

# 白银市番茄黄化曲叶病毒的鉴定

李春雷, 文朝慧, 王溪桥, 尤佳

(甘肃出入境检验检疫局综合技术中心, 甘肃 兰州 730010)

**摘要:** 根据前人研究, 对白银市疑似番茄黄化曲叶病毒病样品合成相同序列引物, 利用 RCR 扩增技术, 并将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST。结果表明, 该片段为番茄黄化曲叶病毒的一段序列, 证实白银地区番茄感染了 TYLCV。

**关键词:** 番茄黄化曲叶病毒; 分子检测; 鉴定; 白银市

**中图分类号:** S436.412.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)03-0039-02

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.03.013

番茄 (*Solanum lycopersicum* Mill.) 属茄科番茄属, 是世界上最重要的蔬菜作物之一<sup>[1]</sup>。番茄黄化曲叶病毒 (TYLCV) 是一种双生病毒 (*geminivirus-es*) 病害, 以烟粉虱作为传播媒介<sup>[2]</sup>。其大面积爆发对经济发展造成了不同程度的破坏<sup>[3-6]</sup>。据不完全统计, 目前我国番茄黄化曲叶病毒病年发生面积超过 6.7 万  $\text{hm}^2$ , 年经济损失至少 20 亿元<sup>[7]</sup>。2011 年, 甘肃省武山县首次发现 TYLCV, 2012 年, 相继在武威市凉州区、民勤县的日光温室发现 TYLCV, 并于 2013 年在武威市设施番茄主产区开始流行蔓延, 造成严重损失<sup>[8-10]</sup>。鉴于此, 我们对发生于白银市的疑似 TYLCV 样品进行分子鉴定, 并进行了序列同源性及系统发育关系的分析, 现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

在甘肃白银市水川镇张庄村选取上部叶片黄化、边缘向上卷曲、植株生长变缓甚至停滞, 矮化变小, 具有典型黄化曲叶病毒病症状的番茄叶片。DNA 提取试剂盒 (Plant Genomic DNA Extraction Kit) 购自天根生化科技有限公司; PCR 反应体系试剂购自宝生物工程有限公司。引物的合成与片段测序由大连宝生物工程有限公司完成。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 特异性引物的设计** 根据李常保等的研究<sup>[11]</sup>, 合成了上游引物 TYLCV-F: 5'-ACGCAT-

GCCTC TAATCC AGTGTG- 3' 和 TYLCV-R: 5'-CCAATAAGGCGTAAGCGT GTA GAC -3'。所要扩增的目的条带为 543 bp。该引物是针对 TYLCV 的特异区段设计, 只与 TYLCV 的特异区结合, 因此, 可以通过 PCR 技术来判断白银地区番茄植株是否感染 TYLCV。

**1.2.2 植物基因组 DNA 提取及 PCR 扩增** 取具有番茄黄化曲叶病毒病症状的番茄叶片, 按照植物基因组 DNA 提取试剂盒的说明提取番茄基因组 DNA, 利用引物 TYLCV-F 和 TYLCV-R 进行 PCR 扩增。扩增体系为 25  $\mu\text{L}$ , 其中 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP (10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 3  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10 mmol/L) 各 1  $\mu\text{L}$ , rTaq 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 16  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为: 第一阶段, 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 第二阶段, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  复性 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 35 个循环; 第三阶段, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 最后利用凝胶自动成像仪检测拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 番茄黄化曲叶病毒病的田间感病表现

如图 1 所示, 采集的番茄植株样品表现为矮缩、生长变缓甚至停滞, 叶片边缘逐渐黄化且变小, 符合黄化曲叶病毒病的发病症状。

### 2.2 番茄黄化曲叶病毒病的 PCR 鉴定

以感病番茄叶片的病毒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2

收稿日期: 2014-11-21

基金项目: 国家质检总局质检公益性行业科研专项(201310071); 国家质检总局科技计划项目(2012IK270)部分内容

作者简介: 李春雷(1988—), 女, 辽宁锦州人, 检验员, 主要从事种子病毒、细菌检测。联系电话: (0)18189539580。

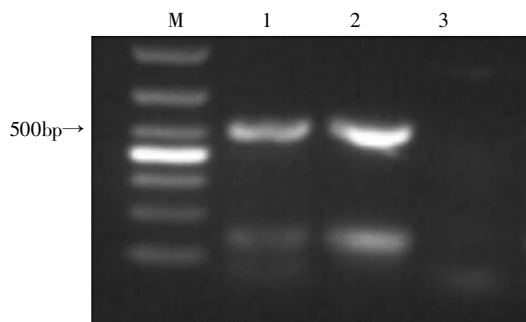
E-mail: 15313316108@163.com

通讯作者: 文朝慧(1969—), 女, 四川简阳人, 高级农艺师, 主要从事植物病害研究工作。E-mail: wzhhli@163.com

所示。得到 543 bp 大小的特异性条带，以水为模板的 PCR 结果无条带。将测序结果（图3）在 NCBI 网站（www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST）上进行 BLAST 比对，结果表明 PCR 扩增所得的 543 bp 序列的特异性条带是番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)的部分序列，根据以上结果，可以诊断确定白银地区的番茄感染了 TYLCV。



图 1 番茄田间感病表型



M 为 DL1000 DNA maker; 1, 2 为生物学重复; 3 为对照

图 2 凝胶电泳检测结果

```
TACGCATGCCTCTAATCCAGTGTATGCAACTATGAAAATACGCATCTATT
TCTATGATTCAATATCAAATTAATAAAAKTTATATTTTATATCATGAGTT
KCTGTTACATTTATTTGTTTTC AAGTACATCATACAATACATGATCAAC
TGCTCTGATTACATTGTTAATTGAAATTACACCAAGACTATMTAAATACT
TAAGAACTTGATATCTAAATACTCTTAAGAAACGACCACTGAGGCTGT
AATGYGTCCAAATTCGGAAGTTGAGAAAACATTTGTGAATCCCCAATRC
CTTCTGATGTTGTTGTTGAATCTTATCTGAATGGAAATGATGCTGKGT
TCATTAGAAATGGCKCTGGCTGTGTTCTGTTATCTTAAAATAGAGGGGA
TTGTTTATCTCCAKATAAAAACGCCATTCTCTGCTTGAGGAGCAGTGAT
GAGTTCCCCTGTGCGTGAATCCATGATTGTTGCAAGTTGATGTGGAGGTAG
TATGAGCAGCCACAGCTTAGGTTCTACACGCTTACGCCTTATTGGA
```

图 3 PCR 产物回收测序结果

### 3 小结与讨论

1) 以李常保等研究为依据<sup>[11]</sup>，以 PCR 技术为鉴定方法，对白银地区的番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)进行了分子鉴定。结果表明，从具有典型番茄黄化曲叶病毒病病症的植株上所采集的病毒，经过 PCR 检测及测序比对分析后，证实其确实为 TYLCV，同时证明通过 PCR 技术可以方便快捷、准确高效地检测到番茄所感染 TYLCV 的情况。

2) 番茄黄化曲叶病毒病的危害严重，且依靠烟粉

虱来传播，传播广泛，已经成为威胁番茄产量与品质的重要病害。在生长发育早期染病的番茄，其生长、开花和座果将受到严重影响，甚至导致毁灭性的绝产；在生长发育后期染病的番茄，番茄的上部叶片及新生叶结果少且小，严重影响了番茄的产量及品质<sup>[12]</sup>。

3) 番茄黄化曲叶病毒病一旦大面积的发生，会给经济造成不可估量的损失，因此，今后的研究还应着重培育适合不同地区种植的抗番茄黄化曲叶病毒病的番茄品种，并着重追踪该病毒的变异以及进化情况，从而有效的控制病情并为培育新的抗病品种奠定理论依据。

### 参考文献:

- [1] 李 敏. 番茄抗花叶病毒(ToMV)的鉴定及其类似序列分离[D]. 成都: 四川农业大学, 2005.
- [2] 蔡建和, 秦碧霞, 朱桂宁, 等. 番茄黄花曲叶病毒病在广西爆发的原因和防治策略[J]. 中国蔬菜, 2006 (7): 47-48.
- [3] 何自福, 虞 皓, 毛明杰, 等. 中国台湾番茄曲叶病毒侵染引起广东番茄黄化曲叶病[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 119-123.
- [4] 赵统敏, 余文贵, 周益军, 等. 江苏省番茄黄化曲叶病毒病(TYLCD)的发生与诊断初报[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 654-655.
- [5] 吴永汉, 张春霄, 徐方程, 等. 温州地区番茄曲叶病毒病放生与防治[J]. 中国蔬菜, 2007(5): 57-58.
- [6] 于 力, 朱龙英, 万延惠, 等. 上海地区番茄黄花曲叶病毒病的鉴定及嫁接接种法研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 115-118.
- [7] ZHANG H, GONG HR, ZHOU XP. Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China[J]. Virus Gen, 2009, 39 (2): 249-255.
- [8] 胡志峰, 邵景成. 甘肃省设施番茄黄化曲叶病毒病的发生与防治[J]. 甘肃农业科技, 2014(1): 54-56.
- [9] 郭复海, 王玉忠, 张丽萍. 凉州区日光温室番茄黄化曲叶病毒病的发生与综合防治[J]. 甘肃农业科技, 2013(2): 52-54.
- [10] 严焕兰. 凉州区番茄黄化曲叶病毒病的发生及防治[J]. 甘肃农业科技, 2013(8): 59-60.
- [11] 李常保, 崔彦玲, 张丽英, 等. 番茄黄化曲叶病毒的快速分子检测[J]. 遗传, 2012, 34(3): 366-370.
- [12] 刘剑峰, 肖启明, 张德咏, 等. 番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)的研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29 (13): 70-76.

(本文责编: 陈 伟)