

## 云南番茄褪绿病毒和菜豆金色花叶病毒属病毒复合侵染番茄的分子鉴定

Molecular identification of mixed infection of *Tomato chlorosis virus* and begomoviruses in tomatoes in Yunnan Province尹跃艳<sup>1,2</sup> 卢训<sup>1</sup> 李婷婷<sup>1</sup> 李凡<sup>3</sup> 兰梅<sup>4</sup> 丁铭<sup>1\*</sup>

(1. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 农业部西南农业基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650223; 2. 云南省农业科学院高山经济植物研究所, 丽江 674199; 3. 云南农业大学云南省植物病理重点实验室, 昆明 650201; 4. 云南省农业科学院园艺作物研究所, 昆明 650205)

Yin Yueyan<sup>1,2</sup> Lu Xun<sup>1</sup> Li Tingting<sup>1</sup> Li Fan<sup>3</sup> Lan Mei<sup>4</sup> Ding Ming<sup>1\*</sup>

(1. Yunnan Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology; Key Laboratory of the Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture; Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, Yunnan Province, China; 2. Institute of Alpine Economic Plant, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Lijiang 674199, Yunnan Province, China; 3. Key Phytopathology Laboratory of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan Province, China; 4. Horticultural Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan Province, China)

菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus* 是双生病毒科 *Geminiviridae* 中病毒种类最多且最具经济毁灭性的病毒属 (Martelli et al., 2011)。云南省楚雄州元谋县是我国重要反季节蔬菜种植基地, 番茄是该县主要的反季节种植蔬菜, 由于气候条件适宜, 该地区番茄受菜豆金色花叶病毒属病毒危害严重。近年来随着抗番茄黄叶曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) 的番茄品种推广和大规模种植, 该类病毒病害得到了有效地预防。2016 年进行病害调查时发现番茄上有疑似番茄褪绿病毒 (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) 侵染的症状, 同时伴随有曲叶症状。为明确引起该病害的主要病原, 采集典型症状样品进行鉴定, 并对其病原的系统进化关系进行分析, 以期为进一步研究和评价该地区抗 TYLCV 番茄品种抗性变化及病毒种类更替提供理论依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

供试植物及品种: 感病番茄植株于 2016 年 9 月采自云南省楚雄州元谋县。番茄品种分别为德澳特 4224 (YN5786)、罗拉 (YN5787)、德澳特-DRW7728 (YN5788) 和东风 1 号 (YN5789)。

试剂及仪器: 植物 RNA 提取试剂 Trizol Regent,

美国英杰生命技术有限公司; 植物 DNA 提取试剂盒, 德国凯杰公司; 载体 pEGM-T easy, 美国普洛麦格公司。TP350 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

## 1.2 方法

感病样品的 RT-PCR 及 PCR 检测: 采用 Trizol 方法分别提取病样的总 RNA, 具体方法参照说明书, 同时根据 GenBank 中报道的 ToCV 序列设计并合成用于扩增 ToCV CP 基因全序列的特异性引物 ToCV-CP-F-4301: 5'-GAATCTTTTAGAAGCTTTGGTTT-AAGG-3' 和 ToCV-CP-R-5148: 5'-GATCCTCTTGA-TCCTCATAGATTTC-3', 采用 RT-PCR 两步法对 ToCV 的 CP 基因全序列进行扩增。第一链 cDNA 合成反应体系: 总 RNA 11.5 μL、5×RT Buffer 4 μL、10 mmol/L dNTP 2 μL、10 U/μL AMV Reverse Transcriptase 1 μL、40 U/μL RNase Inhibitor 0.5 μL、100 μmol/L 下游引物 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。反应条件: 70°C 10 min, 迅速插入冰上 5 min, 42°C 延伸 60 min。50 μL PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 5 μL、2.5 mmol/L dNTP 4 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL、cDNA 产物 5 μL、5 U/μL Taq Plus DNA 聚合酶 0.8 μL、灭菌 ddH<sub>2</sub>O 33.2 μL。PCR 反应条件: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 45 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个

循环;72°C延伸10 min。

根据植物DNA提取试剂盒操作说明提取病样的总DNA,利用Rojas et al.(2005)的引物PA:5'-taatat tac gkg wkg vcc sC-3'和PB:5'-tgg acy ttr caw jjb ccg cac a-3'。50 μL PCR反应体系:10×PCR Buffer 5 μL、2.5 mmol/L dNTP 4 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、样品总DNA模板1 μL、5 U/μL Taq Plus DNA聚合酶0.8 μL、灭菌ddH<sub>2</sub>O 37.2 μL。PCR反应条件:94°C预变性2 min;94°C变性45 s,50°C退火30 s,72°C延伸30 s,35个循环;72°C延伸10 min。

目的片段的克隆、测序及序列分析:回收目的片段并克隆到载体pGEM-T Easy上,筛选阳性克隆,每个样品挑选5个克隆进行测序。利用DNAMAN 7.0进行序列拼接及分析。采用了Mega 6.0软件,以邻接法构建系统进化树,进化树各分支的可信度用Bootstrap检测,1 000次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 ToCV的检测、序列及系统进化分析

结果表明,目的片段大小为848 bp,为ToCV CP基因的全序列,且4个样品序列的核苷酸相似性为100%,与GenBank中报道的ToCV CP基因序列核苷酸相似性为97.8%~99.9%。将该分离物命名为ToCV-YN(KY471138)。构建ToCV-YN与其它分离物的系统进化树,结果显示ToCV-YN分离物与亚洲国家的ToCV分离物聚为一支。表明4个番茄样品均被ToCV侵染。

### 2.2 菜豆金色花叶病毒属病毒检测及序列分析

在YN5786、YN5787、YN5788及阳性样品中均扩增到预期大小的目的片段,而YN5789中未扩增到目的片段。分别对目的片段克隆,结果表明,其中YN5786分离物与中国番木瓜曲叶病毒(*Papaya leaf curl China virus*, PaLCuCNV)的核苷酸相似性最高,为93.2%;YN5787分离物的不同克隆分别与中国番茄黄曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl China virus*, TYLCCNV)和PaLCuCNV的核苷酸相似性最高,分别为94.4%和93.5%;YN5788分离物的不同克隆分别与泰国番茄黄曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*, TYLCTHV)和PaLCuCNV的核苷酸相似性最高,分别为92.8%和92.0%。

## 3 讨论

由于ToCV和菜豆金色花叶病毒均是由烟粉虱*Bemisia tabaci*传播的病毒,这一特性为2种病毒的复合侵染提供了有利条件。有研究表明,ToCV与其它病毒复合侵染可导致病害加重(García-Cano et al.,2006)。赵黎明等(2014)首次报道国内番茄受到ToCV和TYLCV两种病毒的复合侵染,本研究也得到类似结果,除YN5789只检测到ToCV外,其余样品均检测到ToCV和不同的菜豆金色花叶病毒属病毒复合侵染。据报道,预先接种ToCV能破坏番茄抗番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)品种(携带*Sw-5*抗性基因)对TSWV的抗性,而ToCV和TSWV共同接种则不会破坏寄主抗性(García-Cano et al.,2006)。本试验采集的病害样品均为抗TYLCV番茄品种,在4个样品中均检出ToCV,其中3个检出菜豆金色花叶病毒属病毒,且在2个样品中分别检出2种不同的菜豆金色花叶病毒属病毒,因此,ToCV与菜豆金色花叶病毒属病毒复合侵染对当地抗TYLCV品种的抗性以及两类病毒协同侵染导致的病毒间的相互作用都有待进一步研究。

## 参考文献 (References)

- García-Cano E, Resende RO, Fernández-Muñoz R, Moriones E. 2006. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology*, 96(11): 1263-1269
- Martelli GP, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts RHA, Dolja VV, Hu JS, Jelkmann W, Karasev AV, et al. 2011. Closteroviridae.//King AMQ, Adams MJ, Carstens E, Lefkowitz E. Virus taxonomy-9th reports of the international committee on taxonomy of viruses. New York: Elsevier, pp. 977-1001
- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 361-394
- Zhao LM, Li G, Liu YG, Guo JJ, Wei JP, Zhu XP. 2014. Molecular identification on mixed infections of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato yellow leaf curl virus*. *China Vegetables*, (12): 15-20 (in Chinese) [赵黎明, 李刚, 刘永光, 国家进, 魏家鹏, 竺晓平. 2014. 番茄褪绿病毒与番茄黄化曲叶病毒复合侵染的分子鉴定. *中国蔬菜*, (12): 15-20]

(责任编辑:王 璇)