在河南洛阳番茄种植区普遍发生、危害严重,一些番茄种植户由于 TYLCD 的大面积暴发,已出现连续多年不敢种植番茄的现象,而引起洛阳地区番茄黄化曲叶病的病原株系、基因组变异及可能来源情况还未见报道。本研究于 2013 年 7—8 月间,调查了洛阳地区大田番茄种植区 TYLCD 的发病情况,并采集了具有黄化、曲叶等典型症状的番茄病样,进行病毒病原分子检测。本研究旨在明确引起洛阳地区 TYLCD 的病原种类及其进化起源,以针对性地提出防控该病害的相应策略。

1 材料与与方法

1.1 发病情况调查与样品采集

2013 年 7—8 月间在洛阳市宜阳县、孟津县、偃师市、洛龙区及瀍河区主要番茄种植区进行 TYLCD 发病情况调查,并采集表现典型植株矮缩、顶叶卷曲黄化的番茄植株叶片和疑似植株叶片,整理后放于 4℃ 冰箱备用。

收稿日期:2014-02-09

基金项目:国家自然科学基金(编号:31101443);河南省科技攻关计划(编号:22102110197)。

作者简介:黄 狮(1987—)男,河南洛阳人,硕士研究生,主要从事烟粉虱与双生病毒的互作机制研究。E-mail:23524954@qq.com。
通信作者:纠 敏,博士,副教授,主要从事烟粉虱与双生病毒的互作机制研究。E-mail:jjumin0912@163.com。

1.2 病原分子检测

1.2.1 叶片总 DNA 提取 叶片总 DNA 的提取参考刘玉乐等的方法^[7],即称取 10 mg 新鲜番茄病叶,加 100 μL 0.5 mol/L NaOH,匀浆后低速离心,上清液用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 值 8.0) 稀释 100 倍,取 1 μL 作模板进行 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 扩增、克隆和序列测定 根据谢艳等^[8]报道的检测粉虱传双生病毒的简并引物 PA/PB 进行 PCR,扩增双生病毒基因间隔区和部分外壳蛋白基因约 500 bp 的特异片段,并进行克隆和序列测定。在对测序结果分析基础上,利用 DNAMAN 软件设计扩增病毒 DNA-A 近全长序列的特异性引物 HN-F/HN-R,扩增长度 2 500 bp。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用 AxyPrep 凝胶回收试剂盒回收纯化,克隆到 pMD18-T 载体 (TaKaRa) 上,送到南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。利用 DNAMAN 软件 (DNAMAN 6.0) 拼接 DNA-A 全基因组序列。TYLCV 特异性片段扩增所用引物及扩增条件参照文献^[9],所用引物由上海 Sangon 生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 PCR 扩增所用引物及其序列

序列	引物	序列(5'→3')
DNA-A 克隆及测序	PA	TAATATTACCKGWKGVCCSC
	PB	TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA
	HN-F	AACAGATTACAGGAAATTCATTTAG
	HN-R	CGGAAGCCCAGAATATACAGAATG
TYLCV 特异性片段	TYLCV-F	ATCGAAGCCCTGATATCCCCCGTGG
	TYLCV-R	CAGAGCAGTTGATCATG

1.2.3 DNA 序列及系统发育分析 DNA 序列用 DNAMAN Version 6.0 进行处理和分析。序列比对采用 NCBI 序列比对工具 BLAST 程序 nucleotide blast,多序列比较分析采用 Clustal W,进化树构建采用 MEGA4.02 的邻近相邻法 (Neighbor-joining)。

2 结果与分析

2.1 大田番茄 TYLCD 发病情况

2013 年 7—8 月间,在洛阳市宜阳县、孟津县、偃师市、洛龙区及瀍河区主要番茄种植区 TYLCD 发病情况的调查,病株

率一般为20%~30%,严重的高达60%~70%,有些零星种植区发病率甚至为100%。

2.2 病原检测结果

以提取的番茄样品总DNA为模板,利用双生病毒简并引物PA/PB对采集的27份番茄样品进行PCR检测,结果在18份样品中扩增得到约500 bp的特异性片段,阳性检出率为

66.7%(表2)。将18份检测阳性样品进行DNA-A部分片段克隆、序列测定及分析,发现18份分离物之间DNA部分序列同源性高达98.5%以上。由此可见,检测的18份分离物很可能是由同一种病毒引起的。另外,利用TYLCV的特异性引物对27份番茄样品进行PCR检测,结果从25份样品中扩增到约400 bp的特异性片段(表2)。

表2 病毒样品的采集地点、采集时间、样品号及检测结果

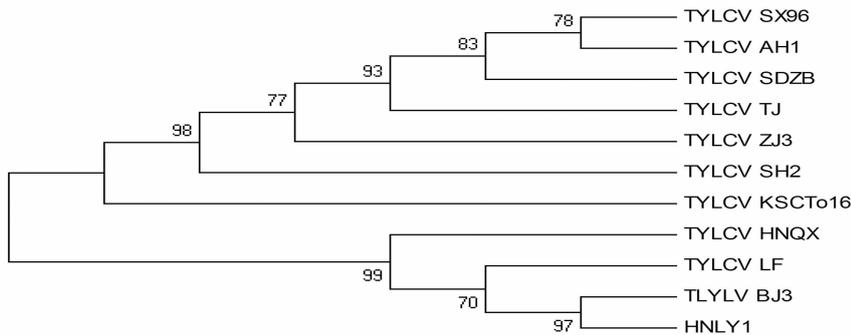
采集地点	采集时间	样品号	TYLCV 特异性引物检测的阳性样品数(份)	PA/PB引物对检测的阳性样品数(份)
宜阳县	2013年8月	HNYY1	1	1
孟津县	2013年8月	HNMJ1 至 HNMJ7	7	2
偃师市	2013年8月	HNYS1 至 HNYS4	4	4
洛阳市洛龙区	2013年7—8月	HNLL1 至 HNLL10	10	8
洛阳市瀍河区	2013年7—8月	HNCH1 至 HNCH5	3	3
总计		27	25	18

2.3 DNA-A全序列特征及系统发育分析

选择番茄HNLL1样品进行DNA-A全基因组扩增及克隆测序,结果表明DNA-A序列全长为2781 nts,具有典型的双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)病毒的基因组结构特征,编码6个ORFs。其中病毒链编码2个ORFs,即AV1(308~1084 nt,编码CP)和AV2(148~498 nt,编码与病毒移动相关基因);互补链编码4个ORFs,分别为AC1(1542~2615 nt,编码复制酶)、AC2(1226~1633 nt,编码转录激活蛋白)、AC3(1081~1485 nt,编码复制增强蛋白)和AC4(2171~2464 nt,编码复制或转录调控因子)。在

基因AC1与AV2之间有313 nt的基因间隔区(intergenicregion, IR),该区含有保守序列TAATATTAC、TATA box、正向重复序列GGTGTCT。

将HNLL1分离物DNA-A全序列与NCBI上登录的中国各地TYLCV不同株系代表分离物进行同源比对,结果发现,HNLL1分离物与已报道的番茄黄化曲叶病毒北京分离物(JF414236.1)的核苷酸序列相似度最高,为99.6%。聚类分析表明,该分离物(TYLCV-HNLL1)与我国已报道的TYLCV各分离物同源关系较近,且与TYLCV-BJ3分离物亲缘关系最近(图1)。



TYLV-BJJ3(序列登录号GU983859.1),为TYLCV北京分离物;TYLCV-LF(序列登录号JF833036.1),为TYLCV河北廊坊分离物;TYLCV-SH2(序列登录号AM282874.1)为TYLCV上海分离物;TYLCV-ZJ3(序列登录号AM698117.1),为TYLCV浙江分离物;TYLCV-SDZB(序列登录号GQ352537.1),为TYLCV山东淄博分离物;TYLCV-SX96(序列登录号JX997799.1),为TYLCV山西分离物;TYLCV-HNQX(序列登录号JQ038235.1)为TYLCV河南杞县分离物;TYLCV-AH1(序列登录号FJ646611.1),为TYLCV安徽分离物;TYLCV-KSCT016(序列登录号JX456638.1),为TYLCV新疆分离物;TYLCV-TJ(序列登录号GU563330.1),为天津分离物。

图1 基于DNA-A全序列构建的TYLCV不同分离物系统进化树

3 小结与讨论

3.1 病原种类及来源

本研究利用双生病毒简并引物PA/PB对采集的27份样品进行PCR检测,其中从18份样品中扩增得到约500 bp特异性片段,阳性检出率为66.7%(表2),其原因可能是由于简并引物PA/PB本身的局限性所致。为此,在本试验中进一步利用TYLCV的特异性引物对27份番茄样品进行PCR检测,结果从25份样品中扩增到约400 bp的特异性片段(表

2),上述结果表明,TYLCV是引起洛阳大田番茄TYLCD的病原,这是首次在分子水平上验证洛阳地区番茄黄化曲叶病由TYLCV引起。

TYLCV DNA-A全基因序列构建的HNLL1分离物与中国其他地区报道的TYLCV分离物的进化树比对结果表明,TYLCV-HNLL1分离物与北京分离物TYLCV-BJ3亲缘关系最近,聚为一分支,但二者的地理位置相差较远。由此说明,河南洛阳地区的番茄黄化曲叶病毒可能是通过人为的贸易活动,携带了染有该病毒的番茄种苗或介体由北京传入。

3.2 防治策略

3.2.1 严控传毒媒介——烟粉虱 TYLCV 为粉虱传双生病毒(whitfly-transmitted geminivirus, WTG), 烟粉虱是其唯一的传播媒介, 一旦携毒, 即可终生带毒和传毒。单头带毒烟粉虱成虫即可成功地将 TYLCV 传播于健康植株上, 尤其在幼年期传毒成功率更高, 且传毒效率随着带毒烟粉虱数量的增多而升高^[10]。近两年, 烟粉虱在洛阳地区大面积发生, 且生物型主要是外来入侵的 Q 型和 B 型, 本地种群几乎被入侵型所替代(本实验室检测结果)。因此, 有效防治 TYLCV 的传播媒介—烟粉虱是防控 TYLCV 在该地区大发生及快速扩散的关键措施之一。

有关烟粉虱的防治措施已经有很多报道, 主要包括物理防治(黄板诱杀、防虫网隔离等)、农业防治(防控越冬虫源等)及化学防治(化学药剂的喷施)等^[6,11-17]。然而, 由于烟粉虱个体较小, 其卵及 1 龄幼虫肉眼观察不到, 致使部分番茄种植户在一定程度上忽视了烟粉虱的危害性, 以至于将带虫苗或带毒的番茄种苗视为无虫、无毒种苗进行栽植。此外, TYLCV 在侵染植物之后到出现病毒症状需要一定时间, 虽未出现发病症状或症状不明显但其已经带毒, 毒株上羽化的烟粉虱已是带毒个体, 可快速地将携带的病毒传播于其他植株上, 这些因素都是导致后期 TYLCV 快速传播的重要原因。严控虫苗及毒苗的存在是防治 TYLCV 后期大发生的关键因子。

3.2.2 防控毒源的异地传播 人类的贸易活动也是 TYLCV 快速异地传播的重要途径。已有研究表明, 中国番木瓜曲叶病毒(papaya leaf curl China virus, PaLCuCNV) 主要在广西省发生, 但 2009 年在河南省中牟县番茄种植区也检测到该病毒病的发生^[18], 而与广西相邻的湖南省并未发现该病毒病的发生。PaLCuCNV 由广西经湖南省、湖北省成功传播至河南省, 其主要原因可能是由于人为的贸易活动携带了染有病毒的番茄种苗或介体造成的。随着人类贸易往来的日益频繁, 不同 WTG 异地传播的概率也随之增高。因此, 对贸易往来过程中的苗木一定要进行检疫, 严控有虫苗、毒苗的跨地区运输也是防控 TYLCV 快速传播的重要措施之一。

近几年, 番茄黄化曲叶病在河南洛阳地区相继暴发, 特别是秋延后番茄, 给番茄生产造成了巨大的损失。鉴于此类病毒扩散蔓延非常迅速, 危害异常严重, 生产上应当密切关注其发生危害情况, 及时发现, 尽早进行防治。

参考文献:

[1] 邢卫锋, 丁雪玲, 柯红娇, 等. 番茄黄化曲叶病毒病生防菌的筛选

及防治效果研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 110-112.

- [2] 孟夏丽, 史亮. 预防番茄黄化曲叶病毒的关键措施[J]. 中国果菜, 2013(3): 32-33.
- [3] 何鑫, 赵统敏, 赵丽萍, 等. 间作及几种物理防治对番茄黄化曲叶病毒病的防控效果[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 86-90.
- [4] 胡恩美, 余文贵, 王银磊, 等. 番茄抗黄化曲叶病基因研究进展[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1496-1502.
- [5] 熊艳, 杨帅, 青玲, 等. 四川番茄黄化曲叶病病原分子鉴定及变异分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(3): 477-484.
- [6] 周涛, 师迎春, 陈笑瑜, 等. 北京地区番茄黄化曲叶病毒病的鉴定及防治对策[J]. 植物保护, 2010, 36(2): 116-118, 132.
- [7] 刘玉乐, 蔡健和, 李冬玲, 等. 中国番茄黄化曲叶病毒——双生病毒的一个新种[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 1998, 28(2): 148-153.
- [8] 谢艳, 张仲凯, 李正和, 等. 粉虱传双生病毒的 TAS-ELISA 及 PCR 快速检测[J]. 植物病理学报, 2002, 32(2): 182-186.
- [9] Ghanim M, Sobol I, Ghanim M, et al. Horizontal transmission of begomoviruses between *Bemisia tabaci* biotypes [J]. Arthropod-Plant Interactions, 2007, 1(3): 195-204.
- [10] Li M, Hu J, Xu F C, et al. Transmission of tomato yellow leaf curl virus by two invasive biotypes and a Chinese indigenous biotype of the white fly *Bemisia tabaci* [J]. International Journal of Pest Management, 2010, 56(3): 275-280.
- [11] 胡京昂, 周建华, 蔡雨惠. 河南省番茄黄化曲叶病毒病的发生与综合防治[J]. 中国瓜菜, 2010, 23(4): 49-50.
- [12] 钟芳芳, 瞿钰峰, 郭慧芳. 高效防治烟粉虱的玫烟色棒束孢 Jz-7 的特性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 104-105.
- [13] 徐进, 张毅, 曹瑛. 番茄黄化曲叶病毒病在西安市的发生特点及防治[J]. 陕西农业科学, 2011, 57(4): 265-266.
- [14] 杨代凤, 周奋启, 顾俊荣, 等. 5 种药剂对烟粉虱的室内毒力及田间防效[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(7): 114-115.
- [15] 杨金明, 姜飞, 马秀玲, 等. 番茄黄化曲叶病毒病的发生流行规律及其综防措施[J]. 中国植保导刊, 2009, 29(5): 28-29.
- [16] 孙作文, 杨进绪, 张美珍, 等. 山东省番茄黄化曲叶病毒病的发生及其防治[J]. 中国蔬菜, 2009(21): 5-6.
- [17] 蔡健和, 秦碧霞, 朱桂宁, 等. 番茄黄化曲叶病毒病在广西暴发的原因和防治策略[J]. 中国蔬菜, 2006(7): 47-48.
- [18] Zhang H, Ma X Y, Qian Y J, et al. Molecular characterization and infectivity of papaya leaf curl China virus infecting tomato in China [J]. Journal of Zhejiang University - Science B, 2010, 11(2): 109-114.