

郝浩永,滕红梅,刘 缙,等. 山西省运城市番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):25-30.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.006

山西省运城市番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定

郝浩永¹,滕红梅²,刘 缙²,许瑞祥²,王 新²

(1. 运城学院理科实验中心,山西运城 044000; 2. 运城学院生命科学系,山西运城 044000)

摘要:从山西省运城市表现黄化曲叶典型症状的番茄植株上分离得到病毒分离物 SXYC-X4(KY499720),对其 DNA-A 的全基因组进行序列分析。结果表明,SXYC-X4 的 DNA-A 全长为 2 781 bp,共编码 6 个开放阅读框。通过序列比对发现,SXYC-X4 与山东省潍坊市的病毒分离物(KC999850)和河南省焦作市的病毒分离物(KX034543)的同源性较高,均为 99.5%,确认 SXYC-X4 是番茄黄化曲叶病毒。系统进化分析结果表明,该病毒分离物属于番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus,简称 TYLCV)-Isreal 株系,与烟草曲茎病毒(tobacco curly shoot virus,简称 TbCSV)在 AC4 氨基酸序列上的同源性高于部分 TYLCV,推测在自然界中 TYLCV 与 TbCSV 在 AC4 序列处可能已经发生了广泛的重组,TYLCV 有可能会获得更强的致病性,应提高警惕。

关键词:番茄黄化曲叶病毒;PCR 检测;序列分析;系统进化

中图分类号: Q943.2;S436.412.1+1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0025-05

番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus,简称 TYLCV)是双生病毒科菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)病毒,主要依靠烟粉虱进行传播。大多数菜豆金色花叶病毒属病毒的基因组由双组分组成,即 DNA-A、DNA-B,大小为 2.5~2.8 kbp,少数病毒为单组分,仅含有 DNA-A^[1-2]。目前国内发现的 TYLCV 大多为 DNA-A,其基因组大小约为 2.8 kbp,有些单组分病毒还伴随有卫星 DNA^[1]。TYLCV 于 1964 年在以色列被发现并正式命名,随后在短短几十年时间内,迅速在世界各地蔓延,给番茄等农作物生产造成了巨大的损失^[3]。2002 年番茄黄化曲叶病毒病传入我国上海^[4],之后在我国 20 多个省、市相继发生,给番茄生产带来了严重的威胁^[5-7]。2010 年,全国番茄种植面积超过 20 万 hm²,经济损失达数十亿元^[8]。

有报道称,2010 年山西省运城市局部番茄田已出现了番茄黄化曲叶病毒病的危害^[9-10]。2016 年,笔者在运城学院新校区及周边多处番茄种植地发现疑似感染番茄黄化曲叶病毒的植株,主要表现为叶片边缘黄化、卷曲、植株矮化等症状。进一步调查发现,番茄黄化曲叶病毒病在运城市的多个番茄种植区都有发生,而且危害较严重,尤其是在夏季和秋季。由于运城市天气干旱炎热的时期较长,适合该病的传播媒介——烟粉虱的生长和繁殖,因此对当地的番茄生产造成了极大的经济损失。近年来,山西省运城市大规模烟粉虱暴发活动频繁出现,2017 年 9 月上旬运城市郊区甚至城区均出现大量烟粉虱。本研究的目的在于通过采集感病番茄植株样品,对引起该病的 TYLCV 的 DNA-A 组分进行检测和鉴定,以明确其 DNA-A 组分的基因组结构,了解发病原因和症状

表现,以期为当地防治番茄黄化曲叶病毒病提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 感病样品采集

疑似感染番茄黄化曲叶病毒的番茄病株于 2016 年 8 月采自山西省运城学院新校区,病株表现矮化、叶片黄化且严重上卷、落花等 TYLCV 侵染的典型症状,采集新鲜叶片直接用于总 DNA 的提取,或保存于 -70 ℃ 备用。以健康植株作为对照。

1.2 番茄叶片总 DNA 的提取

采用十六烷基三甲基溴化铵法提取番茄叶片的总 DNA,于 -20 ℃ 保存备用^[11]。

1.3 引物设计与合成

参照 GenBank 中已发表的 TYLCV 的序列,通过同源性比对分析,并参考文献[12],根据开放阅读框(open reading frame,简称 ORF)AC1 和 AV2 保守区域,设计 2 对引物(P1F/P1R、P2F/P2R)。引物 P1F/P1R 用于扩增约 2 450 bp 的 DNA 片段,引物 P2F/P2R 用于扩增约 550 bp 的 DNA 片段。2 个片段的重叠部分用于拼接,以获得病毒 DNA-A 的全长序列。2 对引物的序列如表 1 所示。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。利用简并引物 PCRc1/PBLv2040 扩增可能存在的双生病毒 DNA-B 组分^[13],利用通用引物 β 01/ β 02、UNA101/UNA102 分别扩增可能存在的双生病毒伴随卫星 DNA β 与 DNA1 全长序列^[14-15]。

表 1 引物序列信息

引物	序列(5'→3')
P1F	CCCAAGCTTATGTGGGATCCACTTCTAAATGAATTTCC
P1R	CGGGGTACCGCCATTAGGTGTCCAGGTATAAGTAAGAC
P2F	CCCAAGCTTATATCGCCTGGTTCGCTTCGACATAGTCAC
P2R	GGGGTACCTTAGAGAGAGAACAATTGGGATATGTTAGGAA

1.4 目的片段的扩增和序列测定

以提取的番茄植株叶片的总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,引物 P1F/P1R 和 P2F/P2R 所用的 PCR 反应体系相同,反

收稿日期:2017-12-18

基金项目:运城学院科研基金(编号:CY-2014014,2008124)。

作者简介:郝浩永(1982—),男,河南周口人,硕士,实验师,主要从事分子生物学及实验教学管理方面的研究。Tel:(0359)8594387; E-mail:haohaoyong@126.com。

应条件不同。PCR 反应体系:1 μL DNA 模板,2 μL *Taq* Plus DNA 聚合酶(2.5 U/ μL),5 μL 10 \times *Taq* Plus Buffer,引物(100 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,10 μL dNTP Mixture(2.5 $\mu\text{mol/L}$),加入 ddH₂O 补足至 50 μL 。引物 P1F/P1R 的反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,15 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,25 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。引物 P2F/P2R 的反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

DNA-B、DNA β 、DNA1 的 PCR 检测参考文献[13-15]完成。PCR 扩增完成后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

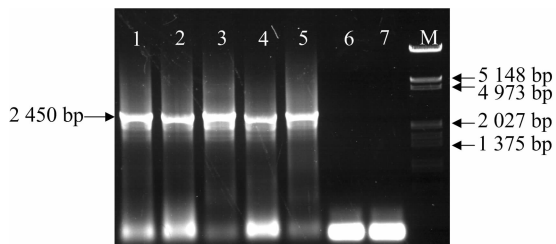
1.5 序列拼接和分析

测序结果使用 DNA Star Lasergene 7.1 软件中的 Seqman 程序进行拼接,用 MegAlign 程序进行序列相似性比较。用 NCBI 中的 ORF finder 程序查找 ORF,采用软件 MEGA 6.0 中的 Clustal W 方法进行多序列比对和邻接(neighbor-joining)法构建系统进化树,并进行 1 000 次 Bootstrap 检验。

2 结果与分析

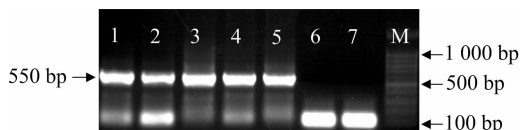
2.1 PCR 检测结果

以病株样品和健康番茄样品提取的 DNA 为模板,利用引物 P1F/P1R 在病株样品中扩增出大小约为 2 450 bp 的条带,在健康植株中未扩增出(图 1);利用引物 P2F/P2R 进行 PCR 扩增,从病株中扩增出大小约为 550 bp 的条带,在健康植株中未扩增出(图 2),与相关文献报道^[12]一致,确认本研究所采病株感染了番茄黄化曲叶病毒。DNA-B、DNA β 、DNA1 在样品中均未检测到,推测感染的番茄黄化曲叶病毒可能是单组分病毒,且无卫星 DNA 伴随。



1~5 为病株; 6、7 为健康植株; M 为 DNA marker

图1 引物 P1F/P1R 的 PCR 扩增产物



1~5 为病株; 6、7 为健康植株; M 为 DNA marker

图2 引物 P2F/P2R 的 PCR 扩增产物

2.2 病毒 DNA-A 的全长序列分析及其基因组结构特征

将长短 2 条目的条带的测序结果用软件 DNA Star Lasergene 7.1 进行拼接,最终得到 1 个长 2 781 nt 的单链环状 DNA,即 DNA-A 组分,将其命名为 SXYC-X4,GenBank 序列号为 KY499720。SXYC-X4 具有菜豆金色花叶病毒属病毒基因组的典型特征:有 6 个 ORF,其中 AV1、AV2 位于病毒链上,AC1、AC2、AC3、AC4 位于其互补链上;AV1(308 ~

1 084 nt)编码病毒的外壳蛋白(coat protein,简称 CP),AV2(148 ~ 498 nt)编码 RNA 沉默抑制子和运动蛋白,AC1(1 542 ~ 2 615 nt)编码复制相关蛋白(replication-associated protein,简称 Rep),AC2(1 226 ~ 1 633 nt)编码转录激活蛋白(transcriptional activator protein,简称 TrAP),AC3(1 081 ~ 1 485 nt)编码复制增强蛋白(replication enhancer protein,简称 Ren),AC4(2 171 ~ 2 464 nt)编码复制或转录调控因子;在 AC1 和 AV2 之间有 1 个 313 nt 的基因间隔区(intergenic region,简称 IR),为非编码区,该区含有保守的九核苷酸序列 TAATATT/AC(2 775 ~ 2 nt)的茎环结构、TATA box(2 675 ~ 2 678 nt)^[16]及正向重复序列 ATCGGTGT(2 653 ~ 2 660 nt,2 661 ~ 2 668 nt)。

2.3 病毒 DNA-A 与其他 TYLCV 的 DNA-A 的同源性分析

将 SXYC-X4 的全长序列通过 Blast 进行比对分析,结果显示,其与山东省潍坊市的病毒分离物 TYLCV-SDWF-L7(KC999850)、河南省焦作市的病毒分离物 TYLCV-HNJZ-19(KX034543)的同源性较高,均为 99.5%。在 AV1、AV2、AC1、AC2、AC3、AC4 核苷酸序列同源性方面,SXYC-X4 与 TYLCV-SDWF-L7 相比较同源性分别为 99.2%、99.7%、99.7%、99.0%、99.5%、99.3%,SXYC-X4 与 TYLCV-HNJZ-19 相比较同源性分别为 99.1%、99.7%、99.5%、99.3%、99.5%、99.3%。从 GenBank 上选取 25 个具有代表性的双生病毒序列进行比对,由表 2 可知,SXYC-X4 与这 25 种双生病毒的 DNA-A 全序列同源性为 76.8%~99.5%,IR 区为 61.5%~99.7%。推导 AV1、AV2、AC1、AC2、AC3、AC4 编码的蛋白质氨基酸序列的同源性分别为 77.3%~99.2%、72.2%~100.0%、69.5%~99.4%、62.7%~98.5%、70.1%~99.3%、32.9%~97.9%,其中 AV1 氨基酸序列的变异最小,AC4 氨基酸序列的变异最大。

2.4 病毒 DNA-A 与其他双生病毒的系统进化分析

为进一步明确 SXYC-X4 的系统进化关系及分类地位,将 SXYC-X4 与表 2 中 25 个双生病毒的核苷酸序列构建系统进化树。由图 3 可知,SXYC-X4 与国内的 TYLCV-SDWF-L7、TYLCV-HNJZ-19、TYLCV-YN4412、TYLCV-LNJZ 等的亲缘关系较近,形成 1 个独立的分支 A,再与澳大利亚的 TYLCV-AU-1923、美国的 TYLCV-USA 及国内其他分离物形成 1 个较大的分支 B,与所有番茄黄化曲叶病毒则形成 1 个更大的分支 C;而与番茄曲叶病毒、南非木薯花叶病毒、东非木薯花叶病毒、烟草草茎病毒等的亲缘关系相对较远。据报道,通常双生病毒 IR 区的变异最大^[1,7,12,17],而本研究中 AC4 氨基酸序列相似性变异大于 IR 区(表 1),SXYC-X4 与 TbCSV-India 的同源性高于属 TYLCV 的 TYLCV-Oman-Tom-30、TYLCV-Sweden、TYLCV-Mild-Japan,然后分别基于 IR 区和 AC4 氨基酸序列作系统进化分析。由图 4 可知,基于 IR 区,SXYC-X4 与 TYLCV-AU-1923、TYLCV-USA、TYLCV-LNJZ 等形成 1 个分支 A,再与除 TYLCV-Mild-Japan、TYLCV-Oman-Tom-30、TYLCV-Sweden 之外的 TYLCV 形成 1 个较大的分支 B。由图 5 可知,基于 AC4 氨基酸序列,SXYC-X4 与大部分的 TYLCV 形成 1 个分支 A,所有 TYLCV 与 TbCSV-India 形成 1 个更大的分支 B。

表 2 SXYC - X4 与 25 种菜豆金色花叶病毒属病毒 DNA - A 及 ORF 的序列比对结果

病毒分离物(序列号)	病毒来源地	同源性(%)							
		DNA - A ^a	IR ^a	AV1 ^b	AV2 ^b	AC1 ^b	AC2 ^b	AC3 ^b	AC4 ^b
TYLCV - SDWF - L7 (KC999850)	中国山东潍坊	99.5	99.7	99.2	100.0	99.4	97.8	99.3	97.9
TYLCV - HNJZ - 19 (KX034543)	中国河南焦作	99.5	99.7	98.8	100.0	99.4	97.8	98.5	97.9
TYLCV - YN4412 (KU975399)	中国云南	99.4	99.4	99.2	100.0	98.6	98.5	98.5	96.9
TYLCV - AU - 1923 (KX347097)	澳大利亚	99.4	98.7	99.2	100.0	99.2	97.8	98.5	96.9
TYLCV - LNJZ (KJ754191)	中国辽宁	99.4	99.0	98.8	99.1	99.2	98.5	99.3	97.9
TYLCV - IL - CN ; SH (GU434144)	中国上海	99.4	99.0	99.2	100.0	98.9	98.5	99.3	96.9
TYLCV - USA (EF539831)	美国加利福尼亚	99.3	98.4	99.2	100.0	99.2	97.0	98.5	96.9
TYLCV - BJ05 (KT338295)	中国北京	99.2	98.1	99.2	100.0	98.9	97.0	98.5	96.9
TYLCV - HBYQ (JQ038232)	中国河北永清	99.1	98.4	99.6	98.3	97.8	97.0	97.8	95.9
TYLCV - ZJHZ1 (FN252890)	中国浙江	99.0	98.1	99.2	99.1	98.0	95.6	96.3	95.9
TYLCV - WGJ (KF990604)	中国广东	99.0	97.1	99.6	100.0	97.8	96.3	97.0	95.9
TYLCV - FJFz02 (KX885028)	中国福建	98.9	97.1	98.8	100.0	98.3	97.0	98.5	95.9
TYLCV - Egypt (AY594174)	埃及伊斯梅利亚	98.2	95.8	98.4	99.1	98.0	94.8	97.0	94.8
TYLCV - MU (KX347171)	毛里求斯	98.0	96.2	98.4	99.1	98.6	94.8	95.5	94.8
TYLCV - SX - XA2 (KC312670)	中国陕西西安	97.8	97.8	96.1	96.6	95.5	93.3	96.3	93.8
TYLCV - Korea (JN183876)	韩国潭阳	97.8	95.8	98.4	99.1	97.8	94.8	94.8	96.9
TYLCV - Iran (KX347166)	伊朗	96.8	91.7	98.8	99.1	97.5	94.1	96.3	89.7
TYLCV - Mild - Japan (AB116632)	日本静岡	92.8	83.3	98.8	99.1	89.1	96.3	97.0	46.4
TYLCV - Sweden (HF548825)	瑞典	92.8	82.1	98.4	99.1	89.4	97.0	97.8	47.4
TYLCV - Oman - Tom - 30 (KF229721)	阿曼苏哈尔	89.3	78.2	97.3	96.6	84.7	83.0	89.6	70.1
TLCV - Gezira - Sudan (AY044137)	苏丹	84.8	79.3	79.0	95.7	85.2	88.9	89.6	51.5
SACMV - Madagascar (KJ887989)	马达加斯加	79.0	61.5	91.1	85.3	79.3	72.6	80.6	41.7
TLCV - Oman - LW1 (HF912280)	阿曼利瓦	77.5	66.0	93.4	77.4	69.5	65.7	70.1	32.9
TbCSV - India (KF551584)	印度卢迪亚纳	77.4	68.3	77.3	72.2	82.6	62.7	72.4	71.1
EACMV - Zambia (KP890351)	赞比亚	76.8	61.8	91.5	86.2	75.1	68.9	76.1	*

注;TYLCV 代表烟草曲叶病毒;SACMV 代表南非木薯花叶病毒;TbCSV 代表烟草曲茎病毒;EACMV 代表东非木薯花叶病毒;a 代表核苷酸序列;b 代表氨基酸序列;* 代表无可比对区域。

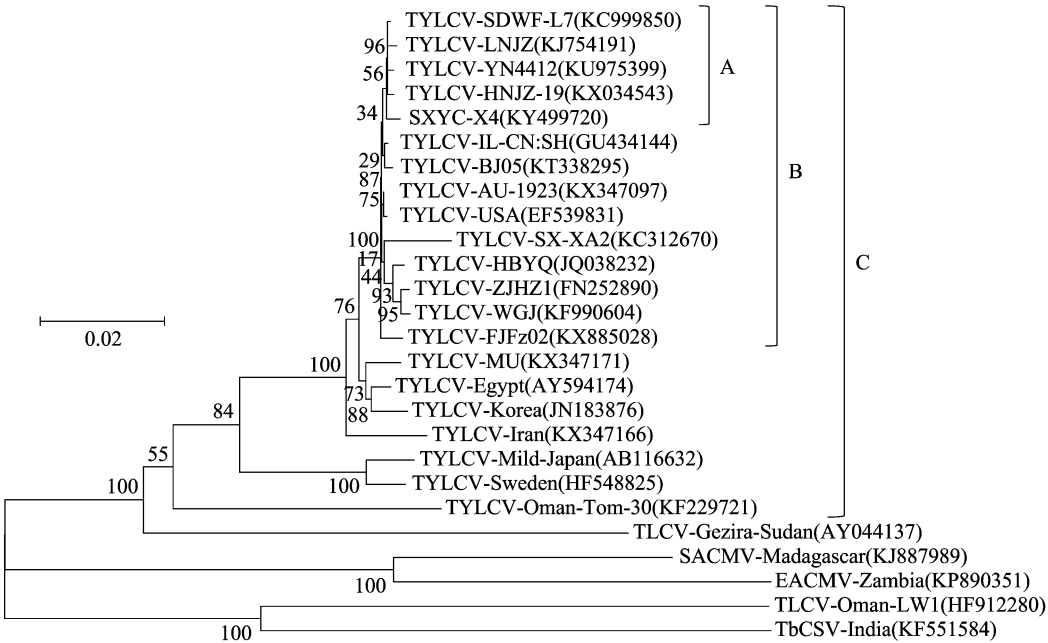


图3 基于 DNA-A 全序列的系统进化树

3 讨论与结论

通过对山西省运城城市病毒分离物 SXYC - X4 基因组全序

列进行分析,结果表明其具有双生病毒科菜豆金色花叶病毒属单组分病毒基因组的典型特征,与 TYLCV - SDWF - L7、TYLCV - HNJZ - 19 的同源性较高,均为 99.5%。与 SXYC - X4

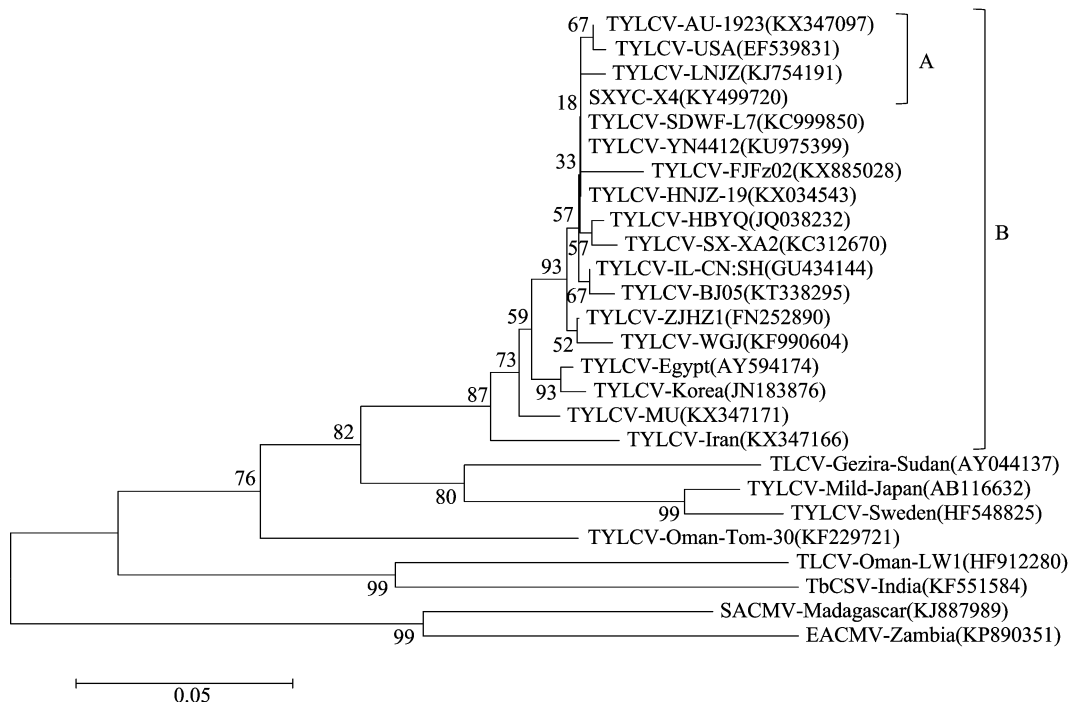


图4 基于 IR 区的系统进化树

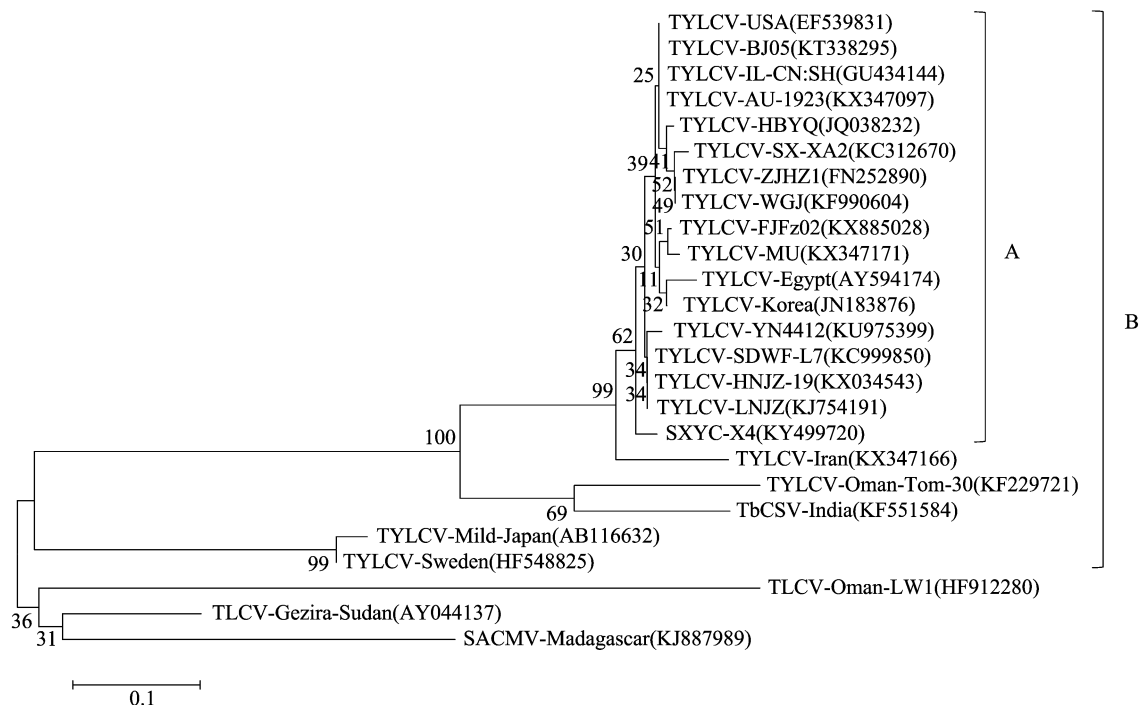


图5 基于 AC4 氨基酸序列的系统进化树

全基因组核苷酸序列同源性大于 89% 的病毒均为 TYLCV,而与同为双生病毒的番茄曲叶病毒、南非木薯花叶病毒、东非木薯花叶病毒、烟草曲茎病毒等的同源性均小于 89%。根据双生病毒科病毒分类原则^[17-20],SXYC-X4 应属于 TYLCV 的一个株系。通过构建 DNA-A 全序列系统进化树发现,SXYC-X4 与属 TYLCV-Isreal 株系^[21]山东、河南、云南、辽宁等地区的分离物聚在一支,亲缘关系最近(图 3),因此笔者认为,SXYC-X4 属 TYLCV-Isreal 株系,这也是目前分布最

广的一个株系^[22]。根据目前已报道的资料^[14-15,23-28]来看,单组分双生病毒通常伴有卫星 DNA,但本研究未检测到,SXYC-X4 是否伴有卫星 DNA 仍须进一步研究确认。在图 3 分支 B 中,仅有 TYLCV-AU-1923、TYLCV-USA 为国外分离物,且分离的时间较早(分别为 2006 年、2007 年),其余皆为国内分离物,分离时间较晚(2007—2016 年),推测可能由于种质资源交流及烟粉虱扩散致使 TYLCV 在山西省运城地区蔓延。在双生病毒的各 ORF 中,最保守的是 AV1 基因,通

常同一地区双生病毒的 AV1 同源性相当高^[29-31]。本研究
中, SXCYC - X4 与来自世界各地 25 种双生病毒的各 ORF 编
码的蛋白中, AV1 编码的 CP 氨基酸序列的变异最小
(77.3% ~ 99.2%), 这进一步证实这种推测。

TbCSV 也可感染番茄^[32], TYLCV 与 TbCSV 可复合侵染
烟草、番茄等作物, 不同双生病毒之间的重组经常发生^[33-34]。
RNA 沉默是指多种真核生物体内发现的一种基于 RNA 水平
的高度保守的特异性降解机制。RNA 沉默的一种重要效应
是防御病毒侵染。崔晓峰等发现, 中国番茄黄化曲叶病毒
Y10 分离物在侵染本氏烟等寄主植物时, 并未诱导明显的症
状, 而烟草曲茎病毒 Y35 分离物单独侵染则诱导曲叶等症
状, 病毒 Y35 的 AC4 蛋白是一个比 Y10 的 AC4 蛋白更强的
RNA 沉默抑制子, 证明菜豆金色花叶病毒属病毒的 AC4 蛋白
与病毒致病性相关^[35]。何自福等研究发现, 来自同一地区的
ToLCGDV - [G3] 和 ToLCGDV - [G2] 同属菜豆金色花叶病
毒属的成员, 亲缘关系最近, 全基因组同源率为 87.9%^[29]。
本研究发现, AC4 氨基酸序列的变异最大 (32.9% ~
97.9%), TYLCV 与 TbCSV - India 的进化关系在 DNA - A 全
序列水平较远, 在 IR 区水平稍近, 在 AC4 氨基酸序列水平最
近, 由此推测, 自然界中 TYLCV 与 TbCSV 在 AC4 序列处可能
已经发生了广泛的重组, TYLCV 有可能会获得更强的致病性,
应提高警惕。

番茄黄化曲叶病可由多种双生病毒侵染引起, TYLCV 是
主要毒源, 此病症可能还由其他病毒复合侵染引起^[21, 36-37]。
本研究目前只检测了 TYLCV, 且发现 SXCYC - X4 与 TbCSV 在
AC4 氨基酸序列上的同源性高于部分 TYLCV, 病株是否同时
感染了其他病毒, 仍须进一步检测。

本研究从分子水平上鉴定了山西省运城地区引起番茄黄
化曲叶病的病原, 明确了病毒分离物 DNA - A 全长序列, 分
析了其在双生病毒科中的分类地位及系统进化关系, 为进一
步利用全长序列构建侵染性克隆奠定了基础, 对山西省运城
市当地番茄黄化曲叶病毒病的防治和番茄抗病育种工作具有
重要的参考价值。

参考文献:

- [1] 李 波, 李战彪, 韦茂春, 等. 从烟草上分离的中国番茄曲叶病毒
及其卫星 DNA 全基因组结构特征[J]. 基因组学与应用生物学,
2011, 30(4): 281 - 287.
- [2] 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.
- [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] 张 穗, 王冬生, 翟培荣, 等. 上海市番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)
病的初步鉴定[J]. 上海农业学报, 2006, 22(3): 126.
- [5] 薛东齐, 刘 冠, 姜景彬, 等. TYLCV 山东分离物株系分化及侵
染性克隆的构建[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(1): 26 - 33.
- [6] 熊 艳, 周常勇, 李 茵, 等. PaLCuCNV 和 TYLCCNV 复合侵染
引起更严重的番茄黄化曲叶病[J]. 园艺学报, 2014, 41(2):
268 - 276.
- [7] 周 莹, 尚巧霞, 罗 晨, 等. 番茄黄化曲叶病毒的鉴定与群体进

- 化分析[J]. 植物保护, 2016, 42(1): 106 - 111.
- [8] 吴篆芳, 曹塍程, 郑建秋, 等. 番茄黄化曲叶病毒研究进展[J].
作物杂志, 2013(1): 18 - 26.
- [9] 朱 芳. 番茄黄化曲叶病毒病的发生规律与防控措施[J]. 农业
技术与装备, 2011(6): 22 - 24.
- [10] 杨 杰, 尹林红, 屈会玲. 浅谈运城市番茄黄化曲叶病的防治
[J]. 农业技术与装备, 2014(13): 93 - 94.
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社,
2009: 438.
- [12] 芦 佳, 刘 健, 王 慧, 等. 番茄黄化曲叶病毒北京分离物的
全基因组序列测定及进化分析[J]. 内蒙古大学学报(自然科学
版), 2014, 45(3): 273 - 280.
- [13] Rojas M R, Gilbertson R L, Russell D R, et al. Use of degenerate
primers in the polymerase chain - reaction to detect whitefly -
transmitted geminiviruses[J]. Plant Disease, 1993, 77(4): 340 -
347.
- [14] Briddon R W, Bull S E, Mansoor S, et al. Universal primers for the
PCR - mediated amplification of DNA β a molecule associated with
some monopartite *Begomoviruses* [J]. Molecular Biotechnology,
2002, 20(3): 315 - 318.
- [15] Bull S E, Briddon R W, Markham P G. Universal primers for the
PCR - mediated amplification of DNA1: a satellite - like molecule
associated with *Begomovirus* - DNA β complexes[J]. Molecular
Biotechnology, 2003, 23(1): 83 - 86.
- [16] 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.
- [17] 廖白璐, 刘 勇, 谢 艳, 等. 刺蒴中分离的中国番茄黄化曲叶
病毒及伴随的卫星 DNA 分子的全基因组结构[J]. 植物病理学
报, 2007, 37(2): 138 - 143.
- [18] Fauquet C M, Bisaro D M, Briddon R W, et al. Revision of
taxonomic criteria for species demarcation in the family
Geminiviridae, and an updated list of *Begomovirus* species [J].
Archives of Virology, 2003, 148(2): 405 - 421.
- [19] 谢 艳, 李桂新, 周雪平. 从烟草上分离的中国番茄黄化曲叶病
毒及其卫星 DNA 的全基因组结构特征[J]. 科学通报, 2003, 48
(6): 593 - 597.
- [20] Harrison B, Robinson D. Natural genomic and antigenic variation in
whitefly - transmitted geminiviruses (*Begomoviruses*) [J]. Annual
Review of Phytopathology, 1999, 37(4): 369 - 398.
- [21] 赵黎明, 李 刚, 刘永光, 等. 番茄褪绿病毒与番茄黄化曲叶病
毒复合侵染的分子鉴定[J]. 中国蔬菜, 2014(12): 15 - 20.
- [22] 刘文浩, 仇平平, 辛相启, 等. 番茄黄化曲叶病毒山东泰安分离
物的全基因组克隆与分析[J]. 山东农业科学, 2012, 44(11):
4 - 7.
- [23] 董 迪, 朱艳华, 何自福, 等. 侵染广东黄秋葵的木尔坦棉花曲
叶病毒及伴随卫星 DNA 的分子特征[J]. 华南农业大学学报,
2012, 33(1): 33 - 39.
- [24] Briddon R W, Mansoor S, Bedford I D, et al. Identification of DNA
components required for induction of cotton leaf curl disease[J].
Virology, 2001, 285(2): 234 - 243.
- [25] Xie Y, Wu P J, Liu P, et al. Characterization of alphasatellites
associated with monopartite *Begomovirus*/betasatellite complexes in
Yunnan, China[J]. Virology Journal, 2010, 7(1): 178 - 187.
- [26] Shahid M S, Natsuaki K T. DNA 1 is no longer a constant feature of

刘 珊,何伟明,陈 宇. 金龙胆草 SRAP 遗传多样性及主要成分相关性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):30-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.007

金龙胆草 SRAP 遗传多样性及主要成分相关性分析

刘 珊^{1,2}, 何伟明¹, 陈 宇¹

(1. 攀枝花学院生物与化学工程学院, 四川攀枝花 617000; 2. 干热河谷特色生物资源研发四川省高校重点实验室, 四川攀枝花 617000)

摘要:为明确攀西金龙胆草种质资源情况,对 16 个居群的样品进行 SRAP 分析,并比较总黄酮、总皂苷和苦蒿素含量。采用 SRAP 进行遗传多样性分析,使用高效液相色谱法和分光光度法进行样品间成分含量相关性研究。SRAP 标记聚类分析将 16 个不同来源地的样品聚为三大类;总黄酮、总皂苷和苦蒿素 3 种有效成分含量相互存在正相关关系,但差异不显著性($P>0.05$)。DNA 分子聚类和成分含量聚类对样品亲缘划分的结果一致性不高。野生金龙胆草资源遗传多样性具有较强的区域相似性,有效成分含量则更依赖生长环境。这些结果对金龙胆草育种开发能提供数据支持。

关键词:金龙胆草;含量测定;相关性分析;遗传多样性

中图分类号: S567.23+9.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0030-04

金龙胆草(*Conyza blinii* H. Lév)是一种菊科白酒草属 2 年生草本植物,为川滇的民间药材,被 2015 年版《中华人民共和国药典》^[1]收录,该植物目前主要分布在四川攀(攀枝花市)西(凉山州)地区,呈野生状态。该植物含有丰富的萜类、生物碱、皂苷、黄酮和挥发油等次生代谢物^[2-4],已有成药商品“金龙胆草浸膏片”用于治疗慢性支气管炎,其中黄酮类和皂苷为该植物的主要药用成分,其总皂苷具有较强的抗肿瘤活性而在近年来得到持续研究^[5]。化合物苦蒿素是一种新克罗烷型二萜内酯,为药典中规定的该药材质量标准

控制物。金龙胆草在一些文献中常被误记载为 1 年生草本,但经笔者所在实验室实际栽种后发现为 2 年生植物,可见该药材的研究仍须要大力加强。本研究对攀西地区金龙胆草进行遗传多样性分析,并对其 3 种主要成分进行含量测定和分析,探究金龙胆草有效成分的相关性,为金龙胆草开展栽培药材的长期研究开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试用野生金龙胆草样品于同时期采集自四川省攀枝花市和凉山州,按照均衡抽样的原则,两两居群之间的地理距离>30 km,居群内样品间距离>15 m,每个居群采集>20 株的样品,分布点见表 1,由四川农业大学陈惠教授鉴定为金龙胆草。所有试验于 2017 年 1—7 月在干热河谷特色生物资源研发四川省高校重点实验室进行。

收稿日期:2018-01-13

基金项目:四川省教育厅重点项目(编号:16ZA0409);四川省高等学校重点实验室项目(编号:GR-2013-E-01)。

作者简介:刘 珊(1980—),女,四川夹江人,博士,副教授,主要从事药用植物生物化学与分子生物学研究。Tel:(0812)3371938; E-mail:chuannong2010@126.com。

the monopartite *Begomovirus* DNA β complex causing cotton leaf curl disease in Pakistan[J]. Tokyo University of Agriculture Repository, 2013,58(2):64-70.

[27] Guo W, Jiang T, Zhang X, et al. Molecular variation of satellite DNA beta molecules associated with *Malvastrum yellow vein virus* and their role in pathogenicity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008,74(6):1909-1913.

[28] Kon T, Hidayat S H, Hase S, et al. The natural occurrence of two distinct *Begomoviruses* associated with DNA beta and a recombinant DNA in a tomato plant from Indonesia[J]. Phytopathology, 2006,96(5):517-525.

[29] 何自福,虞 皓,罗芳芳. 广东番茄曲叶病毒 G3 分离物基因组 DNA-A 的分子特征[J]. 植物病理学报,2005,35(3):208-213.

[30] Padidam M, Beachy R N, Fauquet C M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons [J]. Journal of General Virology, 1995,76(2):249-263.

[31] Hong Y G, Harrison B D. Nucleotide sequences from tomato leaf curl viruses from different countries: evidence for three geographical

separate branches in evolution of the coat protein of whitefly-transmitted geminiviruses[J]. Journal of General Virology, 1995,76(8):2043-2049.

[32] 李正和,李桂新,谢 艳,等. 云南番茄曲叶病是由烟草曲茎病毒引起的[J]. 病毒学报,2002,18(4):355-361.

[33] 刘 怡. 中国番茄黄化曲叶病毒与烟草曲茎病毒卫星 DNA β 分子上症状决定因子的定位[D]. 杭州:浙江大学,2007:26-46.

[34] 青 玲. 伴随卫星分子的两组单组分双生病毒 TbCSV 和 TYLCCNV 之间的拮抗互作[J]. 植物保护学报,2010,37(1):12-18.

[35] 崔晓峰,周雪平. 中国番茄黄化曲叶病毒和烟草曲茎病毒 AC2 和 AC4 蛋白为 RNA 沉默的抑制子[J]. 科学通报,2004,49(23):2431-2436.

[36] 郑慧新,夏吉星,周小毛,等. 警惕烟草虱传播的番茄褪绿病毒病在我国快速扩散[J]. 中国蔬菜,2016(4):22-26.

[37] 阮 涛,于云奇,包凌云,等. 四川米易赛葵上粉虱传双生病毒的分子鉴定及复合侵染检测[J]. 植物保护学报,2011,38(5):419-424.