

# 番茄褪绿病毒 (tomato chlorosis virus) 的新寄主: 水茄 (*Solanum torvum* Swartz)

廖锦钰<sup>1,2</sup>, 张战泓<sup>3</sup>, 张德咏<sup>2</sup>, 谭新球<sup>2</sup>, 史晓斌<sup>1,2\*</sup>, 刘勇<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 湖南大学研究生院隆平分院, 长沙 410128; <sup>2</sup> 湖南省农业科学院植物保护研究所, 长沙 410125;

<sup>3</sup> 湖南省农业科学院蔬菜研究所, 长沙 410125)

A new host of tomato chlorosis virus: *Solanum torvum* Swartz LIAO Jin-yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhan-hong<sup>3</sup>, ZHANG De-yong<sup>2</sup>, TAN Xin-qiu<sup>2</sup>, SHI Xiao-bin<sup>1,2\*</sup>, LIU Yong<sup>2\*</sup> (<sup>1</sup> Subcollege of Longping, Graduate School of Hunan University, Changsha 410128, China; <sup>2</sup> Hunan Plant Protection Institute, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China; <sup>3</sup> Hunan Vegetable Institute, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China)

**Abstract:** Tomato chlorosis virus (ToCV) is a plant virus that is mainly propagated by *Bemisia tabaci* in a semi-persistent and non-circulative manner. It has a wide range of host plants, and has been reported in many countries, causing serious economic losses in vegetable production. In 2019, we investigated about 10 fields, one ha each in Shouguang, Shandong province (China), and in each field we observed symptoms of interveinal chlorosis on lower leaves of the *Solanum torvum* Swartz, and a large number of *B. tabaci* gathered on the back of its leaves. To determine the presence of ToCV, total RNA of *S. torvum* was extracted followed by RT-PCR. The 1 074 (GenBank accessions number MN545620) and 466 bp (GenBank accessions number MN545621) fragments were gel purified and sequenced. The sequences shared 99.44% and 99.57% similarity with ToCV reference sequence tomato chlorosis virus segment RNA1 (AY903447) and RNA2 (AY903448). The results of insect transmission test confirmed that ToCV can spread from *S. torvum* to tomato. This study confirms *S. torvum* as a newly reported host of ToCV.

**Key words:** tomato chlorosis virus; *Solanum torvum* Swartz; host; molecular identification

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2020)06-0789-04

番茄褪绿病毒 (*Tomato chlorosis virus*), 属于长线形病毒科 (*Closteroviridae*) 毛形病毒属 (*Cri-nivirus*), 主要由两条二分体线形正义单链 RNA (+ssRNA) 组成<sup>[1]</sup>。该病毒 1998 年在美国佛罗里达州首次报道<sup>[2]</sup>。迄今, ToCV 已蔓延至我国山东、河南、河北、山西、陕西、浙江、内蒙古、广东、湖南等地, 给我国蔬菜生产造成了严重损失<sup>[3]</sup>。其

危害症状主要表现为: 叶片脉间黄化褪绿, 叶片卷曲, 严重时脉间完全褪绿黄化, 叶片变脆变厚, 果实完全失去商业价值<sup>[4]</sup>。ToCV 主要由烟粉虱 (*Bemisia tabaci*)、温室白粉虱 (*Trialeurodes vaporariorum*)、银叶粉虱 (*B. argentifolii*) 和纹翅粉虱 (*T. abutilonea*) 以半持久方式传播, 其中烟粉虱为传播 ToCV 的主要昆虫, 其传播能力也最为高

收稿日期: 2019-12-20; 修回日期: 2020-01-15; 网络出版时间: 2020-01-15

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20200115.1719.001.html>

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31872932, 31672003); 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ30014); 大宗蔬菜产业体系 (CARS-23-D-02)

通讯作者: 史晓斌, 博士, 副研究员, 主要从事媒介昆虫-病毒-植物互作研究; E-mail: xiaobin.s@163.com

刘勇, 博士, 研究员, 主要从事蔬菜病毒病防治研究; E-mail: liuyong@hunaas.cn

第一作者: 廖锦钰, 硕士研究生, 研究方向为植物病毒与昆虫互作; E-mail: jinququ@hnu.edu.cn。

效<sup>[6]</sup>。ToCV 寄主范围广泛,可侵染 13 个属的 30 种植物<sup>[6,7]</sup>。

水茄 (*Solanum torvum* Swartz), 属茄科 (Solanaceae), 茄属 (*Solanum*), 广泛分布于巴基斯坦、印度、马来亚、中国、菲律宾和热带美洲, 是一种经济价值较高的野生茄科植物。水茄的根、茎、叶、果均可入药, 具有消肿止痛等功效; 水茄还可作为茄科植物的砧木用于嫁接, 以提高嫁接植物的抗病性和抗逆性<sup>[8]</sup>。

2019 年调查发现山东寿光番茄基地发病番茄田块周围的水茄叶片呈典型 ToCV 侵染的黄化褪绿症状, 叶片背面大量烟粉虱聚集。使用番茄褪绿病毒、番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)、番茄花叶病毒 (tomato mosaic virus, ToMV) 以及番茄斑萎病毒 (tomato spotted wilt tospovirus, TSWV) 的特异性引物进行 RT-PCR 检测, 仅检测到 ToCV, 进一步室内传毒验证为 ToCV 侵染, 表明水茄是 ToCV 的新寄主。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水茄: 疑似 ToCV 侵染的 20 株水茄采自山东省寿光市番茄基地, 移栽至实验温室培育, 26℃ ± 1℃、RH (70 ± 5)%、光周期 L 16 h: D 8 h, 未接触任何农药和昆虫。

供试植株: 番茄 (中杂 9 号, *Solanum lycopersicum* Mill. cv. Zhongza9), 于温室内培育, 26℃ ± 1℃、RH (70 ± 5)%、光周期 L 16 h: D 8 h, 未接触任何农药和昆虫。

供试无毒烟粉虱: Q 烟粉虱 (MED), 由中国农业科学院蔬菜花卉所张友军研究员课题组馈赠, 饲

喂于番茄植株上, 之后放在养虫笼内用无虫番茄继代饲养, 每隔两个月进行一次生物型鉴定。

化学试剂及试剂盒: Invitrogen 公司 Trizol、南京诺维赞 (Vazyme) 生物公司 Hiscrypt II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 试剂盒、南京诺维赞 (Vazyme) 生物公司 2×Taq Plus Master Mix II (Dye Plus) 试剂盒、全式金琼脂糖凝胶 DNA 快速回收试剂盒, 其余试剂为国产分析纯, PCR 仪、凝胶成像仪。

1.2 病毒鉴定

采用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 进行病毒鉴定。采用 Trizol 法提取植物以及烟粉虱样品的总 RNA, 测定 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值检测 RNA 质量合格后于 -80℃ 保存备用。随后按照说明书合成 cDNA: 在 RNase free 离心管中分别加入 1 μL RNase Free H<sub>2</sub>O, 1 μL Random hexamers, 4.0 μL 4×gDNA wiper, 7 μL 总 RNA; 吹打混匀后, 42℃ 孵育 2 min 后加入 2 μL 10×RT mix, 2 μL Hiscrypt II Enzyme Mix; 混匀后按照 25℃ 5 min, 50℃ 45 min, 85℃ 5 min 合成 cDNA 保存于 -20℃ 备用。以表 1 中 ToCV1-6-F/ToCV1-6-R、ToCV-5/ToCV-6、TYLCV-F/TYLCV-R、ToMV-F/ToMV-R、TSWV-F/TSWV-R 为特异性引物, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为: ddH<sub>2</sub>O 7 μL, 2×Taq Plus Master Mix II (Dye Plus) 10 μL, 上游引物和下游引物各 1 μL (10 μmol · L<sup>-1</sup>), cDNA 模板 1 μL。PCR 程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 根据不同引物的退火温度退火 30 s (表 1), 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察记录, 纯化回收后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序分析。

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')	Annealing temperature /℃
ToCV1-6-F	TCTGCACCGAGAATAAATGAACG	58
ToCV1-6-R	CACCAAAGCATCCACCAAAACG	
ToCV-5	GGTTTGGATTTTGGTACTACATTCAGT	
ToCV-6	AAACTGCCTGCATGAAAAGTCTC	56
TYLCV-F	GTTACGGAATTTTCGTTGTATG	
TYLCV-R	AGAGGGACTGGCAAAGCAACA	
ToMV-F	TCTCAAGAATGTTACACGGGAAG	51
ToMV-R	CGCATTCTCCGTAATTTTGATC	
TSWV-F	TCACTGTAATGTTCCATAGCAA	
TSWV-R	AGAGCAATTGTGTCAATTTTATTC	49

### 1.3 室内传毒试验

取 600 头无毒烟粉虱放至经检测感染 ToCV 的水茄叶片上取食 48 h,经检测确认烟粉虱带毒后,随机取样,用微虫笼把带毒烟粉虱转移至 10 株 3~4 片真叶期的健康番茄植株上,每株 50 头带毒烟粉虱,取食 48 h 后移除烟粉虱,30 d 后取番茄植株最上部的叶片检测病毒侵染情况,检测方法见 1.2。

## 2 结果与分析

### 2.1 水茄感染 ToCV 的田间症状

在山东寿光番茄基地,发病水茄呈典型 ToCV

侵染症状:叶片脉间黄化褪绿,叶片边缘卷曲、变厚,老叶发病较新叶严重(图 1),水茄密度为 1 株·m<sup>-2</sup>,发病率为 75%。

### 2.2 病毒鉴定

RT-PCR 检测结果显示,15 株水茄样品受 ToCV 侵染,所有水茄样品均未检测出 TYLCV、ToMV 和 TSWV 侵染。PCR 扩增分别得到 1 074 bp (GenBank 登录号:MN545620) 和 466 bp (GenBank 登录号:MN545621) 的目的片段(图 2-A、B)。经测序及 NCBI 比对发现,该片段与 ToCV RNA1 链 (AY903447) 和 ToCV RNA2 链 (AY903448) 相似度高达 99.44% 和 99.57%,确认该病毒为 ToCV(表 2)。

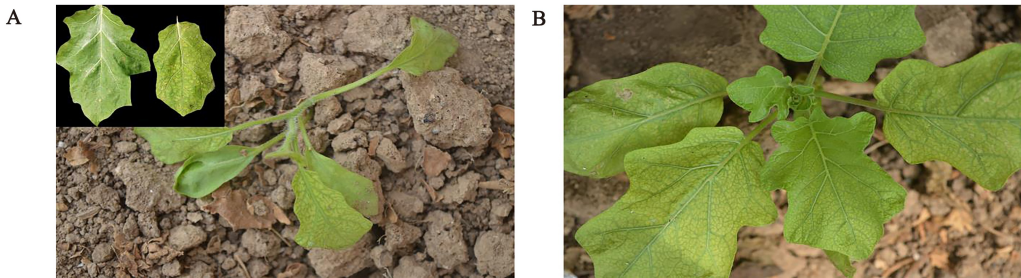


Fig. 1 *Solanum torvum* Swartz infected with tomato chlorosis virus

A:Symptoms of tomato chlorosis virus on the leaf; B: Symptoms of tomato chlorosis virus on the whole plant.

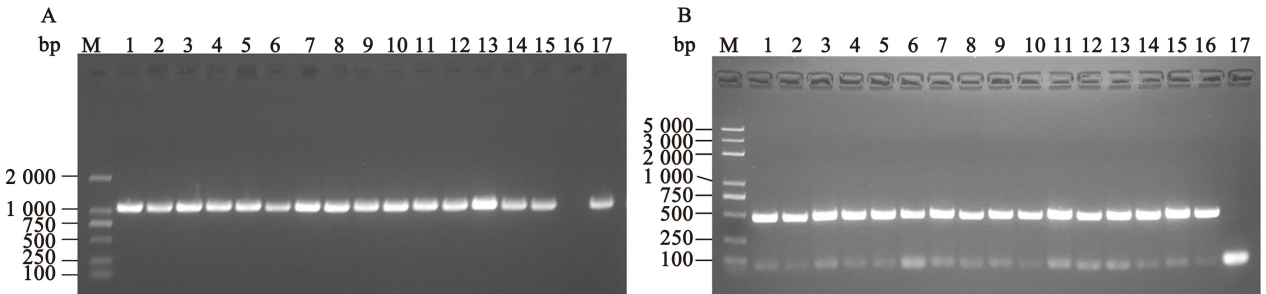


Fig. 2 PCR confirmation of *Solanum torvum* Swartz infected with tomato chlorosis virus

A: RT-PCR with ToCV 1-6-F and ToCV 1-6-R. M, DNA marker; 1-15, The samples of *Solanum torvum* Swartz infected with ToCV; 16, Negative control; 17, Positive control. B: RT-PCR with ToCV-5 and ToCV-6. M, DNA marker; 1-15, The samples of *Solanum torvum* Swartz infected with ToCV; 16, Positive control; 17, Negative control.

Table 2 Nucleotide sequencing analysis of tomato chlorosis virus

Description	Accession	Query cover/%	E value	Ident/%
Tomato chlorosis virus segment RNA 1,complete sequence	AY903447.1	100	0.0	99.44
Tomato chlorosis virus segment RNA 2,complete sequence	AY903448.1	100	0.0	99.57

2.3 室内传毒结果

烟粉虱传毒 30 d 后,番茄植株表现出与水茄相同的发病症状:底部叶片黄化,叶脉浓绿,脉间褪绿黄化,叶片变脆易折(图 3)。RT-PCR 检测结果表明侵染番茄的病毒为 ToCV,在水茄上取食 48 h 的烟粉虱只携带 ToCV,证明 ToCV 通过烟粉虱从水茄传播至番茄植株。

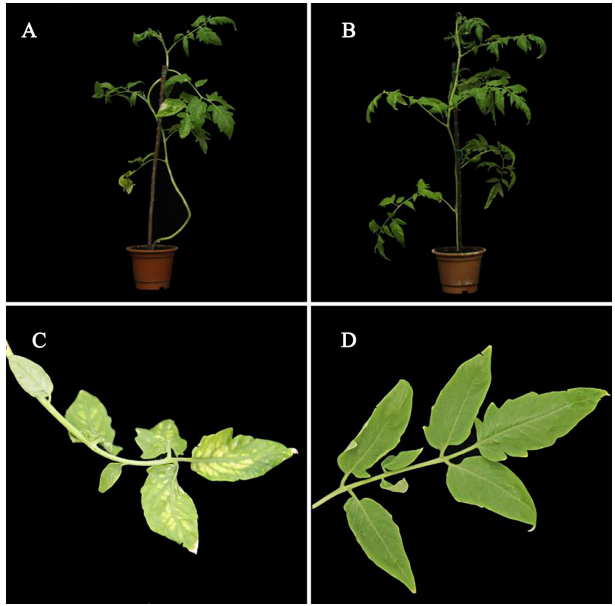


Fig. 3 Laboratory transmission test

A: Whole plants with viruliferous whiteflies feeding; B: Whole plants with non-viruliferous whiteflies feeding; C: Symptoms of tomato leaf inoculated with viruliferous whiteflies; D: A single leaves of B.

3 讨论

对山东省寿光市番茄基地疑似 ToCV 侵染的水茄进行 RT-PCR 检测,确认侵染水茄的病毒为 ToCV,田间带毒率 75%。室内传毒试验表明,发病水茄上的 ToCV 通过烟粉虱传播至健康番茄植株,证实野生茄科植物水茄为 ToCV 的寄主。水茄田间分布广泛,可作为中间寄主通过烟粉虱完成 ToCV 在蔬菜和杂草之间迁移循环。此外,水茄在茄科植物嫁接上应用广泛,ToCV 可从砧木扩散至嫁接植株<sup>[9]</sup>,亟需加强水茄砧木携带 ToCV 的监测工作。

ToCV 潜伏期长,前期症状易与缺素症混淆,目前抗性品种缺乏,田间防治难度较大,需加强媒介昆虫防控,及时隔绝感病植物。

参考文献

[1] Lozano G, Moriones E, Navas-Castillo J. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the *Crinivirus tomato chlorosis virus* [J]. Archives of Virology, 2006, 151 (3): 581.

[2] 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: 402-409.

[3] Wei K K, Li J, Ding T B, et al. Research progress on distribution, identification method of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) and whitefly transmission characteristics (in Chinese) [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 2018, 1(1): 19-24.

[4] Liu Y G, Wei J P, Qiao N, et al. Outbreak of *Tomato chlorosis virus* in Shandong province and its control measures (in Chinese) [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 2014, 1(5), 67-69.

[5] Wintermantel W M, Wisler G C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus* [J]. Plant Disease, 2006, 90(6): 814-819.

[6] Jin F M, Xue J, Song J, et al. Advance of research on *tomato chlorosis virus* (in Chinese) [J]. Tianjin Agricultural Sciences (天津农业科学), 2017, 23(1): 68-71.

[7] Zheng H X, Xia J X, Zhou X M, et al. Be on alert of rapid diffusion of *Tomato chlorosis virus* transmitted by whitefly in China (in Chinese) [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 2016, 1(4): 22-26.

[8] Liao Z Y, Xu L Z, Research progress in the application of *Solanum torvum* Swartz (in Chinese) [J]. Journal of Jia-ying University (嘉应学院学报), 2018, 36(8): 58-62.

[9] Lee H, Kim M K, Choi H S, et al. Efficient transmission and propagation of *Tomato chlorosis virus* by simple single-leaflet grafting [J]. The Plant Pathology Journal, 2017, 33(3): 345-349.