

文章编号: 1674-7054(2013)02-0124-05

海南乐东哈密瓜粉虱传双生病毒的 PCR 检测

林韶东^{1,2} 车海彦^{2,3}

(1. 海南大学 环境与植物保护学院 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101; 3. 海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室 海南 海口 571101)

摘 要: 利用双生病毒简并引物 PA/PB 对海南乐东哈密瓜感病植株的 4 个样品(HA1, HA2, HA3, HA4)进行了 PCR 检测, 其中有 3 个样品扩增到特异片段, PCR 产物经克隆后进行序列测定, 特异片段大小均为 509 bp。通过系统进化分析, 表明 HA1 与 SLCPHV-[Taiwan], SLCPHV 聚类在一个大的分支上, HA3, HA4 与 SLCCNV-[Melon], SLCCNV-[Hn61]聚类在一个大的分支上。结果表明, 在海南哈密瓜上可能存在不同种的双生病毒的侵染。

关键词: 哈密瓜; 粉虱传双生病毒; 海南乐东

中图分类号: S 436.5

文献标志码: A

双生病毒科(Geminiviridae)病毒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, 危害许多经济作物的双生病毒大多为菜豆金黄花叶病毒属(*Begomovirus*)病毒, 该属病毒大多由烟粉虱传播, 故该属病毒也被称为粉虱传双生病毒(Whitefly-transmitted geminiviruses, WTG)。近年来, WTG 在我国云南、广西、广东和海南等省区的番茄、烟草、甜瓜等多种重要经济作物上发生^[1-3], 而且在我国的危害有蔓延和加重的趋势。哈密瓜(*Cucumis melo* var. *Saccharinus*)是海南反季节种植的重要经济作物, 种植面积在 6 000 hm² 以上, 主要分布在日照强、气温高的三亚、乐东、陵水等市县, 哈密瓜生产已成为海南部分县市的支柱产业, 也成为当地农民收入的主要来源。病毒病害是哈密瓜生产上常见的病害, 目前已报道的病毒有黄瓜花叶病毒、西瓜花叶病毒 2 号、南瓜花叶病毒、哈密瓜坏死病毒、哈密瓜叶脉坏死病毒、烟草坏死病毒等^[4-5], 笔者在开展病害调查过程中, 在乐东佛罗镇采集了 4 株感病的哈密瓜病株样品, 并通过对症状的观察, 初步推测为 WTG 侵染后引起的病害。为了进一步明确海南哈密瓜上发生的双生病毒种类, 笔者对以上 4 个病株叶片样品进行了分子检测, 并对所得序列进行了分析, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 供试的 4 株哈密瓜植株, 采自海南省乐东黎族自治县佛罗镇, 分别编号为 HA1, HA2, HA3 和 HA4, 大田表现为植株矮化、叶片变小、花叶等症状。

1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶和 Plant Genomic DNA Kit 购自天根生化科技(北京)有限公司, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, pMD 18-T Vector 和 *E. coli* Competent cells (DH5 α) 购自 TaKaRa 公司。

1.3 DNA 提取及 PCR

1.3.1 DNA 提取 利用 Plant Genomic DNA Kit 提取植物叶片总 DNA, 方法参照试剂盒说明。

1.3.2 PCR 扩增 采用谢艳等^[6]根据双生病毒共同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对 PA(5'-TAATATTACCKGWKGVCSC-3')和 PB(5'-TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA-3')(K = G 或 T; W = A 或 T; V = A, C 或 G; S = C 或 G; Y = C 或 T; R = A 或 G; B = C, T 或 G)。引物由上海立菲生物技术有限公司合成。PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 1 min, 95 ℃ 变性 1 min, 54 ℃ 退火 30

收稿日期: 2013-03-22

基金项目: 农业部热作病虫害疫情监测与防治项目(13RZBC); 海南大学 211 工程建设项目

作者简介: 林韶东(1986-), 男, 广东韶关人, 海南大学环境与植物保护学院 2008 级硕士研究生。

通信作者: 车海彦, 女, 副研究员, E-mail: chehaiyan 2012@126.com

s 72 ℃ 延伸 1.5 min, 循环 35 次, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 反应以健康哈密瓜植株为阴性对照, 以无菌双蒸水为空白对照。

1.3.3 PCR 扩增产物纯化、克隆及序列测定 PCR 扩增目标产物经试剂盒纯化后, 将目标产物与 pMD18-T Simple 载体连接, 转化到 *E. coli* Competent Cell DH5 α 中, 利用 PCR 反应筛选阳性克隆。序列测定委托上海立菲生物技术有限公司。

1.4 序列分析 采用 NCBI 中 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行序列相似性查找。采用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 软件进行序列比较。通过 MEGA 4.0 软件构建亲缘关系树。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测结果 从 HA1, HA3, HA4 样品总 DNA 中均扩增到约 500 bp DNA 片段, 从 HA2 和健康植株中未扩增到此条带(如图 1), 这表明 HA1, HA3, HA4 样品可能感染了粉虱传双生病毒。

2.2 哈密瓜上双生病毒的测序结果 将 HA1, HA3, HA4 样品中扩增到的近 500 bp 的特异性片段进行纯化、克隆和序列测定, 结果表明: HA1, HA3, HA4 样品的序列长度均为 509 bp。利用 NCBI 中的 BLAST 工具, 分别对 3 个样品中扩增的特异片段序列进行同源性分析, 结果表明, 与特异片段有同源关系的病毒均为双生病毒科菜豆金色花叶病毒属成员; 特异片段为双生病毒基因组 DNA-A 的基因间隔区和外壳蛋白的部分区域。将上述 3 个样品的测序结果进行比对, HA3 和 HA4 之间仅有 2 个碱基差异, HA1 与 HA3, HA4 之间分别有 20 个和 18 个碱基差异(见图 2)。

通过 NCBI 中 ORF 工具分析发现, 利用 PA/PB 引物扩增出的序列含 DNA-A 基因组中的全部 AV2 基因、部分 AV1 基因和部分 IR 区。将 HA1, HA3, HA4 与 14 种双生病毒部分 DNA-A 基因组序列进行了比对, 发现 HA1 与 HA3, HA4 的相似性均为 96%, HA3 与 HA4 的相似性为 99%, HA1 与 SLCCNV-[Hn61] 的相似性最高, 达 98%, HA3 与 SLCCNV-[Melon], SLCCNV-[Hn61] 的相似性最高, 均为 99%, HA4 与 SLCCNV-[Melon], SLCCNV-[Hn61] 的相似性最高, 均为 99%。

为了初步分析海南乐东哈密瓜上侵染的双生病毒的变异及系统进化关系, 将 HA1 和 HA3, HA4 与 NCBI 上公布的部分南瓜曲叶病毒的部分 DNA-A 序列(见表 2)进行了比对, 在此基础上构建了亲缘关系树。结果表明, 这些病毒不以分离地区的不同而进行聚类, 但可以看出, HA1 与 SLCPHV-[Taiwan], SLCPHV 聚类在一个大的分支上, HA3, HA4 与 SLCCNV-[Melon], SLCCNV-[Hn61] 聚类在一个大的分支上(见图 3)。

3 讨论

吴会杰等^[3]在海南三亚的甜瓜上发现 SLCCNV, 郭小建^[7]在海南的南瓜上发现 SLCCNV 的侵染。本研究中海南乐东哈密瓜 3 个样品中存在双生病毒的侵染, 而 HA2 样品中未检测到 WTG 的存在, 引起 HA2 样品感病的病毒可能是黄瓜绿斑驳花叶病毒(Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV), 许多病毒侵染引起的症状是相似的, 在大田中观察哈密瓜的症状表现很难准确识别侵染病毒的种类。HA1, HA3, HA4 样品 DNA-A 部分序列分析的结果表明, 3 个感病样品均与南瓜曲叶病毒的关系较近, HA1 与 SLCPHV-[Taiwan], SLCPHV 聚类在一个大的分支上, HA3, HA4 与 SLCCNV-[Melon], SLCCNV-[Hn61] 聚类在一个大的分支上, 这表明在海南哈密瓜上可能存在不同种的双生病毒的侵染。

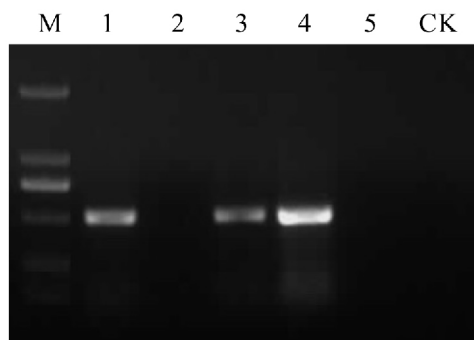


图1 PCR 产物的 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳图
M: DL2000 DNA Marker; 1: HA1; 2: HA2; 3: HA3;
4: HA4; 5: 哈密瓜健康植株样品; CK: 空白对照
Fig. 1 1% agarose gel electrophoretogram of PCR products
M: DL2000 DNA Marker; 1: HA1; 2: HA2; 3: HA3;
4: HA4; 5: Healthy *Cucumis melo* var. *Saccharinus* sample;
CK: Blank control

HA1 TGGACTTTAGATGGGCCTTCACAGCCCTTGGAACGTCGGGACTTCTATACATCCTGTAC
HA3 -----g-a-----c-----
HA4 -----g-a-----c-----

HA1 ATCTTGGGTTTTCTGTTCATGGGCCTGTTTGTCCAGGCCTTTCCCTTTGTGACGCGGGCA
HA3 -----t-----c-----
HA4 -----t-----c-----

HA1 ATGGGGACAAC TGCACGGGAAACATATGGGCTGTGGAAGTTGAGACGTCGGCGTACCTTC
HA3 -----
HA4 -----

HA1 GAGGCGGGAGTTGAAATGATAATATCGGCTGGTCGCTTCGACATAGTTCTTTGCGCGGAG
HA3 --c-----a-----a-----
HA4 --c-----a-----a-----

HA1 AACCAAGAA TGAGATCGCGGAC AAGATCGTAGCCGACTGTGTCCGGAGATATGTTTTTC
HA3 -----g-----
HA4 -----g-----

HA1 CACCTCCTGAAGATATTTACAGCTAGCATGCACCTTAGACCATGAACACTTTCAGGAAA
HA3 -----c-----
HA4 -----c-----

HA1 AGCGTGCAAAAGTGGATCCACATGTTGTGGATCAAAACTTGGTGCGGAAGTCTATTTAA
HA3 tt-----t-----g-----
HA4 tt-----t-----g-----

HA1 TGGTCCCCACAGATTAAATAAGCCATGAGCGTGAATGTCATTGGTCGAGGGCCCCACATA
HA3 -----t-a-----t-----
HA4 -----t-a-----t-----

HA1 AAAAAATCGCGCGGCCATCCGGTAATATTA
HA3 -----ca-----
HA4 -----ca-----

图2 HA1 ,HA3 和 HA4 样品部分 DNA-A 序列比较

Fig.2 Comparison of partial DNA-A nucleotide sequence among HA1 ,HA3 and HA4

表2 HA1 ,HA3 ,HA4 与 14 种双生病毒部分核苷酸序列相似性的比较

Tab.2 Comparison of partial nucleotide sequence among HA1 ,HA3 ,HA4 and 14 begomoviruses

病毒全称 Virus	缩写名称 Abbreviation	登录号 Accession number	寄主 Host	地区 Region	部分 DNA-A 核 苷酸序列相似性 Nucleotide sequences identities of partial DNA-A		
					HA1	HA3	HA4
HA1			哈密瓜 <i>Cucumis melo</i> var. <i>Saccharinus</i>	海南乐东 Ledong , Hainan	100		
HA3			哈密瓜 <i>Cucumis melo</i> var. <i>Saccharinus</i>	海南乐东 Ledong , Hainan	96	100	
HA4			哈密瓜 <i>Cucumis melo</i> var. <i>Saccharinus</i>	海南乐东 Ledong , Hainan	96	99	100
Squash leaf curl China virus	SLCCNV	AB027465	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	广西南宁 Nanning , Guangxi	96	97	97
Squash leaf curl Yunnan virus	SLCYV	AJ420319	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	云南景洪 Jinghong , Yunnan	64	64	64
Squash leaf curl China virus isolate G25	SLCCNV-[G25]	AM260206	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	广西 Guangxi	96	97	97
Squash leaf curl China virus isolate Hn61	SLCCNV-[Hn61]	AM260205	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	海南 Hainan	97	99	99

(续表 2 Continued)							
Squash leaf curl China virus	SLCCNV-[Melon]	HM566112	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	海南 Hainan	96	99	99
Squash leaf curl China virus isolate GZ01	SLCCNV-[GZ01]	KC171648	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	广东 Guangdong	95	94	94
Squash leaf curl Philippines virus-[Taiwan]	SLCPHV-[Taiwan]	EF199774	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	台湾 Taiwan	95		
Squash leaf curl China virus isolate MC1	SLCCNV-[MC1]	EF197940	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	马来西亚 Malaysia	94	95	95
Squash leaf curl China virus-[Wax Gourd: Nakhon Pathom]	SLCCNV-[Wax Gourd: Nakhon Pathom]	EU543562	冬瓜 <i>Benincasa pruriens</i>	泰国 Thailand	94	95	95
Squash leaf curl China virus - [Thailand]	SLCCNV-Thailand	AB330078	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	泰国 Thailand	96	97	97
Squash leaf curl China virus - [Cucurbita pepo: Lahore]	SLCCNV-[Cucurbita pepo: Lahore]	AM286794	西葫芦 <i>Cucurbita pepo</i> L.	巴基斯坦 Pakistan	84	88	88
Squash leaf curl Philippines virus	SLCPHV	NC_005845	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	菲律宾 Philippines	95	95	95
Squash leaf curl China virus - [Pumpkin : Coimbatore]	SLCCNV-[Pumpkin: Coimbatore]	AY184487	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	印度 India	89	88	88
Squash leaf curl China virus - [K]	SLCCNV-[K]	AF509741	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	越南 Vietnam	95	97	97

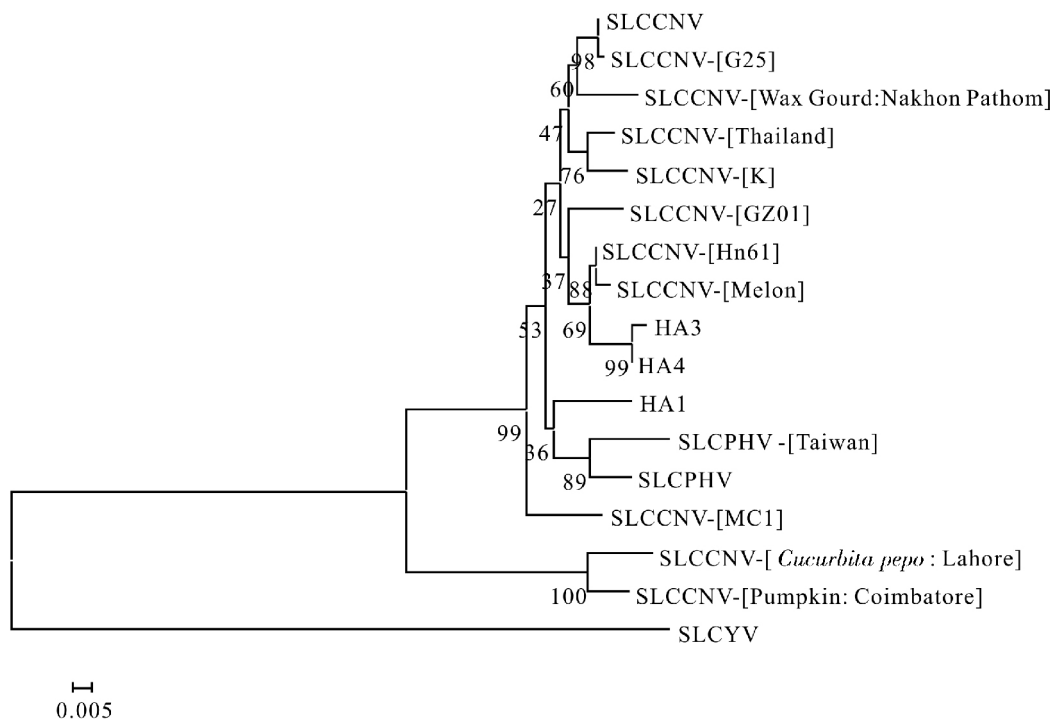


图 3 基于部分 DNA-A 核苷酸序列构建的南瓜曲叶病毒不同分离物的亲缘关系树
Fig.3 Homology tree based on partial nucleotide sequence of isolates of Squash leaf curl virus

参考文献:

- [1]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.
- [2]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.
- [3]吴会杰,彭斌,刘丽峰,等.中国南瓜曲叶病毒侵染甜瓜在国内的首次发现及其致病性[G]//.郭泽建,李宝筠.中国植物病理学会2012年学术年会论文集.北京:中国农业科学技术出版社,2012:203.
- [4]裴美云,邱并生,谢浩,等.哈密瓜花叶病毒病的研究[J].植物病理学报,1982,12(4):27-32.
- [5]古勤生,范在丰,李怀方.葫芦科作物病毒名录[J].中国西瓜甜瓜,2002(1):45-47.
- [6]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.
- [7]郭小建.四种双生病毒的分子鉴定[D].杭州:浙江大学,2006.

PCR Detection of Whitefly-transmitted Geminivirus of *Cucumis melo* var. *Saccharinus* in Ledong, Hainan Province

LIN Shaodong^{1,2}, CHE Haiyan^{2,3}

(1. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Environment and Protection Institute, CATAS, Haikou 571101, China;

3. Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou 571101, China)

Abstract: Four samples of diseased *Cucumis melo* var. *Saccharinus* showing stunting, small leaf, mosaic symptom were collected in Ledong, Hainan Province, China. PCR product of expected size was amplified from three samples using the begomovirus degenerate primer pair PA/PB, cloned and sequenced. The size of the PCR product was 509 bp. Phylogenetic analysis showed that HA1 clustered with SLCPHV – [Taiwan] and SLCPHV while HA3 and HA4 clustered with SLCCNV-[Melon] and SLCCNV-[Hn61], which indicated that the three samples of *C. melo* var. *Saccharinus* were infected likely with different species of geminiviruses.

Key words: *Cucumis melo* var. *Saccharinus*; whitefly-transmitted Geminivirus; Ledong; Hainan Province