

# 寿光地区感病辣椒 TYLCV 的分子鉴定和病毒 DNA-A 序列分析

刘春香,刘彩云,李会平,曹京

(山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室 潍坊学院 山东 潍坊 261061)

**摘要:** 由于 TYLCV 的宿主广泛,本试验对山东寿光地区的感病毒病辣椒进行了 TYLCV 感染的分子鉴定,发现寿光地区的辣椒感染了 TYLCV 病毒,且感染率较高。通过对病毒基因组 DNA-A 序列的克隆和序列分析发现,寿光感病辣椒的 TYLCV 序列与临沂和德州的 TYLCV 亲缘关系最近,并对具体突变点进行了分析。进化树分析显示,克隆得到的辣椒病毒与墨西哥的 TYLCV 病毒同源性较高,而与危害辣椒较严重的 TYLCSV 的遗传距离较远。

**关键词:** 辣椒; TYLCV; 分子鉴定; DNA-A

中图分类号: S641.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)03-0046-04

## Molecular Identification and DNA-A Gene Sequence Analysis of Tomato Yellow Leaf Curl Virus on Pepper(*Capsicum annuum*) in Shouguang Region

LIU Chun-xiang, LIU Cai-yun, LI Hui-ping, CAO Jing

(Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Shandong Province, Weifang University, Weifang 261061, China)

**Abstract:** Molecular identification were done on tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) isolated from pepper plants showing TYLCV symptoms in Shouguang region because TYLCV have more hosts. The result showed peppers in Shouguang infected TYLCV with high efficiency among detected plants. The isolate was the most close to the TYLCV Linyi isolate and Dezhou isolate, and the detail point mutation of Shouguang TYLCV genome compared with Linyi were analyzed. Phylogenetic tree analysis indicated that TYLCV of Mexico were found to show high sequence identity with that we cloned, and with relatively low similarity to TYLCSV strains which damaged pepper seriously.

**Key words:** Pepper; TYLCV; Molecular identification; DNA-A

番茄黄化曲叶病毒 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 于 1964 年在以色列首次发现<sup>[1]</sup>, 1995 年传入我国<sup>[2]</sup>。生产上, TYLCV 病毒主要为害番茄, 造成叶片皱缩、黄化, 植株矮小, 花朵减少, 果实少且小, 严重影响产量和品质<sup>[3]</sup>。2009 年山东寿光有 7 000 ~ 8 000 hm<sup>2</sup> 番茄因类似番茄黄化曲叶病, 造成严重减产或绝收。该病毒在辣椒等作物上也有发生, 也可感染果实<sup>[4]</sup>, 只是不能通过果实在植物间传播, 但种子可能成为远距离传播的途径。除了栽培作物, 还可引起杂草等的黄脉症状<sup>[5]</sup>。

病毒病是影响辣椒生长的重要病害, 生产中又缺乏有效的控制措施, 因此, 混合病毒感染常造

成辣椒连根拔除的严重后果。近几年番茄上 TYLCV 病毒在寿光连年发生, 辣椒也是该病毒的宿主之一, 为了能够深入研究当地的病毒感染类型, 研究有效的防治措施, 笔者对寿光地区的感病辣椒进行了 TYLCV 病毒的鉴定, 并对其序列及变异点进行了分析, 旨在为生产上的防治和切断传播途径提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

在寿光洛城镇的蔬菜温室内采集 9 株有典型病毒侵染症状 (黄脉、曲叶、叶片皱缩、叶色褪绿、植株矮化) 的辣椒枝叶, 带回实验室 -70℃ 保存备用。

收稿日期: 2012-02-01

基金项目: 山东省星火计划项目 (2010XH0620); 潍坊学院 SRTF 项目

作者简介: 刘春香 (1974-), 女, 吉林人, 副教授, 博士, 主要从事蔬菜分子育种研究。

## 1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GeneBank 上发表的山东淄博的 TYLCV 序列(编号: HM627885.1), 在保守的区域设计 3 对引物, TY-413s: 5'-GTC-CAAGGCACAAACAAG-3', TY-1559-a: 5'-GAAAC-CAATAAGGCGTAAG-3', 产物长度 1 147 bp; TY-1541-s: 5'-CTTACGCCTTATTGGTTTCT-3', TY-2676-a: 5'-GCCATTAGGTGTCCAGGTA-3', 产物长度 1 155 bp; TY-2676-s: 5'-ATACCTGGACACCTAATGGCT-3', TY-435-a: 5'-CGTCGCTTGTGTGTCCT-3', 产物长度 541 bp。3 对引物边界有重叠, 涵盖了病毒 DNA-A 的全部区域。引物由上海生工生物技术公司合成。

1.2.1 基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增 将采摘的辣椒叶片研磨, 用 CTAB 法提取基因组 DNA, 50 ng 作模板, 根据每对引物的退火温度进行各段序列的基因组 PCR 扩增。扩增条件: 预变性 94℃ 2 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 30 s, 温度分别为 49.7, 51.3, 52.5℃, 延伸 72℃ 80 s, 循环数 30 个, 72℃ 延伸 5 min。扩增后的产物纯化后克隆到 pMD18-T 载体上, 由上海生工生物技术公司测序。另外, 对每一感病植株的叶片分别提取基因组 DNA, 采用 TY-2676-S, TY-435 引物进行 PCR 扩增, 用以检测 TYLCV 感病率。

1.2.3 序列分析和进化树构建 将测序结果进行拼接, 拼接后的全序列利用 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 进行比较分析, 结合 DNA Star 软件参考查询突变点信息。利用 Clustal X 软件进行进化树构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒病毒 TYLCV 序列的 PCR 扩增

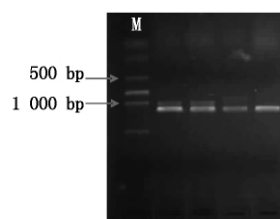
根据 3 对引物对混合 DNA 的病毒基因扩增结果如图 1、2 所示。扩增得到的产物长度分别为 1 147, 1 155, 541 bp, 大小与预期的相似, 初步说明我们获得了病毒基因 3 段序列。

### 2.2 病毒基因组 DNA-A 的全部序列与病毒鉴定

将 PCR 产物进行克隆和测序, 我们分别获得了 1 147, 1 155, 541 bp 的序列, 拼接后为 2 781 bp, 与 GeneBank 上 TYLCV 基因组序列基本一致, 证明我们鉴定的病毒就是 TYLCV。在 GeneBank 的登录号为 JQ411237。

通过 BLAST 比对发现, 我们克隆的辣椒病毒基因组序列与已经报道的 SDLY (山东临沂)、SDDZ (山东德州) 的 TYLCV 病毒基因组序列同源性最高, 为 99.68% (2772/2781), 说明含有 TYLCV 的保

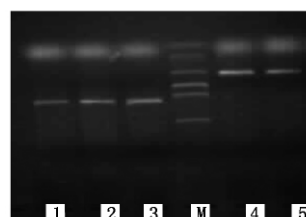
守序列, 鉴定病毒属于 TYLCV。



M. DL2000。

图 1 第 1 对引物 PCR 扩增的结果

Fig. 1 The PCR results by the first primer pair



1~3. 第 2 对引物扩增产物; M. DL2000 分子量标准;  
4, 5. 第 3 对引物扩增产物。

1~3. Produced by the second primer pair; M. DL2000 Marker; 4, 5. Produced by the third primer pair.

图 2 第 2 对引物 (左) 和第 3 对引物 (右) PCR 扩增的结果

Fig. 2 The PCR results by the second and the third primer pairs

### 2.3 病毒感染率调查

辣椒的病毒病多为混合感染, 在我们采集的样品中, 都为有典型病毒感染症状的枝叶。经过 TYLCV 的 PCR 扩增检测 (图 3) 发现, 9 个样品中有 5 个较强的检测信号, 1 个较弱, 说明这些植株感染了 TYLCV 病毒, 另有 3 个未感染, 说明辣椒上除了 TYLCV 之外, 可能还有其他病毒的感染。

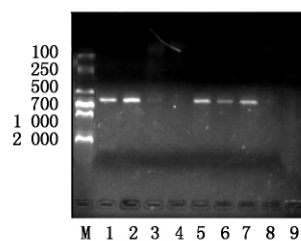
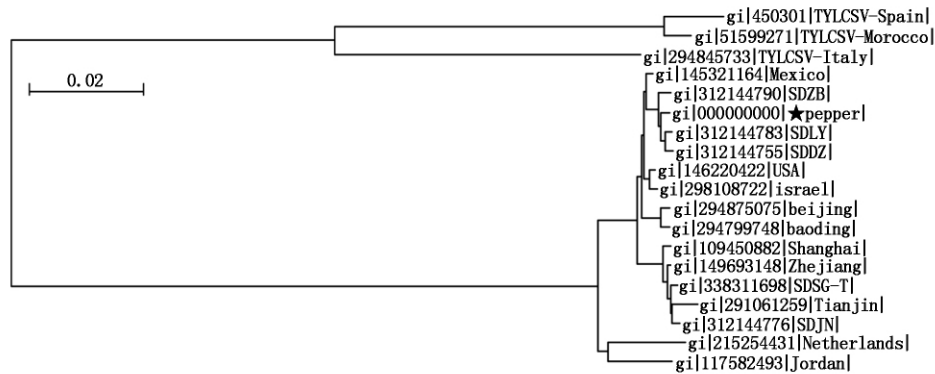


图 3 分株进行辣椒 TYLCV 检测的 PCR 产物电泳

Fig. 3 The PCR results for TYLCV detection on different pepper plants

### 2.4 进化树分析

从进化树 (图 4) 可以看出, 我们克隆的 TYLCV 与山东临沂、德州、淄博、及墨西哥来源的病毒聚为一类, 浙江、上海、天津、济南来源的病毒及寿光稻田的病毒聚为一类, 北京和保定的聚在一起, 荷兰和约旦的与我国的病毒距离很远, TYLCV 与我国的 TYLCV 距离也很远。



★代表作者克隆的 TYLCV 序列。

★ Means the sequence of TYLCV clone by authors.

图4 不同来源的 TYLCV 及 TYLCSV 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of TYLCV and TYLCSV from different regions

## 2.5 辣椒 TYLCV 的突变点分析

相对于山东临沂的序列,我们克隆的 TYLCV 基因组共有 9 个突变点,其中 8 个位于编码框,VI 基因在 308~1 084 区间内,有 2 个突变点,其中 337 位(T/C)突变发生在密码子第 2 位,将一个 Thr 变成 Ile,另一个突变点并不改变氨基酸的编码;V2 基因在 148~498 区间,也发生了 2 个点突变,其中一个不改变氨基酸的编码,另一个在 278 位(A/G)将一个 Gly 变为 Asp。CI 基因 1 542~2 615 区间内,发生了 4 个点突变,其中 3 个都不改变氨基酸的编码,在 1 691 位(T/A)突变位于密码子第 2 位,将一个 Phe 改变为 Tyr;C2 基因在 1 226~1 633 区间内,仅一个点突变,未改变氨基酸的编码;C3 基因在 1 081~1 485 区间内,仍是 C2 内的那个突变点 1 307 位(G/A)在此处位于密码子的第 2 位,将一个 Leu 变成 Ser;C4 基因在 2 171~2 464 区间内,没有突变点。

通过突变点分析可以看出,突变一般发生在密码子的第 3 位,在读码框不同的重叠基因内,一般突变点会出现在一个基因的密码子第 3 位,在另一个基因内一般会改变读码信息。

## 3 讨论

辣椒是易感染病毒病的蔬菜之一,病毒病感染可造成辣椒落花、落果、落叶。在我国生产上病毒病主要是一些 RNA 病毒,如黄瓜花叶病毒(CMV)、烟草花叶病毒(TMV)、马铃薯 Y 病毒(PVY)等<sup>[6]</sup>,TYLCV 病毒在我国辣椒上的发生鲜见报道。作为一种以烟粉虱为传播媒介的双生病毒<sup>[7]</sup>,TYLCV 基因组为 DNA,鉴定和防治应引起重视。以往对辣椒病毒病的鉴定往往是以 RNA 为材料,本试验发现 DNA 病毒也会引发辣椒病毒病。由于病毒感染引起的症状相似,从症状上尚不能确定危害主要是由

TYLCV 引起,还是由 RNA 病毒引起的。

Polston J E 研究认为,TYLCV 对辣椒不同基因型的侵染率为 54.5%<sup>[3]</sup>,对甜椒的侵染率仅为 16.7%,危害程度可能较轻<sup>[8]</sup>。但与 TYLCV 相似的番茄黄化曲叶撒丁尼亚病毒(TYLCSV)是一种病毒新种,其全基因组序列最早是 2003 年报道的(Reina J, GeneBank),该病毒与 TYLCV 有一致的基因结构和相似的大小,也是粉虱类传播,引起曲叶症状,进化树分析显示,与 TYLCV 遗传距离较远。2007 年在意大利首次发现<sup>[9]</sup>,2008 年就在当地保护地辣椒上爆发,使辣椒损失近 50%<sup>[10]</sup>。危害辣椒的种 TYLCSV 和危害番茄的种 TYLCV<sup>[11]</sup>可以通过粉虱在 2 个物种间乃至杂草间<sup>[12]</sup>相互传播,也可以通过贸易等跨国传播,因此,对辣椒上的曲叶病毒病应引起重视。

进化树的分析还提示,山东多个地区已经有多 个变异的病毒株系,在相同的地区病毒序列有时差异很大,推测这些病毒可能来源不同,一部分可能最初源自墨西哥或美国,通过某种传播途径进入山东,再继续变异;也有一些是早年进入国内,经过变异,再继续传播,但危害最大的宿主还是番茄。从遗传距离分析,TYLCV 从荷兰传入的可能性较小。

病毒的基因组一般较为紧凑,多具有重叠基因,在本研究中,复制相关基因 CI 和外壳蛋白基因 VI, V2 都有单个编码信息的改变,但可能并不改变病毒的生活周期和侵染能力。2011 年金凤眉等<sup>[13]</sup>报道,天津地区的 TYLCV 在 C2 基因上有 2 处氨基酸编码信息的改变在国内外病毒内呈规律性的变化。本研究发现,1 307 位 G/A 突变应该是实质性的,许多来源不同的番茄 TYLCV 在这一位点都是 A,这个 G 改变使 C3 基因上的一个疏水氨基酸变为亲水的丝氨酸。

## 参考文献:

- [1] Cohen S ,Harpaz I. Periodic rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector ,the tobacco white-fly( *Bemisia tabaci* Gennadius) [J]. Entomol Exp Appl , 1964 ,7: 155 – 166.
- [2] Zhang Y ,Zhu W ,Cui H ,et al. Molecular identification and the complete nucleotide sequence of TYLCV isolate from Shanghai of China [J]. Virus Genes 2008 ,36( 3) : 547 – 551.
- [3] Ber R ,Navot N ,Zamir D ,et al. Infection of tomato by the tomato yellow leaf curl virus: susceptibility to infection , symptom development ,and accumulation of viral DNA [J]. Arch Virol ,1990 ,112( 3/4) : 169 – 180.
- [4] Polston J E ,Cohen L ,Sherwood T A ,et al. Capsicum species: symptomless hosts and reservoirs of tomato yellow leaf curl virus [J]. Phytopathology ,2006 ,96( 5) : 447 – 452.
- [5] Saunders K ,Bedford I D ,Bridson R W ,et al. A unique virus complex causes Ageratum yellow vein disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A 2000 ,97( 12) : 6890 – 6895.
- [6] 吴丽君 ,吴智明. 辣椒抗病毒病育种研究进展 [J]. 中国种业 2008( 11) : 17 – 18.
- [7] Jun O ,Toshio K ,Fumihiko T , et al. Co-transmission of Tomato yellow leaf curl virus( TYLCV) -Mld and TYLCV-IL by the whitefly *Bemisia tabaci* [J]. Journal of General Plant Pathology 2011 ,77( 1) : 54 – 59.
- [8] Crespi S ,Accotto G P ,Caciagli P ,et al. Use of digoxigenin-labelled probes for detection and host-range studies of tomato yellow leaf curl geminivirus [J]. Res Virol ,1991 , 142( 4) : 283 – 238.
- [9] Fanigliulo A ,Pacella R ,Comes S ,et al. First record of tomato yellow leaf curl Sardinia virus( TYLCSV) on pepper in Italy [J]. Commun Agric Appl Biol Sci 2008 ,73( 2) : 297 – 302.
- [10] Comes S ,Fanigliulo A ,Pacella R ,et al. Severe outbreak of tomato yellow leaf curl Sardinia virus on pepper in southern Italy [J]. Commun Agric Appl Biol Sci 2009 , 74( 3) : 913 – 916.
- [11] Morilla G ,Janssen D ,Garc a-Andrs S ,et al. Pepper ( *Capsicum annuum*) Is a Dead-End Host for Tomato yellow leaf curl virus [J]. Phytopathology ,2005 ,95 ( 9) : 1089 – 1097.
- [12] Salati R ,Nahkla M K ,Rojas M R ,et al. Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: Characterization of an Infectious Clone ,Virus Monitoring in Whiteflies and Identification of Reservoir Hosts [J]. Phytopathology 2002 ,92( 5) : 487 – 496.
- [13] 金凤媚 ,薛 俊 ,郑艳红 等. 天津地区番茄黄化曲叶病毒 DNA-A 的克隆和序列分析 [J]. 华北农学报 , 2011 26( 1) : 58 – 62.