

侵染稀硷的中国番茄黄化曲叶病毒及其卫星 DNA 全基因组结构特征

彭 燕¹ 谢 艳¹ 张仲凯² 周雪平^{1*}

(¹浙江大学生物技术所 杭州 310029)

(²云南省农业生物技术重点实验室 昆明 650223)

摘 要:从云南红河稀硷上分离到病毒分离物 Y64,全序列测定表明,Y64 DNA-A 全长 2730 个核苷酸。基因组比较发现,Y64 DNA-A 与中国番茄黄化曲叶病毒 Y38 分离物(TYLCCNV[Y38])同源性最高(99%),与中国番茄黄化曲叶病毒广西分离物(TYLCCNV)的同源性次之(96%),而与亚洲地区的其它双生病毒的同源性均在 83% 以下,表明稀硷上的分离物 Y64 是 TYLCCNV 的 1 个分离物。利用 DNA β 的特异性引物 beta01 和 beta02,在病毒分离物 Y64 中扩增到卫星 DNA 分子(Y64 β)。序列分析表明,Y64 β 全长 1340 个核苷酸,至少在其互补链上编码 1 个有功能的 ORF (C1)。Y64 β 的全序列与 TYLCCNV 的各个分离物的卫星分子(Y38 β 、Y36 β 和 Y8 β)的同源性最高,分别为 99.5%、99.5%和 99.3%;与其它已报道的卫星 DNA β 的同源性均低于 66.4%。系统关系树研究表明,卫星 DNA β 分子与其辅助病毒是共同进化的。

关键词:中国番茄黄化曲叶病毒,稀硷,菜豆金色花叶病毒层,卫星 DNA β

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2004)01-0029-05

双生病毒是一类具有孪生颗粒形态的单链环状植物 DNA 病毒。根据介体传播、寄主范围和基因组结构可以分成 4 个属。粉虱传双生病毒(Whitefly-transmitted geminivirus,WTG)属于其中的菜豆金色花叶病毒属(Begomovirus),自然条件下由烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播^[1]。大多数 Begomoviruses 为双组分病毒,基因组含有两条大小均为 2.5~3.0kb 的 DNA 分子,即 DNA-A 和 DNA-B。少数 Begomoviruses 为单组分病毒,基因组只含 1 条 DNA 分子,即 DNA-A,大小约 2.8kb^[2]。对新加坡胜红蓟黄脉病毒(Ageratum yellow vein virus,AYVV)、巴基斯坦棉花曲叶病毒(Cotton leaf curl virus,CLCuV)及印度秋葵黄脉花叶病毒(Bhendi yellow vein mosaic virus,BYVMV)的研究发现,这类单组分 Begomoviruses 伴随着 1 种新型卫星分子(DNA β)。DNA β 是症状相关因子,但其复制、包裹、移动和介体传播等都依赖辅助病毒的 DNA-A^[3~5]。

双生病毒寄主范围广,病毒基因组变异快,已在 39 个国家的番茄、木薯和棉花等作物上造成毁灭性

危害^[6]。我国已在云南、广西地区的烟草、番茄、南瓜上发现了多种双生病毒^[7~10],但杂草上的 Begomoviruses 还未见报道。

杂草是双生病毒的重要中间寄主,因其分布广泛、繁殖能力强,对病毒的传播扩散起了重要作用。为了解双生病毒在杂草上的分布、危害情况,我们对亚洲常见杂草稀硷(*Siegesbeckia orientalis*)上的双生病毒进行了研究。本文报道了稀硷中分离到的 Begomovirus 及其伴随卫星 DNA 的全基因组结构特征。

1 材料和方法

1.1 毒源

病毒分离物 Y64 采自云南红河地区的稀硷,病株表现叶脉增厚、叶片黄化、植株矮化等症状。

1.2 DNA 提取

按谢艳等^[8]报道的方法提取总 DNA。

1.3 PCR 扩增、克隆和序列测定

根据双生病毒基因间隔区及外壳蛋白保守序列设计引物 PA 和 PB,扩增 DNA-A 部分区域,并进行

基金项目:国家杰出青年基金资助项目(30125032)

* 通讯作者。Tel:86-571-86971680;Fax:86-571-86971680;E-mail:zzhou@zju.edu.cn

作者简介:彭燕(1974-),女,江西人,博士,从事植物病理研究,现工作单位为广州医学院实验医学研究中心。E-mail:ahappyli2000@yahoo.com

收稿日期:2003-03-26,修回日期:2003-07-31

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

克隆及序列测定,然后根据测出的序列设计特异引物 Y6F₁ 和 Y6R 扩增近全长的 DNA-A。PCR 反应条件参照 Zhou 等^[11]的方法。根据谢 艳等^[5]报道的

方法扩增 DNA β 全长序列。PCR 产物分离纯化后,克隆到 pGEM-T 载体。利用通用引物及各特异测序引物进行序列测定(表 1)。

表 1 PCR 扩增和测序所用引物
Table 1 Primers used for PCR and sequencing

Primers	Sequenced(5'→3')*	Position
Primers used for DNA-A cloning :		
PA	TAATATTACCKGWKGVCCSC	2724 ~ 13
PB	TGGACYTTRCAWGBBCCTTCACA	512 ~ 490
Y6F1	ACCGGATGTACAGAAGCCCTGA	455 ~ 476
Y6R	CTTCCGATACATGGGCCTGTTTG	444 ~ 422
Primers used for DNA-A sequencing :		
Y64F	GAGGGTGACGAAGATCGC	1586 ~ 1603
Y64R	CCTGCCAAATCTGGACTCAT	1258 ~ 1239
Y64F1	TTATCGACCGCCCAITCA	1986 ~ 2004
Y64R1	TTGGGAATTACGATAATGCC	2690 ~ 2671
Y6R2	GGAAGCCAGTTCAAATTTAAAGG	1731 ~ 1710
Primers used for DNA β cloning :		
beta01	GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC	1277 ~ 1301
beta02	GGTACCTACCCCTCCAGGGGTACAC	1281 ~ 1257
Primers used for DNA β sequencing :		
beta03	CTTGGCTAATGCTGCTGACT	443 ~ 462

* B = C , T or G ; K = G or T ; R = A or G ; S = C or G ; V = A , C or G ; W = A or T ; Y = C or T .

1.4 序列分析

利用 DNASTar 软件(Madison ,Wis ,USA)和 DNAMAN Version 4.0 (Lynnon Biosoft , Quebe Canada)进行序列分析。多序列比较采用 DNASTar clustalw 方法 ,进化树构建采用 DNAMAN 的邻近相连法(Neighbor-joining)。用于 DNA-A 序列比较和进化分析的病毒有 :中国番茄黄化曲叶病毒烟草分离物 Y38(Tomato yellow leaf curl China virus-Tb[Y38] , TYLCCNV-Tb [Y38] , AJ420317) 中国番茄黄化曲叶广西分离物 (Tomato yellow leaf curl China virus , TYLCCNV , AF311734) 泰国番茄黄化曲叶病毒缅甸分离物(Tomato yellow leaf curl Thailand virus-[Myanmar] , TYLCTHV-[MM] , AF206674) 泰国番茄黄化曲叶病毒 1 号分离物(Tomato yellow leaf curl Thailand virus-[1] , TYLCTHV-[1] , X63015) 越南番茄曲叶病毒 (Tomato leaf curl Vietnam virus , ToLCVV , AF264063) 胡椒曲叶病毒(Pepper leaf curl virus , PepLCV , AF134484) 烟草曲茎病毒 Y1 分离物(Tobacco curly shoot virus-[Y1] , TbCSV-[Y1] , AF240675) Karnataka 番茄曲叶病毒(Tomato leaf curl Karnataka virus , ToLCKV , U38239) 斯里兰卡胜红蓟黄脉病毒(Ageratum yellow vein Sri Lanka virus , AYVSLV , AF314144) 云南烟草曲叶病毒 Y3 分离物(Tobacco leaf curl Yunnan virus-[Y3] , TbLCYNV-[Y3] , AJ420319) 云南南瓜曲叶病毒(Squash leaf curl Yunnan virus , SLCYV , AJ420319) 中国南瓜曲叶病毒(Squash leaf curl China

virus , SLCCNV , AB027465)。用于 DNA β 序列比较的 DNA β 分子有 新加坡胜红蓟黄脉病毒(Ageratum yellow vein virus , AYVV β , AJ252072) 秋葵黄脉花叶病毒 (Bhendi yellow vein mosaic virus , BYVMV β , AJ308425) Multan 棉花曲叶病毒(Cotton leaf curl Multan virus , CLCuMV β 01 , AJ292769 ; CLCuMV β 02 , AJ298903) Rajasthan 棉花曲叶病毒(Cotton leaf curl Rajasthan virus , CLCuRV β , AY083590) 中国番茄黄化曲叶病毒 Y8、Y36 和 Y38 分离物(TYLCCNV-[Y8、Y36、Y38] , Y8 β 、Y36 β 和 Y38 β , AJ421622、AJ506791、AJ420315)。

2 结果

2.1 病毒基因组 DNA-A 结构

利用 PA 和 PB ,PCR 扩增得到 1 条约 500bp 的特异性条带。在对 500bp 产物进行序列测定的基础上 ,用引物 Y6F1 和 Y6R 扩增出 1 条约 2.7kb 的特异条带 ,而健康对照无此产物。全序列测定拼接后发现 ,Y64 DNA-A 全长 2730 个核苷酸(nt)(EMBL 登录号 AJ457823)。Y64 DNA-A 基因组结构具有典型的粉虱传双生病毒特性 ,共编码 6 个可读框(ORFs) (图 1-A)。在 AV2 和 AC1 之间含 1 个长 265nt 非编码区 ,又称基因间隔区(Intergenic region ,IR) ,对应于核苷酸 2594 ~ 128 位。IR 区含有双生病毒复制和转录所需的各种顺式元件 :茎环结构(含有保守的 9 个核苷酸 TAATATTAC) ,TATA box(位于茎环结构上游

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

60~63nt 处)重复序列 GGTGTCT(位于核苷酸 2601~2163 位,重复于 2635~2641nt)及 CAAATGQ(位于 2630~2636nt,重复于 2666~2672nt)。

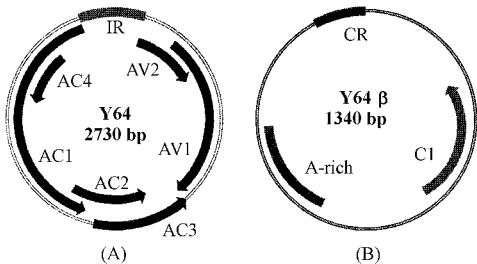


图 1 Y64 DNA-A 和 DNAβ 基因组结构

Fig.1 Genomic organization of Y64 DNA-A(A) or DNAβ(B)

2.2 Y64 DNA-A 与其它双生病毒的同源性比较

将 Y64 DNA-A 全序列进行 Blast 检索发现 ,Y64 与亚洲报道的双生病毒的同源性较高 ,而与美洲、非洲及地中海地区的相对较低。进一步与亚洲地区的双生病毒比较表明 ,Y64 与 TYLCCNV 的同源性为 96% ,与烟草上的 TYLCCNV 分离物 Y38(TYLCCNV-[Y38])的同源性达 99% ,而与其它双生病毒的同源性均在 83% 以下。仔细比较 Y64 与 TYLCCNV-[Y38] ,发现即使是变异最大的 IR 区 ,两者之间的同源性也达 98% ,各 ORFs 的同源性均达 99~100% (表 2)。Y64 与我国报道的 TbCSV-[Y1]、TbLCYNV-[Y3]、SLCYV 及 SLCCNV 的同源性分别为 80%、76%、75% 和 72%。从系统关系树得知 ,Y64 与 TYLCCNV 及其分离物 Y38 形成一独立分支 ,且与 Y38 的关系更近 ,而与其它 10 种病毒的同源关系均较远(图 2)。

表 2 Y64 与亚洲其它双生病毒 DNA-A、IR 及各 ORFs 的同源性比较(%)

Table 2 Comparison of nucleotide and amino acid sequence identities of complete DNA-A, IR and encoded ORFs between Y64 DNA-A and other 12 begomoviruses in Asia(%)								
Virus	DNA-A ^a	IR ^a	AV2 ^b	AV1 ^b (CP)	AC1 ^b (Rep)	AC2 ^b	AC3 ^b	AC4 ^b
TYLCCNV-Tb[Y38]	99	98	100	99.6	99	99	99	99
TYLCCNV	96	96	97	97	99	97	95	98
TYLCTHV-[MM]	83	81	69	78	93	88	87	90
TYLCTHV-[I]	82	76	70	78	92	90	87	88
ToLCVV	81	83	82	84	88	67	63	86
PepLCV	80	77	76	77	85	81	72	77
TbCSV-[Y1]	80	76	72	78	81	69	64	86
ToLCKV	78	49	63	79	78	50	64	59
AYVSLV	78	77	72	76	87	69	69	78
TbLCYNV-[Y3]	76	72	72	78	76	71	70	42
SLCYV	75	70	65	78	75	82	75	35
SLCCNV	72	38	60	77	69	52	64	8

^a Nucleotide ; ^b Amino acid .

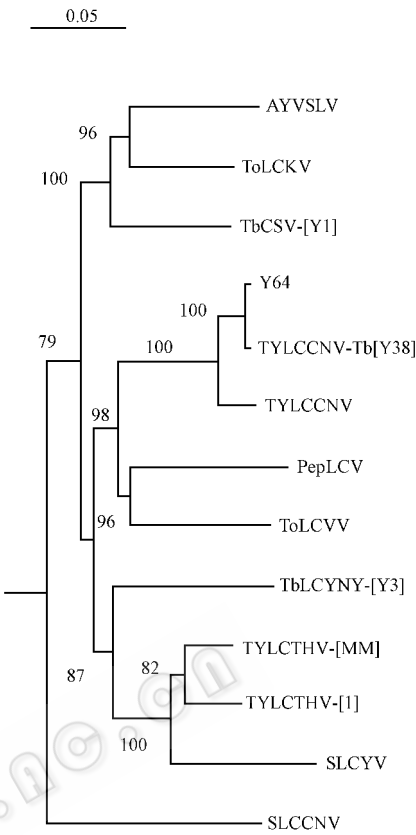


图 2 基于 DNA-A 构建的系统进化树

Fig.2 Relationship dendrogram based on DNA-A of Y64 and other 12 begomoviruses

2.3 病毒伴随 DNA β 分子结构及与其它已报道 DNA β 的同源性比较

根据 DNAβ 的保守序列 ,设计引物 beta01 和 beta02 ,PCR 扩增后得到 1 条 1.3kb 特异条带 ,而健康对照则无任何条带。全序列测定表明 ,Y64β 长 1340 个核苷酸(EMBL 登录号为 AJ421483) ,互补链上编码 1 个 13.6kD 的 C1 蛋白 ,在 761~994 位核苷酸之间富含 A(65.8% A) ,在 1240~15 位核苷酸之间含 1 个长为 115nt 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 TAATAT-TAC(图 1-B)。

Y64β 与已报道的其它 DNAβ 的全序列同源性比较表明 ,Y64β 与 TYLCCNV 各分离物伴随的卫星分子同源性最高 ,与 Y8β、Y36β 和 Y38β 的同源性分别为 99.3%、99.5% 和 99.5% ,与胜红蓟、秋葵、棉花上的卫星 DNAβ 的同源性较低 ,为 51.2~66.4%。从 C1 编码的氨基酸序列比较看 ,Y64βC1 与 Y8β、Y36β 和 Y38β 的同源性很高 ,分别为 100%、99.2% 和 100% ,而与其它 5 个卫星分子的 C1 的同源性只有 29.4~61%。CR 是 DNAβ 分子中最保守的区域 ,

Y64β 与同种 TYLCCNV 的各个 DNAβ 的 CR 区完全一致,与其它 5 个 DNAβ 的 CR 区同源性也很高,达 93.9~98.3%(表 3)。

表 3 Y64 β 与其它双生病毒卫星 DNA β 的同源性比较(%)

Table 3 Percentages of nucleotide and amino acid sequence identities between DNAβ of Y64 and other begomoviruses(%)								
Virus	Y8β	Y36β	Y38β	AYVVβ	BYVMVβ	CLCuMVβ 01	CLCuMVβ 02	CLCuRVβ
DNAβ ^a	99.3	99.5	99.5	66.4	51.8	51.4	51.2	52.8
C1 ^b	100	99.2	100	61	29.4	33.1	33.1	33.1
CR ^a	100	100	100	98.3	94.8	94.8	95.7	93.9

^a Nucleotide ; ^b Amino acid.

2.4 基因组 DNA-A 与其伴随卫星 DNAβ 分子共进化的

DNAβ 分子与其辅助的单组分双生病毒 DNA-A 分别用全序列(DNAβ 或 DNA-A)构建系统关系树,分析表明,以 DNA-A 构建的进化树形成四大分支, TYLCCNV 的 4 个分离物(Y8、Y36、Y38 和 Y64)形成 1 个分支,AYVV 及 BYVMV 因同源关系较远分别形成 1 个分支,从 CLCuMV-[Fai3]和 CLCuRV 形成 1 个分支;以 DNAβ 构建的系统关系树形成与其伴随的辅助病毒 DNA-A 一一对应的四大分支(图 3)。这说明 DNAβ 分子与其辅助病毒 DNA-A 是共同进化的。

0.05

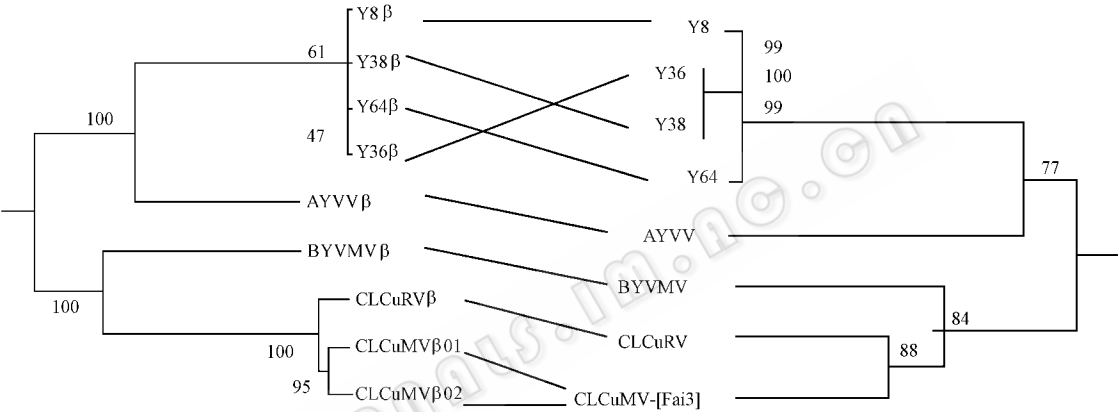


图 3 卫星 DNA 分子与其辅助病毒的进化分析

Fig. 3 Phylogenetic trees of complete nucleotide sequences of DNA β and their cognate helper viruses

3 讨论

我们对从云南杂草稀硷上分离到的 Y64 进行全基因组结构研究。序列分析发现,Y64 与 TYLCCNV 广西分离物及其烟草分离物 Y38 的同源性最高,分别达 96% 和 99%。双生病毒科病毒全基因组核苷酸序列同源性小于 89%,往往定名为不同病毒,大于 89%,则认为是同一病毒的不同株系^[12]。由此,我们认为 Y64 是 TYLCCNV 的 1 个分离物。

广西报道的 TYLCCNV 证实为单组分病毒^[13],而我们对稀硷上的 Y64 用 DNA-B 特异引物 PCR 扩增和 Southern 杂交均未能检测到 DNA-B,推测 Y64 可能也是单组分 Begomovirus。目前,已发现含卫星 DNAβ 分子的双生病毒 AYVV、CLCuMV 和 BYVMV 均为单组分病毒,因此 Briddon^[3,4]认为 DNAβ 只与单组分 Begomoviruses 相伴随。运用卫星 DNAβ 的特异引物 beta01 和 beta02,从 Y64 中分离到与病毒相伴随的卫星 Y64β。研究发现,DNAβ 被辅助病毒的

外壳蛋白包裹,由烟粉虱传播,大小为 DNA-A 的一半,除茎环结构和 TAATATTAC 外,与病毒基因组 DNA-A 无序列同源性。Y64β 含有的 CR 区,推测是辅助病毒 DNA-A 编码的复制蛋白识别及互作位点,其 A-rich 区可能是与卫星分子包装的尺寸要求相关的^[14]。Y64 分离物中发现有 DNAβ,进一步辅证 Y64 可能是单组分 Begomovirus。

杂草分布广泛,生命力极强,是多种病虫害赖以生存的重要中间寄主。从稀硷上分离到中国番茄黄化曲叶病毒,说明稀硷是该病毒的重要中间寄主,由于稀硷分布广,因此有可能会造成该病毒发生面扩大,目前该病毒已在云南和广西引起作物严重危害,应引起重视。为了更好地了解我国双生病毒的类型及分布情况,有必要对杂草上的 Begomoviruses 进行深入系统的研究。

参 考 文 献

[1] Harrison B D , Robinson D I . Natural genomic and antigenic variation
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Annu Rev Phytopath* , 1999 , **37** : 369 – 398 .
- [2] Lazarowitz D G . Geminiviruses : Genome structure and gene function . *Crit Rev Plant Sci* , 1992 , **11** (4) : 327 – 349 .
- [3] Saunders K , Bedford I D , Briddon R W , *et al* . A unique virus complex causes ageratum yellow vein disease . *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , **97** : 6890 – 6895 .
- [4] Briddon R W , Mansoor S , Bedford I D , *et al* . Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease . *Virology* , 2001 , **285** : 234 – 243 .
- [5] 谢 艳 ,周雪平 ,李正和 ,等 . 与烟草曲叶病毒伴随的新型 DNA 分子鉴定 . 科学通报 , 2002 , **47** (10) : 768 – 771 .
- [6] Moflat A S . Plant pathology : Geminiviruses emerge as serious crop threat . *Science* , 1999 , **286** : 1835 .
- [7] Zhou X P , Xie Y , Zhang Z K . Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting tobacco in Yunnan , China . *Arch Virol* , 2001 , **146** : 1599 – 1606 .
- [8] 谢 艳 ,周雪平 ,张仲凯 ,等 . 从云南分离的烟草曲叶病毒为菜豆金色花叶病毒属的一个新种 . 科学通报 , 2001 , **46** (17) : 1459 – 1462 .
- [9] 洪益国 ,蔡健和 ,王小凤 ,等 . 中国南瓜曲叶病毒 : 一个双生病毒新种 . 中国科学 (B 辑) , 1994 , **24** (7) : 608 – 613 .
- [10] 刘玉乐 ,蔡健和 ,李冬玲 ,等 . 中国番茄黄花曲叶病毒——双生病毒的一个新种 . 中国科学 (C 辑) , 1998 , **28** (2) : 148 – 153 .
- [11] Zhou X P , Liu Y , Calvert L , *et al* . Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination . *J Gen Virol* , 1997 , **78** : 2101 – 2111 .
- [12] Fauquet C M , Bisaro D M , Briddon R W , *et al* . Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae , and an updated list of begomovirus species . *Arch Virol* , 2003 , **148** : 405 – 421 .
- [13] Yin Q Y , Yang H Y , Gong Q H , *et al* . Tomato yellow leaf curl China virus : monopartite genome organization and agroinfection of plants . *Virus Res* , 2001 , **81** : 69 – 76 .
- [14] Zhou X P , Xie Y , Tao X R , *et al* . Characterization of DNA β associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A . *J Gen Virol* , 2003 , **84** (1) : 237 – 247 .

Molecular Characterization of Tomato Yellow Leaf Curl China Virus and its Associated Satellite DNA Infecting *Siegesbeckia orientalis*

PENG Yan¹ XIE Yan¹ ZHANG Zhong-Kai² ZHOU Xue-Ping^{1*}

(¹ Institute of Biotechnology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

(² Yunnan Biotechnology Research Institute , Yunnan Academy of Agricultural Sciences , Kunming 650223 , China)

Abstract : Virus isolate Y64 was obtained from *Siegesbeckia orientalis* in Honghe , Yunnan province . The complete nucleotide sequence of DNA-A was determined , it contains 2730 nucleotides . Comparisons show that the total DNA-A of Y64 has the highest sequence identity (99%) with that of Tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV) isolate Y38 , and 96% sequence identity with that of TYLCCNV Guangxi isolate , while less than 83% identities are found when compared with other begomoviruses isolated in Asian . It is concluded that Y64 infecting *Siegesbeckia orientalis* is an isolate of TYLCCNV . Satellite DNA molecule (Y64 β) was found to be associated with Y64 using the primers beta01 and beta02 . Y64 β consists of 1340 nucleotides , with a functional ORF (C1) in complementary-sense DNA . Y64 β has 99.5% , 99.5% and 99.3% sequence identities with Y38 β , Y36 β and Y8 β associated with TYLCCNV , respectively , and lower than 66.4% sequence identities are found with other reported satellite DNA molecules . Relationship dendrograms show that satellite DNA β molecules are co-evolved with their help begomoviruses .

Key words : Tomato yellow leaf curl China virus , *Siegesbeckia orientalis* , Begomovirus , Satellite DNA β

Foundation item : National Natural Science Foundation for Outstanding Youth Scholars (30125032)

* Corresponding author . Tel : 86-571-86971680 ; Fax : 86-571-86971680 ; E-mail : zzhou@zju.edu.cn

Received date 03-26-2003