

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2013.03.010

烟粉虱携带番茄黄化曲叶病毒检测 及其传入山东省的考证

苏明明, 陶云荔, 李 洁, 褚 栋*

青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东 青岛 266109

摘要:【背景】番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)是由媒介昆虫烟粉虱传播的一种双生病毒,对蔬菜及烟草等经济作物造成严重危害。前人资料表明,该病毒于2006年传入我国南方地区,2007年传入山东省,2008年后在山东各地逐渐蔓延扩散。【方法】为了考证TYLCV传入山东省的时间,本研究利用mtCOI基因对于2005和2006年7~8月份在山东省不同地区作物上共采集的15份烟粉虱样品进行了生物型鉴定,并进一步检测了烟粉虱携带TYLCV情况,同时对PCR扩增产物进行了测序分析。【结果】2005年的4份样品烟粉虱生物型均为B型,均不携带TYLCV。2006年的11份烟粉虱样品为B型与Q型混合样品,其中,2份烟粉虱样品检测到TYLCV,进一步证实该病毒为TYLCV。【结论与意义】本研究首次证实了TYLCV早在2006年就已经传入山东省。研究结果不仅对于防控该病毒具有重要指导意义,而且对于其入侵生物学研究也具有重要参考价值。

关键词: 山东省; 番茄黄化曲叶病毒病; 烟粉虱; 生物入侵

Tomato yellow leaf curl virus has been introduced in Shandong Province since 2006 based on the detection of the virus within vector whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius)

Ming-ming SU, Yun-li TAO, Jie LI, Dong CHU*

Key Laboratory of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: 【Background】Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is one of geminiviruses, which is transmitted by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. The virus can cause serious damage to economic crops, such as vegetables and tobaccos. Previous data indicated that the virus was introduced into the southern China in 2006 and then into Shandong in 2007. The virus has been gradually spreading throughout Shandong Province since 2008. 【Method】In order to determine the dispersal time of TYLCV in Shandong Province, we surveyed 15 *B. tabaci* samples collected from different counties in the province from July to August in 2005 and 2006, respectively. 【Result】The results showed that the 4 *B. tabaci* samples in 2005 were biotype B and all of them were nonviruliferous. The 11 *B. tabaci* samples in 2006 were mixed with biotypes B and Q. TYLCV was only detected within 2 of 11 samples in 2006. Molecular analysis confirmed that the virus was TYLCV. 【Conclusion and significance】The study proved for the first time that it was at least in 2006 that the TYLCV was introduced into Shandong Province. The results have important guidance not only for the prevention and control of this virus, but also have important reference value for the invasion biology of this virus.

Key words: Shandong Province; Tomato yellow leaf curl virus disease; *Bemisia tabaci*; biological invasion

生物入侵对入侵地区经济、生态及社会构成严重危害。生物入侵是个链式过程,一般包括传入、定殖、潜伏、扩散与危害几个过程。了解外来种入侵过程对于揭示其入侵机制与防控具有重要的理论意义与指导价值(Lockwood *et al.*, 2007)。由烟粉虱传播的番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)隶属于双生病毒科 Geminiviridae 菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus*,是

收稿日期(Received): 2013-06-25 接受日期(Accepted): 2013-08-02
基金项目: 国家科技支撑计划课题(2012BAD19B06); 青岛农业大学高层次人才基金项目(631212); 青岛市科技发展计划项目(13-1-3-108-nsh); 泰山学者建设工程专项经费
作者简介: 苏明明,女,硕士研究生。研究方向: 农业有害生物检疫与入侵生物学。E-mail: hjb2013@sina.com
* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: chinachudong@sina.com

一个环形的单链 DNA 植物病毒 (Liu *et al.*, 2013)。TYLCV 最早在以色列发现 (Cohen & Harpaz, 1964)。在我国,2006 年 3 月在上海孙桥发现 TYLCV (Wu *et al.*, 2006),同年秋冬季浙江几个地区发生了严重番茄黄化曲叶病毒病 (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) (Mugiira *et al.*, 2008)。山东省于 2007 年在济宁市鱼台县唐马乡首次发现番茄病株 (赵玖华等, 2010), 同年在单县、临淄区秋延迟番茄大棚零星出现 (刘文浩等, 2012; 孙作文等, 2009)。2008 年在潍坊、聊城、枣庄等地局部发生 (孙作文等, 2009), 2009 年全面扩散暴发成灾 (褚栋等, 2010; 李常保等, 2010; 刘剑锋等, 2013; 赵玖华等, 2010), 已遍布全省各地的番茄种植区, 对番茄等重要经济作物造成严重减产甚至绝产。一般认为, TYLCV 在 2006 年传入我国南部局部地区,

2007 年传入山东省, 2008 年后在山东各地逐渐蔓延扩散。

前人研究表明, 利用 PCR 的方法可以快速检测到单头烟粉虱体内 TYLCV (曹骞等, 2013)。为了进一步考证 TYLCV 传入山东省的时间, 我们对 2005 年与 2006 年山东省烟粉虱种群进行了携带 TYLCV 的检测, 探讨了 TYLCV 传入的时间及其影响因素, 以期对 TYLCV 的防控及其入侵生物学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源采集

2005 年与 2006 年 7~8 月, 烟粉虱样品分别采自山东省各地。所采集的 15 个种群相关信息如表 1 所示。样品均在 -20 ℃ 低温条件下保存。

表 1 山东省各地烟粉虱采样信息
Table 1 Sampling information of *B. tabaci* in Shandong Province, China

年份 Year	采集地点 Sampling location	种群代码 Population code	寄主植物 Host plant	烟粉虱生物型比例 Biotypes of <i>B. tabaci</i> (%)	
				B	Q
2005	济南 Jinan	JNM05	棉花 Cotton	100	0
	枣庄 Zaozhuang	ZZH05	黄瓜 Cucumber	100	0
	聊城 Liaocheng	LCM05	棉花 Cotton	100	0
		LCH05	黄瓜 Cucumber	100	0
2006	济南 Jinan	JNQ06	茄子 Eggplant	26	74
		JNH06	黄瓜 Cucumber	68	32
	淄博 Zibo	ZBM06	棉花 Cotton	18	82
		ZBQ06	茄子 Eggplant	12	88
	聊城 Liaocheng	LCH06	黄瓜 Cucumber	70	30
	临沂 Linyi	LYQ06	茄子 Eggplant	22	78
		LYH06	黄瓜 Cucumber	34	66
	德州 Dezhou	DZM06	棉花 Cotton	2	98
		DZQ06	茄子 Eggplant	96	4
		DZK06	棉花 Cotton	22	78
	寿光 Shouguang	SGQ06	茄子 Eggplant	48	52

1.2 烟粉虱鉴定

单头烟粉虱 DNA 提取方法参照褚栋等 (2005)。利用 mtCOI 基因对山东省采集的烟粉虱生物型鉴定表明, 仅为两种生物型即 B 型或 Q 型 (Chu *et al.*, 2010a)。因此, 我们利用 *Vsp*I 酶切 mtCOI 片段的方法 (即 PCR-RFLP 方法) 快速鉴别出 B 型与 Q 型 (Chu *et al.*, 2010a)。烟粉虱 mtCOI 片段扩增参照 Chu *et al.* (2011), 所用引物为 R-BQ-2195 (5'-CTGGTTYTTTGGTCATCCRGARGT-3') 和 F-BQ-2819 (5'-CTGAATATCGRCGAGGCATTCC-3'), 扩增产物大小约为 620 bp。PCR 产物酶切后以 1.0%

琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色后在紫外透视仪上观察, 记录结果。每个种群检测 50 头。同时, 为了进一步确定烟粉虱生物型, 每个种群 3 头烟粉虱的 mtCOI PCR 产物直接进行双向测序。

1.3 烟粉虱携带 TYLCV 检测

使用 TYLCV 特异引物 (上游引物 5'-CGC-CCGTCTCGAAGGTTC-3'; 下游引物 5'-GCCATATA-CAATAACAAGGC-3') 进行扩增, 引物及反应体系参照 (Picó *et al.*, 1998)。以已知的 TYLCV 基因组和水分别作为阳性和阴性对照。取 5 μL PCR 产物, 在 1.0% 琼脂糖上电泳后, EB 染色, 凝胶成像观

察。对 15 份样品 750 头烟粉虱(每份样品检测 50 头)进行 PCR 检测(表 1)。对 50 个 PCR 产物直接双向测序且对测序进行 Blast 分析。

1.4 TYLCV 基因序列同源性分析

获得 TYLCV 基因序列来自 GenBank 中山东、江苏、浙江、上海、日本(截止 2013 年 10 月 15 日),并以中国台湾番茄曲叶病毒(ToLCTWV)和菲律宾

番茄曲叶病毒(ToLCPV)为外群(表 2)。用 MEGA5.05 软件将 GenBank 中已知的 TYLCV 和本研究获得的序列(编号为 SD1~SD10,代表序列)进行序列分析,并辅以人工校对。采用 Kimura2-parameter 距离矩阵,以邻接法(NJ)构建系统树,系统树各分支地置信度(Bootstrap)均进行 1000 次的重复检验。

表 2 GenkBank 数据库 TYLCV 参考序列及外群
Table 2 TYLCV reference sequence from GenBank database and outgroup

病毒 Virus	编号 Number	登录号 Accession	采集地点 Sampling location	病毒 Virus	编号 Number	登录号 Accession	采集地点 Sampling location
TYLCV	SDFJ646611	FJ646611	山东 Shandong	TYLCV	ZJAM698118	AM698118	浙江 Zhejiang
	SDGQ352537	GQ352537	山东 Shandong		ZJAM698119	AM698119	浙江 Zhejiang
	SDHM627880	HM627880	山东 Shandong		ZJFN252890	FN252890	浙江 Zhejiang
	SDHQ702861	HQ702861	山东 Shandong		ZJFN256256	FN256256	浙江 Zhejiang
	SDHQ702862	HQ702862	山东 Shandong		ZJFN256257	FN256257	浙江 Zhejiang
	SDHQ702863	HQ702863	山东 Shandong		ZJFN256258	FN256258	浙江 Zhejiang
	SDJN990922	JN990922	山东 Shandong		ZJJX675237	JX675237	浙江 Zhejiang
	JSFJ646611	FJ646611	江苏 Jiangsu		ZJKC312671	KC312671	浙江 Zhejiang
	JSFN256259	FN256259	江苏 Jiangsu		ZJKC312672	KC312672	浙江 Zhejiang
	JSGU111505	GU111505	江苏 Jiangsu		ZJKC312673	KC312673	浙江 Zhejiang
	JSJQ326957	JQ326957	江苏 Jiangsu		JapanAB014346	AB014346	日本 Japan
	JSKC312662	KC312662	江苏 Jiangsu		JapanAB110217	AB110217	日本 Japan
	JSKC312663	KC312663	江苏 Jiangsu		JapanAB116631	AB116631	日本 Japan
	SHAM282874	AM282874	上海 Shanghai		JapanAB116632	AB116632	日本 Japan
	SHEU031444	EU031444	上海 Shanghai		JapanAB439841	AB439841	日本 Japan
	SHFN256258	FN256258	上海 Shanghai	ToLCTWV	AM698111ToLCTWV	AM698111	浙江 Zhejiang
	SHGU434142	GU434142	上海 Shanghai	ToLCPV	DQ092867ToLCPV	DQ092867	菲律宾 Philippines
	SHKC312668	KC312668	上海 Shanghai				

2 结果与分析

2.1 烟粉虱生物型鉴定

利用 *VspI* 酶切 mtCOI 片段的方法对烟粉虱生

物型鉴定结果(图 1)表明,山东省 2005 年的 4 个烟粉虱种群均为 B 型,2006 年的 11 个烟粉虱种群为 B 型和 Q 型的混合种群。

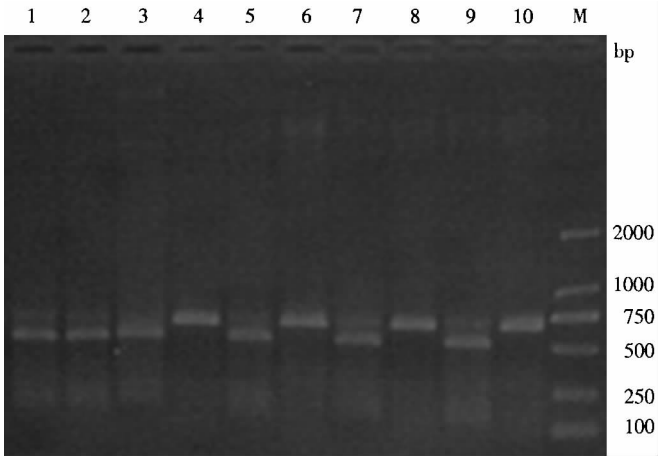


图 1 B 型和 Q 型烟粉虱 mtCOI 基因 PCR-RFLP 图谱

Fig.1 *VspI*-based mtCOI PCR-RFLP pattern of *B. tabaci* biotypes B and Q

1~8: 取自 SGQ06 样品个体; 9: Q 型对照; 10: B 型对照; M: DL2000 DNA ladder.
1~8: Whitefly samples of SGQ06; 9: Control for Q; 10: Control for B; M: DL2000 DNA ladder.

2.2 烟粉虱携带 TYLCV 比率

通过检测烟粉虱携带 TYLCV 情况并对 PCR 扩增产物测序且进行 Blast 分析。山东省 2005 年的 4 个烟粉虱种群没有检测到 TYLCV,2006 年的 11 个种群中有 2 个种群检测到 TYLCV 的存在,分别为德州

的 DZQ06、寿光的 SGQ06(图 2)。在这 2 个种群中 TYLCV 检出率均为 96%。德州 DZQ06 种群烟粉虱 Q 型 TYLCV 的检出率为 100%,B 型 TYLCV 的检出率约为 96%。而寿光 SGQ06 种群烟粉虱 B 型 TYLCV 检出率为 100%,Q 型 TYLCV 检出率约为 92%。

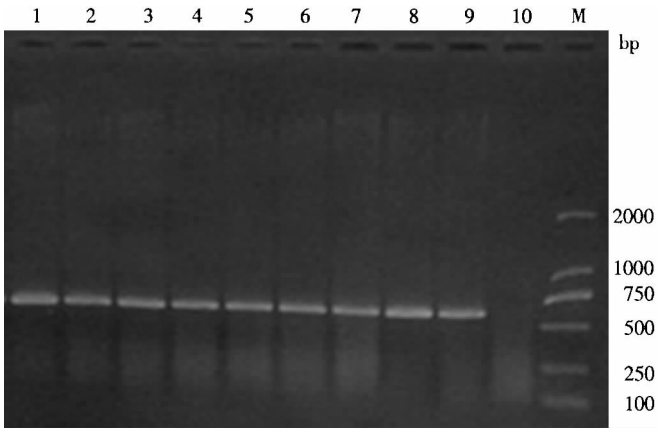


图 2 烟粉虱体内 TYLCV 特异性片段的扩增结果

Fig.2 Amplification of TYLCV gene fragment using specific primers

1~3: 取自 DZQ06 样本个体; 4~8: 取自 SGQ06 样本个体; 9: 阳性对照; 10: 阴性对照; M: DL2000 DNA ladder。

1~3: Whitefly samples from DZQ06; 4~8: Whitefly samples from SGQ06; 9: Positive control; 10: Negative control; M: DL2000 DNA ladder.

2.3 基于 TYLCV 的系统发育分析

基于 NJ 法构建的系统树(图 3)表明,山东地区烟粉虱携带的 TYLCV 特异性片段与我国江苏、浙江、上海地区及日本均聚为一支,说明山东地区烟粉虱携带的病毒检测确为 TYLCV。除去中国台湾番茄曲叶病毒(ToLCTWV)和菲律宾番茄曲叶病毒(ToLCPV)这 2 个外群,TYLCV 系统发育树分为 3 支,其中,2 个分支是由日本 TYLCV(登录号为 AB014346、AB110217、AB116631、AB1166632)组成,另 1 支由日本(登录号为 AB439841)和中国山东、上海、浙江、江苏地区的 TYLCV 组成。

3 结论与讨论

本研究结果对于揭示 TYLCV 传入山东省的历史具有重要指导价值。由于烟粉虱成虫体内 TYLCV 与寄主植物密切相关;携毒烟粉虱在 TYLCV 的非媒介植物上的子代成虫体内检测不到 TYLCV(Pan *et al.*,2012)。本研究采集的植物为棉花、黄瓜、茄子,并非 TYLCV 媒介植物,而研究中携毒的 2 个种群的寄主植物均为茄子,这也可能影响烟粉虱 B 型和 Q 型携毒检测结果。此外,本研究中烟粉虱采集的种群数量并不是很多,也可能影响本研究的结果。尽管如此,我们的研究仍能表明,TYLCV 在

2006 年就已经传入山东省,这与之前的结果不同。前人报道表明,继 2006 年 TYLCV 传入我国南方局部地区后,在 2007 年传入山东省并随后在各地逐渐蔓延扩散。

TYLCV 在山东省的出现可能与 Q 型烟粉虱的传入密切相关。Q 型烟粉虱在山东地区主要是 2006 年开始出现并逐年增加的(Chu *et al.*,2007; Chu *et al.*,2010b)。本研究只在 2006 年的极少数种群检测到 TYLCV 的存在,两者在山东省出现的时间基本吻合。同时,相关研究表明,Q 型在获毒、传毒(不论是水平传播还是垂直传播)能力方面都显著高于 B 型,Q 型相对于 B 型能够获得更多的病毒,能够在短时间内达到病毒的最高载量(Pan *et al.*,2012)。Pan *et al.* (2013)研究表明,TYLCV 与 Q 型是间接互惠作用型存在互惠效应,但对 B 型有致害效应。这进一步支持了 TYLCV 的传入可能与 Q 型烟粉虱传入有关的推测,随后几年 TYLCV 的大发生可能与 Q 型烟粉虱的进一步扩散有关(Chu *et al.*,2010b)。

上述研究结果不仅有助于了解 TYLCV 的入侵过程,而且对于病毒防控具有重要的指导意义。此外,本研究中利用烟粉虱携毒的方法可以快速、准确的检测到 TYLCV,此方法可以在生产中推广应用。

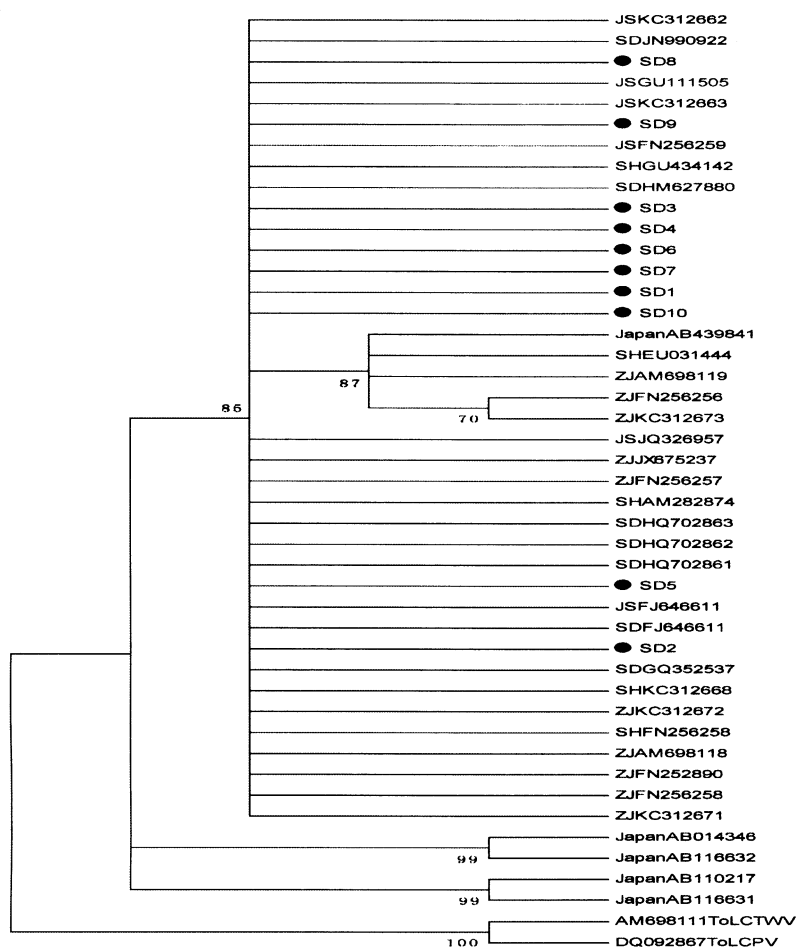


图 3 基于 NJ 法构建的 TYLCV 系统发育树 (Bootstrap > 70%)

Fig. 3 Phylogenetic tree of TYLCV constructed with NJ method (Bootstrap > 70%)

分支点数值表示置信度。

Number means support values for clades.

参考文献

曹骞, 李晶, 买热木古丽·克依木, 王惠卿, 李国志, 马德英. 2013. 新疆地区烟粉虱生物型的区域分布及其携带的番茄黄化曲叶病毒检测. 昆虫学报, 56(6): 652–664.

褚栋, 侯丽霞, 刘国霞, 高长生, Brown J K. 2010. 山东省局部地区番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定. 山东农业科学, (2): 13–15, 19.

褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 朱国仁. 2005. 烟粉虱不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学, 38(1): 76–85.

李常保, 柴敏, 李季, 郑建秋. 2010. 北京番茄黄化曲叶病毒病的发生及分子检测. 中国蔬菜, (1): 28–30.

刘剑锋, 肖启明, 张德咏, 周鹏, 成成, 唐前君. 2013. 番茄黄化曲叶病(TYLCV)的研究进展. 中国农学通报, 29(13): 70–76.

孙作文, 杨进绪, 张美珍, 李向东. 2009. 山东省番茄黄化曲叶病毒病的发生及其防治. 中国蔬菜, (21): 5–6.

刘文浩, 仇平平, 辛相启, 苏文敏, 王祥, 竺晓平. 2012.

番茄黄化曲叶病毒山东泰安分离物的全基因组克隆与分析. 山东农业科学, 44(11): 4–7.

赵玖华, 尚佑芬, 王升吉, 李燕霞, 郭和平. 2010. 番茄黄化曲叶病的发生危害、病原检测及防治措施. 山东农业科学, (2): 82–84.

Chu D, Wan F H, Zhang Y J and Brown J K. 2010a. Change in the biotype composition of *Bemisia tabaci* in Shandong Province of China from 2005 to 2008. *Environmental Entomology*, 39: 1028–1036.

Chu D, Gao C S, De Barro P, Wan F H and Zhang Y J. 2011. Investigation of the genetic diversity of an invasive whitefly in China using both mitochondrial and nuclear DNA markers. *Bulletin of Entomological Research*, 101: 477–486.

Chu D, Jiang T, Liu G X, Jiang D F, Tao Y L, Fan Z X, Zhou H X and Bi Y P. 2007. Biotype status and distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Shandong Province of China based on mitochondrial DNA markers. *Environmental Entomology*, 36: 1290–1295.

- Chu D, Zhang Y J and Wan F H. 2010b. Cryptic invasion of the exotic *Bemisia tabaci* biotype Q occurred widespread in Shandong Province of China. *Florida Entomologist*, 93: 203 – 207.
- Cohen S and Harpaz I. 1964. Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 7: 155 – 166.
- Liu B M, Preisser E L, Chu D, Pan H P, Xie W, Wang S L, Wu Q J, Zhou X G and Zhang Y J. 2013. Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Virology*, 87: 4929 – 4937.
- Lockwood J L, Hoopes M F and Marchetti M P. 2007. *Invasion Ecology*. Blackwell Publishing.
- Mugiira R B, Liu S S and Zhou X. 2008. *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato leaf curl Taiwan virus* invade south-east coast of China. *Journal of Phytopathology*, 156: 217 – 221.
- Pan H P, Chu D, Yan W Q, Su Q, Liu B M, Wang S L, Wu Q J, Xie W, Jiao X G, Li R M, Yang L N, Yang X, Xu B Y, Brown J K, Zhou X G and Zhang Y J. 2012. Rapid spread of *Tomato yellow leaf curl virus* in China is aided differentially by two invasive whiteflies. *PLoS ONE*, 7 (4): e34817. doi: 10. 1371/journal.pone. 0034817.
- Pan H P, Chu D, Liu B M, Shi X B, Guo L T, Xie W, Carrière Y, Li X C and Zhang Y J. 2013. Differential effects of an exotic plant virus on its two closely related vectors. *Scientific Reports*, 3: 2230. doi: 10. 1038/srep02230.
- Picó B, Díez M J and Nuez F. 1998. Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Euphytica*, 101: 259 – 271.
- Wu J B, Dai F M and Zhou X P. 2006. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in China. *Plant Disease*, 90: 1359.

(责任编辑:彭露)

