

海南菜豆上粉虱传双生病毒的分子检测

车海彦,罗大全,杨旭光,符瑞益,叶莎冰

(中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所,海南 儋州 571737)

[摘要] 为了解粉虱传双生病毒在海南的发生情况,从海南儋州采集了 3 个菜豆病样,症状表现为花叶、皱缩、叶背部叶脉突起,根据粉虱传双生病毒基因组 DNA 基因间隔区及外壳蛋白基因保守序列设计的简并引物,对这 3 个样品进行了 PCR 检测,从其中两个样品中扩增到预期大小为 522 bp 的 DNA 片段。PCR 产物经克隆后进行序列测定,BLAST 分析结果表明,该序列与与印度绿豆黄花叶病毒豇豆分离物(GenBank 登录号:AF481865)的同源性最高,为 65.9%,说明海南菜豆中存在着粉虱传双生病毒的侵染。

[关键词] 菜豆;粉虱传双生病毒;分子检测

[中图分类号] S432.4⁺1;Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0139-04

Molecular detection of whitefly-transmitted Geminivirus in *Phaseolus vulgaris* L. in Hainan Island

CHE Hai-yan, LUO Da-quan, YANG Xu-guang, FU Rui-yi, YE Sha-bing

(Environmental and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: To investigate the occurrence of whitefly-transmitted geminivirus in *Phaseolus vulgaris* L. in Hainan, three virus-infected *Phaseolus vulgaris* L. samples with mosaic, crinkle and vein plum symptom were collected in Danzhou, Hainan Province. A degenerate primer pair was designed according to the conserved sequence of CP gene and intergenic spacer of WTG, and a single PCR product of expected size (522 bp) was amplified from two samples by PCR, cloned and sequenced. BLAST analysis showed that PCR product had a geminiviral gene origin, and the sequence had the highest sequence identity (65.9%) with that of *Mungbean yellow mosaic India virus* [Cowpea] (AF481865), which indicated that two samples were infected with geminiviruses.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L.; whitefly-transmitted geminivirus; molecular detection

粉虱传双生病毒(Whitefly-transmitted geminiviruses, WTG)是一类广泛发生在热带、亚热带地区植物上的具有孪生颗粒形态的单链 DNA 病毒,在分类上属双生病毒科(Geminiviridae)的菜豆金色黄花叶病毒属(*Begomovirus*),该属的大多数病毒都由 2 个组分(DNA-A 和 DNA-B)组成,为两条闭合环状 ssDNA 分子,长度相似,每条为 2.5~2.8 kb,

少数病毒为单组分,仅有 DNA-A 组分^[1]。近年来,多种粉虱传双生病毒在我国云南、广西、广东和海南等省区的多种作物和杂草上被发现^[2-8],而且该类病毒在我国的危害有蔓延和加重的趋势。笔者在海南开展大田病害调查过程中,获得了感病的菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)病株样品 C1、C2 和 C3,通过症状观察初步推测其为 WTG 侵染后引起的病

*收稿日期] 2006-09-04

[基金项目] 中国热带农业科学院科技基金项目(Rky 0303)

[作者简介] 车海彦(1976-),女,吉林镇赓人,助理研究员,硕士,主要从事植物病毒学研究。

E-mail: chehaiyan2002@yahoo.com.cn

害,本研究主要对以上 3 个病株样品叶片进行了分子检测,并对所得序列进行了分析,旨在为 WTG 病害的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 双生病毒样品的来源

菜豆病株样品 C1、C2 和 C3 采自海南儋州地区,症状表现为花叶、皱缩、叶背部叶脉突起。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取及 PCR 扩增 采用 CTAB 法提取菜豆病株样品 C1、C2 和 C3 叶片的 DNA^[9]。采用谢艳等^[10]方法,根据双生病毒共同区及外壳蛋白基因保守序列,设计粉虱传双生病毒的通用引物对 PA (5-TAATA TTACCKGWKGVCSC-3) 和 PB (5-TGGACYTTRCAWGGBCCTTCA-3) (K 为 G 或 T;W 为 A 或 T;V 为 A,C 或 G;S 为 C 或 G;Y 为 C 或 T;R 为 A 或 G;B 为 C,T 或 G),引物由上海 Sangon 公司合成。PCR 反应条件:95 预变性 1 min,95 变性 1 min,55 退火 30 s,72

延伸 1.5 min,循环 35 次;最后 72 延伸 5 min。PCR 反应以感染粉虱传双生病毒的海南胜红蓟样品 DNA 为阳性对照,以表现健康的菜豆样品 DNA 为阴性对照,以无菌双蒸水为空白对照。

1.2.2 克隆和序列分析 将样品 C1、C2 和 C3 的 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,用 Ta KaRa Agarose Gel Purification Kit Ver. 2.0 回收纯化的大小约 500 bp 的特异性片段,克隆入 pMD 18-T 载体中,PCR 和酶切筛选阳性克隆,进行双向测序,序列测定委托大连宝生物工程有限公司完成。Ta KaRa Agarose Gel Purification Kit Ver. 2.0 和 DNA Marker DL2000 均购自大连宝生物工程有限公司。序列同源性检索利用国际基因数据库 GenBank 中的 BLAST 程序,序列比较用 DNASTar MegAlign 中的 Clustal W 方法进行。

1.2.3 亲缘关系树的构建 采用 DNAMAN 4.0 程序进行构建。用于亲缘关系树构建的双生病毒包括:印度绿豆黄花叶病毒豇豆分离物 (*Mungbean yellow mosaic India virus*-[Cowpea], MYMIV-[Cp], GenBank 登录号:AF481865);豇豆金色花叶病毒 (*Cowpea golden mosaic virus*, CPGMV, GenBank 登录号:A Y099067);镰扁豆黄花叶病毒 (*Dolichos yellow mosaic virus*, Do YMV, GenBank 登录号:A Y547317);印度绿豆黄花叶病毒尼泊尔分离物 (*Mungbean yellow mosaic India virus*-[Nep]

pal], MYMIV-[Nep], GenBank 登录号:A Y271895);印度绿豆黄花叶病毒孟加拉分离物 (*Mungbean yellow mosaic India virus*-[Bangladesh], MYMIV-[BG], GenBank 登录号:AF314145);印度绿豆黄花叶病毒伯格拉分离物 (*Mungbean yellow mosaic India virus*-[Bogra], MYMIV-[Bog], GenBank 登录号:AM087116);印度绿豆黄花叶病毒 (*Mungbean yellow mosaic India virus*, MYMIV, GenBank 登录号:DQ389154);绿豆黄花叶病毒 (*Mungbean yellow mosaic virus*, MYMV, GenBank 登录号:DQ400848);中国番茄黄曲叶病毒 Y302 分离物 (*Tomato yellow leaf curl China virus*-[Y302], TYLCCNV-[Y302], GenBank 登录号:AJ971522);中国番茄黄曲叶病毒 Y318 分离物 (*Tomato yellow leaf curl China virus*, TYLCCNV-[Y318], GenBank 登录号:AM261852);中国胜红蓟黄脉病毒 (*Ageratum yellow vein China virus*, AYVCNV, GenBank 登录号:AJ514868);假马鞭曲叶病毒 Hn5 分离物 (*Stachytarpheta leaf curl virus*-[Hn5], StaLCV-[Hn5], GenBank 登录号:AJ495814);云南烟草曲叶病毒 Y275 分离物 (*Tobacco leaf curl Yunnan virus*-[Y275], TbLCYNV-[Y275], GenBank 登录号:AJ971507);烟草曲茎病毒 (*Tobacco curly shoot virus*, TbCSV, GenBank 登录号:AJ512765);泰国番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*, TYLCTHV, GenBank 登录号:A Y514630);菜豆金色花叶病毒 (*Bean golden mosaic virus*, BGMV, GenBank 登录号:U92531);云南赛葵黄脉病毒 Y279 分离物 (*Malvastrum yellow vein Yunnan virus*-[Y279], MYV YNV-[Y279], GenBank 登录号:AJ971503);忍冬黄脉花叶病毒 (*Honeysuckle yellow vein mosaic virus*, HYVMV, GenBank 登录号:AB178948);黄花捻曲叶病毒 (*Sida leaf curl virus*, SiLCV, GenBank 登录号:AM050731)。

2 结果与分析

2.1 菜豆病株样品 DNA 的 PCR 检测

以提取的菜豆病株样品叶片总 DNA 为模板,用简并引物 PA、PB 进行 PCR 扩增,扩增产物的电泳结果见图 1。由图 1 可知,从采集的 C1、C2 样品中均扩增到大小约 500 bp DNA 片段,与从侵染粉虱传双生病毒的胜红蓟病株样品上扩增到的特异性条带大小一致,而在其他样品中均未能扩增到此条

带,表明菜豆病株样品 C1 和 C2 均感染了粉虱传双生病毒。

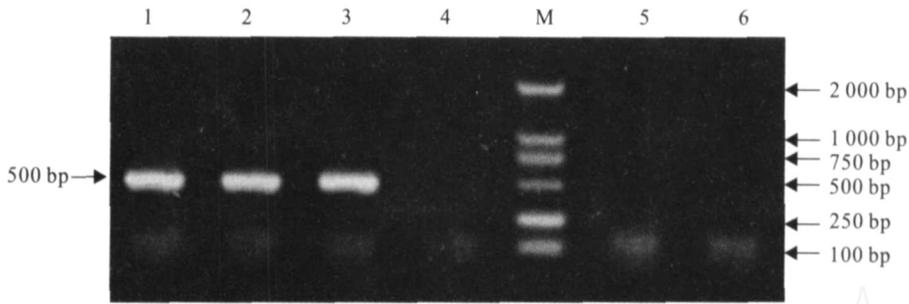


图 1 菜豆病株样品 DNA 的 PCR 检测

1. 感染粉虱传双生病毒的胜红蓊样品; 2. C1; 3. C2; 4. C3; M. Marker; 5. 健康菜豆样品; 6. 空白对照

Fig. 1 Detecting result of the diseased bean plants by PCR

1. Diseased Ageratum conyzoides sample; 2. C1 3. C2 4. C3; M. Marker; 5. Healthy bean; 6. Blank control

2.2 菜豆粉虱传双生病毒 DNA 的序列测定

将从菜豆病株样品 C1 和 C2 中扩增出的特异性片段纯化回收,克隆入 pMD18-T 载体中,对筛选得到的阳性克隆进行测序,结果发现,两者的测序结果完全相同,片段大小为 522 bp, GenBank 登录号为 DQ914441。利用国际基因数据库 GenBank 中的 BLAST 程序对特异性片段序列进行同源性检索,结果表明,与菜豆样品 C1 和 C2 特异性片段有同源关系的病毒均为双生病毒科菜豆金色黄花叶病毒属成员,特异性片段为双生病毒基因组 DNA-A 的基因间隔区和外壳蛋白基因的部分区域。用 DNASTar

MegAlign 中的 Clustal W 方法,对与其亲缘关系较密切的 *Begomovirus* 病毒进行比较发现,该病毒和已知的 *Begomovirus* 病毒基因组 DNA-A 的同源性较低,菜豆病株样品 C1 和 C2 的基因间隔区和部分外壳蛋白基因与印度绿豆黄花叶病毒豇豆分离物 (MYMIV-[Cp], GenBank 登录号: AF481865) 的同源性最高,为 65.9%。

为了初步明确 C1 和 C2 与 *Begomovirus* 中其他病毒的亲缘关系,选择了与其亲缘关系较近的部分双生病毒,利用 DNAMAN4.0 软件构建了 C2 与这些双生病毒的亲缘关系树(图 2)。

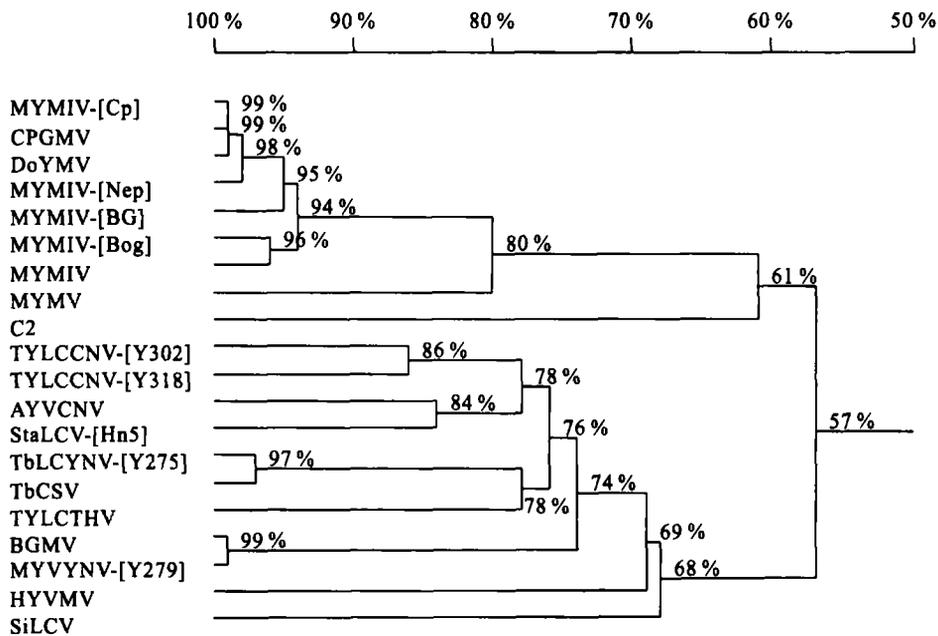


图 2 基于部分 DNA-A 核苷酸序列构建的 C2 与双生病毒的亲缘关系树

Fig. 2 Homology tree based on partial nucleotide sequence of A-component genomes of P1, H2 and other begomoviruses

由图 2 可知, C2 单独形成一个小的进化分枝,但与印度绿豆黄花叶病毒 (MYMIV)、镰扁豆黄花叶病毒 (Do YMV)、豇豆金色花叶病毒 (CPGMV) 和绿豆黄花叶病毒 (MYMV) 等 8 种病毒共处于同一

大的分枝上,说明 C2 与这 8 种病毒的亲缘关系较近;中国番茄黄曲叶病毒 Y302 分离物(TYLCCNV-[Y302])、假马鞭曲叶病毒 Hn5 分离物(StaLCV-[Hn5])和中国胜红蓟黄脉病毒(A YVCNV)等 11 个病毒处于另一个大的进化分枝上,与 C2 的亲缘关系相对较远。

3 讨 论

采用已报道的根据双生病毒基因组 DNA 基因间隔区及外壳蛋白基因的保守序列设计的粉虱传双生病毒的通用引物,从海南菜豆病株样品 C1 和 C2 DNA 中均扩增出了特异条带,且两个样品的测序结果完全相同,说明侵染 C1 和 C2 两个样品的可能为同一种双生病毒。进一步对该病毒基因间隔区和部分外壳蛋白基因的同源性比较发现,该病毒和已知的 *Begomovirus* 病毒的同源性较低,与 MYMIV-[Cp]的同源性最高,为 65.9%。因此,推测该病毒在进化关系上可能与其他的菜豆金色黄花叶病毒属成员相对较远。根据国际病毒分类委员会第八次报告中,关于 Geminiviridae 中 *Begomovirus* 基因组 DNA-A 全序列的同源性低于 89%,应为不同种的规定^[11],该病毒很可能是一种新的病毒种。目前,对 C1 和 C2 两个样品的病毒 DNA-A 全基因组的测定工作正在进行,以期获得更翔实的数据资料。

本研究首次对双生病毒在海南岛菜豆上的发生进行了报道,由于这类病毒的危害逐年加重,海南又是我国热带果蔬主要产区和冬季良种繁育的基地,了解粉虱传双生病毒在海南的发生及流行动态,对

于有效控制该病害的为害具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 刘玉乐,田 波. 植物双生病毒研究进展[J]. 中国病毒学, 1998,13(1):6-16.
- [2] 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.
- [3] 周雪平,彭 燕,谢 艳,等. 赛葵黄脉病毒:一种含有卫星 DNA 的双生病毒新种[J]. 科学通报,2003,48(16):1801-1805.
- [4] Xiong Q, Guo XJ, Che H Y, et al. Molecular characterization of a distinct *Begomovirus* and its associated satellite DNA molecule infecting *Sida acuta* in China[J]. J. Phytopathology, 2005, 153, 264-268.
- [5] 张 颖,殷勤燕,刘玉乐,等. 中国烟草曲叶病毒广西株的初步研究[J]. 中国病毒学,2000,15(4):405-408.
- [6] 张仲凯,丁 铭,方 琦,等. 粉虱传双生病毒在云南的发生分布[J]. 云南农业大学学报,2002,17(4):450-451.
- [7] 范三薇,周雪平. 从海南省杂草胜红蓟和假马鞭上检测到粉虱传双生病毒[J]. 植物病理学报,2003,33(6):513-516.
- [8] 何自福,虞 皓. 警惕广东番茄烟粉虱传双生病毒病的发生[J]. 广东农业科学,2003(4):41-43.
- [9] 谢 艳,周雪平,张仲凯,等. 从云南分离的烟草曲顶病毒为菜豆金色花叶病毒属的一个新种[J]. 科学通报,2001,46(17):1459-1462.
- [10] 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.
- [11] Stanley J, Bisaro D M, Briddon R W, et al. Geminiviridae [M]// Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus taxonomy 7th report of the international committee on taxonomy of viruses. London: Elsevier Academic Press, 2004: 301-326.