

# 沈阳市新民地区番茄黄化曲叶病毒分子检测

苗则彦,白元俊,李 颖,赵 杨

(辽宁省农业科学院 辽宁省农作物有害生物控制重点实验室,辽宁 沈阳 110161)

**摘要:**为了鉴定并防治番茄黄化曲叶病毒病,采用分子生物学方法对沈阳新民地区3个番茄植株样品进行检测,对PCR产物中的特异性片段进行回收、克隆、测序。结果表明:3个番茄植株样品均感染番茄黄化曲叶病毒病,说明沈阳市新民地区已有番茄黄化曲叶病毒病发生且PCR技术可以快速、准确、高效地完成番茄黄化曲叶病毒病的检测。

**关键词:**番茄;番茄黄化曲叶病毒病;分子检测

**中图分类号:**S436.412.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)12-0077-02

番茄黄化曲叶病毒病(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV),是番茄作物上一种毁灭性病害,造成番茄产量损失可达100%<sup>[1]</sup>,2009年,进入辽宁省以来,该病毒已进入了危险高发期和频发期。目前该病在瓦房店市、海城市、大石桥市、铁岭市、朝阳市、盘锦市和兴城市等地相继发生。发病棚发病株率最低47%,最高达87%<sup>[2]</sup>。

番茄黄化曲叶病毒病由烟粉虱传播,有研究表明辽宁省冬季温室内存在越冬温室白粉虱[*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)]与烟粉虱[*Bemisia tabaci* (Gennadius)],且烟粉虱逐渐成为辽宁省粉虱主要种类,越冬的烟粉虱伪蛹携带TYLCV,推测可能造成次年灾害。目前在辽宁省沈阳地区已发现越冬的烟粉虱伪蛹<sup>[3]</sup>。

李常保<sup>[4]</sup>利用TYLCV全序列的特异区段设计特异引物,通过PCR技术,根据特异片段的有无检测植株是否感染该病毒。该文基于这种方法对采自沈阳地区的病样进行检测,为该地区病害的鉴定与防治提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2013年在沈阳市新民市周坨子镇周坨子村和苏坨子村3个温室内,分别采集表现植株矮缩顶叶卷曲黄化的番茄植株叶片(编号:XMZ1、XMZ2和XMS)及未发病的阴性对照植株的叶片,各约100 mg放入实验室内-80℃冻存。

### 1.2 方法

1.2.1 叶片总DNA提取 采用TIANGEN植物基因组DNA提取试剂盒,取冻存的叶片放入液氮充分研磨至粉末状,按照试剂盒中的试验步骤提取DNA,最后将提取的DNA于-20℃保存。

1.2.2 PCR扩增、克隆和序列测定 参照番茄黄化曲叶病毒全基因组序列的特异区段设计的1对特异性PCR引物,上游引物TYLCV-F:5'-ACGCATGCCTCTAATCCAGTGTA-3',下游引物TYLCV-R:5'-CCAATAAGGCGTA-AGCGTGTAGAC-3',PCR扩增特异片段为543 bp<sup>[4]</sup>。

PCR扩增采用2\* Taq Green Mix试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限公司),25 μL体系:DNA模板1 μL、上下游引物各0.5 μL、2\* Taq Green Mix 12.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。

PCR扩增条件:94℃预变性3 min,94℃变性30 s,56℃复性30 s,72℃延伸30 s,共30个循环;72℃延伸10 min。PCR产物进行克隆和序列测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒检测

以提取的番茄叶片总DNA为模板,利用特异性引物对3个样品进行扩增,得到特异性片段,片段大小在电泳图中与预期的543 bp一致,阴性对照无特异性条带出现,该引物对番茄黄化曲叶病毒具有特异性和高效性(见图1)。

### 2.2 序列测定结果

3个PCR产物进行克隆、测序,回收产物由北京鼎国昌盛生物技术有限公司测序部测定完

收稿日期:2014-04-30

基金项目:辽宁省农业综合开发省级重点科技推广资助项目(SNF-2014-A-01)

第一作者简介:苗则彦(1968-),女,辽宁省沈阳市人,博士,研究员,从事蔬菜病害防治研究。E-mail: mzyln@aliyun.com。

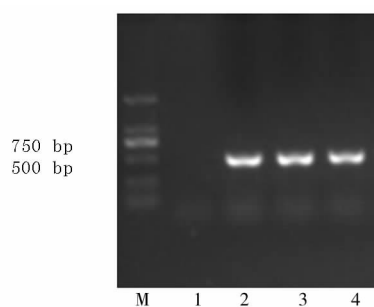


图1 3个样品的PCR扩增结果

M:DNA Marker;1:阴性对照;2~4:样品 XMZ1、XMZ2、XMS。

Fig.1 PCR amplification of DNA extracted from 3 samples

M:DNA Marker;1:Negative control;2~4:Tomato samples XMZ1,XMZ2 and XMS.

成。从所获序列在 NCBI 上进行 Blast 比对结果可知,3 个样品与(GenBank 登录号 KC138544.1、KC138543.1、JX456642.1、JX456641.1 等)有高度同源性,达到 99% 以上。确定 3 份样品均感染番茄黄化曲叶病毒病。

### 3 结论与讨论

通过对 3 个番茄样品 PCR 产物产生的特异性片段回收、克隆、测序及在 NCBI 数据库中的 Blast 比对可知,3 个样品已感染番茄黄化曲叶病毒病,说明沈阳市新民地区已存在番茄黄化曲叶病毒病,在番茄生产中应引起广泛重视。

番茄黄化曲叶病毒病由烟粉虱传播,在辽宁省沈阳地区已发现越冬的烟粉虱伪蛹并在伪蛹中检测到番茄黄化曲叶病毒,其中的试验样品属于沈阳的辽中地区和法库地区<sup>[3]</sup>。沈阳市新民地区是否有伪蛹过冬、是否带毒、是否是次年病害的主要传染源值得关注和探讨。

关于番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定还有很多相关报道<sup>[5-10]</sup>,该文只借鉴一种方法,且为了增加

准确性,在原来 PCR 检测的基础上进行了特异性片段的序列测序和比对。相对延长了鉴定时间、增加了鉴定成本。下一步应对几种分子鉴定方法进一步分析、比较和综合,摸索出更加快速、准确和高效的方法。

### 参考文献:

- [1] Pico B, Dicz M J, Nuez F, et al. Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus-areview[J]. Scientia Horticulturae, 1996,67:151-196.
- [2] 张万民,马辉,洪晓燕,等. 辽宁省番茄黄化曲叶病毒病发生及粉虱种群演替情况[J]. 中国植保导刊,2012,32(7):27-28.
- [3] 张万民,李洪冉,朴春树,等. 辽宁省冬季温室越冬粉虱伪蛹的种类鉴定及烟粉虱体内番茄黄化曲叶病毒的检测[J]. 昆虫学报,2013,56(8):945-951.
- [4] 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.
- [5] 田鹏,杜朝,宋建军,等. 河北省番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定及序列分析[J]. 中国农学通报,2012,28(7):119-125.
- [6] 宋晰,师迎春,张世晨,等. 北京地区番茄黄化曲叶病毒分离物测定及株系的初步鉴定[J]. 植物病理学报,2013,43(2):113-119.
- [7] 褚栋,侯丽霞,刘国霞,等. 山东省局部地区番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定[J]. 山东农业科学,2010(2):13-15.
- [8] Mehrach K, Sedegui M, Hatimi H, et al. Molecular characterization of a Moroccan isolate of tomato yellow leaf curl Sardinia virus and differentiation of the tomato yellow leaf curl virus complex by the polymerase chain reaction[J]. Phytopathologia Mediterranea,2007,46:185-194.
- [9] Rojas M R, Gilbertson R L, Russel D R, et al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect white fly transmitted gemini viruses[J]. Plant Disease, 1993,77:340-347.
- [10] Davino S, Davino M, Accotto G P. A single tube PCR assay for detecting viruses and their recombinants that cause tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean-basin[J]. Journal of Virological Methods,2008,147:93-98.

## Molecular Identification of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from Xinmin Area of Liaoning Province

MIAO Ze-yan, BAI Yuan-jun, LI Ying, ZHAO Yang

(Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Liaoning Key Laboratory of Crop Pest Management, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract:** In order to authenticate and control tomato yellow leaf curl virus, 3 tomato samples were detected through molecular identification of tomato yellow leaf curl virus(TYLCV) from Xinmin area of Liaoning province by PCR reaction, and then the generated specific segments were collected, cloned and sequenced. The results of Blast showed that the nucleotide sequence of 3 samples had high identity from TYLCV. PCR detection for TYLCV was high sensitive, high efficient and with high specificity.

**Key words:** tomato; tomato yellow leaf curl virus; molecular identification