

姜 静, 王银磊, 李亚茹, 等. 江苏省及其他地区番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定及序列分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 238-240.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.035

江苏省及其他地区番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定及序列分析

姜 静^{1,2}, 王银磊^{1,3}, 李亚茹^{1,2}, 赵丽萍^{1,3}, 周 蓉^{1,3}, 陈伟男^{1,3}, 赵统敏^{1,3}, 余文贵^{1,2}

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 3. 江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

关键词: 番茄; 番茄黄化曲叶病毒; 分子鉴定; 序列分析

中图分类号: S641.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)01-0238-03

Molecular identification and sequence analysis of tomato yellow leaf curl virus in Jiangsu province and its peripheral area

JIANG Jing^{1,2}, WANG Yin-lei^{1,3}, LI Ya-ru^{1,2}, ZHAO Li-ping^{1,3}, ZHOU Rong^{1,3}, CHEN Wei-nan^{1,3}, ZHAO Tong-min^{1,3}, YU Wen-gui^{1,2}

(1. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Key Laboratory of High Efficiency Horticultural Crop Genetic Improvement of Jiangsu Province, Nanjing 210014, China)

Key words: tomato; tomato yellow leaf curl disease; molecular identification; sequence analysis

番茄黄化曲叶病 (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) 是一种严重威胁番茄农业生产的病害, 该病是由番茄黄化曲叶病毒 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 引发, 通常感病的番茄植株表现为顶部叶片皱缩、黄化、卷曲, 严重的植株矮化、停止生长等^[1-2]。番茄黄化曲叶病毒是双生病毒, 在植物病毒中是具有孪生颗粒形态的单链环状 DNA (Single stranded DNA, ssDNA), 通过带 TYLCV 的烟粉虱 (*Bemisia tabaci* Gennadius) 传播^[3-5]。TYLCV 的 DNA-A 组分约 2.8 kb, 由病毒链 (Virion-sense strand) 和互补链 (Complementary-sense strand) 共同编码, 共有 6 个开放阅读框 (Opening reading frame, ORFs), 能够在寄主细胞核内形成双链 DNA 复制中间体^[6]。目前世界各地的 TYLCV 分离物的全基因组序列信息已被大量报道, 中国的北京、河北、天津、河南等地区的 TYLCV 分离物序列已进行测序分析, 结果证明, 不同地区的病毒基因组序列都具有较高的同源性^[7-10]。

番茄是江苏省主要的蔬菜作物, 常年栽培面积在 4.78×10^4 hm² 以上, 在蔬菜周年供应中占有重要地位^[11]。但随着 TYLCV 在江苏省的暴发, 番茄的农业生产受到了严重的危害。虽然农业生产中对 TYLCV 的防治可以针对中间传毒媒介烟粉虱进行物理防治或化学防治, 但其成本高、防治效果不理想还污染了环境, 也不能彻底解决 TYLCV 的危害。而选育抗病的番茄品种是一种经济绿色有效的方法, 可以从根源上解决问题^[12-14]。但是在实际的农业生产过程中已发现, 同一份抗 TYLCV 的番茄材料, 在不同地区其抗性水平存在差异, 因为 TYLCV 是单链的环状 DNA 病毒, 其病毒基因组极易发生基因组重组和变异。因此在开展抗性育种工作前, 对品种栽培区域的 TYLCV 进行分析, 可以确保选育的品种对该地区的 TYLCV 具有抗病性。本试验对江苏省及其周边地区的 TYLCV 分离物进行序列分析和系统发育分析, 旨在明确 TYLCV 不同株系在不同地区的分布和传播途径, 为有针对性的品种选育奠定基础, 也为进一步揭示 TYLCV 的致病机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

2015 年秋季, 在北京市 (BJTZ)、武汉市 (HBWH)、南京市江宁区 (JSNJ-JN)、南京市六合区 (JSNJ-LH)、扬州市 (JSYZ)、盐城市 (JSYC)、南通市 (JSNT)、宿迁市 (JSSQ-SY)、连云港市 (JSLYG-GY)、郑州市 (HNZZ)、临安市 (ZJLA)、杭州市 (ZJHZ) 等 12 个地区的番茄产地选取顶部叶片黄化、叶片边缘向上卷曲、植株矮小、生长迟缓等具有典型番茄黄化

收稿日期: 2017-05-02

基金项目: 十三五国家重点研发计划项目 (2016YFD0101703); 国家自然科学基金青年基金项目 (31401884); 江苏省农业科学院基本科研业务专项 [ZX(15)2003]

作者简介: 姜 静 (1989-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 从事蔬菜遗传育种研究。 (E-mail) hhjiangj@126.com。王银磊为共同第一作者。

通讯作者: 赵统敏, (E-mail) tmzhaomail@163.com; 余文贵, (E-mail) wenguiyu@jaas.ac.cn

曲叶病毒病症状的植株,取植株顶部幼嫩叶片各3份,用液氮速冻后保存于-80℃冰箱备用。

1.2 TYLCV 全长基因的克隆和分析

用植物基因组DNA提取试剂盒(快速型,Karroten公司产品),提取番茄感病叶片的总DNA,得到的样品DNA溶液于-20℃保存备用。根据GenBank中已获得的TYLCV不同株系全长基因组序列,通过序列同源性比对,在保守区域序列处设计1对相邻背向引物713-F/R和检测引物TY-F/R。引物713-F/R分别为5'-CATGTTCTTCTTGCTTCGTG-3'和5'-CCTGATTAGTGTGATTCTGC-3',扩增片段大小为2.8 kb;引物TY-F/R分别为5'-CGGGATGATATTAAGCATACTGG-3'和5'-GTTGCATACACTGGATTAGAGGC-3',扩增片段大小为494 bp。引物设计用Primer 5.0软件,引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。

TYLCV全长扩增PCR体系(25.00 μl):DNA模板稀释10倍后加2.50 μl,10 μmol/L正反向引物各0.25 μl,高保真酶Max(TaKaRa公司产品)12.50 μl,ddH₂O 9.50 μl。PCR反应条件:98℃变性10 s,55℃退火15 s,72℃延伸15 s,共35个循环。用1%琼脂糖凝胶电泳观察PCR结果。

利用胶回收试剂盒(TaKaRa公司产品)对PCR扩增产物中2.8 kb的特异性条带进行回收、纯化,然后在3'末端加A(TaKaRa公司产品),形成可以与pMD19-T载体连接的粘性末端。反应体系(20.0 μl):10×Easy Taq Buffer 2.0 μl,dNTP 2.5 μl,回收产物14.0 μl,Taq酶0.5 μl,Mg²⁺ 1.0 μl。在PCR仪中,72℃反应1 h。产物克隆到pMD19-T载体上,转化到大肠杆菌感受态细胞中,在含氨苄青霉素的LB固体培养基上37℃培养12~16 h,挑单菌落进行PCR鉴定。PCR体系为20 μl,包括DNA模板菌斑,上下游检测引物各1 μl,2×Taq Master Mix DNA聚合酶10 μl,ddH₂O 8 μl。PCR反应程序为:94℃预变性5 min,94℃变性45 s,49℃退火45 s,72℃延伸45 s,37个循环,最后72℃延伸10 min,4℃保存。PCR产物于1.2%琼脂糖凝胶中在电压5 V/cm条件下电泳20 min,以100 bp DNA marker为标准,用凝胶成像仪观察是否存在目的片段大小的条带。根据结果选取每个分离物的阳性克隆送金斯瑞生物科技有限公司进行测序,以健康植株为阴性对照。

1.3 序列分析

DNA序列用DNAMAN Version 6.0进行处理和分析。通过NCBI Blast(Basic local alignment search tool)检索TYLCV同源序列信息,采用Clustal W进行多序列比较分析,采用MEGA 5.1的邻近相邻法NJ(Neighbor-joining)对该分离物序列和GenBank中不同地区的TYLCV序列进行序列同源性比较分析和系统进化树分析,重复次数是1 000。

2 结果与分析

2.1 番茄黄化曲叶病毒的基因检测及全长基因组序列的扩增

以提取的番茄叶片总DNA为模板,用引物TY-F/R扩增出450 bp的片段,得到与预期大小一致的目的片段。测序后在NCBI上进行BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)同源性比对,证实所扩增序列为TYLCV部分序

列。利用相邻背向引物713-F/R通过PCR扩增,获得番茄植株病毒分离物的DNA-A近全长基因组序列,序列测定结果表明,该序列大小为约2.8 kb。

2.2 番茄黄化曲叶病毒的同源性

查找病毒分离物DNA-A近全长基因组序列的开放阅读框,结果表明该序列共编码6个开放阅读框(ORF),分别为位于病毒链上的2个ORF(AV1和AV2)和位于互补链上的4个ORF(AC1、AC2、AC3和AC4)。上述特征表明,12个地区的分离株系所测病毒为番茄黄化曲叶病毒,并且只含有DNA-A组分。

为了进一步了解分离株系携带病毒的分类和进化来源,选取NCBI上中国地区及国际上已经报道的能引起番茄黄化曲叶病的病原分离物DNA-A序列,与本研究中的TYLCV进行同源性分析,序列包括国内不同省份地区的TYLCV、国外不同地区的病毒分离物以及国际病毒委员会根据不同株系划分的几种分离物。分析结果显示,在核苷酸水平上,12个病毒与国内其他地区病毒的同源性在98.30%至99.60%之间,具有很高的同源性;与日本(JAPAN-AB19296)和韩国(Korea-GU126513)地区的同源性最高,同源性均在99.00%以上;除南京-江宁和武汉地区的病毒外,墨西哥(Mexico-DQ631892)地区的与其他病毒间的同源性均在99.00%以上;苏丹(Gezira-AY044138)和伊朗(IRAN-GU076453)地区的与测定样品的亲缘关系较远,平均同源性分别为89.00%和89.10%。在本研究选取的12个样品内,南京江宁、武汉和临安这3个地区的样品与其他9个地区的样品的同源性稍低,均小于99.00%,而其他地区的样品间同源性,除北京与盐城为98.90%以外,其他均在99.00%以上。

2.3 番茄黄化曲叶病毒的系统发育关系

为了进一步揭示番茄黄化曲叶病毒的系统发育关系,选取NCBI上中国地区及国际上已经报道的能引起番茄黄化曲叶病原分离物的DNA-A序列,与本研究中的TYLCV进行系统发育进化树的构建。结果显示,宿迁(JSSQ-SY)、连云港(JSYG-GY)、郑州(HNZZ)、北京(BJTZ)、南京六合(JSNJ-LH)、南通(JSNT)、扬州(JSYZ)、盐城(JSYC)、杭州(ZJHZ)地区的亲缘关系较近,进化上处于一个大的分支,与山东寿光(SDSG-XC-KC999851)、南京(NANJING-FN256259)、北京(Beijing-GU983859)、墨西哥(Mexico-DQ631892)地区的亲缘关系较近,形成一个更大的分支。南京-江宁(JSNJ-JN)地区的单独形成一个独立小分支,武汉(HBWH)、临安(ZJLA)地区的亲缘关系较近,以上3地区的与韩国(Korea-GU126513)、以色列(Israel-JX128099)、日本(JAPAN-AB192966)地区的亲缘关系更近。

3 讨论

本研究对江苏省及其周边不同地区番茄产地的番茄黄化曲叶病毒进行了分子鉴定与序列分析,对不同地区番茄产地具有典型黄化曲叶病毒病症状的植株上所采集的病毒样品进行全长基因组的扩增及序列分析,证实12个不同番茄产地的病毒分离物均为番茄黄化曲叶病毒。TYLCV病毒分离物序列全长均约为2.8 kb。

在双生病毒科病毒同源性比较中,全基因组序列同源性小于 89% 的被认为是不同病毒,同源性大于 89% 则被认为是同一病毒的不同株系^[15-17]。如果同种双生病毒基因组序列同源性大于 94%,则被认为是同一株系的不同分离物^[18]。据此,TYLCV 分离物被分为 Gezira (TYLCV-Gez)、Iran (TYLCV-IR)、Israel (TYLCV-IL)、Mild (TYLCV-Mild) 和 Oman (TYLCV-OM) 等株系^[19-20]。本研究在上述不同株系中选择与中国 TYLCV 同源性高的株系进行比较分析。通过本研究中 12 个地区的病毒样品与不同株系病毒序列进行比较分析,确定与 TYLCV-IL 株系的同源性均在 98.8% 以上,与 TYLCV-Gez 株系 Gezira-AY044138 的同源性为 88.8%~89.3%,与 TYLCV-OM 株系 IRAN-GU076453 的同源性在 88.7% 至 89.4% 之间,基本上符合同一病毒不同株系的划分要求,但个别地区的同源性低于 89%,存在病毒突变为不同病毒类型的可能。12 个病毒在核苷酸水平上同源性均很高,同源性达到 98.40% 以上。袁伟等^[21]推测浙江省的病毒与云南省的病毒并不属于同一病毒,证实中国双生病毒种类繁多,地理环境和气候环境影响双生病毒的分布。本研究的 12 种病毒与日本 (JAPAN-AB19296) 和韩国 (Korea-GU126513) 地区的同源性最高,同源性均在 98.90% 以上,其次为墨西哥 (Mexico-DQ631892) 地区的,这与宋晰等^[7]测得北京地区病毒的亲缘关系相一致。

系统发育关系分析结果表明,在 12 个地区的病毒样品中,南京江宁、武汉和临安的 TYLCV 与其他地区的亲缘关系较远,其中南京 2 个地区的分在不同的分支中,与此前该地区的南京 (NANJING-FN256259) 在进化上有所差异,表明它们之间的基因组序列存在较高的变异。推测这可能是由于 TYLCV 病毒结构复杂,在复制过程中存在突变和重组^[22],变异比较随机。此外,烟粉虱携带不同病毒,在不同地区迁移也会造成本地病毒的改变。鉴于本研究结果,在开展针对 TYLCV 的番茄抗病育种中,为了防止病毒的变异导致番茄抗性的变化,对不同育种材料在不同地区进行当地病毒类型的抗病鉴定具有十分重要的意义。本研究结果为开展番茄抗病育种材料鉴定和抗病新品种的选育奠定了理论基础,也为今后进一步研究该病毒的分布、传播、变异与进化分析提供了理论依据。

参考文献:

- [1] HANSEN I M, LAPIDOT M, THOMMA B P H J. Emerging viral diseases of tomato crops[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2010, 23:539-548.
- [2] 季英华,朱叶芹,李 贵,等.江苏省及周边地区番茄黄化曲叶病毒寄主范围调查[J].江苏农业科学,2017,45(2):90-93.
- [3] HARRISON B D, ROBINSON D J. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminivirus (sBegomoviruses) [J]. Annual Reviews Phytopathology, 1999, 37:369-398.
- [4] CZOSNEK H, GHANIM M. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *bemisia tabaci* insights from studies with tomato yellow leaf curl virus [J]. Annals of Applied Biology, 2002, 140:215-231.
- [5] 田兆丰,刘伟成,谢 欢,等.不同番茄品种对番茄黄化曲叶病毒的抗病性鉴定[J].植物保护学报,2013,40(1):56-60.
- [6] LAZAROWITZ S G, SHEPHERD R J. Geminiviruses: genome structure and gene function [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1992, 11(4):327-349.
- [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,2013,42(2):113-119.
- [8] 白晓娟,李亚栋,王国华,等.番茄黄化曲叶病毒石家庄分离物的分子鉴定及序列分析[J].园艺学报,2015,42(1):167-173.
- [9] 金凤娟,薛 俊,郑艳红,等.天津地区番茄黄化曲叶病毒 DNA 的克隆和序列分析[J].华北农学报,2011,26(1):58-62.
- [10] 于云奇,阮 涛,杨水英,等.河南省番茄黄化曲叶病原分子鉴定及全基因组序列分析[J].西南大学学报(自然科学版),2014,36(1):13-17.
- [11] 赵统敏,余文贵,周益军,等.江苏省番茄黄化曲叶病毒病 (TYLCD) 的发生与诊断初报[J].江苏农业学报,2007,23(6):654-655.
- [12] 王银磊,赵统敏,余文贵,等.抗番茄黄化曲叶病新品种苏粉 15 号选育及早春栽培技术[J].江苏农业科学,2016,44(12):184-185.
- [13] LAPIDOT M, FRIEDMANN M. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses [J]. Annals of Applied Biology, 2002, 140(2):109-127.
- [14] STANLEY P A S, NCHEZ P A, RODRIGUEZ J M, et al. Prospects for biological control of *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) in greenhouse tomatoes of southern Spain [J]. Crop Protection, 2004, 23(8):701-712.
- [15] FUKUTA S, KATO S, YOSHIDA K, et al. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction [J]. Journal of Virological Methods, 2003, 112(1/2):35-40.
- [16] 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.
- [17] DENG D, MCGRATH P F, ROBINSON D J, et al. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminivirus in plant and vector insects by polymerase chain reaction with degenerate primers [J]. Annals of Applied Biology, 1994, 125:327-336.
- [18] 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.
- [19] ANTIGNUS Y, COHEN S. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) [J]. Phytopathology, 1994, 84(7):707-712.
- [20] MORIONES E, NAVAS-CASTILLO J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide [J]. Virus Research, 2000, 71:123-134.
- [21] 袁 伟,万红建,王荣青,等.浙江省番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定及序列分析[J].分子植物育种,2013,11(2):185-192.
- [22] DUFFY S, HOLMES E C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus Tomato yellow leaf curl virus [J]. Journal of Virology, 2008, 82(2):957-965.

(责任编辑:张震林)