

邯郸、保定番茄黄化曲叶病毒检测及其 DNA-A 全序列分析

李志勇^{1,2}, 谢夏青³, 李兴红², 董志平¹

(1. 河北省农林科学院 谷子研究所 河北 石家庄 050031; 2. 北京市农林科学院 植物保护环境保护研究所 北京 100089;

3. 南京农业大学 生命学院 江苏 南京 210095)

摘要: 2009 年河北保定和邯郸地区番茄受到一种毁灭性的新病毒危害, 对两地 5 个病样检测, 结果均为番茄黄化曲叶病毒, 但未检测到卫星 DNA β 分子。对保定和邯郸分离物 DNA-A 全长进行克隆测序, 两分离物 DNA-A 全长均为 2 781 bp, 这两个分离物 DNA-A 全长与其他地区番茄黄化曲叶病毒分离物同源性的 98.6% ~ 99.8%, 发现其基因间隔区变异稍大, 与其他地区番茄黄化曲叶病毒分离物同源性为 96.2% ~ 99.7%。邯郸分离物与山东分离物(SD-2) 亲缘关系最近, 保定分离物与南京分离物(JSNJ1) 亲缘关系最近。聚类分析表明, 中国几个省市分离物有很高的同源性, 但可以分为两个分支, 邯郸和保定的分离物分别在两个分支内。

关键词: 番茄黄化曲叶病毒; 分子检测; 序列分析; DNA-A

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)03-0064-04

Molecular Detection and Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of TYLCV Isolates from Handan and Baoding

LI Zhi-yong^{1,2}, XIE Xia-qing³, LI Xing-hong², DONG Zhi-ping¹

(1. Millet Institute of Agricultural Academy of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, China;

2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100089, China; 3. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A new virus disease occurred in Handan and Baoding district in 2009 which caused heavy loss to tomato production. Five samples showing TYLCV-like symptom were collected and the PCR detection result showed that they were tomato yellow leaf curl virus. The DNA β were not detected from all the samples. Comparison of DNA sequence of Handan and Baoding isolate showed the complete DNA-A sequence of Handan and Baoding were 2 781 bp and shared high sequence identity with other isolates from China between 98.6% and 99.8%. The intergenic region had the highest diversity compared to other regions and shared sequence identity with other isolates from China between 96.2% and 99.7%. Handan isolate was most closely related to Shandong isolate(SD-2), while Baoding isolate was most closely related to the Nanjing isolate(JSNJ-1). Phylogenetic analysis based on the DNA-A sequence showed TYLCV isolates from China were classed into two branches and Handan and Baoding isolates belonged to different branches.

Key words: Tomato yellow leaf curl virus; Molecular detection; Sequence analysis; DNA-A

番茄为河北省主要的蔬菜作物, 2009 年以来在河北邯郸、保定和衡水等地区发现一种新的番茄病毒, 经初步检测为番茄黄化曲叶病毒。该病害对番茄的生产造成毁灭性危害, 造成大面积的番茄大棚

拉秧或毁种, 仅邯郸地区该病毒造成的直接经济损失近 1 亿元。番茄黄化曲叶病毒于 2006 年在上海首次发现^[1], 接着在广东、云南、浙江、江苏、山东等地区爆发成灾^[2-5]。该病毒为双生病毒科(Gemini-

收稿日期: 2011-02-15

基金项目: 国家“863”计划(2008AA100905-21); 北京市自然科学基金(6052010)

作者简介: 李志勇(1976-), 男, 河北邯郸人, 博士, 助理研究员, 主要从事茄果类病毒研究。

通讯作者: 李兴红(1962-), 女, 河北乐亭人, 研究员, 硕士, 主要从事园艺作物病害研究。

董志平(1964-), 女, 河北平乡人, 研究员, 硕士, 主要从事分子植物病理学研究。

viridae) 菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*) ,是由蚜粉虱传毒,大多数菜豆金色花叶病毒属病毒基因组含两个组分,少数为仅含一条 2.8 kb DNA-A^[6]。近年来在一些单组分的菜豆金色花叶病毒属发现了卫星 DNA β 分子,并认为是致病因子^[7]。本研究对河北邯郸和保定地区采集的疑似病样进行检测,并且对病毒基因组 DNA-A 进行测序,以明确这两个地区病毒变异,为今后转基因育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂与菌株

Ex *Taq* 酶、DNA Marker 和 pMD-19 T 载体购于大连宝生物公司,大肠杆菌 JM109 本实验室保存,引物合成与测序在上海生工。

1.2 病样采集

2009 年从河北邯郸和保定采集具有典型番茄黄化曲叶病毒症状的病叶。共从邯郸采集 3 个样品,在保定采集 2 个样品。

1.3 PCR 扩增、克隆、测序及 DNA β 组分检测

采用常规的 CTAB 方法提取邯郸和保定病叶 5 个样品的病叶总 DNA,根据双生病毒共同区及外壳蛋白基因的保守序列设计一对兼并引物 PA(5'-TA-ATATTACCKGWKGVCCSC-3') 与 PB(5'-TGGACYT-TRCAWGGBCCTTCACA-3'),用于扩增病毒 DNA-A 部分序列^[8]。PCR 反应体系:模板 1.0 μ L,10 μ mol/L 引物各 1 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L,10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,5 U Ex *Taq* 酶 0.5 μ L,补水至 25 μ L。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C,10 min。根据兼并引物 PA 与 PB 扩增邯郸和保定分离物测序结果,用软件 Primer5.0 设计引物 TYLCV-Fu1(5'-AGCCCAATACATT-GGGCCACGA-3') 与 TYLCV-Fu2(5'-CGTAAGTTTC-CTCAACGGACTGC-3'),用于扩增邯郸和保定分离物 DNA-A 近全长。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,51 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C,10 min。

根据卫星 DNA β 保守序列设计一对引物 β 01(5'-GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC-3') 与 β 02(5'-GGTACCTACCTCCCCAGGGGTACAC-3'),用于扩增卫星 DNA β 分子。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C,10 min。把扩增产物电泳后回收目的条带,与 PMD19-T 载体连接后热激转化到大肠杆菌 JM109 中,挑菌 PCR 法检测阳性克隆,把阳性克隆送到上海生工进行测序。

1.4 序列分析

把邯郸和保定番茄黄化曲叶病毒分离物 2 次测序结果拼接起来,得到 2 个分离物 DNA-A 全序列,把邯郸和保定番茄黄化曲叶病毒 DNA-A 全序列提交 Genbank,获得其登录号。通过 NCBI 网站 BlastN 比较这两个分离物与其他番茄黄化曲叶病毒分离物的同源性。用 DNAMAN 软件分析比较邯郸和保定 2 个分离物 DNA-A 中各个基因与中国其他分离物的同源性,并进行聚类分析研究。

2 结果与分析

2.1 邯郸和保定番茄黄化曲叶病毒分离物检测与 DNA-A 全序列测定

邯郸和保定温室大棚种植的番茄普遍感染番茄黄化曲叶病毒,这两个地区番茄表现的典型症状为叶片变小,边缘黄化卷曲,不结果或果实很小,丧失经济价值(图 1)。用兼并引物 PA 和 PB 扩增邯郸和保定分离物,均可以扩增出 500 bp 左右的目的条带,而健康对照未扩增出任何片段(图 2)。测序后比较发现邯郸 3 个分离物同源性都为 100%,并且保定 2 个分离物同源性也为 100%。引物 TYLCV-Fu1 与 TYLCV-Fu2 扩增出邯郸和保定分离物 DNA-A 近全长 2.8 kb 片段(图 3)。这两个分离物与其他番茄黄化曲叶病毒同源性很高为 97%~99%,这两个分离物同源性为 98%。引物 β 01 与 β 02 在 5 个邯郸和保定的样品中未扩增出任何条带。

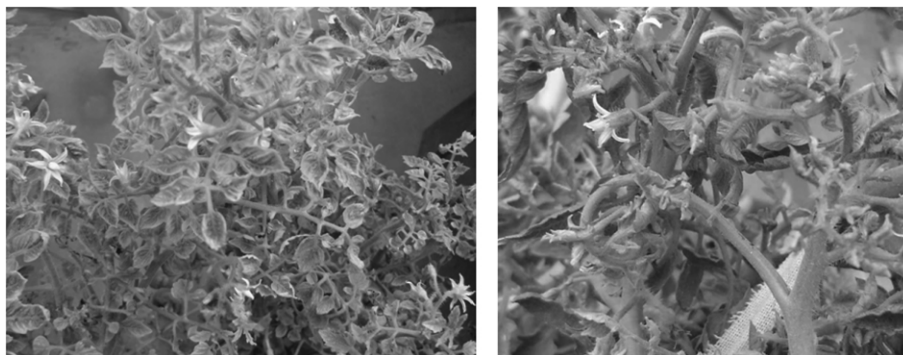
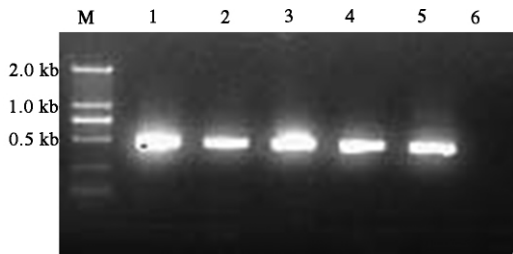


图 1 田间番茄感染黄化曲叶病毒后症状

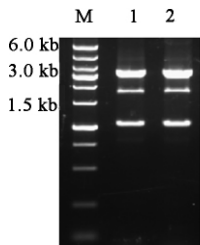
Fig. 1 Symptoms of tomato infected by TYLCV in field



M. DL2000; 1~3. 邯郸病样; 4~5. 保定病样; 6. 健康番茄。
M. DL2000; 1~3. Handan infected samples; 4~5. Baoding infected samples; 6. Health tomato.

图2 田间病样的 PCR 检测

Fig.2 PCR detection of infected samples and control



M. WR6000; 1. 邯郸分离物; 2. 保定分离物。
M. WR6000; 1. Handan isolates; 2. Baoding isolates.

图3 PCR 法扩增保定和邯郸分离物 DNA-A 近全长

Fig.3 Amplification of nearly complete DNA-A fragment of Handan and Baoding isolates

2.2 序列分析与聚类研究

邯郸和保定番茄黄化曲叶病毒分离物两次测序结果拼接起来,结果表明,两分离物 DNA-A 全长均为 2 781 bp,把这 2 个病毒基因组全长提交到 Genbank,它们在 Genbank 上登录号分别为 GU951437 和 GU951436。具有典型的番茄黄化曲叶病毒基因组特征,病毒正义链编码 2 个开放阅读框(AV1 和 AV2),反义链编码 4 个开放阅读框(AC1、AC2、AC3 和 AC4),以及这些开放阅读框之间的基因间隔区(IR)。邯郸分离物与安徽和山东的番茄黄化

曲叶病毒分离物源性最高,保定分离物与江苏南京番茄黄化曲叶病毒源性最高。中国各个番茄黄化曲叶病毒分离物 DNA-A 全长源性较高,源性为 98.6%~99.8%。基因间隔区相对 DNA-A 其他部分变异较大,源性为 96.2%~99.7%。各个病毒分离物 AV2 区源性为 99.4%~100%,AV1 区源性 97.9%~100%,AC1 区源性为 98.9%~99.9%,AC2 区源性为 97.8%~99.8%,AC3 区源性为 97.8%~99.8%,AC4 区源性为 99.0%~100%(表 1)。基于番茄黄化曲叶病毒 DNA-A 全序列,用 DNAMAN 软件构建了邯郸、保定分离物与中国其他地区分离物的进化聚类树。中国的 15 个番茄黄化曲叶病毒分离物聚为两支,邯郸和保定分离物分别在不同分支内(图 4)。

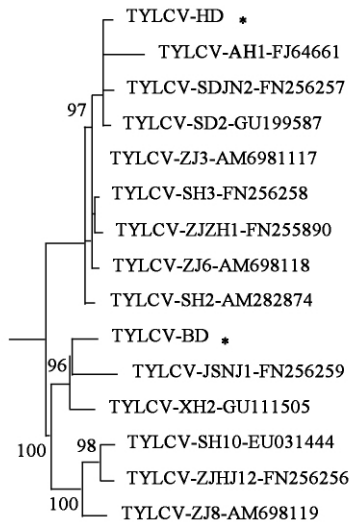


图4 基于 DNA-A 建立的邯郸(TYLCV-HD)、保定分离物(TYLCV-BD)与中国其他 TYLCV 聚类树

Fig.4 Phylogenetic tree of DNA-A of Handan and Baoding isolates and other TYLCV from China

表1 邯郸分离物与国内其他番茄黄化曲叶病毒 DNA 及各编码基因核苷酸序列同源性

Tab.1 Percentages of nucleotide sequence identities between Handan isolate and other TYLCV from China

株系 Strains	登陆号 Accession No.	DNA-A	IR	AV2	AV1	AC1	AC2	AC3	AC4
AH1	FJ646611	99.5	96.2	100	100	99.9	99.8	99.8	100
SD2	GU199587	99.8	99.7	100	100	99.9	99.3	99.3	100
ZJ3	AM698117	99.7	99.0	100	100	99.8	99.8	99.5	100
SH3	FN256258	99.6	98.4	99.7	99.7	99.8	99.5	99.3	100
ZJ6	AM698118	99.6	98.4	100	99.9	99.7	99.5	99.5	100
SH2	AM282874	99.6	98.4	100	100	99.6	99.5	99.5	100
JSNJ1	FN256259	98.6	97.4	99.7	97.9	99.2	99.0	98.8	99.0
SH10	EU031444	98.7	96.5	99.4	99.4	99.0	97.8	97.8	99.3
ZJ8	AM698119	98.7	96.2	99.7	99.1	99.2	98.5	98.3	99.7
BD	GU951436	98.8	96.5	99.4	99.5	98.9	98.8	98.8	99.0

3 讨论

由于番茄黄化曲叶病毒大多存在于植物韧皮

部,叶内病毒含量很低,不易通过酶联免疫方法检测出。PCR 方法具有很高的灵敏性,并且引物 PA 和 PB 是根据双生病毒保守区域设计的兼并引物,不仅

可以方便地检测番茄黄化曲叶病毒,还可以检测其他的烟粉虱传播的双生病毒,非常适合双生病毒的田间检测。一些单组分的菜豆金色花叶病毒属病毒常带有卫星 DNA β 分子,但用 PCR 方法未发现邯郸与保定的黄化曲叶病毒样品带有 DNA β 组分,这与周雪平^[3] 研究中国其他地区番茄黄化曲叶病毒的结果一致。相对于病毒其他部分,基因间隔区变异稍大,有可能是这个区间不编码功能基因,选择压力较小的原因。邯郸和保定分离物虽然地理位置很近,但它们亲缘关系并不是最近的,同样浙江的 3 个分离物也在不同分支上。番茄黄化曲叶病毒原来在热带或亚热带发生,但随着气候的变暖和我国北方大力发展设施蔬菜,为传毒烟粉虱提供了越冬场所,导致该病害在我国北方河北爆发成灾。目前河北种植的番茄品种均对该病毒敏感,今后应推广一些带有 Ty-1、Ty-2 和 Ty-3 抗性基因的番茄品种。番茄黄化曲叶病毒中间寄主很多,要对该病毒的田间寄主进行普查,同时进行田间杂草的清除和对传毒介体烟粉虱进行控制。由于双生病毒容易重组造成更大流行,以后应加强对该病毒的监控。

参考文献:

- [1] Wu J B, Dai F M, Zhou X P. First report of tomato yellow leaf curl virus in China [J]. Plant Disease, 2006, 90: 1359.
- [2] Zhang Y P, Zhu W M, Cui H M, *et al.* Molecular identification and the complete nucleotide sequence of TYLCV isolate from Shanghai of China [J]. Virus Gene, 2008, 36: 547 – 551.
- [3] Zhang H, Gong H R, Zhou X P. Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China [J]. Virus Gene, 2009, 39: 249 – 255.
- [4] Mugiira R B, Liu S S, Zhou X P. Tomato yellow leaf curl virus and tomato leaf curl Taiwan virus invade South-east coast of China [J]. Journal of Plant Pathology, 2008, 156: 217 – 221.
- [5] 季英华, 熊如意, 程兆榜, 等. 江苏省番茄黄化曲叶病的病原分子诊断 [J]. 园艺学报, 2008, 35(12): 1815 – 1818.
- [6] Boulon M. Geminivirus: major threats to world agriculture [J]. Annals of Applied Biology, 2003, 142: 142 – 143.
- [7] 徐幼平, 周雪平. 侵染广西烟草的中国番茄黄化曲叶病毒及其伴随的卫星 DNA 分子的基因组特征 [J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 358 – 362.
- [8] 谢 艳, 张仲凯, 李正和, 等. 粉虱传双生病毒的 TAS-ELISA 及 PCR 快速检测 [J]. 植物病理学报, 2002, 32(2): 182 – 186.

[1] Wu J B, Dai F M, Zhou X P. First report of tomato