

# 番茄曲叶病及其血清学和 PCR 测定

蔡健和\* 王苏燕 王小凤 田 波

(\* 广西农业科学院植物保护研究所 南宁 530007)

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

我国曾报道的番茄病毒病有多种,其中最常见的是黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草花叶病毒(TMV)引起的花叶病。柯冲等(1964)<sup>[1]</sup>在大陆首次报道烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播的番茄病毒病——番茄黄顶病,此病在 50~60 年代曾在广州市郊流行,造成大面积减产。Green 等(1984)<sup>[2]</sup>报道台湾发生番茄黄曲叶病,此病与日本的番茄黄矮病(Tomato yellow dwarf)相似,并且与烟草曲叶病毒(TLCV)有血清学关系。印度、委内瑞拉等国也曾报道发生由烟粉虱传播的番茄曲叶病和番茄黄曲叶病<sup>[3]</sup>。1991 和 1992 年秋,在广西南宁市郊发现一种症状表现为植株矮缩,叶片向上向内卷曲,叶背面产生耳状或杯状增生,对光看有时可见叶脉呈墨绿色,不结果或少结果的番茄病害。1992 年秋广西农业科学院的番茄试验地发病率高达 6.8%,对当地秋番茄生产构成了威胁。作者对病害症状、传播、血清学反应及 PCR 分析等方面与烟草曲叶病毒进行了比较研究,证实了该病的病原与烟草曲叶病毒有很高的同源性。现将研究结果简报如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒传播

1.1.1 嫁接传染:用嫩病叶作接穗,采用腹接法嫁接到供试的番茄和烟草幼苗上。

1.1.2 烟粉虱传播:参考文献[4]方法。

### 1.2 血清学测定

参照 Thomas 等<sup>[5]</sup>方法。所用的非洲木薯花叶病毒(ACMV)单克隆抗体 SCR<sub>1</sub>,由英国苏格兰作物研究所 B. D. Harrison 教授提供。

### 1.3 从病株中提取总 DNA 和 PCR 扩增

PCR 引物是根据烟粉虱传染类双生病毒基因组的“共同序列”,并比较它们的核苷酸序列设计而成, P1: TAATATTACCGNNGNCCNC, P2: TGGACNTTNCANGGNCCTTCACA。

病叶中总 DNA 的提取:取 3 片直径为 3mm 的病叶,放在一个 1.5ml 的小塑料离心管中,加少量金刚砂,用 0.5ml 的塑料离心管套在其中将叶片捣碎,加 50μl 提取缓冲液(50mmol/L Tris-HCl pH7.0; 100mmol/L NaCl; 10mmol/L EDTA; 1%SDS),继续研磨,再加 150μl 提取缓冲液,加入 200μl 酚:氯仿(1:1)混合液,振荡混匀,13000r/min 离心约 5min,将上清液转移到一个新管中,加等体积氯仿,振荡混匀,13000r/min 离心约 5min,将上清液转到一个新管中,加 1/10 体积 3mol/L NaAc pH5.2 和两体积 100% 乙醇,放在冰上约 10min,13000r/min 离心 10min,用 70% 乙醇洗沉淀一次,将沉淀溶于 300μl 无菌蒸馏水中。加 1~5μl 进行 PCR 检测。

再加 10 倍扩增缓冲液

10μl

4 种 dNTP, 每种终浓度

200μmol/L

引物 1

100pmol/L

引物 2

100pmol/L

无菌蒸馏水补至

100 $\mu$ l

10 倍扩增缓冲液 (50mmol/L KCl, 100mmol/L Tris-HCl pH8.3, 15mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5% 明胶)。加 2~3 单位 Taq DNA 聚合酶, 再加 100 $\mu$ l 轻矿物油, 将小管放入 PCR 仪。

循环	变性	复性	合成
第一次	94℃ 2min	55~58℃ 1min	72℃ 2min
35 次	94℃ 45s	55~58℃ 1min	72℃ 2min
最后一次	94℃ 45s	55~58℃ 1min	72℃ 5min

#### 1.4 PCR 产物的酶切分析

PCR 扩增完毕, 于反应液中加入 1/10 体积 3mol/L NaAc 和 2 体积 95% 乙醇沉淀过夜, 再用 79% 乙醇抽提一次, 离心后, 沉淀溶于 50 $\mu$ l 无菌水中。取 5 $\mu$ l 样品, 分别用限制性内切酶 AluI (BRL 公司), Sau3A (BRL 公司) 和 Taq I (Boehringer Mannheim 公司) 处理, 酶解产物进行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经 EB 染色后, 在紫外灯下观察, 拍照电泳结果。

## 2 结果

### 2.1 番茄曲叶病的传播试验

**2.1.1 嫁接传染:** 嫁接 1 个月后, 供试的 6 株番茄苗共有 4 株发病, 初期症状为叶片正面细叶脉呈现灰白色, 以后叶片向上向内卷曲, 与自然病株相同, 嫁接 10 株普通烟 (G28) 共有 6 株发病, 症状表现为叶片卷曲, 叶背面产生耳状增生, 对光看叶脉呈墨绿色, 与当地自然发生的烟草曲叶病症状相同。

**2.1.2 烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 传染:** 接种 1 个月后, 从番茄病株传染的 6 株番茄苗共有 4 株发病; 从嫁接发病烟草传染的 16 株番茄苗共有 7 株发病, 症状与自然病株相同。

### 2.2 血清学反应

ELISA 测定结果, 番茄曲叶病叶提取液及烟草曲叶病叶提取液均与 ACMV 单抗 SCR<sub>11</sub> 呈阳性反应, 而健康对照呈阴性反应。

### 2.3 PCR 扩增及产物分析

PCR 反应完毕, 取 5~10 $\mu$ l PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明, 番茄曲叶病侵染烟草的样品和烟草曲叶病样品均可扩增出约 500bp 的 DNA 片断 (图版 1-3)。健康对照未见扩增出此特异核酸带。直接用番茄曲叶病叶核酸提取液作 PCR 扩增没有成功, 可能是由于番茄汁液中存在某些物质干扰了 PCR 反应过程的缘故。

### 2.4 PCR 产物的酶切分析

结果 (图版 1-4) 可见, 番茄曲叶病及烟草曲叶病样品的 PCR 产物分别经三种限制性内切酶降解的结果都是一致的。

## 3 结论和讨论

根据以上结果, 番茄曲叶病可通过嫁接和烟粉虱传染, 接种普通烟导致的症状与烟草曲叶病相同, 而烟草曲叶病感染番茄也导致典型的曲叶症状<sup>[4]</sup>, 因而可以初步推断番茄曲叶病的病原与烟草曲叶病很相似。此二种病的病叶提取液均与另一种烟粉虱传染的双生病毒——非洲木薯花叶病毒的单抗 SCR<sub>11</sub> 呈阳性反应, 二者的 PCR 产物分子量及三种限制性内切酶降解的结果相同, 从而进一步证实番茄曲叶病的病原与烟草曲叶病毒具有一定的同源性。

我们在调查中也发现了与番茄黄曲叶病及番茄黄顶病相类似的番茄病害, 进一步的鉴定工作正在进行中。

## 参 考 文 献

- [1] 柯冲, 孙芥菲, 范怀忠. 植物保护学报, 1965, 4(1): 103.
- [2] Green S K, Sulyo Y. *FAO Plant Protection Bulletin*, 1987, 35 (2): 62.

- [3] Muniyappa V. Whiteflies. In: Maramorosch K F *et al* ed. Vectors of Plant Pathogen. New York: Academic Press, 1980. 61~63.
- [4] 蔡健和, 王小凤, 黄福新, 等. 微生物学报, 1993, 33(3): 166~169.
- [5] Thomas J E, Massalski P R, Harrison B D. *J Gen Virol*, 1986, 67: 2739~2748.

## TRANSMISSION, SEROLOGY AND PCR ANALYSIS OF TOMATO LEAF CURL VIRUS

Cai Jianhe\* Wang Suyan Wang Xiaofeng Tian Bo

(\*Institute of Plant Protection Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 53000)

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** Tomato leaf curl virus (TomLCV) disease was found in the suburb of Nanning city of Guangxi in the autumn of 1991~1992. It showed the symptoms of stunting, leaf curling, cup or ear-like enation on the back of leaves, dark green vein. Test indicated that it could be transmitted by grafting and whiteflies (*Bemisia tabaci*). The infected tobacco and tomato by TomLCV induced the same leaf curl symptom as that by tobacco leaf curl virus (TLCV), based on this result, the pathogen of tomato leaf curl disease was primarily referred as TLCV. Further studies showed that both TLCV and TomLCV infected leaf extract reacted positively to MAb-SCR<sub>18</sub> of African cassava mosaic virus (ACMV). Both virus could produce about 500bp DNA fragments by PCR using the whitefly-transmitted geminivirus common primers. Restriction enzyme analysis (using AluI, Sau3A and TaqI respectively) of these two viruses PCR products produced the same results. All the above results further confirmed that the pathogenic virus of tomato leaf curl disease has high homology with TLCV.

**Key words** Tomato leaf curl virus, Transmission, Serology, PCR

### 图版说明

1. 番茄曲叶病病症, 示叶片卷曲, 叶背面耳状和杯状增生; 2. 番茄曲叶病嫁接烟草引起的曲叶症状; 3. TomLCV 和 TLCV PCR 产物的电泳结果: (1) 烟草曲叶病烟草叶; (2) 番茄曲叶病嫁接烟草后的病叶; (3, 4) 番茄曲叶病引起的番茄病叶; (5) 健康烟草叶; (6) 健康番茄叶; (7) 1kb 分子量标准品; 4. PCR 产物的酶切分析: (1, 3, 5) 感染番茄曲叶病烟草叶的 PCR 产物; (2, 4, 6) 感染烟草曲叶病烟草叶的 PCR 产物; (7) 1Kb 分子量标准品; (1, 2) 样品用 Alu 酶切; (3, 4) 样品用 Sau3A 酶切; (5, 6) 样品用 TaqI 酶切。