

# 云南省建水县番茄上 *Tospovirus* 属病毒的初步鉴定

刘雅婷<sup>1,3</sup>, 郑元仙<sup>1</sup>, 李永忠<sup>2</sup>, 李正跃<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup> 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; <sup>2</sup> 云南农业大学烟草学院; 昆明 650201; <sup>3</sup> 云南农业大学植保学院, 昆明 650201)

**摘要:** 2005—2006年对云南省主要蔬菜种植区昆明、红河和楚雄等 3个地区进行调查, 获得 9份疑似番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 病毒的样本。通过该属病毒引物 (*Tospovirus* Group Primer) 进行 RT-PCR 扩增, 其中 1份来自红河州建水县番茄上的样品获得约 500 bp 核酸片段, 通过 NCBI BLAST 网络数据库比对, 确定为 *Tospovirus* 属的病毒; 应用 DNAMAN 软件与已经公布的 *Tospovirus* 属病毒 L RNA 序列比对分析, 从得到的相似性树状图可以看出, 该样品与血清组 的 *Tospovirus* 属病毒聚为一簇。

**关键词:** 番茄; 番茄斑萎病毒属; 血清组

**中图分类号:** S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 03-0437-04

## Preliminary Identification of *Tospovirus* on Tomato in Jianshui County of Yunnan Province

LIU Ya-ting<sup>1,3</sup>, ZHENG Yuan-xian<sup>1</sup>, LI Yong-zhong<sup>2</sup>, and LI Zheng-yue<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Agricultural and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; <sup>2</sup> College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; <sup>3</sup> College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** Nine samples possibly from genus *Tospovirus* were collected from major vegetable-growing field in Yunnan province, including Honghe, Chuxiong and Kunming, during 2005—2006 period. Around 500 bp fragments were obtained after RT-PCR were executed on 9 samples using *Tospovirus* Group Primer. The sequence results of around 500 bp fragments were compared in the NCBI BLAST website, one sample from tomato in Honghe County of Yunnan Province was identified as *Tospovirus* genus. A phylogenetic tree was constructed using DNAMAN software according to the sequence of the sample and their corresponding public L RNA fragment sequences of *Tospovirus*. The results indicated that this sample obtained in this study fell into the Serogroup .

**Key words:** tomato; *Tospovirus*; serogroup

番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 是布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 惟一的植物病毒属, 能够侵染烟草、番茄、辣椒和花生等多种重要作物, 致使这些作物发生严重病害, 导致世界范围内重大农业经济损失 (Whitfield et al, 2005)。该属病毒球状, 具有包膜, 由 S RNA、M RNA 和 L RNA, 3个单链 RNA 分子构成 (German et al, 1992)。 *Tospovirus* 属目前已经有 14 个确定种 (Whitfield et al, 2005)。在亚洲报道的种有: 花生芽坏死病毒 (*Peanut bud necrosis virus*, PBNV)、西瓜芽坏死病毒 (*Watermelon bud necrosis virus*, WBNV)、鸢尾黄斑病毒 (*Iris yellow spot virus*, IYSV)、花生黄斑病毒

收稿日期: 2008 - 10 - 09; 修回日期: 2009 - 02 - 04

基金项目: 云南省自然科学基金面上项目 (2005C0036M, 2007C0036M); 云南省教育厅自然科学基金项目 (5Y0171B); 国家 '973' 项目 (2006CB100204)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lizhengyue@vip.km169.net; Tel: 0871-5227633)

致谢: 感谢美国北卡罗来那州立大学植物病理系主任 James W. Moyer 教授为本研究提供完善的试验条件。

(*Peanut yellow spot virus*, PYSV)、辣椒褪绿病毒 (*Capsicum chlorosis virus*, CaCV)、西瓜银斑病毒 (*Watermelon silvermottle virus*, WSMoV)、瓜类黄斑病毒 (*Melon yellow spot virus*, MYSV)、花生褪绿扇斑病毒 (*Peanut chlorotic fan virus*, PCFV) 和彩色马蹄莲褪绿斑病毒 (*Calla lily chlorotic spot virus*, CCSV)。张仲凯等 (1997) 报道了云南烤烟上发现 *Tospovirus*, 并在 2005 年报道了云南省具有其广泛的野生自然寄主 (张仲凯等, 2005)。

作者在云南省蔬菜种植基地调查了 *Tospovirus* 属病毒侵染情况, 并应用 RT-PCR 技术确定 *Tospovirus* 属病毒在云南省番茄上的发生。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒样本收集

2005—2006 年, 在云南省昆明、楚雄和红河地区对主要蔬菜基地的番茄、辣椒、莴苣和花生等蔬菜作物进行田间调查, 获得 9 份具有感染 *Tospovirus* 属病毒较为典型症状的植株样品 (表 1)。按照 Ndunguru 等 (2005) 的方法将具有疑似症状的叶片转移到 FTA 卡 (Whatman, Inc) 上备用。

表 1 本研究采集的病毒样本及其分离物

Table 1 Virus samples and isolates collected in the study

样品编号 Sample No.	自然寄主 Natural host	症状 Symptom	采样地点 Location	采样时间 / (Y - M - D) Date
To-2	番茄 Tomato	黄斑和同心环纹 Yellow spot, concentric ring	昆明呈贡 Chenggong, Kunming	2005 - 07 - 19
Pep-3	辣椒 Pepper	同心环纹 Concentric ring	楚雄元谋 Yuanmou, Chuxiong	2006 - 02 - 14
Le-1	莴苣 Lettuce	坏死斑 Necrotic spot	楚雄元谋 Yuanmou, Chuxiong	2006 - 02 - 14
Tomato	番茄 Tomato	黄斑和同心环纹 Yellow spot, concentric ring	红河建水 Jianshui, Honghe	2006 - 05 - 30
Pean-1	花生 Peanut	坏死斑 Necrosis spot	楚雄元谋 Yuanmou, Chuxiong	2006 - 08 - 03
To-3	番茄 Tomato	同心环纹和坏死斑 Concentric ring, necrosis spot	楚雄元谋 Yuanmou, Chuxiong	2006 - 08 - 03
Pep-4	辣椒 Pepper	同心环纹和坏死斑 Concentric ring, necrosis spot	昆明呈贡 Chenggong, Kunming	2006 - 07 - 27
To-4	番茄 Tomato	同心环纹和坏死斑 Concentric ring, necrosis spot	昆明呈贡 Chenggong, Kunming	2006 - 07 - 27
Onion-1	洋葱 Onion	褪绿斑 Chlorotic lesion	红河蒙自 Mengzi, Honghe	2006 - 09 - 06

### 1.2 RNA 的提取

应用 PureLink Total RNA 纯化试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 从 FTA 卡上提取 RNA, 根据 Invitrogen 公司使用说明书操作, 并略有改动, 在 RNA 溶解溶液中加入 2% PVP 和 1%  $\beta$ -巯基乙醇, 取 5 mm<sup>2</sup> FTA 卡溶解于 500  $\mu$ L RNA 裂解溶液中。

### 1.3 L RNA 片段的 RT-PCR

用随机引物 N<sub>6</sub> (Invitrogen, Carlsbad, CA) 逆转录合成 cDNA。使用 AGDIA 公司设计的 *Tospovirus* 通用引物 *Tospovirus* Group Primer 和试剂盒 (AGDIA, Elkhart, N) 进行 L RNA 片段 PCR 扩增, PCR 反应在 MJ 研究 (Watertown, MA) 的 PTC-100 热周期循环中完成, 反应程序如下: 预变性 94 10 min; 94 1 min, 45 2 min, 72 3 min, 5 个循环; 然后 94 1 min, 52 2 min, 72 3 min, 30 个循环; 72 延伸 10 min。然后在 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外成像系统拍照。

### 1.4 基因克隆和测序

用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen Inc, Chatsworth, CA) 纯化 PCR 扩增产物, 将扩增产物克隆到 pGEM-T 载体 (Promega, Madison, WI, USA) 上, 并转化大肠杆菌菌株 JM-109, 在美国北卡罗立大学基因组研究所完成重组体克隆的测序。

### 1.5 序列分析

用 Vector NTI Version 9.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 创建序列数据库; Bioedit (<http://www.cnki.net>)

www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) 用于序列整理；通过 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行比对分析；使用 DNAMAN (version 2.5, Lynnon Biosoft, Quebec, Canada) 将获得的序列与已知的 TSWV、IYSV 以及其他公布的 *Tospovirus* 属病毒序列进行多序列比对产生相似性矩阵及系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 云南省 *Tospovirus* 属病毒分布

通过引物 *Tospovirus* Group Primer 进行 L RNA 序列 RT-PCR 扩增，其中采自云南省红河州建水县番茄的样本获得 4 条 500 bp 左右的序列 (图 1, tomato-5, tomato-8, tomato-9, tomato-10)，通过 BLAST 比对发现该序列与 *Tospovirus* 属其他已经在 GenBank 中公布的序列有较高的一致性，因此确定该样本为 *Tospovirus* 属病毒。

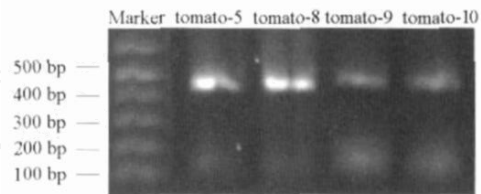


图 1 样品番茄应用引物 *Tospovirus* Group Primer 的 PCR 扩增

Fig 1 PCR amplification from tomato samples by *Tospovirus* Group Primer

### 2.2 L RNA 核酸序列片段比对和系统进化关系分析

通过引物 *Tospovirus* Group Primer 进行 L RNA 序列 RT-PCR 扩增，该样品均获得约 500 bp L RNA 片段。应用 DNAMAN 软件将这些核酸序列和 GenBank 公布的其他序列比对，从图 2 可以看出，云南的该样本与 *Tospovirus* 属血清组 IV 的病毒 PBNV 和 WSMoV 聚为一簇，相似性超过 79%。

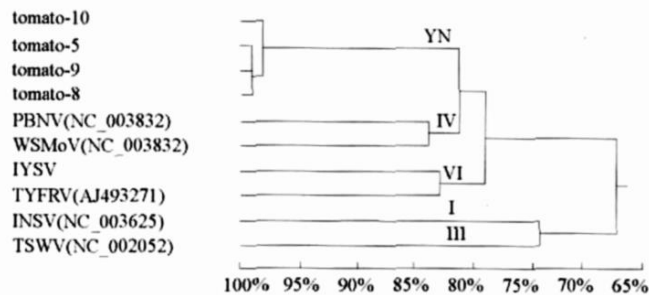


图 2 应用 *Tospovirus* Group Primer 获得 *Tospovirus* 属 L RNA 序列的系统进化树

Fig 2 A phylogenetic tree based on the L RNA fragment of *Tospovirus* IYSV (Moyer et al, unpublished data)

### 2.3 该病毒在自然寄主上的典型症状

该病毒在番茄果实上表现出黄斑和同心环纹的症状 (图 3)。



图 3 *Tospovirus* 属病毒自然侵染番茄的症状表现

Fig 3 The symptom of tomato infected by *Tospovirus*

### 3 讨论

血清组是一种广泛用于 *Tospovirus* 属病毒新种确定和分类的重要标准, 血清学比较是检测和鉴定 *Tospovirus* 属病毒最有效的方法 (Chu et al, 2001)。目前 *Tospovirus* 属病毒划分为 6 个血清组, 即 , , , 和 (de Haan et al, 1990; Maiss et al, 1991; de Avila et al, 1993), TSWV 是血清组 的代表种。番茄褪绿斑病毒 (*Tomato chlorotic spot virus*, TCSV) 和花生环斑病毒属于血清组 。凤仙花坏死病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, NSV) 和花生芽坏死病毒 (*Peanut bud necrosis virus*, PBNV) 分别是血清组 和 的代表种。两种新的 *Tospovirus* 即花生黄斑病毒 (*Peanut yellow spot virus*, PYSV) 和鸢尾黄斑病毒 (*Iris yellow spot virus*, IYSV) 分别是血清组 (Satyanarayana et al, 1998) 和 (Cortez et al, 1998) 的代表种。本研究中的云南样品与 聚为一群, 因此可能属于血清组 。

自 1947 年以来, 陆续有关于 *Tospovirus* 的发现, 但是中国对于 *Tospovirus* 很少有系统的调查和研究, 关于种的鉴定鲜见报道。

作者在过去的几年中对云南省蔬菜进行调查, 确定采自云南红河建水县番茄上的病毒样本为 *Tospovirus* 属病毒, 但是属于 *Tospovirus* 属的哪一个种, 还有待进一步的研究确定。

### References

- Chen C C, Chen T C, Lin Y H, Yeh S D, Hsu H T. 2005. A chlorotic spot disease on calla lilies (*Zantedeschia* spp.) is caused by a *Tospovirus* serologically but distantly related to watermelon silvermottle virus. *Plant Dis*, 89: 440 - 445.
- Chu F H, Chao C H, Peng Y C, Lin S S, Chen C C, Yeh S D. 2001. Serological and molecular characterization of peanut chlorotic fan-spot virus, a new species of the genus *Tospovirus*. *Phytopathology*, 91 (9): 856 - 863.
- Cortez I, Livieratos IC, Derks A, Peters D, Komelink R. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus a new and distinct *Tospovirus* species. *Phytopathology*, 88: 1276 - 1282.
- de Avila A C, de Haan P, Komelink R, de Resende R O, Goldbach R W, Peters D. 1993. Classification of *Tospoviruses* based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J Gen Virol*, 74: 153 - 159.
- de Haan P, Wagmakers L, Peters D, Goldbach R. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J Gen Virol*, 71: 1001 - 1007.
- Geman T L, Ullman D E, Moyer J W. 1992. *Tospoviruses*: Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annu Rev Phytopathol*, 30: 315 - 34.
- Maiss E, Ivanova L, Breyer E, Adam G. 1991. Cloning and sequencing of the S RNA from a Bulgarian isolate of tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol*, 72: 461 - 464.
- Ndunguru J, Taylor N J, Yadav J, Aly H, Legg J P, Aveling T, Thompson G, Fauquet C M. 2005. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. *Virology Journal*, 2: 45.
- Satyanarayana T, Gowda S, Lakshminarayana R K, Mitchell S E, Dawson W O, Reddy D V R. 1998. Peanut yellow spot virus is a member of a new serogroup of *Tospovirus* genus based on small (S) RNA sequence and organization. *Arch Virol*, 143: 353 - 364.
- Whitfield A E, Ullman D E, Geman T L. 2005. *Tospovirus*-thrips interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 43: 459 - 489.
- Yu T F. 1947. Spotted wilt of broad bean. *Phytopathology*, 37: 191 - 192.
- Zhang Zhong-kai, Ding Ming, Fang Qi, Zhang Li-zhen, Li Ting-ting, Peng Lu-bo, Su Xiao-xia, Li Zhan. 2005. The preliminary study of the occurrence and distribution of *Tospovirus* in Yunnan. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 17 (21): 163 - 168. (in Chinese)
- 张仲凯, 丁 铭, 方 琦, 张丽珍, 李婷婷, 彭璐波, 苏晓霞, 李 展. 2005. 番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 病毒在云南的发生分布研究初报. *西南农业学报*, 17 (21): 163 - 168.
- Zhang Zhong-kai, Fang Qi, Ding Ming, Peng Lu-bo, Zhang Li-zhen. 1997. Study on the occurrence of tobacco seedling virus diseases by electron microscopic. *Journal of Shandong Agricultural University*, 28 (5): 36 - 38. (in Chinese)
- 张仲凯, 方 琦, 丁 铭, 彭璐波, 张丽珍. 1997. 应用电镜技术研究烟苗期病毒病的发生状况. *山东农业大学学报*, 28 (5): 36 - 38.