

侵染广东黄秋葵的木尔坦棉花曲叶病毒及 伴随卫星 DNA 的分子特征

董迪^{1,2}, 朱艳华¹, 何自福¹, 柴兆祥², 余小漫¹, 罗芳芳¹

(1 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东 广州 510640; 2 甘肃农业大学 草业学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:从广东省表现黄脉曲叶的黄秋葵病株上分离到病毒分离物 Okra06, PCR 检测结果显示, 该病毒属双生病毒科 Geminiviridae 菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus*. 基因克隆及序列分析结果表明, 其基因组仅含 A 组分(DNA-A), 全长为2 737 nt, 推导编码6个开放阅读框(Open reading frame, ORF). 该组分与木尔坦棉花曲叶病毒(*Cotton leaf curl Multan virus*, CLCuMV)分离物 G6 的核苷酸序列相似性最高, 为99.7%; 二者编码的6个 ORF 相似性分别为100%、100%、99.6%、99.8%、100%和99.7%. 该病毒还伴随有卫星分子 β (DNA β), 全长为1 346 nt, 推导其互补链上编码1个 ORF (C1). 该分子与伴随 CLCuMV 分离物 G6 DNA β 的核苷酸序列相似性也最高(99.5%). DNA β 系统进化分析显示, Okra06 DNA β 与 CLCuMV-[G6] DNA β 、CLCuMV-[Gx08] DNA β 亲缘关系最近, 三者形成一个独立分支; 进一步与其他 CLCuMV DNA β 和 CLCuV DNA β 聚类在一起. 这些结果证明, 侵染广东黄秋葵的病毒分离物 Okra06 属于 CLCuMV, 且该分离物与引起广东朱槿曲叶病的 CLCuMV-G6 应同属木尔坦棉花曲叶病毒朱槿株系.

关键词:黄秋葵黄脉曲叶病; 木尔坦棉花曲叶病毒; DNA-A; 卫星 DNA β

中图分类号:S432.41

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2012)01-0033-07

Molecular Characterization of *Cotton leaf curl Multan virus* and the Associated Satellite DNA Infecting Okra in Guangdong

DONG Di^{1,2}, ZHU Yan-hua¹, HE Zi-fu¹, CHAI Zhao-xiang², SHE Xiao-man¹, LUO Fang-fang¹

(1 Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2 Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The virus isolate Okra06 was obtained from the diseased okra plants exhibiting yellow vein and leaf curl symptoms in Guangzhou, Guangdong Province. The results of PCR detection indicated that the virus belonged to the genus *Begomovirus* of the family Geminiviridae. The genome of the virus was cloned and sequenced. The results showed that it had only A component(DNA-A). The complete nucleotide sequence of DNA-A was determined to be 2 737 nucleotides, encoding six potential ORFs. The comparison showed that Okra06 DNA-A had the highest nucleotide sequence identity (99.7%) with CLCuMV-[G6]. Six ORFs shared 100%, 100%, 99.6%, 99.8%, 100% and 99.7% nucleotide sequence identities with CLCuMV-[G6], respectively. The Okra06 was also associated with satellite DNA β molecular. The full-length sequence of DNA β was determined to be 1 346 nucleotides, encoding one potential ORF (C1). The comparison further showed that Okra06 DNA β had the highest nucleotide sequence identity(99.5%) with G6 DNA β . Phylogenetic analysis revealed that DNA β of isolate Okra06, G6 and Gx08 were more closely related than the other begomoviruses associated with DNA β , and were clustered

收稿日期:2010-12-01

作者简介:董迪(1984—),女,硕士;通信作者:何自福(1966—),男,研究员,博士,E-mail: hezf@gdppri.com

基金项目:国家自然科学基金(30670085);公益性行业(农业)科研专项(201003065);广东省自然科学基金(9151064001000031);广东省国际科技合作项目(2007A050100005);省部产学研结合项目(2008B090500212)

in a separate branch and further clustered with other isolates of CLCuMV DNA β or CLCuV DNA β . Those results revealed that the virus isolate Okra06 infecting okra plants in Guangdong belonged to the species CLCuMV, and it should be the *Hibiscus* strain.

Key words: Okra yellow vein leaf curl disease; *Cotton leaf curl Multan virus*; DNA-A; satellite DNA β

双生病毒科 Geminiviridae 菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus* 病毒是一类由烟粉虱 *Bemisia tabaci* 以持久方式传播的单链 DNA 病毒^[1],已在以色列、巴基斯坦、印度、美国、中国、非洲和加勒比海等多个国家和地区的番茄、棉花、木薯和菜豆等多种作物上造成毁灭性危害.近年来,我国广西、云南、广东、江苏和浙江等地的番茄^[2-5]、烟草^[6]、番木瓜^[7]和朱槿^[8]等作物上先后发现多种该属病毒的严重为害.

黄秋葵 *Abelmoschus esculentu* (L.) Moench 又名羊角豆和秋葵等,属锦葵科秋葵属,生长于热带、亚热带和地中海气候地带,在印度、巴基斯坦、美国、埃及、尼日利亚、希腊和土耳其等国广泛种植,是一种深受欢迎的蔬菜作物.黄脉花叶病或曲叶病是黄秋葵生产上主要病害,由黄秋葵黄脉花叶病毒 (*Okra yellow vein mosaic virus*, OYVMV)、秋葵黄脉花叶病毒 (*Bhendi yellow vein mosaic virus*, BYVMV)、黄秋葵曲叶病毒 (*Okra leaf curl virus*, OkLCV)、杰济拉棉花曲叶病毒 (*Cotton leaf curl Gezira virus*, CLCuGV) 或木尔坦棉花曲叶病毒 (*Cotton leaf curl Multan virus*, CLCuMV) 等侵染引起,其中 OYVMV 和 BYVMV 是生产上最主要制约因子^[9-10].上述这些病毒均属菜豆金色花叶病毒属.

近年来,中国大陆从中国台湾及日本引进黄秋葵种植.目前,在广东、北京、上海、山东、江苏、浙江、海南和福建等地均有栽培.2008年,笔者首次在广东省广州市花都区蔬菜基地发现黄秋葵黄脉曲叶病. PCR 检测^[11]及室内烟粉虱传毒试验均证明病株中存在菜豆金色花叶病毒属病毒.为了明确侵染引起广东黄秋葵黄脉曲叶病的病原病毒种类,以及进一步防治该病害提供依据,我们对该病毒代表分离物的基因组进行了克隆与序列分析.

1 材料与方法

1.1 毒源

黄秋葵黄脉曲叶病样采自广东省广州市花都区花东蔬菜基地.以室内介体烟粉虱传毒获得的病毒分离物 Okra06 作为毒源进行基因克隆.

1.2 DNA 提取

采用 2% CTAB 法^[12]提取病株总 DNA,作为 PCR 模板.

1.3 PCR 扩增、克隆和序列测定

利用菜豆金色花叶病毒属病毒特异简并引物 AV494 和 CoPR^[13-14]进行 PCR 扩增,获得 DNA-A 上 570 bp 大小的片段,将该片段进行克隆、序列测定和比较分析.根据该片段序列又设计了 1 对特异引物 OPL1 (5'-accaggaatcacacgaattcggtc-3') 和 OPR1 (5'-accgacaccacgagtaacatcaga-3'),用于扩增 DNA-A 近全长序列,将 PCR 特异片段进行克隆、测序与分析.

应用菜豆金色花叶病毒属病毒卫星分子 DNA β 特异引物 β 01 和 β 02^[15],PCR 扩增获得 DNA β 全长序列,进行克隆和序列测定;再根据测得的序列设计 1 对反向引物 β 03 (5'-gacccaaacactttcaaccatta-3') 和 β 04 (5'-atttgatgagcgatggtgacttgg-3'),扩增包括引物 β 01 和 β 02 序列区在内约 1 000 bp 的片段,加以验证.

上述各 PCR 产物分离纯化后,分别克隆到 pMD-18T 载体[宝生物工程(大连)有限公司]上,随机各挑选 3 个克隆进行序列测定.引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成.

1.4 序列分析

通过上述方法分别获得分离物 Okra06 的 DNA-A 和 DNA β 全长序列.利用 BLAST 程序在 GenBank 中对这 2 个序列进行相似性检索,利用 DNASTar MegAlign 5.01 (DNASTAR Inc.) Clustal W 方法进行多序列比较分析,并构建系统进化树.

2 结果与分析

2.1 黄秋葵黄脉曲叶病症状

病株表现为矮化,病株叶片向上或向下卷曲、叶背面叶脉呈网状突起,对着光可见其叶支脉呈墨绿色或存在墨绿色的线条(图 1A、1B).病株后期,叶片从边缘开始逐步退绿黄化,叶正面的叶脉黄化明显、背面叶脉肿大(图 1C、1D).

2.2 病毒分离物 Okra06 基因组 DNA-A 全序列及特征

利用菜豆金色花叶病毒属病毒特异简并引物 AV494 和 CoPR,从病毒分离物 Okra06 病株总 DNA 中 PCR 扩增获得 1 条预期大小的 DNA 片段.序列分析显示,该片段长为 570 bp;在 GenBank 中,与其有较高相似性的均为菜豆金色花叶病毒属病毒,其中

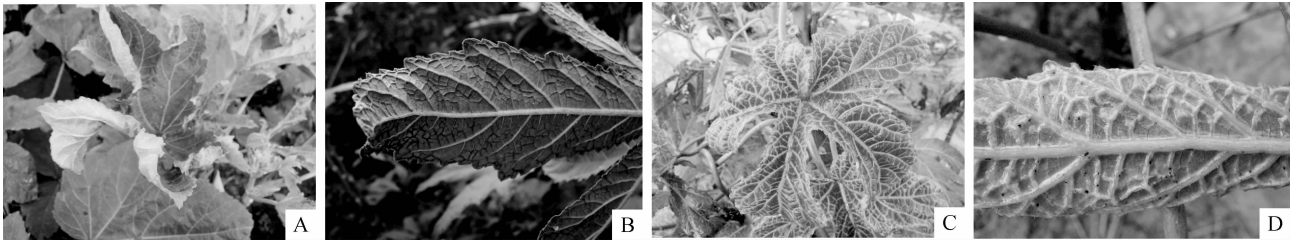


图1 黄秋葵黄脉曲叶病症状

Fig. 1 The symptoms of okra yellow vein and leaf curl disease

与 CLCuMV 分离物 G6^[8] 的相似性最高(99%),说明分离物 Okra06 也应属菜豆金色花叶病毒属。为此,根据该片段序列,又设计了一对特异引物 OPL1 和 OPR1,PCR 扩增出一条预期大小约 2 600 bp DNA 片段,健康对照未扩增出任何片段。序列测定结果显示,该片段长为 2 614 bp。上述 2 个 DNA 片段序列重叠部分核苷酸序列完全一致,拼接后得到分离物 Okra06 的 DNA-A 全序列长为 2 737 nt (GenBank 登录号:FJ770370)。

Okra06 DNA-A 具有菜豆金色花叶病毒属病毒基因组典型特征,为闭合环状单链 DNA,推导编码 6 个 ORFs,分别是病毒链上的 AV1 基因(位于 276 ~ 1 046 nt)、AV2 基因(位于 116 ~ 481 nt)以及互补链上的 AC1 基因(位于 1 495 ~ 2 586 nt)、AC2 基因(位于 1 146 ~ 1 598 nt)、AC3 基因(位于 1 049 ~ 1 453 nt)和 AC4 基因(位于 2 127 ~ 2 429 nt),在 AV2 与 AC1 之间有 266 nt (位于 2 587 ~ 115 nt) 的基因间隔区(Intergenic region, IR),该区域中含有病毒复制和转录所需的调控元件,包括 11 nt 茎和 11 nt 环的茎环结构(2 717 ~ 13 nt),保守的 TAATATTAC 序列。

2.3 分离物 Okra06 DNA-A 与其他双生病毒的相似性比较结果

BLAST 检索结果表明,GenBank 中与分离物 Okra06 DNA-A 有同源关系的序列均属菜豆金色花叶病毒属病毒,其中相似性较高的病毒共有 15 种 49 个分离物或株系(表 1),它们分别是可侵染棉花的 CLCuMV、CLCuGV、拉贾斯坦棉花曲叶病毒(*Cotton leaf curl Rajasthan virus*, CLCuRV)、布里瓦拉棉花曲叶病毒(*Cotton leaf curl Burewala virus*, CLCuBuV)、班加罗尔棉花曲叶病毒(*Cotton leaf curl Bangalore virus*, CLCuBV)和阿拉巴德棉花曲叶病毒(*Cotton leaf curl Alabad virus*, CLCuAV)等 6 种病毒,以及可侵染黄秋葵或秋葵的 CLCuGV、OYVMV、OkLCV、BYVMV、黄秋葵黄化皱缩病毒(*Okra yellow crinkle virus*, OYCrV)、伊瓜拉黄秋葵黄斑驳病毒(*Okra yellow mottle Iguala virus*, OYMIV)、黄秋葵斑驳病毒(*Okra mottle virus*, OkMoV)、德里秋葵黄脉病毒(*Bhendi*

yellow vein Delhi virus, BYVDV)、布巴内斯瓦尔秋葵黄脉病毒(*Bhendi yellow vein Bhubhaneswar virus*, BYVBV)和哈里亚纳秋葵黄脉病毒(*Bhendi yellow vein Haryana virus*, BYVHV)等 10 种病毒。

分离物 Okra06 与上述 49 个病毒分离物 DNA-A 全序列比较结果显示:Okra06 与 CLCuMV 17 个分离物 DNA-A 的相似性均大于 89%,其中与分离物 G6 的相似性最高,为 99.7%;二者 AV1、AV2、AC1、AC2、AC3 和 AC4 基因的相似性分别为 100%、100%、99.6%、99.8%、100% 和 99.7%,即使菜豆金色花叶病毒属基因组中最易变异的 IR 区相似性也达 98.9%,推导编码的 6 个蛋白质氨基酸序列相似性为 99.0% ~ 100%。除与 CLCuRV - [Sirsa:04] 和 OYCrV - [Cameroon] 的相似性为 89.0% 外,Okra06 与 CLCuRV (Abohar, Sri)、CLCuBuV、CLCuAV、BYVMV、OYVMV、CLCuBV、BYVDV、BYVHV 和 BYVBV 等 9 个病毒 22 个分离物的相似性仅为 77.4% ~ 86.3%,而与 OYCrV - [Mali]、CLCuGV、OYMIV、OkLCV 及 OkMoV 等 5 个病毒 8 个分离物的相似性均小于 70% (63.1% ~ 69.0%) (表 1)。

2.4 卫星分子 DNA β 结构及相似性比较结果

应用菜豆金色花叶病毒属病毒卫星分子 DAN β 的特异引物 β 01 和 β 02,从分离物 Okra06 病株总 DNA 中 PCR 扩增获得一条 1 321 bp DNA 片段,而健康对照无任何扩增片段,克隆测序后得到该片段序列。相邻反向引物 β 03 和 β 04 PCR 扩增获得的特异片段长为 1 026 bp,该片段与 β 01/ β 02 扩增获得的片段序列重叠,二者除 2 bp 差异(由引物 β 01 和 β 02 引入,位于引物近 5'端)外,其余序列完全一致。因此,拼接后获得 Okra06 DNA β 全长序列为 1 346 nt (GenBank 登录号为:FJ770371)。

该序列为闭合环状单链 DNA,推导在其互补链上有一个 ORF(位于 193 ~ 549 nt),编码含 118 个氨基酸的 C1 蛋白,在 764 ~ 994 位核苷酸之间富含 A,在 1 246 ~ 15 位核苷酸之间含有一个长为 115 nt 的保守区域(Conserved region, CR),CR 区含有双生病毒科病毒共有的茎环结构和 TAATATTAC 序列。

表1 Okra06与49个菜豆金色花叶病毒属病毒分离物或株系DNA-A及各基因编码的氨基酸序列相似性比较¹⁾

Tab.1 Percentages of nucleotide or amino acid sequences identities between Okra06 and 49 isolates of begomoviruses %

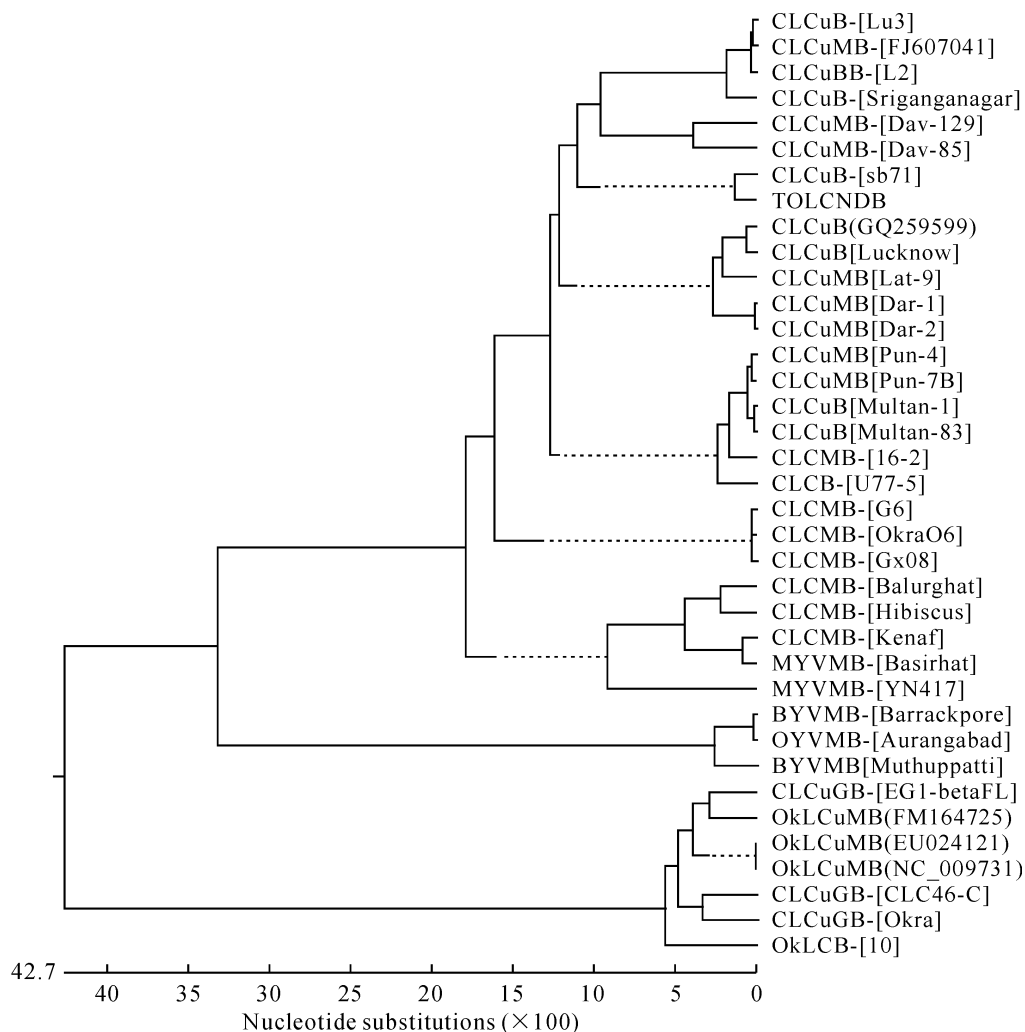
病毒分离物 ²⁾	GenBank 登陆号	DNA-A ⁿ	IR ⁿ	CP ^b	AV2 ^b	AC1 ^b	AC2 ^b	AC3 ^b	AC4 ^b
CLCuMV - [G6]	EF465535	99.7	98.9	100	100	99.4	99.3	100	99.0
CLCuMV - [GX08]	GQ503175	99.6	98.7	100	100	97.4	91.0	100	100
CLCuMV - [62]	AJ002447	95.4	85.0	98.4	97.5	95.0	94.0	98.5	93.0
CLCuMV - [26]	AJ002458	95.3	85.4	97.7	97.5	94.8	94.7	98.5	93.0
CLCuMV - [33af]	AJ496461	95.1	87.0	97.3	95.1	93.1	93.3	95.5	93.0
CLCuMV - [Faisalabad1]	X98995	95.1	87.0	97.3	95.1	93.1	93.3	95.5	93.0
CLCuMV - [Faisalabad2]	AJ496287	94.7	85.3	95.3	95.1	95.3	92.0	95.5	93.0
CLCuMV - [Ok]	AJ002459	93.9	88.1	98.4	96.7	91.1	93.3	98.5	88.0
CLCuMV - [Lat - RCA]	EU384573	93.4	90.2	97.3	82.8	93.4	76.7	81.3	90.0
CLCuMV - [Faisalabad3]	AJ132430	92.2	87.2	96.1	93.6	87.5	91.3	95.5	84.0
CLCuMV - [Ludhiana04]	AY765257	90.9	85.1	83.7	82.5	71.7	76.0	70.2	66.7
CLCuMV - [Multan]	FJ218487	90.7	88.6	98.0	74.4	-	-	92.8	64.2
CLCuMV - [Hirs - 1]	FJ218486	90.4	86.4	75.7	65.9	48.1	83.2	90.2	70.6
CLCuMV - [Rajasthan]	EU365616	89.4	79.8	95.9	82.3	76.1	84.8	94.0	36.8
CLCuMV - [Hissar04]	AY765253	89.9	54.7	82.1	80.3	72.6	74.3	72.7	68.8
CLCuMV - [Delhi04]	AY765256	89.4	80.0	82.2	80.3	74.3	75.5	72.3	68.3
CLCuMV - [Bhatinda 05]	DQ191160	89.0	63.5	82.1	81.3	72.5	76.2	73.5	68.3
CLCuRV - [Sirsa :04]	AY765254	89.0	73.1	98.0	96.7	85.6	92.0	97.8	66.1
CLCuRV - [Abohar]	AY795606	85.8	80.2	86.2	90.8	69.2	84.2	73.1	42.6
CLCuRV - [Sri]	EF057791	85.9	80.0	87.3	80.0	-	79.4	90.2	-
BYVMV - [OY177]	FJ179371	86.3	69.5	83.1	80.8	73.4	67.7	62.9	59.1
BYVMV - [OYCO4]	FJ179372	86.3	58.2	83.8	81.5	69.6	67.7	62.2	55.4
BYVMV - [OY - W1]	FJ179373	83.9	78.5	95.4	79.5	65.5	35.9	48.8	58.5
BYVMV - [Thadagan]	FJ176235	83.4	63.4	90.9	92.4	56.4	36.7	50.0	41.3
BYVMV - [Pandaralli]	FJ176236	83.0	66.5	94.9	83.5	66.2	41.7	52.8	34.4
BYVMV - [301]	AJ002453	82.2	62.6	95.7	91.7	82.3	78.7	87.3	70.8
BYVMV - [Mad]	AF241479	81.7	60.2	96.5	93.4	80.1	79.0	86.6	62.7
BYVMV - [Nol751]	EU589392	81.5	58.5	96.5	91.7	80.7	76.7	85.8	49.5
BYVMV - [Noll101]	EU482411	81.5	58.1	95.3	90.9	80.7	76.7	85.8	49.5
BYVMV - [OYT]	FJ179370	80.6	77.6	94.9	92.4	50.6	42.7	51.7	32.3
BYVDV - [OY131]	FJ515747	81.4	63.5	70.3	55.4	69.1	63.8	54.5	54.4
BYVHV - [OY76]	FJ561298	78.2	63.4	78.8	66.3	61.5	53.4	51.2	39.1
BYVBV - [OYBHU]	FJ589571	77.4	58.9	69.9	59.0	67.0	59.2	51.2	47.0
CLCuBuV - [7]	EU384570	85.7	79.5	68.5	32.9	81.9	78.3	55.2	89.2
CLCuBuV - [Vehari]	AM421522	85.6	78.6	68.9	33.3	-	-	54.0	53.9
CLCuBV	AY705380	84.4	73.2	67.3	37.7	80.3	56.6	73.2	65.2
CLCuAV - [802a]	AJ002455	80.2	73.5	95.9	87.5	53.3	54.6	63.2	76.9
CLCuAV - [804a]	AJ002452	80.1	77.6	95.4	61.7	53.3	54.1	73.2	65.2
OYCrV - [Cameroon]	FM164724	89.1	77.5	16.2	3.1	49.4	50.5	35.4	36.7
OYCrV - [Mali]	EU024119	68.5	52.3	16.2	3.5	44.3	50.5	37.8	38.3
OYVMV - [201]	AJ002451	85.3	69.4	97.3	93.4	87.3	80.7	86.6	76.0
OYVMV - [Aurangabad]	GU181356	80.7	69.8	81.0	-	45.7	46.9	53.5	42.6
CLCuGV - [Okr - EG]	AY036010	69.0	49.8	62.0	52.5	68.1	46.7	44.0	39.3
CLCuGV - [Okr - Sha]	AY036008	69.0	49.8	62.4	48.2	68.1	46.7	44.6	38.3
CLCuGV - [Okr - Gez]	AY036006	68.7	50.2	62.4	48.2	67.8	46.7	44.6	36.1
OYMIV	AY751753	68.2	42.6	44.3	-	40.9	40.2	25.8	24.6
OkLCV - [Cameroon]	FM164726	65.7	52.5	14.0	7.8	53.3	25.3	28.9	21.0
OkMoV - [6319]	EU914817	63.2	43.3	47.9	-	39.9	49.4	20.7	-
OkMoV - [6328]	EU914819	63.1	43.2	47.9	-	38.5	49.4	20.7	-

1) n: 核苷酸序列; b: 氨基酸序列; -: 没有编码 ORF. 2) CLCuMV: 木尔坦棉花曲叶病毒; CLCuRV: 拉贾基坦棉花曲叶病毒; BYVMV: 秋葵黄脉花叶病毒; BYVDV: 德里秋葵黄脉病毒; BYVHV: 哈里亚纳秋葵黄脉病毒; BYVBV: 布巴内斯瓦尔秋葵黄脉病毒; CLCuBuV: 布里瓦拉棉花曲叶病毒; CLCuBV: 班加罗尔棉花曲叶病毒; CLCuAV: 阿拉巴德棉花曲叶病毒; OYCrV: 黄秋葵黄化皱缩病毒; OYVMV: 黄秋葵黄脉花叶病毒; CLCuGV: 杰济拉棉花曲叶病毒; OYMIV: 伊瓜拉黄秋葵黄斑病毒; OkLCV: 黄秋葵曲叶病毒; OkMoV: 黄秋葵斑驳病毒。

BLAST 检索及序列相似性比较表明,Okra06 DNA β 与伴随菜豆金色花叶病毒属 10 种 36 个 DNA β 卫星分子的相似性较高,其中与 CLCuMV - [G6] DNA β 序列相似性最高(为 99.5%),与 CLCuMV - [Gx08] DNA β 相似性也达到 99.3%;与伴随 CLCuMV 的其他 12 个 DNA β 及伴随 CLCuV 的 8 个 DNA β 相似性为 82.6% ~ 92.2%;而与侵染黄秋葵或秋葵的 BYVMV、OYVMV、OkLCuMV、OkLCV、CLCuGV 等 5 种病毒伴随的 7 个 DNA β 相似性仅有 48.9% ~ 58.7%。该卫星分子与 CLCuMV - [G6] 编码的 C1 氨基酸相似性也是最高,为 100%。CR 是 DNA β 中最保守的区域,Okra06 与伴随 CLCuMV、CLCuV、CLCuBuV、新德里番茄曲叶病毒(*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV)、玫瑰茄黄脉花叶病

毒(*Mesta yellow vein mosaic virus*, MYVMV)和云南赛葵黄脉病毒(*Malvastrum yellow vein Yunnan virus*, MaYVV)等 6 种病毒的 26 个 DNA β 的 CR 相似性均大于 88.9%;但与伴随侵染黄秋葵或秋葵的 OYVMV 等 5 种病毒 7 个 DNA β 的 CR 相似性均不超过 44.5%。

系统进化关系分析结果显示,Okra06 DNA β 与 CLCuMV - [G6] DNA β 、CLCuMV - [Gx08] DNA β 亲缘关系最近,三者形成一个独立分支;进一步与其他 12 个 CLCuMV DNA β 及 8 个 CLCuV DNA β 聚类在一起,而与侵染黄秋葵或秋葵的 BYVMV、OYVMV、OkLCuMV 等病毒的 DNA β 亲缘关系均相对较远(图 2)。



CLCuMB: 木尔坦棉花曲叶病毒 DNA β 分子; CLCuB: 棉花曲叶病毒 DNA β 分子; CLCuBB: 布里瓦拉棉花曲叶病毒 DNA β 分子; ToLCNDB: 新德里番茄曲叶病毒 DNA β 分子; MYVMB: 玫瑰茄黄脉花叶病毒 DNA β 分子; MYVYnV: 云南赛葵黄脉病毒; BYVMB: 秋葵黄脉花叶病毒; OYVMB: 黄秋葵黄脉花叶病毒 DNA β 分子; OkLCuMB: 马里黄秋葵曲叶病毒 DNA β 分子; OkLCB: 黄秋葵曲叶病毒 DNA β 分子; CLCuGB: 杰济拉棉花曲叶病毒 DNA β 分子。

图2 Okra06 DNA β 与伴随菜豆金色花叶病毒属病毒 36 个 DNA β 的系统关系树

Fig 2 Phylogenetic tree of DNA β of Okra06 and 36 other *Begomoviruses*

3 讨论与结论

对来自广东黄秋葵黄脉曲叶病株的病毒分离物 Okra06 基因组 DNA-A 全序列进行了分析,其具有菜豆金色花叶病毒属单组分病毒基因组典型特征,且与已登陆 GenBank 中 CLCuMV 各分离物的相似性均大于 89%,其中与分离物 G6 的相似性最高,达 99.7%。根据目前双生病毒科病毒分类标准^[16],分离物 Okra06 应属于菜豆金色花叶病毒属的木尔坦棉花曲叶病毒种(CLCuMV)。

该病毒分离物也伴随有卫星 DNA β ,其大小约为 DNA-A 的一半,除茎环结构和 TAATATTAC 序列外,与病毒 DNA-A 无序列同源性。菜豆金色花叶病毒属病毒伴随的 DNA β 分子中含有一个 115 个核苷酸的保守区,推测是辅助病毒 DNA-A 编码的复制蛋白识别作用位点^[17],Okra06 DNA β 也不例外地含有该保守区。Okra06 DNA β 还含一个约 230 个核苷酸 A-rich 区,该区域可能与 DNA β 分子包装过程中的尺寸要求有关^[18]。该卫星分子与侵染棉花的 CLCuMV、CLCuV、CLCuBuV 病毒的 DNA β 分子相似性较高(大于 82.6%),其中与同是分离自广东省广州市的 CLCuMV - [G6] DNA β 序列相似性最高(99.5%),与来自中国广西的 CLCuMV - [Gx08] DNA β 相似性也高达 99.3%;但与侵染黄秋葵或秋葵的 BYVMV、OYVMV、OkLCuMV、OkLCV 和 CLCuGV 等 5 种病毒 DNA β 相似性仅有 48.9% ~ 58.7%。这说明伴随 CLCuMV 侵染广东黄秋葵的 DNA β 与世界上其他地区侵染黄秋葵的菜豆金色花叶病毒属病毒卫星分子是不同的。另外,对来自广东、广西不同地理区域的 CLCuMV 多个分离物研究还发现,其 DNA-A 及伴随的 DNA β 分子序列相似性高达 98% ~ 100%,变异很小(结果待发表),说明发生在我国的 CLCuMV DNA β (即 Okra06 DAN β 和 G6 DNA β) 与其辅助病毒 CLCuMV 稳定伴随。

应用菜豆金色花叶病毒属病毒基因组 B 组分特异引物^[10,19-20]进行 PCR,未能在 Okra06 中检测到该组分的存在。目前,已报道的 CLCuMV 均仅有 A 组分,而且发现含卫星 DNA β 分子的双生病毒 CLCuMV、CLCuBV、CLCuGV、BYVMV 和 OYVMV 等也均为单组分病毒^[16]。同时,农杆菌介导的侵染性克隆接种试验结果证明,Okra06 DNA-A 和 DNA β 混合接种即可引起本生烟 *Nicotiana benthamiana* 产生曲叶症状(文中未显示)。因此,笔者认为:侵染广东黄秋葵的 CLCuMV 分离物 Okra06 也是一个单组分菜豆金色花叶病毒属病毒。

CLCuMV - [G6] 是在我国发现的第一个 CLCuMV 分离物^[8],该分离物侵染锦葵科黄槿属朱槿 *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. (又称为扶桑、大红花等)引起曲叶病^[8];随后,将分离自我国朱槿的 CLCuMV 各分离物称之为朱槿株系,该株系分离物可侵染朱槿、棉花引起曲叶病^[21-22]。本研究证明侵染黄秋葵的 Okra06 也是 CLCuMV,而且该分离物与朱槿分离物 G6 相似性高达 99.7%。因此,我们认为,侵染广东黄秋葵引起黄脉曲叶病 Okra06 与先前报道的 CLCuMV - [G6]^[8]同属木尔坦棉花曲叶病毒朱槿株系。

根据目前文献,可侵染黄秋葵的菜豆金色花叶病毒属病毒至少有 11 个种或暂定种,其中 CLCuMV - [Ok] (AJ002459) 与 Okra06 的相似性为 93.9%,说明二者间仍存在一定差异;OYVMV^[9]、BYVMV^[10]、BYVDV、BYVHV、BYVBV 与 Okra06 为害黄秋葵或秋葵的症状相似,但其相似性只有 77.4% ~ 86.3%,表明 Okra06 与它们明显不同;而 OYCrV、OYMIV、OkLCV、OkMoV 和 CLCuGV 与 Okra06 的相似性为 63.1% ~ 89.1%,说明这 5 种病毒与 Okra06 亲缘关系也较远。因此,引起广东黄秋葵黄脉曲叶病的病毒分离物 Okra06 与世界其他地区报道可侵染黄秋葵的菜豆金色花叶病毒属病毒是不同的。

棉花曲叶病毒是棉花上的毁灭性病害。该病害最先(1967 年)发生在巴基斯坦木尔坦地区(Multan),并于 20 世纪 80 年代末在巴基斯坦木尔坦地区开始流行,其后快速扩散到该国其他棉区及印度^[20]。该病害是多种菜豆金色花叶病毒属病毒侵染引起的,其中 CLCuMV 是引起巴基斯坦和印度棉花曲叶病大流行的主要病原病毒之一^[21]。在我国,目前各棉区还未发生棉花曲叶病毒病,但现已在我国广东和广西表现为曲叶症状的朱槿和表现黄脉曲叶症状的黄秋葵病株上分别检测鉴定到 CLCuMV^[8,22];更为重要的是,近期在广西某个试验田中发现了由 CLCuMV 自然侵染引起的棉花曲叶病植株^[23]。虽然广东、广西等华南地区极少种植棉花,发生在广东和广西的 CLCuMV 不会立即传播到我国棉花产区,但该病毒传播介体烟粉虱在我国华南地区、长江流域和黄河流域等普遍发生,通过介体烟粉虱带毒传播到我国棉区是完全有可能的。因此,入侵广东和广西并已定殖的 CLCuMV 对我国棉花生产构成了严重威胁^[21],应引起我国有关部门的高度重视。

参考文献:

- [1] FAUQUET C M, MAYO M A, MANILOFF J, et al. Virus

- Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. London: Academic Press, 2005: 301-326.
- [2] 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: C 辑, 1998, 28 (2): 148-153.
- [3] 何自福,虞皓,罗方芳. 广东番茄曲叶病毒 G3 分离物基因组 DNA-A 的分子特征 [J]. 植物病理学报. 2005, 35 (3): 208-213.
- [4] 孙海霞,季英华,熊如意,等. 2008 年侵染江苏省番茄的粉虱传双生病毒发生分布 [J]. 江苏农业学报, 2009, 25(6): 1278-1281.
- [5] 吴永汉,张纯胃,许方程,等. 温州地区番茄曲叶病毒病发生与防治 [J]. 中国蔬菜, 2007 (5): 57-58.
- [6] 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.
- [7] 张鲁斌,周国辉,李华平,等. 侵染广州番木瓜的曲叶病毒 DNA-A 分子特征及生物学测定 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(9): 1805-1810.
- [8] 毛明杰,何自福,虞皓,等. 侵染朱槿的木尔坦棉花曲叶病毒及其卫星 DNA 全基因组结构特征 [J]. 病毒学报, 2008, 24(1): 64-68.
- [9] ALI M, HOSSAIN M Z, SARKER N C. Inheritance of yellow vein mosaic virus (YVMV) tolerance in a cultivar of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) [J]. Euphytica, 2000, 111: 205-209.
- [10] JOSE J, USHA R. Bhendi yellow vein mosaic disease in India is caused by association of a DNA β satellite with a *Begomovirus* [J]. Virology, 2003, 305 (2): 310-317.
- [11] 董迪,何自福,柴兆祥. 广东黄秋葵黄脉曲叶病样中检测到烟粉虱传双生病毒 [J]. 植物保护, 2010, 36 (1): 65-68.
- [12] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13-15.
- [13] 何自福,虞皓,罗方芳. 番茄烟粉虱传双生病毒 PCR 检测 [J]. 中国病毒学, 2004, 19: 67-69.
- [14] 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.
- [15] ZHOU Xue-ping, XIE Yan, TAO Xiao-rong, et al. Characterization of DNA β associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A [J]. J Gen Virol, 2003, 84: 237-247.
- [16] FAUQUET C M, BRIDDON R W, BROWN J K, et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature [J]. Archives of Virology, 2008, 153: 783-821.
- [17] BRIDDON R W, MANSOOR S, BEDFORD I D, et al. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease [J]. Virology, 2001, 285: 234 ~ 243.
- [18] SAUNDERS K R, BRIDDON W, STANLEY J. Replication promiscuity of DNA- β satellites associated with monopartite begomoviruses, deletion mutagenesis of the Ageratum yellow vein virus DNA- β satellite localizes sequences involved in replication [J]. J Gen Virol, 2008, 9: 3165-3172.
- [19] ROJAS M R, GILBERTSON R L, RUSSELL 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.
- [20] BRIDDON R W, MARKHAM P G. Cotton leaf curl virus disease [J]. Virus Research, 2000, 71: 151-159.
- [21] 何自福,董迪,李世访,等. 木尔坦棉花曲叶病毒已对我国的棉花生产构成严重威胁 [J]. 植物保护, 2010, 36 (2): 147-149.
- [22] 林林,胡冬梅,蔡健和,等. 侵染南宁市朱槿的木尔坦棉花曲叶病毒基因组结构及寄主范围研究 [C] // 彭友良,朱有勇. 中国植物病理学会 2009 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 336.
- [23] CAI J H, XIE K, LIN L, et al. Cotton leaf curl Multan virus newly reported to be associated with cotton leaf curl disease in China [J]. Plant Pathology, 2010, 59 (4): 794-795.

【责任编辑 周志红】