

## 番茄烟粉虱传双生病毒 PCR 检测\*

何自福\*\*, 虞 皓, 罗方芳

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东广州 510640)

## Detection of Whitefly-transmitted Geminiviruses from Tomato by PCR

HE Zi-fu\*\*, YU Hao, LUO Fang-fang

(Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** From the conserved regions of the reported nucleotide sequences of whitefly-transmitted geminiviruses (WTGV), a pair of degenerate primers was designed to anneal to the conserved sequence. The tomato samples infected geminivirus-like from Guangdong were detected by PCR. The results showed that a 356bp specific fragment was amplified from the samples. The specific fragment was cloned and sequenced, and the sequence was compared with all nucleotide sequences in GenBank by Blast of NCBI. The result showed that the fragment belonged to *Geminiviridae* DNA. So the degenerate primers may be used to detect the WTGV from tomato in Guangdong. Moreover, both of the homology of the fragment between WTGV from tomato in Guangdong and the reported WTGV in the world and WTGV from tomato in Guangxi were under 82%. These results implied that the WTGV from tomato in Guangdong differed from the above-mentioned WTGV.

**Key words:** Whitefly-transmitted geminivirus(WTGV), PCR detection, Sequence analysis

关键词: 烟粉虱传双生病毒; PCR 检测; 序列分析

中图分类号: S432.41

文献标识: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0067-03

烟粉虱传双生病毒(Whitefly-transmitted Geminiviruses, WTGV) 病是世界番茄生产上重要病害之一, 已给美国、以色列、埃及、澳大利亚等国的番茄生产造成了严重损失, 病原是一类具有孪生颗粒形态的单链环状 DNA 植物病毒, 属双生病毒科(*Geminiviridae*)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*), 其基因组由 2 个组分(DNA-A 和 DNA-B)组成, 每个组分的大小为 2.5~2.8kb, 少数病毒为单组分; 由烟粉虱(*Bemisia tabaci*)以持久方式传播<sup>[1]</sup>。

据报道, 目前该病毒病已在我国的广西<sup>[2]</sup>、云南<sup>[3]</sup>等省发生。我们在广东菜区田间调查时也发现, 一些番茄植株上的病症与文献描述的双生病毒病症状十分相似, 而烟粉虱自二十世纪九十年代中期以来即在广东普遍发生。因而推测, 烟粉虱传双生病毒病很可能已在广东番茄等作物上发生为害。为

了弄清该病毒病在我省番茄等作物上的发生及为害情况, 进而开展综合控制对策研究, 从 2001 年起, 我们即开始对其进行研究。本文报道的是对该病毒病检测方法研究。

## 1 材料与方 法

## 1.1 简并引物的设计

已有研究<sup>[4,5]</sup>表明, 烟粉虱传双生病毒 DNA 间同源性较高。比较 GenBank 中已报道的烟粉虱传双生病毒 DNA 序列, 根据其保守区序列, 我们设计了 1 对简并引物, 用于扩增该保守区的 356bp 片段。简并引物序列分别为: CoPL 5'>AA(AG)(AG)T(ACT)TGGATGGA(CT)G(AG)(AGT)AA<3' (位于 *Begomovirus* 代表种 BGMV-PR DNA 的 708nt~727nt); CoPR 5'>GA(AGCT)G(GC)AT G(ACT)GT

收稿日期: 2003-06-12, 修回日期: 2003-07-11

\* 基金资助: 广东省自然科学基金(031992); 广东省农业科学院“十五”重点科技项目(2001-基金-16)

\*\* 通讯作者: 何自福(1966-), 男, 安徽六安籍, 副研究员, 博士, 研究方向为植物病毒学。

Corresponding author. Tel: 027-87597476, E-mail: hezifu@163.net

(AG) CA (AGT)GCCATATA<3' (位于 BGMV-PR DNA 的 1041nt~1063nt)。引物由上海生工生物技术工程服务有限公司合成。

### 1.2 病样本总 DNA 的制备

对采集于广州市黄埔及增城等地番茄上似烟粉虱传双生病毒症状的病样本, 采用 NaOH 法<sup>[6]</sup>和 CTAB 法<sup>[7]</sup>2 种方法分别提取其总 DNA, 作为 PCR 模板。以广西番茄上烟粉虱传双生病毒病样本 (由广西农科院植保所蔡建和研究员提供) 作为阳性对照。

### 1.3 烟粉虱传番茄双生病毒 PCR 检测及特异片段序列分析

取上述 DNA 1 $\mu$ L 为模板, 依次加入 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 2.5 $\mu$ L、25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 $\mu$ L、10mmol/L 4dNTPs 0.5 $\mu$ L、5 $\mu$ mol/L 简并引物 CoPL 和 CoPR 各 2.5 $\mu$ L、Taq 酶 (广州华美公司) 1U, 加双蒸水至 25 $\mu$ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 4min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min、50 $^{\circ}$ C 退火 45sec、72 $^{\circ}$ C 延伸 45sec, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10min。反应结束后, 取 10 $\mu$ L PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检查结果。

将简并引物 PCR 扩增的特异片段克隆和测序, 并利用 BLAST 程序将该序列与 GenBank 上已报道的序列进行比较分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 广东番茄上烟粉虱传双生病毒 PCR 检测

表 1 广东番茄双生病毒特异片段序列与其它双生病毒 DNA 序列的同源率(%)

Table 1 The homology of the specific fragment sequences between *Tomato geminivirus* in Guangdong and the *Geminiviruses* reported(%)

Geminiviruses	SLCV-Yn	TYLCV-Th	TGV-Yn	TLCV-Yn	TLCV-Kar	CYVMV	ToLCV-Gu
GenBank accession	AJ420319	X63015	AJ514321	AJ512762	AY007616	AJ507777	AF413671
		AJ495812		AJ512761			AY190290
		AF141922					AF449999
		AF206674					
Guangdong isolate	81.5	73.0~73.6	73.6	79.8~80.1	79.5	79.2	74.2~74.4

### 2.3 烟粉虱传双生病毒广东番茄分离物 PCR 特异片段与中国其他分离物的序列比较

PCR 特异片段序列分析结果显示, 广东番茄上烟粉虱传双生病毒 (AY333411) 与广西番茄上分离物 (AY333412) 间的同源率为 74%, 而与先前 Yin 等<sup>[8]</sup>报道的 TYLCV 中国分离物 DNA (TYLCV-Ch, AF311734) 的同源序列片段长为 287nt (716nt~1002nt), 同源率仅为 71% (图 1), 这可能暗示广东番茄上烟粉虱传双生病毒与上述 2

应用设计的简并引物, 对采集于广州市黄埔及增城等地番茄上似烟粉虱传双生病毒病样本进行 PCR 检测, 结果表明: 广东番茄病样本及阳性对照广西番茄上烟粉虱传双生病毒病样本均能扩增出 1 条 356bp 特异带, 健康番茄、CMV 及 ToMV 侵染的番茄病样本均不能扩增出任何带, 与预期的结果一致; 2 种提取病株总 DNA 方法的 PCR 结果一致。

### 2.2 PCR 特异片段序列分析结果

对广东番茄病样本 PCR 的特异片段进行克隆及序列 (GenBank 登录号: AY333411) 分析, 结果表明: 与特异片段序列有同源关系的病毒均属双生病毒科菜豆金色花叶病毒属, 其中同源片段长度超过 300nt 的病毒有云南南瓜曲叶病毒 (Squash leaf curl virus Yunnan, SLCV-Yn)、泰国蕃茄黄曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus-Thailand*, TYLCV-Th)、云南番茄双生病毒 (Tomato geminivirus Yunnan, TGV-Yn)、云南烟草曲叶病毒 (Tobacco leaf curl virus Yunnan, TLCV-Yn)、烟草曲叶病毒 Karnataka 分离物 (*Tobacco leaf curl virus Karnataka*, TLCV-Kar)、巴豆黄脉花叶病毒 (*Croton yellow vein mosaic virus*, CYVMV)、Gujarat 番茄曲叶病毒 (*Tomato leaf curl virus Gujarat*, ToLCV-Gu) 等 7 种病毒, 其同源率为 73.0%~81.5% (表 1), 说明该简并引物扩增的是烟粉虱传双生病毒 DNA 的片段。因此, 可以用该简并引物来检测广东番茄上烟粉虱传双生病毒。

个分离物是不同的。

另外, 对广西番茄上烟粉虱传双生病毒 PCR 特异片段比较结果显示, 与其同源片段长度超过 310nt 的病毒有辣椒曲叶病毒马来西亚分离物 (*Pepper leaf curl virus-Malaysia*, 同源率为 84.0%) 和泰国分离物 (同源率为 78.1%)、ToLCV 越南分离物 (同源率为 85.7%)、台湾分离物 (同源率为 81.7%) 和菲律宾分离物 (同源率为 81.5%) 及番木瓜曲叶病毒 (*Papaya leaf curl virus*) 台湾分离物 (同源率为

WTGV-Gd	aaggtttggatggatggaacaatcaaggtgaagaaccacactaacaccgttatgttctggatagtgaggatagacgtcctagtgaactcctaatgatt	100
WTGV-Gx	-----a-----g-----t-----acc-----t-----t-----t-----g-----t-----ttt-----tc-----t-----ga-----a-----att-----g-----ac-----g-----	100
TYLCV-Ch	-----c-----a-----t-----t-----g-----	746
WTGV-Gd	ttcagcaggtgtttaaagtgttacgataatgaaccttctacggctaccgctcaagaacgaccatcgtgatcgtttccagggttgaggaggttccaggcaac	200
WTGV-Gx	--ggt-----a-----g-----t-----g-----agc-----l-----t-----g-----a-----ca-----a-----c-----t-----a-----tc-----c-----cc-----t-----t-----g-----	200
TYLCV-Ch	-c-----a-----c-----tg-----t-----c-----agc-----l-----t-----a-----a-----tttaa-----g-----t-----a-----tcgtc-----t-----aa-----tt-----tt-----	846
WTGV-Gd	agttaccgggtggtcaatatgcagctaaggaacagcgcalaattagaagttctatcgtgttaacaatcattagtttacaatcaccaagaagctgggacg	300
WTGV-Gx	t-----t-----g-----ag-----g-----t-----gg-----g-----a-----tatgaag-----g-----c-----gacc-----t-----c-----l-----c-----a-----	300
TYLCV-Ch	g-----g-----c-----a-----g-----ttg-----g-----t-----gg-----g-----ag-----ga-----t-----atc-----c-----t-----c-----t-----c-----t-----cag-----c-----a-----	946
WTGV-Gd	tacgagaatcacaccgagaatgctcttctcttgtatattggcctgcacgcattccctc	356
WTGV-Gx	--t-----c-----a-----t-----t-----g-----t-----t-----	356
TYLCV-Ch	-----t-----g-----at-----at-----g-----c-----g-----t-----t-----g-----	1002

图 1 WTGV PCR 特异片段与 TYLCV-Ch 序列比较

Fig.1 Comparison of the PCR specific fragment of WTGV and TYLCV-Ch

WTGV-Gd: Isolate from Guangdong; WTGV-Gx: Isolate from Guangxi; TYLCV-Ch: Tomato yellow leaf curl virus china

82.9%)；而该片段与 TYLCV-Ch DNA<sup>[8]</sup>的同源性也仅有 75%，说明本次实验所选用的番茄双生病毒病样本与其有较大的差异。

由于为害番茄的双生病毒病是由烟粉虱以持久方式传播，不能通过人工摩擦接种传毒，且它们存在于寄主植物组织的韧皮部，在植物体内的浓度较低，所以应用常规生物学测定及 ELISA 技术来检测该类病毒的难度大。近年来，以 PCR 为基础的分子检测技术已被应用于检测番茄植株和介体烟粉虱体内的 TYLCV、ToMoV 等烟粉虱传双生病毒<sup>[3-5,7,9-11]</sup>。根据目前已报道的烟粉虱传双生病毒基因组序列，针对其序列共同保守区，我们设计了 1 对简并引物，用于 PCR 检测广东番茄上烟粉虱传双生病毒，并获得了成功。这为快速、准确地大量检测番茄病样本提供了技术支持，对弄清广东番茄上双生病毒发生及为害，进而研究该病害的流行规律、综合治理对策及指导番茄抗病育种等都具有十分重要的意义。

序列比较结果显示，广东番茄上烟粉虱传双生病毒 PCR 扩增的特异片段与目前世界上已报道的双生病毒 DNA 序列间同源率最大为 81.5%；与广西番茄上烟粉虱传双生病毒的同源率为 74%，与 TYLCV 中国分离物 DNA<sup>[8]</sup>的序列同源率仅 71%。虽然这仅仅是对 DNA 一个片段的比较结果，但由于该片段是位于烟粉虱传双生病毒 DNA 序列保守区，因此，可以初步得出广东番茄上烟粉虱传双生病毒与已报道 TYLCV 中国分离物及广西分离物间可能存在较大的差异，进一步研究还在进行中。

## 参考文献

- [1] Van Regenmorte M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, *et al.* Virus Taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. New York, Dan Diego: Academic Press, 2000. 285-297.
- [2] 蔡健和. 广西粉虱传染类植物双生病毒调查[J]. 植物保护, 1996, 22(6): 48.
- [3] 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.
- [4] Rojas M R, Gilbertson R L, Russel D R, *et al.* Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses [J]. Plant Disease, 1993, 77: 340-347.
- [5] Wyatt S D, Brown J K. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction [J]. Phytopathology 1996, 86(12): 1288-1293.
- [6] 刘玉乐, 蔡健和, 李冬玲, 等. 中国番茄黄化曲叶病毒——一个双生病毒新种[J]. 中国科学, 1998, 28(2): 148-153.
- [7] Harrison B D, Liu Y L, Khalid S, *et al.* Detection and relationships of Cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted Geminiviruses occurring in Pakistan [J]. Annals of Applied Biology, 1997, 130: 61-75.
- [8] Yin Q, Yang H, Gong Q, *et al.* Tomato yellow leaf curl China virus: monopartite genome organization and agroinfection of plants [J]. Virus Res. 2001, 81(1-2): 69-76.
- [9] Méhta P, Wyman J A, Nakhla M K, *et al.* Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia Tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses [J]. J Econ Entomol, 1994, 87: 1285-1290.
- [10] Torres-Pacheco I, Garzon-Tiznado J A, Brown J K. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States [J]. Phytopathology, 1996, 86: 1186-1192.
- [11] Khan J A. Detection of Tomato leaf curl geminivirus in its vector *Bemisia tabaci* [J]. Indian J Exp Biol, 2000, 38(5): 512-515.