

## 香料烟粉虱传双生病毒的 PCR 检测 \*

董家红<sup>1</sup>, 李光西<sup>2</sup>, 罗延青<sup>1</sup>, 丁 铭<sup>1</sup>, 张仲凯<sup>1\*\*</sup>

(1. 云南省农业生物技术重点实验室, 云南 昆明 650223;  
2. 云南省烟草保山香料烟有限责任公司, 云南 保山 678000)

**摘要:** 发生在保山香料烟生产区粉虱传双生病毒病, 已严重影响到了香料烟的品质和产量。本研究利用 PCR 技术快速检测香料烟植株及田间其它植物如胜红蓟、赛葵及菜豆等、以及病毒介体的带毒情况。对部分样品的 PCR 检测及序列分析表明, 感染香料烟双生病毒有中国番茄黄曲叶病毒、番茄黄曲叶病毒、云南烟草曲茎病毒、烟草曲茎病毒以及云南烟草曲叶病毒等, 且一些样品存在复合侵染现象。本研究为掌握病害发生流行的基本规律, 监控病害在香料烟上的发生流行提供了依据。

**关键词:** 粉虱传双生病毒; 香料烟; PCR 检测

**中图分类号:** S435.72      **文献标识码:** A

## PCR Detection of Whiteflies-Transmitted Geminiviruses-infecting Oriental Tobacco

Dong Jia-hong<sup>1</sup>, Li Guang-xi<sup>2</sup>, Luo Yan-qing<sup>1</sup>, Ding Ming<sup>1</sup>, Zhang Zhong-kai<sup>1\*\*</sup>

(1. Yunnan Provincial Key Laboratory for Agro-Biotechnology, Kunming 650223, China;  
2. Baoshan Oriental Tobacco Co. Ltd, Baoshan 678000, China)

**Abstract:** The occurrence of *Whiteflies-Transmitted Geminiviruses* (WTGs) disease in Baoshan's oriental tobacco planting areas has a severe effect on the quality and yield of oriental tobacco. This study detected rapidly WTGs infecting oriental tobacco, and weeds such as *Ageratum*, *malvastrum* and bean surrounding the oriental tobacco field, and vector-transmitted WTGs by PCR. PCR detection and sequence analysis of some samples revealed WTGs infecting oriental tobacco consist of Tomato yellow leaf curl China virus, Tomato yellow leaf curl virus, Tobacco curly shoot Yunnan virus, Tobacco curly shoot virus and Tobacco leaf curl Yunnan virus. Some samples were infected complexly by these viruses. This study provides the research foundation for holding the basic mechanism of the occurrence and prevalence of WTGs and to monitor the disease.

**Key words:** Whiteflies-Transmitted Geminiviruses, oriental tobacco, PCR detection

粉虱传双生病毒 (*Whiteflies-Transmitted Geminiviruses*, WTGs) 大部分属于双生病毒科 (*Geminiviridae*) 菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*) 病毒, 因该属病毒在自然条件下由烟粉虱 (*Bemisia*

*tabaci*) 以持久方式传播而得名, 广泛分布于热带和亚热带地区, 在烟草、番茄、南瓜、木薯、棉花等重要经济作物上造成毁灭性危害<sup>[1]</sup>, 引起被感染的植物曲叶、曲茎、叶脉增厚、明脉、叶背产生耳突, 植株

收稿日期: 2005-08-10, 修回日期: 2005-12-08

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30360005); 云南省烟草专卖局 (公司) 科技项目 (03A34)

作者简介: 董家红 (1974-), 男, 云南富源人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物病毒学研究。

Tel: 0871-5123133, E-mail: dongjhn@126.com

\*\* 通讯作者: 张仲凯 (1966-), 男, 云南昌宁籍, 研究员, 主要从事植物病毒学研究。

Tel: 0871-5183204, E-mail: zhongkai99@sina.com

矮化等典型症状。在我国除云南外,还在广西、广东、福建、台湾、山东、吉林及黑龙江等省普遍发生<sup>[3]</sup>。在云南南部烟区,WTGs在部分烤烟上发病率分别达到15%~30%,在香料烟上尤为严重,在局部田块WTGs引起的曲叶病发病率达到70%以上,且有逐年上升的趋势。

大多数WTGs粒子为双联体结构,基因组为双组分,有两条大小约2.5~2.8kb的DNA分子,即DNA-A和DNA-B。目前为止,云南的WTGs仅检测到单组分,仅有一条约2.7kb大小的DNA分子,即DNA-A,有4~6个ORFs,其中所有WTGs均编码AV1、AC1、AC2、AC3,一些病毒还编码AV2、AC4。最新的研究发现,单组分WTGs一般伴随有卫星DNA分子,即DNA $\beta$ ,分子大小约为DNA-A的一半,除茎环结构及保守的TAATATTAC外,与辅助病毒的DNA分子几乎没有同源性。DNA $\beta$ 可以增加辅助病毒在寄主细胞的积累水平,对症状的形成及辅助病毒的寄主范围均有影响<sup>[3]</sup>。

香料烟是混合型卷烟中调味增香的主要原料。保山香料烟种植在怒江峡谷流域,该流域地属低纬度高原深切低海拔干热河谷地区,干热、少雨、光照强的自然环境有利于优质香料烟的生产,同样也利于WTGs的传毒介体——烟粉虱的繁殖。初步调查结果表明,WTGs已在香料烟上发生危害,且逐年加重。本课题组长期以来与保山香料烟有限公司合作,开展侵染香料烟的WTGs种类鉴定及香料烟曲叶病发生流行特点研究,以便为监控WTGs在香料烟上引起的危害提供有效的措施,本文主要报道通过PCR检测该病害在香料烟上的危害情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验样品采集于保山香料烟公司香料烟基地,采集香料烟植株及周边的胜红蓟、赛葵及菜豆等植物:a病株明显表现曲叶、叶背有耳突、明脉、植株矮化、黄脉等典型症状,b无症状的植株,c发病田里捕获的烟粉虱。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA的提取

取50mg植物样品,于液氮中研碎,加1ml pH8.0的CTAB抽提缓冲液[2%CTAB,40mM EDTA,140mM NaCl,200mM Tris-HCl(pH8.0),1%PVP,pH8.0],混匀后于65℃温育1小时,用等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提两次,上

清用等体积的异丙醇沉淀,70%乙醇洗涤,溶于2.5mM的Tris-HCl(pH8.5)中,-20℃保存备用。

#### 1.2.2 PCR快速检测

根据双生病毒基因间隔区及外壳蛋白基因保守序列设计WTGs的简并引物PA(5'-TAA TATTACCKGW KGVCCSC-3')和PB(5'-TGGA CYTTRCAW GGCCTTCACA-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),该对引物能扩增约500bp的特异片段<sup>[4]</sup>。PCR反应在如下条件下进行:94℃预变性2分钟,然后94℃变性45秒,45℃退火45秒,72℃延伸1分钟,5个循环;94℃变性45秒,55℃退火45秒,72℃延伸1分钟,30个循环延伸10分钟。

引物beta01(5'-GGTACCCTACGCTACGCAGCAGC-3')和beta02(5'-GGTACCCTACCTCCAGGGGTACAC-3')根据Zhou等<sup>[5]</sup>设计,能扩增DNA $\beta$ 全长序列,用于检测病毒是否伴有卫星DNA $\beta$ 分子。PCR反应在如下条件下进行:94℃预变性2分钟,然后94℃变性45秒,45℃退火45秒,72℃延伸1分钟,5个循环;94℃变性45秒,50℃退火45秒,72℃延伸1分钟,30个循环延伸10分钟。

#### 1.2.3 引物PAPB扩增出的特异片段进行克隆和序列分析

根据采集地点、样品种类及症状差异对样品进行分类,对相同症状同一种类的样品,将引物PAPB扩增出的约500bp特异片段克隆到pMD18-T载体(TaKaRa)上,进行序列测定,利用NCBI的Blast程序进行检索,分析该序列与已发表的序列同源性,根据同源性鉴定病原。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR的快速检测

以提取的总DNA为模板,用引物PA\PB,beta01\beta02分别进行PCR扩增检测,检测结果表明,症状明显的病样及一份烟粉虱样(20头烟粉虱)均能用引物PA\PB扩增出目的片段,而能用引物beta01\beta02扩增出DNA $\beta$ 分子的样品除个别样品(样品6)外,均表现为曲叶和耳突。电泳图略,表1仅示阳性结果及部分阴性结果。结果表明,症状明显的植株均已被WTGs感染,烟粉虱也带有病毒。

检测表明所采集样品大部分均带有WTGs(见表2),尤其是常年生长于烟田间的赛葵、胜红蓟、豨莶等植物以及传播介体烟粉虱,带毒率达43%~75%,是侵染香料烟WTGs的主要毒源。

表1 PCR检测为WTGs阳性的样品  
Table 1 Samples of WTGs positive by PCR

样品编号	作物	症状	采样点	采样时间	PA/PB	DNA $\beta$
1.	香料烟	曲叶、耳突	隆阳潞江(邦陇)	2004.12	+	+
2.	香料烟	曲叶	隆阳潞江(芒棒)	2004.12	+	—
3.	香料烟	曲叶、耳突	隆阳潞江	2004.12	+	+
4.	香料烟	曲叶	隆阳潞江	2004.12	+	—
5.	香料烟	曲叶	隆阳芒宽(新光)	2004.12	+	—
6.	香料烟	曲叶	隆阳潞江(芒棒)	2004.12	+	+
7.	香料烟	曲叶、耳突	隆阳潞江(新寨)	2004.12	+	+
8.	香料烟	曲叶	隆阳潞江(新寨)	2004.12	+	—
9.	香料烟	曲茎	隆阳潞江(芒棒)	2004.12	+	—
10.	香料烟	曲叶	隆阳潞江(邦陇)	2004.12	+	—
11.	香料烟	曲叶	隆阳芒宽	2004.12	+	—
12.	香料烟	曲叶、曲茎	隆阳芒宽	2004.12	+	—
13.	香料烟	曲叶、曲茎	隆阳芒宽	2004.12	+	—
14.	香料烟	曲叶、耳突	隆阳潞江(芒棒)	2004.12	+	—
15.	香料烟	曲叶、曲茎	隆阳芒宽(新光)	2005.1	+	
16.	香料烟	曲叶、矮化	隆阳芒宽(新光)	2005.1	+	
17.	香料烟	曲叶、耳突	隆阳芒宽(新光)	2005.1	+	
18.	香料烟	曲叶、耳突	隆阳芒宽(敢顶)	2005.1	+	+
19.	香料烟	曲叶、曲茎	隆阳潞江(芒棒)	2005.1	+	
20.	香料烟	曲叶、耳突	昌宁卡斯	2004.9	+	+
21.	香料烟	曲叶	昌宁卡斯	2004.9	+	
22.	白肋烟	曲叶、耳突	隆阳潞江	2004.12	+	+
23.	白肋烟	曲叶	隆阳潞江	2004.12	+	—
24.	烟粉虱	—	隆阳潞江	2004.12	+	—
25.	胜红蓟	黄脉	隆阳潞江	2004.12	+	—
26.	胜红蓟	黄脉	隆阳道街	2004.9	+	—
27.	胜红蓟	黄脉	隆阳道街	2004.9	+	+
28.	赛葵	黄脉	隆阳道街	2004.9	+	—
29.	豨荑	脉突	昌宁卡斯	2004.9	+	+
30.	豨荑	脉突	昌宁卡斯	2004.9	+	+
31.	豨荑	脉突	昌宁卡斯	2004.9	+	+

## 2.2 引物 PAPB 扩增出的特异片段序列分析

根据样品种类、症状差异以及样品采集地点对样品进行分类,回收相同症状同一种类的部分样品 PAPB 扩增出的特异片段,并进行克隆及序列测定。利用 NCBI 的 Blast 程序进行检索,分析该序列与已发表的序列特同源性,根据分析结果,初步鉴定了危害香料烟的病毒病原,见表 3。

根据谢艳等的报道能侵染云南烟草的 WTGs 主要有云南烟草曲叶病毒 (*Tobacco leaf curl Yunnan virus*, TbLCYNV)<sup>[6]</sup>,烟草曲茎病毒 (*Tobacco curly*

*shoot virus*, TbCSV)<sup>[7]</sup>,中国番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl China virus*, TYLCCNV)<sup>[8]</sup>。对 PAPB 扩增出的目的片段的序列分析表明,侵染保山香料烟、白肋烟以及周边杂草植物胜红蓟、菜豆的 WTGs 主要为中国番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl China virus*, TYLCCNV)、番茄黄曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)、云南烟草曲茎病毒 (*Tobacco curly shoot Yunnan virus*, TCSYNV)、烟草曲茎病毒 (*Tobacco curly shoot virus*, TCSV) 以及云南烟草曲叶病毒 (*Tobacco leaf*

表2 WTGs的PCR检测

Table 2 PCR detection of WTGs samples in field

编号	样品种类	检测样品总数	样品阳性数(率%)
1.	香料烟	52	22(42)
2.	白肋烟	2	2(100)
3.	胜红蓼	6	3(50)
4.	赛葵	7	3(43)
5.	豨莶	4	3(75)
6.	野苘蒿	1	0
7.	桐油叶	1	0
8.	菜豆	2	1(50)
9.	甘薯	1	0
10.	烟粉虱*	2	1(50)

表3 不同症状样品的病原鉴定

Table 3 Identification of the pathogeny caused the different symptoms

样品种类	症状	采集地点	病原	PAPB与病毒分离物的同源性
香料烟	曲叶、耳突	潞江邦陇	TYLCCNV	Y10,94%
	曲叶、耳突	潞江新寨	TYLCV	Y87,99%
	曲叶、耳突	芒宽新光	TYLCV	Y92,98%
	曲叶、耳突	潞江芒棒	TYLCV	Y87,98%
	曲叶、曲茎	潞江芒棒	TLCYNV	Y283, 99%
	曲叶、曲茎	芒宽新光	TLCYNV	Y276, 99%
	曲叶	潞江芒棒	TCSV 和 TYLCV	TCSV Y98, 97% 和 TYLCV Y92,99%
	曲叶	芒宽	TLCYNV	Y283, 99%
	曲茎	潞江芒棒	TCSV	Y99, 99%
	曲叶、矮化	芒宽新光	TCSV 和 TCSYNV	TCSV Y41, 97% 和 TCSYNV Y123, 98%
白肋烟	曲叶、耳突	潞江	TYLCV	Y92,98%
	曲叶	潞江	TYLCV	Y87,99%
胜红蓼	无症	潞江芒棒	TYLCV	Y45,93%
胜红蓼	黄脉	潞江芒棒	TCSV	Y98, 97%
赛葵	无症	芒宽	没有检测到	
赛葵	黄脉	芒宽	MYVYNV	99%
菜豆	皱缩、黄化	潞江芒棒	TYLCCNV	Y43,92%

*curl Yunnan virus*, TLCYNV) 等, 且一些样品存在复合侵染现象。在黄脉症状的塞奎中检测到云南塞奎黄脉病毒 (*Malvstrum yellow vein Yunan virus*, MYVYNV)。

### 3 讨论

为害香料烟的 WTGs 是由烟粉虱以持久方式传播, 香料烟生产需要的干热少雨的环境也非常有利于

烟粉虱大量繁殖。生长于烟田周边的胜红蓼、赛葵等属于常年生植物, 既是烟粉虱的过渡寄主, 也是为害香料烟的 WTGs 的主要寄主, 若带毒则成为为害香料烟的重要毒源。根据多年连续监测结果, 由 WTGs 引起的病害严重度与这些过渡寄主发病率及烟粉虱种群消长相关, 即周边带毒的中间寄主越多, 烟粉虱群体越大, 主栽作物——香料烟的发病率越高。因此, 清除基地周边环境的杂草 (主要是胜红蓼、赛葵及豨

茎等), 控制传毒介体的繁殖数量, 是降低香料烟的发病率的有效手段。烟粉虱在我省许多烟区均有分布, 要警惕其大规模爆发及扩散, 造成严重危害。

WTGs 机械摩擦接种困难, 不易进行传统的生物学测定检测, 另外, WTGs 在植物体内的浓度较低, 且主要分布于寄主植物组织的韧皮部, 用常规的血

清学方法检测较为困难, 而 PCR 检测技术具有快速、灵敏、准确等优点, 能快速地对侵染香料烟的 WTGs 进行大批量样品的检测, 为监测 WTGs 引起的病害的发生, 研究该病害的流行规律, 及最大程度的降低病害造成的危害提供了技术保证。

### 参考文献

- [1] Harrison BD, Robinson DJ. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminivirus (Begomoviruses) [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1999, 37 : 369-398.
- [2] 宫倩红, 刘玉乐, 洪益国, 等. 导致田间烟草曲叶病的又一病毒非中国烟草曲叶病毒 [J]. *科学通报*, 2000, 45 (7) : 718-723.
- [3] Saunders K, Salim N, Mali, VR, et al.. Characterisation of Sri Lankan cassava mosaic virus and Indian cassava mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus [J]. *Virology*, 2002, 293 : 63-74.
- [4] 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.
- [5] Zhou XP, Xie Y, Tao XR, et al. Characterization of DNAB associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A [J]. *J. Gen. Virol.*, 2003, 84 : 237-247.
- [6] Zhou, XP, Xie, Y. & Zhang, ZK. Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting tobacco in Yunnan, China [J]. *Arch Virol*, 2001, 146, 1599-1606.
- [7] Xie, Y, Zhou, XP, Zhang, ZK & Qi, YJ. Tobacco curly shoot virus isolated in Yunnan is a distinct species of Begomovirus [J]. *Chin Sci Bull*, 2002, 47, 197-200.
- [8] Xie, Y, Zhou X P, and Li. GX. Molecular characterization of Tomato yellow leaf curl China virus and its satellite DNA isolated from tobacco [J]. *Chin. Sci. Bull*, 2003a, 48 : 766-770.