

张俊,李伟,张静,等. 青岛烟草番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定与全基因组序列分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):50-53.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.012

青岛烟草番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定 与全基因组序列分析

张俊^{1,2}, 李伟³, 张静³, 申莉莉², 王凤龙², 章松柏¹, 杨金广²

(1. 长江大学农学院,湖北荆州 434025; 2. 中国农业科学院烟草研究所,山东青岛 266101;

3. 红云红河烟草(集团)有限责任公司,云南昆明 650231)

摘要:2016 年 6 月从青岛即墨市中国农业科学院烟草研究所试验基地采集疑似感染番茄黄化曲叶病毒的烟叶样品。提取病叶总 DNA,使用双生病毒(Geminivirus)通用引物 PA/PB 对样品进行 PCR 扩增和测序,感病叶片 DNA 仅检测出番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus,简称 TYLCV);根据测定的部分序列片段,设计了 1 对全长序列反向引物,对其基因组全长进行克隆测定。结果显示,该病毒核酸为单链环状 DNA,基因组为单一组分 DNA-A,经过分子比对和系统进化树分析发现,TYLCV-SDQDJM(GenBank:KY640456)与山东省潍坊市番茄分离物 TYLCV、山东省泰安市番茄分离物 TYLCV 同源性最高为 99%,与已经报道的其他地区 TYLCV 分离物同源性均在 97% 以上,因此确定从青岛即墨市采集的烟草矮化病毒症状烟株是由 TYLCV 侵染所致;同时采集了发病植株以及周边蔬菜保护地部分蔬菜上的烟粉虱成虫进行检测,其中 15.0% 的烟粉虱样品检出番茄黄化曲叶病毒,因此明确了侵染该地区烟草的番茄黄化曲叶病毒是由带毒烟粉虱传播的。

关键词:番茄黄化曲叶病毒;烟草;烟粉虱;分子鉴定;全基因组序列分析

中图分类号:S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)18-0050-04

烟草是我国重要的经济作物之一,其病毒病的危害是最

收稿日期:2016-03-13

基金项目:中国烟草总公司重大专项[编号:110201601024(1S-04)];山东省自然科学基金(编号:ZR2015YL065、ZR2014CQ025);红云红河烟草(集团)有限责任公司科技项目(编号:HYHH2016YL02)。

作者简介:张俊(1993—),男,湖北松滋人,硕士研究生,研究方向为植物病毒监测。E-mail:191172885@qq.com。

通信作者:章松柏,博士,副教授,研究方向为病毒监测与分子病毒学,E-mail:yangtze2008@126.com;杨金广,博士,副研究员,研究方向为烟草病毒病综合防治与分子病毒学,E-mail:yangjinguang@caas.cn。

析表明,*MIOX* 基因在红麻根、茎和叶组织中均有表达,在根中的表达量最高。这是在纤维作物红麻中首次分离得到该基因,研究结果为下一步分析该基因的功能和了解红麻抗旱的分子机制提供参考。

参考文献:

- [1] Fang Y J, Xiong L Z. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(4): 673-689.
- [2] Zhang H Y, Li W, Mao X G, et al. Characterization of genomic sequence of a drought-resistant gene *TaSnRK* in wheat species[J]. Genet, 2015, 94(2): 299-304.
- [3] 李连朝, 王学臣. 水分亏缺下细胞延伸生长与细胞膨压和细胞壁特性的关系[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(3): 161-167.
- [4] Kanter U, Usadel B, Guerineau F, et al. The inositol oxygenase gene

为严重的。烟草病毒病曾相继在世界各主产烟区暴发流行,每年给烟草生产带来重大损失,严重影响烟叶的品质,给烟农造成严重的经济损失^[1]。2016 年 6 月,青岛即墨市烟田发现了部分烟株表现矮小,叶片黄化上卷,呈现皱缩症状,推测该烟株疑似感染双生病毒(Geminivirus)。该病毒病在我国西南烟区发生尤为普遍,特别是在部分烟区的冬春烟墒危害严重,例如在广西省百色烟区冬春烟上发病率超过 60%,给当地烟叶生产造成极大损失,直接导致百色烟区冬春烟的绝产,促使了百色烟区烟叶种植模式的调整^[2]。

作为菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)的典型代表,番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus,简称 TYLCV)是

family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides[J]. Planta, 2005, 221(2): 243-254.

- [5] Lorence A, Chevone B I, Mendes P, et al. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2004, 134(3): 1200-1205.
- [6] Sharma P, Dubey R S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings[J]. Plant Growth Regulation, 2005, 46(3): 209-221.
- [7] Huang C H, He W L, Guo J K, et al. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(422): 3041-3049.
- [8] 王海光, 张洪亮, 段俊枝, 等. 水稻肌醇加氧酶基因的表达分析及植物表达载体的构建[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(4): 1-6.
- [9] 陈美霞, 陈富成, 颜克伟, 等. 红麻叶片高质量 RNA 提取方法比较分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(6): 561-565.

由烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 传播的一种双生病毒,其病原是具有孪生颗粒形态的植物病毒,核酸为单链环状 DNA,基因组为单一组分 DNA-A^[3],在实际生产中,主要通过烟粉虱在番茄和辣椒等蔬菜作物上传播危害,每年给蔬菜等经济作物带来严重的经济损失^[4]。近年来,该病毒传播介体烟粉虱在山东省烟区危害较为严重,在潍坊、临沂、日照、青岛等市烟区均存在不同程度的发生,而该病毒侵染引起的病毒病田间症状鲜见发生。本研究首次明确了山东省青岛即墨市中国农业科学院烟草研究所试验基地烟田中疑似矮化烟株是受 TYLCV 侵染所致。笔者对采集的病样进行了病原分子鉴定,对分离物全基因组进行克隆和序列分析,同时采集发病烟田及周边保护地内的烟粉虱,利用双生病毒通用引物对采集到的烟粉虱样品进行检测,明确了该病毒在青岛烟区的传播途径,为该病毒病的精准测报和防控提供了基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 感病样品采集 待测样品于 2016 年 6 月采自山东省青岛即墨市中国农业科学院烟草研究所试验基地烟田,烟粉虱成虫样品采自试验基地烟田、周边保护地蔬菜及杂草上,成虫数量约 600 头,每组 10 头,分为 60 组,置于 -80 ℃ 保存待用。本试验中以采自山东省寿光市的 TYLCV 侵染的番茄植

株作为阳性对照,以健康烟草植株为阴性对照。

1.1.2 相关试剂材料 DNA 提取试剂盒 (Plant Genomic DNA Kit),昆虫基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Genomic DNA Kit),胶回收试剂盒,克隆载体 (pEASY-Blunt Simple Cloning Kit) 以及感受态细胞均购自北京全式金生物有限公司;Prime STAR Max Premix (2 ×) 以及 DL2000 DNA Maker 购自 TaKaRa 公司。其他常规生化试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取,PCR 扩增及目的基因的连接、克隆、测序 使用植物 DNA 提取试剂盒 (Plant Genomic DNA Kit) 提取病样总 DNA。使用昆虫基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Genomic DNA Kit) 提取烟粉虱样品总 DNA。使用检测双生病毒的通用引物 PA/PB 进行扩增,扩增得到的序列经 Blast 程序与 GenBank 中已经上传的 TYLCV 的 DNA-A 序列进行比对,确定病样感染番茄黄化曲叶病毒后,根据已经报道的 TYLCV 全序列,利用 Primer 5.0 设计 1 对全长序列背向引物扩增病毒 DNA-A 全序列,所用引物详见表 1。扩增程序如下:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,35 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。扩增的产物进行凝胶电泳检测,将目的条带进行胶回收纯化,回收产物克隆到 pEASY-Blunt 载体上。待克隆检测为阳性重组质粒后,委托上海生工青岛测序部进行测序。

表 1 引物信息

名称	序列(5'→3')	片段大小(bp)	退火温度(℃)
PA	TAATATTACCKGWKGVCSC	535	55.0
PB	TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA	535	55.0
TYLCV-F	TGAAGAATGATTTGCGGGATAG	2 800	55.0
TYLCV-R	CTCATCACTTGAAACCTATCCCGCA	2 800	55.6

注: B=C、T、G; K=G、T; R=A、G; S=C、G; V=A、C、G; W=A、T; Y=C、T。

1.2.2 序列分析 将测序后得到的序列通过 Blast 程序进行比对,在 NCBI 上选取同源性最高的 TYLCV 分离物全基因组,利用 DNAMAN 软件进行一致率分析,使用 SnapGene 软件对样品基因组结构进行分析。选取山东省 TYLCV 分离物和部分有代表性分离物的全基因组序列为对照,利用 MEGA 5.1 中的邻接法,对青岛即墨市的 TYLCV 分离物全基因组序列进行系统发育进化分析^[5-7]。

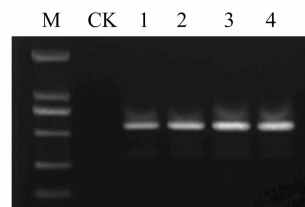
2 结果与分析

2.1 双生病毒通用引物 PCR 检测结果

以提取烟草病株叶片 DNA 为模板,利用双生病毒通用引物 PA/PB 进行 PCR 扩增。PCR 产物为约 500 bp 大小的特异性条带(图 1),经克隆、测序、Blast 程序比对,发现青岛即墨市感病烟叶样品扩增出的基因片段与 GenBank 已经登录的部分地区 TYLCV 分离物的同源性达到 98.0% 以上。因此,笔者初步确定该样品感染了 TYLCV。

2.2 病毒分离物 DNA-A 全序列的克隆与序列分析

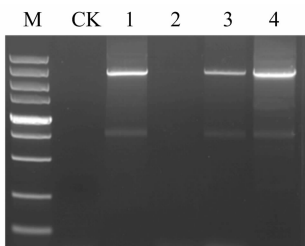
2.2.1 病毒分离物 DNA-A 全序列的克隆 利用设计的全长序列背向引物对感病样品的 DNA-A 全序列进行扩增,PCR 产物为约 2 800 bp 大小的特异性条带(图 2)。经克隆、测序后结果表明,青岛即墨市烟草分离物 TYLCV-SDQDJM 序列全长为 2 781 个核苷酸。该序列为闭合环状单链 DNA,



M—DL2000 DNA maker; CK—阴性对照; 4—阳性对照

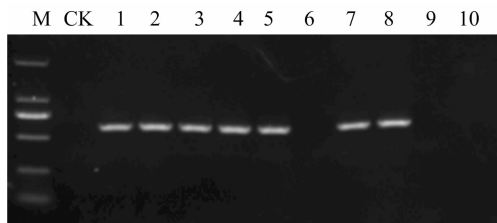
图 1 感病烟叶样品 PA/PB 扩增结果

共 6 个 ORF,具有菜豆金色花叶病毒属病毒基因组典型特征。图 4 显示,这 6 个开放阅读框分别是 AV1 基因 (308 ~ 1 084 nt,编码外壳蛋白)、AV2 基因 (148 ~ 498 nt,编码和病毒移动相关蛋白) 以及位于互补链上的 AV1 基因 (1 542 ~ 2 615 nt,编码复制酶)、AV2 基因 (1 226 ~ 1 633 nt,编码转录激活蛋白)、AV3 基因 (1 081 ~ 1 485 nt,编码增强复制的蛋白) 和 AV4 基因 (2 171 ~ 2 464 nt)。通过 Blast 比对发现山东省青岛即墨市烟草上的分离物 TYLCV-SDQDJM 与山东省潍坊市番茄上的分离物 TYLCV-SDWF-L7 (GenBank: KC999850.1)、云南省 TYLCV-YN4392 (GenBank: KU934104.1)、海南省 TYLCV-HNJZ19 (GenBank: KX034543.1) 的同源性最高为 99%。与来自中国不同地区的 TYLCV 分离物的同源性均在 98% 以上。



M—DL5000 DNA maker; CK—阴性对照; 4—阳性对照

图2 DNA-A 全序列扩增结果



M—DL2000 DNA maker; CK为阴性对照

图3 部分烟粉虱样品 PA/PB 扩增结果

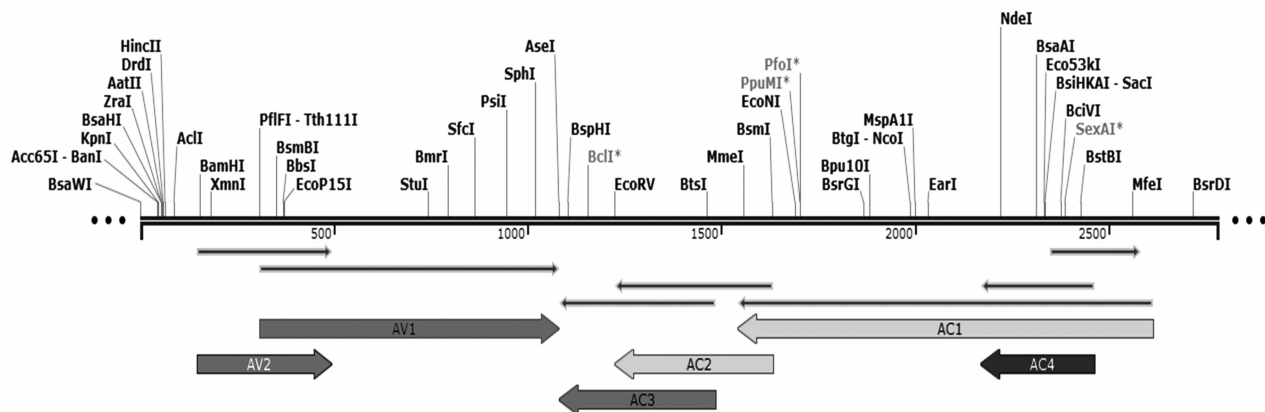


图4 SnapGene 全序列分析图

为进一步分析青岛即墨市烟草 TYLCV - QDJM 分离物与已经报道的各 TYLCV 分离物及侵染烟草的其他 DNA 病毒的亲缘关系,本研究选取了来自国外 12 个国家以及国内 12 个地区的 TYLCV 代表分离物,同时选取了国内外不同地区已经报道的侵染烟草的其他 5 类 DNA 病毒作为外组利用 MEGA 5.1 软件构建系统进化树^[9]。从该系统进化树(图 5)可以看出,SDQDJM 与来自中国的 12 个分离物以及国外的 8 个分离物亲缘关系较近,并聚在一个大的分支。其中 TYLCV - SDQDJM 与 TYLCV - SDWF78 亲缘关系最近,位于一个小分支上,而与科威特分离物(TYLCV - KISR4)、阿曼分离物(TYLCV - BidBid)、伊朗分离物(TYLCV - Ir2)以及沙特阿拉伯分离物(TYLCV - Jeddah)亲缘关系相对较远。同时,由图 5 还可以看出,侵染烟草的其他双生病毒分离物位于外族分支上,其中番茄黄化曲叶撒丁尼亚病毒意大利分离物(TYLCSV - Sar - [IT; Sic; 04])与番茄黄化曲叶病毒沙特阿拉伯分离物(TYLCV - Jeddah)位于一个小分支上。

2.3 烟粉虱体内 TYLCV 检测鉴定

将试验基地烟田及周边蔬菜保护地部分蔬菜上捕获的烟粉虱样品以每组 10 头,共分为 60 组,提取烟粉虱样品 DNA

2.2.2 序列分析与系统进化树的构建 利用 DNAMAN 软件,将扩增测序得到的 TYLCV - SDQDJM 分离物的 DNA - A 全序列与国内外已经报道的具有代表性的 TYLCV 分离物全序列进行比对,得出核苷酸的一致率。同时,将其与 GenBank 中已经登录的侵染烟草的其他 DNA 病毒全序列进行比对。结果显示, TYLCV - QDJM DNA - A 与来自中国不同地区的 TYLCV 分离物的一致率均在 97% 以上,其中与山东省潍坊市和山东省泰安市的分离物一致率最高,为 99%,与山东省其他地区以及国内其他省份还有国外部分地区报道的番茄黄化曲叶病毒一致率都在 97% 以上。而与侵染烟草的其他 DNA 病毒序列比对发现,该烟草病毒样品与中国番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl China virus,简称 TYLCCNV)、番茄曲叶病毒(tomato leaf curl China virus,简称 ToLCCNV)、烟草曲叶病毒(tobacco leaf curl virus,简称 TbLCV)、烟草曲茎病毒(tobacco curl shoot virus,简称 TbCSV)、番茄黄化曲叶撒丁尼亚病毒(tomato yellow leaf curl Sardinia virus,简称 TYLCSV)^[8]的一致率都在 76% 以下。因此,该病毒分离物为番茄黄化曲叶病毒的一个分离物(TYLCV - SDQDJM)。

作为模板,使用双生病毒通用引物 PA/PB 进行扩增。结果发现,共计 9 组样品扩增得到大小约为 500 bp 的特异性条带(图 3),经测序后使用 Blast 程序比对,最终确定 15.0% 的烟粉虱样品携带 TYLCV。值得注意的是,利用双生病毒通用引物 PA/PB,只检测到了 TYLCV,并没有检测到其他双生病毒种类,说明青岛地区可能仅有一种双生病毒危害。

此次危害当地烟草的烟粉虱主要是 B 型烟粉虱^[10],而山东省当地广泛种植的大棚蔬菜给烟粉虱提供了很好的越冬场所,5—11 月进入烟粉虱危害严重时期,而随着山东省近年来保护地蔬菜种植规模的扩大,栽培方式多样,种类增多,给烟粉虱提供了丰富的寄主范围和适宜的生长环境,有利于烟粉虱越冬,为来年双生病毒的传播提供了良好的生境。先前报道表明,近几年 TYLCV 在山东省本地番茄上危害十分严重,各地均有报道,而烟粉虱寄主范围十分广泛,可危害 74 科 600 种植物^[11]。因此笔者推测,本次采集到的烟粉虱在取食本地 TYLCV 侵染的蔬菜时,成功获取并携带 TYLCV,随着正常的迁飞过程进入青岛即墨市烟田,开始取食烟草幼嫩烟叶,随着口针穿过烟叶表皮细胞和薄壁细胞,其携带的 TYLCV 成功通过烟粉虱的传播侵染了当地烟草。

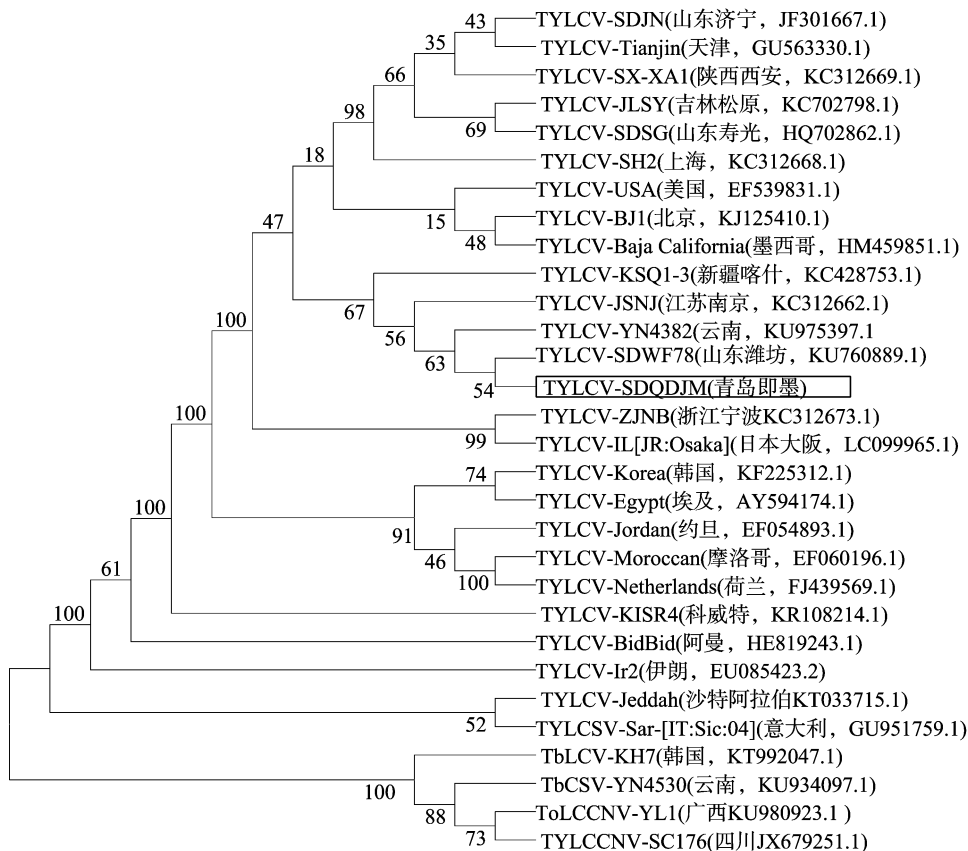


图5 青岛即墨市烟草分离物与其他双生病毒的系统进化树

3 结论与讨论

山东省烟区是我国老烟区之一。近年来,随着农业耕作结构的调整,特别是保护地栽培的广泛发展,使山东省烟区病毒病种类发生了较大变化。通过近 5 年烟草病虫害预测预报网络数据分析,烟粉虱作为烟草上的主要害虫在山东省烟区发生越来越重,已经上升为仅次于蚜虫的刺吸式害虫,但烟粉虱传播的双生病毒在山东省烟草上鲜见发生,主要报道集中在保护地栽培的番茄上^[9]。本研究首次报道了山东省青岛市烟草上发现的植株矮化和叶片皱缩的烟株是由烟粉虱传播的 TYLCV 侵染所致。通过对山东省青岛即墨市烟草病毒分离物 DNA-A 的全序列分析,明确了该分离物为番茄黄化曲叶病毒的一个分离物。该分离物与山东省(寿光)TYLCV 同源性达到了 99%,而与山东省以外的其他 TYLCV 分离物同源性较小,表明 TYLCV 在遗传进化上表现出一定的地理隔离。通过检测即墨市周边保护地部分蔬菜上的烟粉虱,发现采集到的 15.0% 烟粉虱样品携带 TYLCV,表现 TYLCV 具备潜在大发生的危险,应引起当地植物保护从业者的警惕,提前做好治虫防病措施,以防该病毒病暴发成灾。

参考文献:

- [1] 马国胜,何博如. 烟草病毒病的发生与防治研究进展[J]. 河南农业科学,2005,34(2):42-46.
- [2] 林北森. 广西百色烟草病毒病发生特点及控制技术应用[D]. 北

京:中国农业科学院烟草研究所,2009.

- [3] 郭小建. 四种双生病毒的分子鉴定[D]. 杭州:浙江大学,2006.
- [4] 田守波. 番茄黄化曲叶病毒分子鉴定及致病性研究[D]. 上海:上海海洋大学,2012.
- [5] He J. Molecular detection and sequence analysis of a new hepatitis E virus isolate from Pakistan[J]. Journal of Viral Hepatitis,2006,13(12):840-844.
- [6] Dong J H, Luo Y Q, Ding M, et al. First report of tomato yellow leaf curl China virus infecting kidney bean in China[J]. Plant Pathology, 2007,56(2):342-342.
- [7] Liu J, Liu C S, Wei S L, et al. Analysis of rDNA-ITS sequences and similarity of radix paeoniae[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2011,34(10):1517-1521.
- [8] Fanigliulo A, Pacella R, Comes S, et al. First record of tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCV) on pepper in Italy[J]. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 2007,73(2):297-302.
- [9] Gharsallah C S, Gorsane F, Nakhla M K, et al. First report of tomato yellow leaf curl virus - israel species infecting tomato, pepper and bean in Tunisia[J]. Journal of Phytopathology,2007,155(4):236-240.
- [10] 宁雯熙. B 型、Q 型烟粉虱传播番茄黄化曲叶病毒的差异研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2015.
- [11] 纠敏,周雪平,刘树生. 烟粉虱传播双生病毒研究进展[J]. 昆虫学报,2006,49(3):513-520.