

吴然然,陈景斌,崔晓艳,等. 绿豆黄花叶病研究进展[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):33-35.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.008

绿豆黄花叶病研究进展

吴然然¹, 陈景斌¹, 崔晓艳¹, 闫强¹, 薛晨晨¹, 袁星星¹, 陈华涛¹, 张红梅¹, 刘晓庆¹, 缪亚梅², 陈新¹

(1. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏南京 210014; 2. 江苏沿江地区农业科学研究所, 江苏如皋 226541)

摘要: 绿豆黄花叶病是最具威胁的病毒性病害之一, 发病严重时可导致绿豆绝收, 在南亚及东南亚地区发病最为严重, 造成巨大的经济损失。本文主要介绍了绿豆黄花叶病症状、致病病毒及其传播媒介, 总结了目前针对绿豆黄花叶病抗性基因开发的分子标记及相关 QTLs 研究进展, 以期对我国防控绿豆抗黄花叶病、筛选及培育绿豆抗性品系相关分子育种工作和生产实践提供一定的指导意义。

关键词: 绿豆; 黄花叶病; 分子标记; QTLs; 研究进展

中图分类号: S435.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0033-03

黄花叶病 (yellow mosaic disease, YMD) 是普遍存在于作物中的一种病毒性病害, 20 世纪 40 年代末, 典型的 YMD 首次在印度西部的利马豆 (*Phaseolus lunatus* L.) 上被发现。随后 20 世纪 50 年代在印度北部的绿豆上也发现了 YMD。随后, YMD 在印度各地流行并传播到周边国家, 如斯里兰卡、巴基斯坦和孟加拉国等。这种病害发生严重时可导致绿豆绝收, 是南亚和东南亚最主要的绿豆生产制约因素之一, 造成了巨大的经济损失^[1-2]。本文主要介绍了绿豆黄花叶病症状、致病病毒、传播媒介、抗性基因分子标记及相关 QTLs 研究进展, 以期对绿豆抗 YMD 品种的分子育种、病毒防控和生产实践等提供指导。

1 绿豆黄花叶病症状

YMD 可以在绿豆生长的各个阶段发病。病毒侵染后的病害症状主要依赖于宿主种的易感性, 严重程度并不完全一致, 有的只是少数叶片上出现少量黄色斑点, 有的则是整株植物中所有叶片都发黄萎蔫随后坏死^[2]。一般而言, 染病初期, 绿豆嫩叶上会出现轻微黄色斑点或斑块, 随着病情的发展, 叶子呈现不规则的绿色和黄色斑块, 新的叶子可能出现完全黄色。叶子的大小一般不会受到太大影响, 但有时绿色的区域会稍微凸起, 叶子会有轻微的皱缩和缩小。染病植株通常晚熟, 花和豆荚很少, 长成的豆荚较小且向上卷曲、斑驳, 含有少量和较小颗粒的种子^[3-4]。在高易感株系中, 症状包括: 节间缩短、严重的植物发育迟滞没有产量或无花、产生小的畸形果荚、形成未成熟和枯萎的种子等^[2]。

2 绿豆黄花叶病致病病毒

引起绿豆 YMD 的病毒主要有绿豆黄花叶病毒 (mungbean yellow mosaic virus, MYMV)、印度绿豆黄花叶病毒 (mungbean yellow mosaic India virus, MYMIV) 等, 属于双生病毒家族 (Geminiviridae) 中的菜豆金黄花叶病毒属 (*Begomovirus*)^[5]。双生病毒家族由小的环状单链 DNA 病毒组成, 大多数的基因组由 2 个部分组成, 其中 DNA-A 组分

收稿日期: 2019-01-16

基金项目: 江苏特粮特经产业技术体系集成创新中心项目 (编号: JATS[2018]255); 国家自然科学基金 (编号: 31871696); 江苏省科技支撑计划 (编号: BE2016327); 国家食用豆产业技术体系生物防治与综合防控岗位科学家 (编号: CARS-08-G15)。

作者简介: 吴然然 (1985—), 女, 河北石家庄人, 博士, 助理研究员, 主要从事豆类作物分子育种研究。E-mail: rrwu@jaas.ac.cn。

通信作者: 陈新 (1970—), 男, 江苏射阳人, 博士, 研究员, 主要从事豆类作物遗传育种研究。E-mail: cx@jaas.ac.cn。

[46] Li M, Li X, Zhou Z, et al. Reassessment of the four yield-related genes GnlA, DEPI1, GS3, and IPA1 in rice using CRISPR/Cas9 system [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(12217): 377.

[47] Uauy C. Wheat genomics comes of age [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 36: 142-148.

[48] Yi Z, Zhen L, Yuan Z, et al. Efficient and trans gene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12617.

[49] Shan Q W, Wang Y P, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 686-688.

[50] Liang Z, Chen K, Zhang Y, et al. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or

ribonucleoproteins [J]. *Nature protocols*, 2018, 13(3): 413-430.

[51] Bhowmik P, Ellison E, Polley B, et al. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9 [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 6502.

[52] Liang Z, Chen K L, Li T D, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14261.

[53] Zhang Y, Liang Z, Zong Y, et al. Efficient and trans gene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12617.

[54] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system [J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(10): 2395-2410.

编码病毒在单个细胞中复制所需的所有蛋白质功能,而 DNA-B 组分则提供系统传播所需的运动功能^[6]。双生病毒家族是植物病毒中的第二大家族,目前已发现九个属,分别为菜豆金黄花叶病毒属(*Begomovirus*)、伊朗甜菜曲顶病毒属(*Becurtovirus*)、弯叶画眉草条纹病毒属(*Eragrovirus*)、芜菁曲顶病毒属(*Turncurtovirus*)、玉米线条病毒属(*Mastrevirus*)、甜菜曲顶病毒属(*Curtoovirus*)、番茄伪曲顶病毒属(*Topocovirus*)、葡萄红斑病毒属(*Grabovirus*)和大戟小刺潜伏病毒属(*Capulavirus*)^[7-8]。在过去几十年中,这些病毒已成为毁灭性病原体,特别是在热带和亚热带地区,威胁着农作物的生产,造成巨大的经济损失。其中,菜豆金黄花叶病毒属是双生病毒家族中最大的属,在木薯、棉花、谷类、豆类和蔬菜等多种作物中都能侵染致病,也是危害最为严重的病毒属^[1,7]。MYMV 导致的绿豆 YMD 主要分布在印度的西部和南部、泰国和印度尼西亚。MYMIV 引发的绿豆 YMD 主要在印度的中部、东部和北部、巴基斯坦、孟加拉国、尼泊尔和越南^[4-5]。此外,据报道 MYMV 和 MYMIV 除了可以引起绿豆发病外,也可以侵染长豇豆[*Vigna unguiculata* (L.) Walp]、大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)、黄瓜(*Cucumis sativus*)等引起 YMD^[9-12]。受农耕方式、交通系统、昆虫媒介迁移等因素的影响,这些病毒正渐渐向邻近国家甚至世界范围扩散。

3 绿豆黄花叶病毒的传播媒介

粉虱是一种具有传播多种病毒能力的重要昆虫类群。其中,烟粉虱(*Bemisia tabaci*,半翅目、粉虱科)是最主要的媒介类群。目前已知菜豆金黄花叶病毒属中的 320 多种病毒(包括 MYMV 和 MYMIV)都是由烟粉虱传播的。该媒介物种是一种由多个遗传群体组成的复杂物种,在区域性菌株和个体间具有不同的内共生体^[8,13]。虽然 MYMV/MYMIV 在绿豆生长的各个阶段均可以侵染,但由于烟粉虱种群随不同地点、不同季节而波动性变化,导致绿豆 YMD 的发病并不均匀。一般情况下,在利于烟粉虱增殖的春季和雨季,会有较高的发病率^[4]。目前防治绿豆 YMD 的主要方法还是化学防控,即喷洒杀虫剂以控制烟粉虱的数量,但这种方法在烟粉虱严重侵袭时效果并不显著,而且对环境也造成一定程度的污染^[2,5]。因此最有效、经济且环保的控制 YMD 的途径是培育绿豆 MYMV/MYMIV 抗性品系,这也是目前绿豆育种工作者的主要目标之一。

4 MYMV/MYMIV 抗性基因分子标记研究

抗/耐受 MYMV/MYMIV 基因的遗传信息对培育绿豆抗性品系具有重要意义。经典遗传学研究表明,绿豆中 YMD 抗性性状由带有修饰的单一主要隐性基因控制或者 2 个隐性基因控制,又或者具有互补效应的隐性基因控制^[5,14]。这似乎暗示利用传统的育种方法并不难获得抗性株系。然而,由于田间烟粉虱种群分布的不均匀和波动会降低绿豆抗性评价的准确性,导致抗性基因型选择的误差,费时费力,且效果不显著^[2]。分子标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)是作物遗传改良的有效工具,具有快速、准确、不受环境条件干扰的优点^[15]。

近几十年,绿豆研究中一些常用分子标记被开发。如早期的 RFLP 标记^[16]、RAPD 标记^[17-18]以及少量的 SSR 标记^[19],这些标记多用于鉴定遗传的多变性和相似性以提高作物产量。随着测序技术的进一步发展,尤其是绿豆全基因组序列的公布^[20],越来越多的 SSR 和 SNP 标记被开发^[21]。SSR 和 SNP 标记的开发极大推动了绿豆高密度遗传图谱构建,为后续 QTLs 定位以及基因精细定位奠定了基础^[17,20]。

虽然 YMD 病害发现得较早,但目前与该病害有关的分子标记报道较少。2006 年, Selvi 等利用分离群体分组分析法在抗 MYMV 绿豆株系 ML267 和易感株系 CO4 的杂交 F₃ 代群体中开发了 RAPD 标记,发现 OPS7₉₀₀ 标记与 MYMV 抗性相关^[22]。随后,印度研究学者利用易感株系 VBN (Gg)2 和抗性株系 KMG 189 的杂交 F₂ 代群体,也开发了 RAPD 标记,发现 OPBB 05 260 标记与 MYMV 抗性紧密相关^[23]。2011 年, Maiti 等报道了绿豆抗 MYMIV 的分子标记——抗病基因类似物标记(resistant gene analogues, RGAs),利用易感株系 cv. T9 和 3 个抗病株系 VM1、VM4 和 VM6 杂交的 F₂ 和 F₃ 代,最终鉴定了 2 个 MYMIV 抗性标记位点 YR4 和 CYR1,其中 CYR1 与 MYMIV 抗性株系完全连锁,并与黑绿豆的 MYMIV 抗性株系的 F₂、F₃ 代共分离^[24]。随后,研究人员又在 RAPD 基础上开发了绿豆抗 MYMV 的序列特征扩增区标记(sequence characterized amplified region, SCAR),利用了抗性株系 TM-99-37 和易感株系 Mulmarada 杂交后代构建的重组近交系,鉴定的抗性标记为 OPB-07600^[25]。但目前尚无这些标记在育种中的成功应用报道。

5 MYMV/MYMIV 抗性相关 QTLs 研究

绿豆中 MYMIV 抗性相关的 QTLs 在近几年刚有报道。2013 年, Chen 等首次报道了印度地区绿豆 MYMIV 相关 QTLs,该团队利用抗 MYMIV 株系 NM92 和抗豆象株系 TC1966 杂交 F₁₂ 代构建的 RILs (200 个),运用 RAPD、AFLP 和 SSR 等标记在 3 个不同的连锁群上鉴定了 4 个主要的 MYMIV 抗性 QTL^[26]。同一年 Kitsanachandee 等利用抗性株系 NM10-12-1 和易感株系 KPS2 的杂交 F₃ 代构建的 RILs (122 个),分别在印度和巴基斯坦地区进行了抗性评估,初步定位了 MYMIV 相关 QTLs,印度地区鉴定到 3 个——*qYMIV1*、*qYMIV2*、*qYMIV3*,巴基斯坦地区鉴定到 2 个——*qYMIV4* 和 *qYMIV5*。其中 *qYMIV1* 和 *qYMIV4* 都位于第二个连锁群且相同标记之间,是同一个 QTL^[2]。随后 Alam 等在孟加拉国地区检测了 MYMIV 相关 QTLs,利用抗 MYMIV 株系 BM6 和易感株系 BM1 的杂交 F₂ 和 BC₁ F₁ 群体,最终确定了 2 个主要 QTL——*qMYMIV2* 和 *qMYMIV7*^[5]。分析发现,Alam 报道的 *qMYMIV2* 与 Chen 报道的 MYMIVr9_25,以及 Kitsanachandee 等鉴定到的 *qYMIV1* 都位于相同的分子标记之间。由此可见,*qYMIV1* 在不同的季节、地点、环境和遗传背景下都较为稳定,是一个普遍抗性的 QTL,适于进一步精细定位并应用于分子标记辅助育种中。

6 结语

虽然我国目前尚未发现大面积的绿豆 YMD 病害,但我国与绿豆 YMD 高发区印度接壤,并不能排除病毒入侵的可

能性。一方面,我们需要对致病病毒 MYMV/MYMIV 等加强检疫,另一方面,绿豆育种工作者也要注重开展相关基础研究,鉴定或者培育抗性资源,防患于未然。绿豆抗 MYMV/MYMIV 的分子标记和 QTLs 的研究为后续分子育种奠定了重要的理论基础。绿豆基因组全序列信息的公开也为绿豆基因水平研究提供了很多便利^[20]。这将推动 MYMV/MYMIV 抗性基因的确定,继而为分子育种工作的顺利开展提供依据。绿豆 MYMV/MYMIV 抗性品系是应对 YMD 最有效的途径。

参考文献:

- [1] Varma A, Malathi V G. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production [J]. *Annals of Applied Biology*, 2003, 142 (2): 145 – 164.
- [2] Kitsanachandee R, Somta P, Chatchawankanphanich O, et al. Detection of quantitative trait loci for mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) resistance in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in India and Pakistan [J]. *Breeding Science*, 2013, 63 (4): 367 – 373.
- [3] Rouhibakhsh A, Malathi V G. Severe leaf curl disease of cowpea – a new disease of cowpea in northern India caused by mungbean yellow mosaic India virus and a satellite DNA beta [J]. *Plant Pathology*, 2005, 54 (2): 259 – 259.
- [4] Singh N, Mallick J, Sagolsem D, et al. Mapping of molecular markers linked with MYMIV and yield attributing traits in mungbean [J]. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2018, 78 (1): 118 – 126.
- [5] Alam A K M M, Somta P, Srinives P. Identification and confirmation of quantitative trait loci controlling resistance to mungbean yellow mosaic disease in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] [J]. *Molecular Breeding*, 2014, 34 (3): 1497 – 1506.
- [6] Shivaprasad P V, Akbergenov R, Trinks D, et al. Promoters, transcripts, and regulatory proteins of mungbean yellow mosaic geminivirus [J]. *Journal of Virology*, 2005, 79 (13): 8149 – 8163.
- [7] Li F, Xu X, Huang C, et al. The AC5 protein encoded by mungbean yellow mosaic India virus is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing – based antiviral defenses [J]. *New Phytologist*, 2015, 208 (2): 555 – 569.
- [8] Zerbini F M, Briddon R W, Idris A, et al. ICTV virus taxonomy profile: geminiviridae [J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98 (2): 131 – 133.
- [9] Tsai W S, Shih S L, Rauf A, et al. Genetic diversity of legume yellow mosaic begomoviruses in Indonesia and Vietnam [J]. *Annals of Applied Biology*, 2013, 163 (3): 367 – 377.
- [10] Shahid M S, Al – Mahmooli I H, Al – Sadi A M, et al. Identification of mungbean yellow mosaic India virus infecting cucumber in Oman [J]. *Plant Disease*, 2018, 102 (2): 465 – 466.
- [11] Marabi R S, Sagare D B, Das S B, et al. Molecular detection of mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) infecting soybean in Madhya Pradesh [J]. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 2017, 14 (1): 315 – 318.
- [12] Shahid M S, Briddon R W, Al – Sadi A M. Identification of mungbean yellow mosaic Indian virus associated with tomato leaf curl betasatellite infecting *Phaseolus vulgaris* in Oman [J]. *Journal of Phytopathology*, 2017, 165 (3): 204 – 211.
- [13] Ansari P G, Singh R K, Kaushik S, et al. Detection of symbionts and virus in the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), vector of the mungbean yellow mosaic India virus in Central India [J]. *Applied Entomology and Zoology*, 2017, 52 (4): 567 – 579.
- [14] Dhole V J, Reddy K S. Genetic analysis of resistance to mungbean yellow mosaic virus in mungbean (*Vigna radiata*) [J]. *Plant Breeding*, 2012, 131 (3): 414 – 417.
- [15] Lande R, Thompson R. Efficiency of Marker – Assisted selection in the improvement of quantitative traits [J]. *Genetics*, 1990, 124 (3): 743 – 756.
- [16] Young N D, Kumar L, Menanciohautea D, et al. RFLP mapping of a major bruchid resistance gene in mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 84 (7/8): 839 – 844.
- [17] Kim S K, Nair R M, Lee J, et al. Genomic resources in mungbean for future breeding programs [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 626.
- [18] Kaga A, Tomooka N, Egawa Y, et al. Species relationships in the subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis [J]. *Euphytica*, 1996, 88 (1): 17 – 24.
- [19] Yu K F, Park S J, Poysa V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*) [J]. *Genome*, 1999, 42 (1): 27 – 34.
- [20] Kang Y J, Kim S K, Kim M Y, et al. Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5543.
- [21] Wang L X, Elbaidouri M, Abernathy B, et al. Distribution and analysis of SSR in mungbean (*Vigna radiata* L.) genome based on an SSR – enriched library [J]. *Molecular Breeding*, 2015, 35 (1): 25.
- [22] Selvi R, Muthiah A R, Manivannan N, et al. Tagging of RAPD marker for MYMV resistance in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] [J]. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2006, 5 (2): 277 – 280.
- [23] Karthikeyan A, Sudha M, Senthil N, et al. Screening and identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to mungbean yellow mosaic virus (MYMV) resistance in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] [J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2012, 45 (6): 712 – 716.
- [24] Maiti S, Basak J, Kundagrami S, et al. Molecular marker – assisted genotyping of mungbean yellow mosaic India virus resistant germplasm of mungbean and urdbean [J]. *Molecular Biotechnology*, 2011, 47 (2): 95 – 104.
- [25] Dhole V J, Reddy K S. Development of a SCAR marker linked with a MYMV resistance gene in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) [J]. *Plant Breeding*, 2013, 132 (1): 127 – 132.
- [26] Chen H M, Ku H M, Schafleitner R, et al. The major quantitative trait locus for mungbean yellow mosaic Indian virus resistance is tightly linked in repulsion phase to the major bruchid resistance locus in a cross between mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] and its wild relative *Vigna radiata* ssp. *sublobata* [J]. *Euphytica*, 2013, 192 (2): 205 – 216.