

河南省番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定及序列分析

黄 狮¹, 纠 敏^{1*}, 李 萌², 汪伦记¹, 彭 红³, 李净净¹, 王浩权¹

(1. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 洛阳出入境检验检疫局, 河南 洛阳 471003; 3. 河南省植保植检站, 河南 郑州 450002)

摘要: 从河南省 9 个地市蔬菜大田内采集到 49 份表现番茄黄化曲叶病毒病 (tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) 典型黄化及曲叶症状的番茄样品, 为了明确引起 TYLCD 的病原, 利用双生病毒简并引物 PA/PB 对 49 份番茄样品进行 PCR 检测。结果表明, 从 32 份样品中扩增得到约 500 bp 的特异性片段, 阳性检出率为 65.3%。随机选择番茄 HNAY3、HNKF2、HNXY1、HNLY1、HNNY1、HNXC2、HNXX1 及 HNSQ1 样品进行 DNA-A 全基因组扩增及克隆测序, 结果表明, DNA-A 全长均为 2 781 nt, 具有典型的双生病毒科 (*Geminiviridae*) 菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*) 病毒的基因组结构特征, 共编码 6 个 ORFs。聚类分析表明, 这 8 个分离物与我国已报道的番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 各分离物亲缘关系较近。这些结果表明, 引起河南省大田番茄上 TYLCD 的病原是 TYLCV。

关键词: 河南省; 番茄; 番茄黄化曲叶病毒; 序列分析

中图分类号: S436.412.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)07-0085-05

Molecular Identification and Sequence Analysis of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from Henan Province

HUANG Shi¹, JIU Min^{1*}, LI Meng², WANG Lun-ji¹, PENG Hong³,
LI Jing-jing¹, WANG Hao-quan¹

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;
2. Luoyang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Luoyang 471003, China;
3. Henan Plant Protection and Quarantine Station, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Using PCR, 49 tomato samples displaying tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) symptoms collected from nine cities in Henan province were detected with degenerate primers PA/PB for geminiviruses in order to clear the pathogen of TYLCD. The results showed that a specific fragment of about 500 bp was amplified from 32 samples. The positive detection rate was 65.3%. DNA-A whole genome was amplified, cloned and sequenced from randomly selected HNAY3, HNKF2, HNXY1, HNLY1, HNNY1, HNXC2, HNXX1 and HNSQ1 samples. The length of DNA-A from all samples was 2 781 nt, coding six ORFs, which showed typical virus genome structure of the genus *Begomovirus* of *Geminiviridae*. The eight isolates had closer genetic relationship with tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) isolates reported previously in China. These results suggest that the pathogen of TYLCD emerging in Henan province is TYLCV.

Key words: Henan; tomato; tomato yellow leaf curl virus (TYLCV); sequence analysis

收稿日期: 2013-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101443); 河南省科技攻关计划项目 (122102110197)

作者简介: 黄 狮 (1987-), 男, 河南洛阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 烟粉虱与双生病毒的互作机制。

E-mail: 23524954@qq.com

* 通讯作者: 纠 敏 (1971-), 女, 河南杞县人, 副教授, 博士, 主要从事烟粉虱与双生病毒的互作机制研究。

E-mail: jiumin0912@163.com

番茄黄化曲叶病毒病 (tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) 是世界许多地区番茄生产中的一种毁灭性病害, 20 世纪 30 年代在以色列首次发现^[1]。发病的植株叶片边缘呈黄色、卷曲, 叶脉褪绿, 叶肉变厚, 叶片变小, 严重时植株矮化萎缩, 一旦发生, 番茄产量会受到很大的损失, 严重时造成绝产。目前番茄黄化曲叶病毒病在非洲、欧洲、大洋洲、中东地区、东南亚地区、东北亚地区、中美洲、北美洲等地均有发生^[2-3], 给热带和亚热带地区的番茄生产造成了严重损失。近年来, 该病在我国由南向北快速扩展, 在浙江、江苏、山东、安徽、河北、天津、北京等地均有发现, 危害严重^[4-10]。

TYLCD 的病原十分复杂, 全世界已报道可侵染番茄的双生病毒至少有 57 种^[11-13]。在我国, 番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)^[12,14-15]、中国番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV)^[16-17]、台湾番茄曲叶病毒 (tomato leaf curl Taiwan virus, ToLCTWV)^[14,18]、中国番木瓜曲叶病毒 (papaya leaf curl China virus, PaLCuCNV)^[19]、烟草曲茎病毒 (tobacco curly shoot virus, TbCSV)^[20] 和泰国番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl Thailand virus, TYLCTHV)^[21] 等 10 多种双生病毒均可侵染番茄引起黄化和曲叶症状。以上病毒均为双生病毒科 (*Geminiviridae*) 菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*) 成员。该属大多数病毒为双组分 (DNA-A 和 DNA-B), 具 2 条闭合环状单链 DNA 分子; 少数病毒为单组分, 有的单组分双生病毒还伴随卫星 DNA β 分子并与其形成双生病毒/DNA β 病毒复合体^[11]。

自 2009 年以来, 在河南省的番茄主产区陆续发现植株表现矮化、叶片黄化及卷曲等症状, 与 TYLCD 症状极为相似。近几年来, 有关河南省番茄黄化曲叶病毒分离物的检测鉴定已有诸多报道^[22-25], 为了全面明确河南省番茄黄化曲叶病毒病原株系、基因组变异及可能来源, 于 2012—2013 年在河南省 9 个地市采集番茄黄化曲叶病毒病疑似病株, 进行病毒检测和部分样品的病毒基因组克隆及分析, 旨在明确引起河南 TYLCD 的病毒种类及其进化起源, 为进一步开展该病害的防控研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集

2012—2013 年在河南省郑州、开封、洛阳、南阳、信阳、许昌、商丘、安阳及新乡 9 个地区的大田番茄种植区采集表现植株矮缩、顶叶卷曲黄化的番茄植株叶片, 整理后放 4 °C 冰箱备用。

1.2 叶片总 DNA 提取

叶片总 DNA 的提取参考刘玉乐等^[16]的方法。即称取 10 mg 新鲜番茄病叶, 加 100 μ L 0.5 mol/L NaOH, 匀浆后低速离心, 上清液用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 值 8.0) 稀释 100 倍, 取 1 μ L 作模板进行 PCR 扩增。

1.3 PCR 扩增、克隆和序列测定

采用谢艳等^[26]报道的检测粉虱传双生病毒的简并引物 PA (5'-TAATATTACCKGWKGVCSC-3') 和 PB (5'-TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA-3') (K=G 或 T; W=A 或 T; V=A、C 或 G; S=C 或 G; Y=C 或 T; R=A 或 G; B=C、T 或 G) 进行 PCR, 扩增双生病毒基因间隔区和部分外壳蛋白 (CP) 基因约 500 bp 的特异片段, 之后进行克隆和序列测定。根据测序及序列分析结果, 利用 DNAMAN 6.0 软件设计扩增 TYLCV 近全长序列的特异性引物 HN-F (5'-AACAGATTCAGGGAATTCATTTAG-3') 和 HN-R (5'-CGGAAGCCAGAATATACAGAATG-3'), 扩增长度 2.5 kb。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用凝胶回收试剂盒回收纯化, 克隆到 pMD18-T 载体 (TaKaRa) 上, 送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。利用 DNAMAN 6.0 软件拼接全基因组序列。上述各引物均由上海 Sangon 生物工程有限公司合成, PCR 扩增以健康植株为阴性对照。

1.4 序列分析

DNA 序列用 DNAMAN 6.0 进行处理和分析。序列比对采用 NCBI 网站序列比对工具 BLAST 程序 nucleotide blast, 多序列比较分析采用 Clustal W, 进化树构建采用 MEGA 5.05 的邻接法 (Neighbor-Joining)。用于 DNA 序列比较和进化分析的其他序列见表 1。

表 1 用于系统发育分析的番茄黄化曲叶病毒分离物

序号	分离物名称	缩写	分离年份	来源	序列登录号
1	北京分离物	TLYLV-BJ3	2010	北京	GU983859.1
2	河北分离物	TYLCV-LF	2011	廊坊	JF833036.1
3	上海分离物	TYLCV-SH2	2006	上海	AM282874.1
4	浙江分离物	TYLCV-ZJ3	2008	浙江	AM698117.1

续表 1 用于系统发育分析的番茄黄化曲叶病毒分离物

序号	分离物名称	缩写	分离年份	来源	序列登录号
5	山东分离物	TYLCV-SDZB	2011	淄博	GQ352537.1
6	山西分离物	TYLCV-SX96	2013	山西	JX997799.1
7	河南分离物	TYLCV-HNQX	2012	杞县	JQ038235.1
8	安徽分离物	TYLCV-AH1	2009	安徽	FJ646611.1
9	新疆分离物	TYLCV-KSCT016	2012	新疆	JX456638.1
10	天津分离物	TYLCV-TJ	2010	天津	GU563330.1
11	广东分离物	TYLCGDV	2006	广东	AY602166.1
12	USA 分离物	TYLCV-USA	2010	美国	EF539831.1
13	Israel Australia 分离物	TYLCV-Israel Australia	2010	澳大利亚	GU178820.1
14	Israel Japan 分离物	TYLCV-Israel Japan	2010	日本	AB192966.1
15	Baja California 分离物	TYLCV-Baja	2010	墨西哥	HM459851.1
16	KISR 分离物	TYLCV-KISR Kuwait	2011	科威特	JF451352.1
17	Thailand 分离物	TYLCTHV-Thailand	2005	泰国	X63015.1
18	Netherlands 分离物	TYLCV-Netherlands	2010	荷兰	FJ439569.1
19	Egypt 分离物	TYLCV-Egypt	2006	埃及	AY594174.1
20	Cuba 分离物	TYLCV-Cuba	2005	古巴	AJ223505.1
21	Iran 分离物	TYLCV-Iran	2009	伊朗	AJ132711.1
22	Mild Jordan 分离物	TYLCV-Mild Jordan	2006	约旦	EF054894.1

2 结果与分析

2.1 PCR 检测结果及 DNA-A 序列分析

以提取的番茄叶片总 DNA 为模板,利用双生病毒简并引物 PA/PB 对采集的 49 份样品进行 PCR 检测,其中 32 份样品扩增得到约 500 bp 特异性片段,阳性检出率为 65.3% (表 2)。随机选取 HNAY3、HNKF2、HNXY1、HNLY1、HNNY1、HNXC2、HNXX1 及 HNSQ1 样品进行 DNA-A 全序列扩增及克隆测序,结果表明,DNA-A 全长均为 2 781 nt,这些分离物之间 DNA-A 序列同源性均在 98.3% 以上(表 3),推测是同一种病毒的不同分离物。

表 2 番茄样品的 PCR 检测结果

采集地点	采集时间/(年·月)	样品号	PCR 检测阳性样品数/份
郑州	2012-08	HNZZ1-7	7
安阳	2012-08	HNAY1-6	4
开封	2012-08	HNKF1-5	3
洛阳	2012-08、2013-08	HNLY1-8	8
南阳	2012-08	HNNY1-6	2
商丘	2012-08	HNSQ1,2	2
新乡	2012-08	HNXX1-4	2
信阳	2012-08	HNXY1-4	2
许昌	2012-08、2013-08	HNXC1-7	2
合计/份		49	32

表 3 河南省部分 TYLCV 分离物与已报道的 TYLCV 分离物的同源性比较

TYLCV 分离物	HNAY3	HNKF2	HNLY1	HNNY1	HNSQ1	HNXX1	HNXY1	HNXC2
HNAY3	100							
HNKF2	99.4	100						
HNLY1	98.6	98.6	100					
HNNY1	98.7	98.7	99.6	100				
HNSQ1	98.7	98.7	99.6	99.7	100			
HNXX1	98.6	98.6	99.2	98.3	99.3	100		
HNXY1	98.9	98.8	99.0	99.1	99.1	99.0	100	
HNXC2	98.6	98.5	98.9	99.0	99.0	99.0	99.3	100
TYLCV-Israel	99.2	99.2	98.7	98.8	98.8	98.7	98.9	98.7
TYLCV-Iran	90.1	90.3	90.4	90.4	90.4	90.3	90.5	90.4
TYLCV-Mild	91.6	91.6	91.5	91.7	91.6	91.5	91.7	91.7

2.2 DNA 全序列特征及河南省优势株系初步分析

DNA-A 全序列具有典型的双生病毒科菜豆金色花叶病毒属病毒的基因组结构特征,共编码 6 个 ORFs。其中,病毒链编码 2 个 ORFs,即 AV1 (308—1 084 nt,编码 CP)和 AV2 (148—498 nt,编码与病毒移动相关的蛋白),互补链编码 4 个 ORFs,分别为 AC1 (1 542—2 615 nt,编码复制酶)、AC2 (1 226—1 633 nt,编码转录激活蛋白)、AC3 (1 081—1 485 nt,编码复制增强蛋白)和 AC4 (2 171—2 464 nt,编码复制或转录调控因子)。在基因 AC1 与 AV2 之间有 313 nt 的基因间隔区,该区含有保守序列 TAATATTAC、TATA box、正向重复序列 GGTGTCT。

将 8 个分离物全序列与 NCBI 上登录的 TYLCV 分离物进行同源性比对(表 3),发现这 8 个分离物与 TYLCV-Israel 株系基因组序列同源性非常高,均在 98.7% 以上,与 TYLCV-Mild 株系、TYLCV-Iran 株系基因组序列同源性较低,均在 92% 以下。因此认为,河南省的 8 个分离物属于 TYLCV-

Israel 株系。

2.3 河南省 TYLCV 分离物与其他 TYLCV 分离物的分子进化分析

为了进一步了解河南省 TYLCV 分离物的分类地位和可能来源,选择我国和世界其他地区已报道的引起番茄黄化曲叶病毒病的代表性病毒株系建立进化树(图 1)。经分析发现:HNXY1、HNSQ1、HNLY1 及 HNXX1 与北京分离物(TYLCV-BJ3)、河北分离物(TYLCV-LF)及河南分离物(TYLCV-HNXX)亲缘关系较近,形成一个独立分支;HNXC2 和 HNXY1 与新疆分离物(TYLCV-KSCT016)亲缘关系较近,形成另一个独立分支;最终 HNXY1、HNSQ1、HNLY1、HNXX1、HNXC2 和 HNXY1 这 6 个分离物形成一个大的分支。HNKF2 和 HNAY3 与前 6 个分离物亲缘关系较远,但与天津分离物(TYLCV-TJ)、山东分离物(TYLCV-SDZB)、安徽分离物(TYLCV-AH1)等亲缘关系较近,形成另一分支。由此可见,河南省分离物与我国已报道的 TYLCV 各分离物亲缘关系较近。

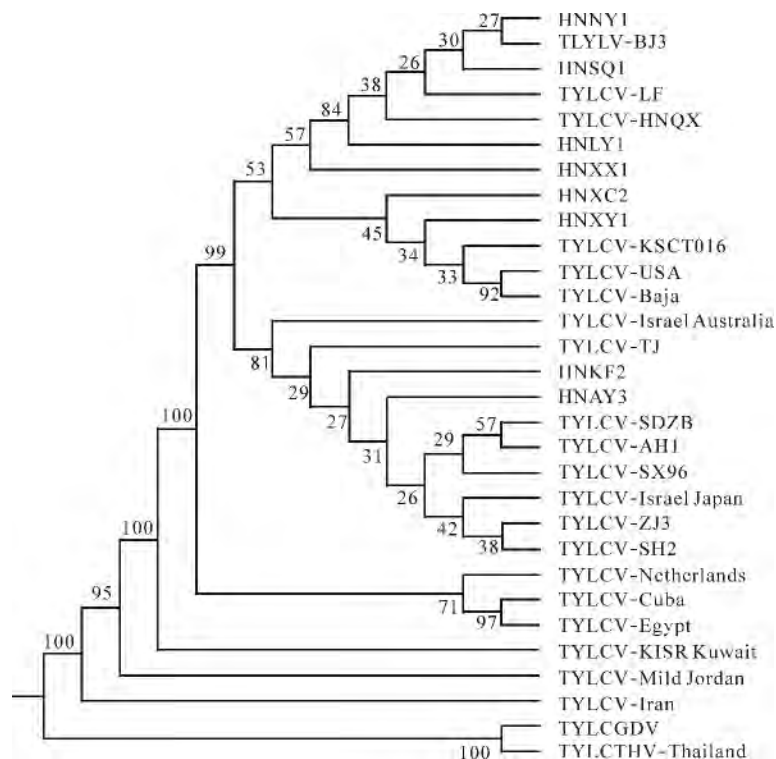


图 1 基于 DNA-A 全序列构建的 TYLCV 不同分离物进化树

3 结论与讨论

本研究利用双生病毒简并引物 PA/PB 对采集的 49 份番茄样品进行 PCR 检测,其中 32 份样品扩增得到约 500 bp 的特异性片段,阳性检出率为

65.3%。由于简并引物 PA/PB 本身的局限性,并不能保证其适合所有菜豆金色花叶病毒属成员,故有待采用滚环扩增等技术对其他病样进一步扩增。

TYLCV 的株系有 TYLCV-Israel、TYLCV-Mild、TYLCV-Iran 等^[7]。通过对 8 个 TYLCV 分

离物 DNA-A 基因组全序列同源性比对发现,8 个分离物与 TYLCV-Israel 株系同源性均高于 98.7%,远高于与其他株系的同源性(92%以下)。依据同种双生病毒基因组序列同源性大于 94%被认为是同一株系的不同变种^[13],认为河南省 8 个分离物均属于 TYLCV-Israel 株系,初步推测河南省番茄黄化曲叶病毒的优势株系是 TYLCV-Israel。

基于 TYLCV DNA-A 全序列构建河南省分离物与其他已报道各分离物的进化树,可以得知,河南省 8 个分离物中的 6 个(HNNY1、HNSQ1、HNLY1、HNXX1、HNKF2 和 HNAY3)均与其临近省份(河北、山东以及安徽)分离物亲缘关系较近,由此可见,河南省的病毒源可能是由其临近省份传入;而 HNXC2 和 HNX1 这 2 个分离物与新疆分离物(TYLCV-KSCT016)亲缘关系较近,形成另一个独立小分支,但二者的地理位置相差较远,可能是通过蔬菜或种苗调运传入。

在对侵染我国番茄的双生病毒种类鉴定过程中发现,侵染河南省番茄的病毒源除了 TYLCV 以外,还有 PaLCuCNV^[25]。但从目前的调查结果来看,PaLCuCNV 并未在河南省内快速传播及大暴发。本研究及已报道的结果表明,造成河南省番茄黄化曲叶病毒病的主要毒原是 TYLCV。值得关注的是,TYLCV 为粉虱传双生病毒(whitefly-transmitted geminiviruses, WTG),单头烟粉虱即可携带并成功传播该病毒。近年来,2 种入侵型烟粉虱 B 型和 Q 型在河南省大发生^[27],这无疑是该病毒病在河南省快速传播及危害加重的重要原因。

致谢:衷心感谢河南省各地市植保站在病毒样品采集过程中提供的诸多帮助!

参考文献:

- [1] Pico B, Diez M J, Nuez F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop II. The tomato yellow leaf curl virus: A review[J]. Scientia Horticulturae, 1996, 67(3/4): 151-196.
- [2] Varma A, Malath I V G. Emerging geminivirus problems. A serious threat to crop production[J]. Annals of Applied Biology, 2003, 142(2): 145-164.
- [3] Moriones E, Navas-Castillo J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide[J]. Virus Research, 2000, 71(1/2): 123-134.
- [4] 赵统敏, 余文贵, 周益军, 等. 江苏省番茄黄化曲叶病毒病发生与诊断初报[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 654-655.
- [5] 余文贵, 赵统敏, 杨玛丽, 等. 山东、安徽两省栽培番茄烟粉虱传双生病毒的 PCR 检测及序列分析[J]. 江苏农业科学, 2009, 25(4): 747-751.
- [6] 李志勇, 谢夏青, 李兴红, 等. 邯郸、保定番茄黄化曲叶病毒检测及其 DNA-A 全序列分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(3): 64-67.
- [7] 宋晰, 师迎春, 张世晨, 等. 北京地区番茄黄化曲叶病毒分离物测定及株系的初步鉴定[J]. 植物病理学报, 2013, 43(2): 113-119.
- [8] 郝永娟, 王万立, 金凤媚, 等. 天津市番茄黄化曲叶病毒病的发生与防治[J]. 天津农业科学, 2010, 16(2): 48-50.
- [9] 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.
- [10] 熊艳, 杨帅, 青玲, 等. 四川番茄黄化曲叶病原分子鉴定及变异分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(3): 477-484.
- [11] Glick E, Levy Y, Gafni Y. The viral etiology of tomato yellow leaf curl disease—A review[J]. Plant Protection Science, 2009, 45(3): 81-97.
- [12] Zhang H, Gong H R, Zhou X P. Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China[J]. Virus Genes, 2009, 39(2): 249-255.
- [13] Fauquet C M, Briddon R W, Brown J K, et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature[J]. Archives of Virology, 2008, 153(4): 783-821.
- [14] Mugiira R B, Liu S S, Zhou X P. Tomato yellow leaf curl virus and tomato leaf curl Taiwan virus invade southeast coast of China[J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156(4): 217-221.
- [15] 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 Genes, 2008, 36(3): 547-551.
- [16] 刘玉乐, 蔡健和, 李冬令, 等. 中国番茄黄化曲叶病毒——双生病毒的一个新种[J]. 中国科学(C 辑), 1998, 28(2): 148-153.
- [17] 都业娟, 许文博, 向本春, 等. 侵染新疆加工番茄的中国番茄黄化曲叶病毒 DNA-A 的基因组特征[J]. 植物病理学报, 2011, 41(4): 393-398.
- [18] 何自福, 虞皓, 毛明杰, 等. 中国台湾番茄卷叶病毒侵染引起广东番茄黄化卷叶病[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 119-123.
- [19] Zhang H, Ma X Y, Qian Y J, et al. Molecular characterization and infectivity of papaya leaf curl China virus infecting tomato in China[J]. 浙江大学学报: B 卷英文版, 2010, 11(2): 109-114.
- [20] 李正和, 李桂新, 谢艳, 等. 云南番茄黄化曲叶病是由烟草曲茎病毒引起的[J]. 病毒学报, 2002, 18(4): 355-361.
- [21] Jan F J, Green S K, Shih S L, et al. First report of tomato yellow leaf curl Thailand virus in Taiwan[J]. Plant Disease, 2007, 91(10): 1363.
- [22] 于云奇, 阮涛, 熊艳, 等. 河南郑州番茄黄化曲叶病的病原鉴定[C]//郭泽建, 李宝筠. 中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 2012.
- [23] 胡京昂, 刘雪霞, 蔡雨惠, 等. 河南周口番茄黄化曲叶病原分子鉴定[J]. 长江蔬菜, 2012, 20(1): 83-85.
- [24] 胡京昂, 郭竞, 崔杏春, 等. 番茄黄化曲叶病毒郑州分离物外壳蛋白基因的克隆与序列分析[J]. 河南农业科学, 2013, 42(9): 87-90.
- [25] 张辉. 侵染我国番茄双生病毒种类鉴定及致病性分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [26] 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.
- [27] Pan H P, Chu D, Ge D Q, et al. Further spread of and domination by Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q on field crops in China[J]. Journal of Economic Entomology, 2011, 104(3): 978-985.