

## 木尔坦棉花曲叶病毒基因重组和缺失产生 DNA $\beta$ 相关的新型小分子

赖艺祯<sup>1</sup>, 谢科<sup>1</sup>, 蔡健和<sup>2</sup>, 秦碧霞<sup>2</sup>, 李战彪<sup>2</sup>, 刘玉乐<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>清华大学生命科学学院, 北京 100084;

<sup>2</sup>广西农业科学院植物保护研究所, 南宁 530007

**摘要:** 【目的】棉花曲叶病是棉花生产上的一种重要的病毒病害, 在巴基斯坦和印度等国家地区大面积流行, 造成严重的经济损失。近年在中国广西南宁的棉花田间发现了棉花曲叶病害, 在广西的黄秋葵中也发生了曲叶病, 二者的病原均为木尔坦棉花曲叶病毒 (Cotton Leaf Curl Multan Virus, CLCuMV), 为了对这 2 个病害有更深入的了解, 本文对该双生病毒伴随的 DNA 小分子进行测序分析。【方法】分别从广西南宁地区感染 CLCuMV 的 3 棵棉花和 3 棵黄秋葵中提取总 DNA, 用 CLCuMV DNA $\beta$  的特异引物进行 PCR 扩增, 将产物分离纯化并克隆测序, 进行序列比对分析。【结果】从棉花曲叶病害中分离得到了 1384 nt 的新型重组 DNA 分子, 以及从黄秋葵曲叶病害中分离得到了 754 nt 的新型缺失型 DNA 分子。研究结果表明 1384 nt 重组分子是由 CLCuMV GX1 的 DNA-A 和 DNA $\beta$  重组而成。重组分子大部分来源于 CLCuMV 的 DNA-A, 包含基因间隔区, 附近的部分 AV2 和 AC1 基因, 以及反向互补的部分 AC3 基因。其余部分来源于伴随的 DNA $\beta$ , 包含 A-rich 区域。分析拼接片段的附近序列, 发现接头部分含有 2-3 个共同碱基, 推测为重组作用发生的位点。与以前报道的在实验室中产生的 CLCuMV 重组分子进行比较显示, DNA-A 的基因间隔区和 DNA $\beta$  的 A-rich 区在重组过程中非常保守。另外, 754 nt 的重组小分子是由 CLCuMV Okra1 DNA $\beta$  缺失突变产生, 缺失了大部分的编码 C1 蛋白开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 以及小部分的 A-rich 区。【结论】本研究在自然条件下分离到了来源于 CLCuMV 和卫星 DNA $\beta$  的重组分子, 以及 DNA $\beta$  缺陷型分子。这 2 种重组小分子以前未见报道, 这也是在中国发现的棉花曲叶病毒中首次发现重组分子。这种基因组变异现象在棉花曲叶病毒的进化和寄主适应过程中可能有重要的意义。

**关键词:** 木尔坦棉花曲叶病毒, 双生病毒, DNA-A, 卫星 DNA, 重组, 缺失

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2012)07-0932-08

棉花曲叶病病毒 (Cotton Leaf Curl Virus, CLCuV) 是一类烟粉虱传双生病毒 (whitefly-transmitted geminiviruses)<sup>[1]</sup>, 属于双生病毒科 (Geminiviridae) 中的菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*)。该病毒能侵染棉花、黄秋葵等植物, 产生叶片向上卷曲, 叶脉变厚, 造成结实率降低或不

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30800594, 30725002); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003065); 国家国际科技合作项目 (2011DFB30040)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-40-62794013; E-mail: yuleliu@mail.tsinghua.edu.cn

**作者简介:** 赖艺祯 (1985-), 女, 广东韶关人, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: joyce136@126.com

**收稿日期:** 2012-03-07; **修回日期:** 2012-03-29

结实等症状<sup>[2]</sup>。目前已分离鉴定了 7 种与棉花曲叶病相关的 CLCuV, 均为单组分病毒, 即基因组里只含 DNA-A, 大小约 2.8kb<sup>[3]</sup>。同时还伴随着卫星分子 DNA $\beta$ , DNA $\beta$  为棉花上诱导典型症状所必需的致病因子, 其复制、包装、移动和传播等依赖 DNA-A<sup>[4]</sup>。20 世纪 90 年代巴基斯坦的木尔坦 (Multan) 地区爆发了棉花曲叶病害, 并逐渐在印度、非洲流行成灾, 造成了重大的经济损失, 严重威胁着这些地区的棉花生产<sup>[1]</sup>。

我国是世界最大棉花生产和消费国, 棉花总产量和总消费量均占世界的四分之一, 而且我国重要的棉花产地新疆与棉花曲叶病流行的巴基斯坦等国毗邻。长时间以来, 我国一直没有在棉花上发现曲叶病毒疫情, 但近年来在广东和广西地区的朱槿 (*Hibiscus rosa-sinensis* Linn.) 和黄秋葵 [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] 上检测鉴定到了 CLCuMV, 该病毒分别引起朱槿曲叶病、黄秋葵黄脉曲叶病或黄秋葵曲叶病<sup>[5-7]</sup>。最近在广西南宁发现棉花田间也有该病毒出现<sup>[8]</sup>。

我们从棉花病株中分离到木尔坦棉花曲叶病毒 (CLCuMV) 分离物 GX1 DNA-A 全长为 2738 个核苷酸 (GenBank 序列号 GQ924756), DNA $\beta$  全长为 1346 个核苷酸 (GQ906588)。这是首次在中国发现棉花曲叶病毒病害<sup>[8]</sup>, 与在广东和广西地区的朱槿和黄秋葵上检测到的 CLCuMV DNA-A 和 DNA $\beta$  几乎完全相同。此外, CLCuMV 在广东和广西的朱槿和黄秋葵植物中引起的曲叶病已较为普遍, CLCuMV 已对我国棉花生产构成重大潜在威胁。

本研究意外发现, CLCuMV 棉花分离物 GX1 中除了含有经典的 CLCuMV 单组分和伴随的卫星 DNA 外, 还含有 1 种长度为 1384 核苷酸的新型分子, 由 DNA-A 部分序列缺失、倒位并插入 DNA $\beta$  部分序列重组而成。CLCuMV 黄秋葵分离物 Okra1 中除了含有经典的 CLCuMV DNA $\beta$  分子, 还含有 DNA $\beta$  缺失突变产生的 754 nt 缺陷型小分子。这 2 种重组小分子以前未见报道, 也是首次在中国发现棉花曲叶病毒的基因组重组缺失现象。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品来源: CLCuMV 棉花分离物来自广西南

宁市的具有典型的曲叶病症状的棉花植株, 病症表现为叶片向上卷曲, 叶脉变厚, 脉深绿化, 叶背主脉上有耳状突起, 植株矮化等。CLCuMV 黄秋葵分离物来自同一地区感染黄秋葵曲叶病的病株, 表现为幼叶小且向下卷曲, 叶正面形成网络状, 叶背面叶脉变厚。

1.1.2 主要试剂和仪器: Ex Taq 酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶购自大连宝生物公司, 质粒提取试剂盒购自天根公司, 琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒购自 Promega 公司。常用化学试剂均为国产分析纯试剂, PCR 仪购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 DNA 提取

采用 CTAB 法<sup>[9]</sup> 分别从 6 棵病株的叶片中提取总 DNA, 作为 PCR 模板。

### 1.3 PCR 扩增、克隆和测序

应用 DNA $\beta$  特异引物  $\beta$ -F 和  $\beta$ -R (病毒链引物: 5'-GACTGGGTGGTTTTACCATTTACTG-3'; 互补链引物: 5'-ACCTTCAAACGACAACGTTTTTCGGAG-3') 扩增 DNA 全长序列, 分离纯化 PCR 产物中长度约 1.3 kb 以及 750 bp 的条带, 克隆到 pGEM-T 载体 (Promega 公司)。每个样品分别随机选取 3 个阳性克隆进行测序, 引物合成和测序由上海生物工程有限公司完成。

### 1.4 序列分析

用 BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) 对测序得到的序列进行同源性检索; 利用 Geneious Pro 4.8.5 进行 DNA 多序列比较分析。

## 2 结果

### 2.1 GX1 分离物中的新型 DNA 分子

利用木尔坦棉花曲叶病毒 DNA $\beta$  特异引物  $\beta$ -F 和  $\beta$ -R 扩增得到一条预期大小约 1.3 kb 的片段, 而对照样本 (健康植株) 无任何扩增条带。将该条带进行克隆, 随机选取 4 个克隆进行测序, 结果显示 CLCuMV 棉花分离物 GX1 中有 2 种序列, 一种与 CLCuMV GX1 的卫星 DNA $\beta$  完全一致, 为 1346 bp, 而另一种长度为 1384 bp, 与 CLCuMV GX1 的 DNA $\beta$  只有 26.8% 的相似性。该新型 DNA 分子命名为 CLCR GX1 (Cotton leaf curl recombinant, Genbank 序列号: JQ679092)。

## 2.2 CLCuMV 新型重组 DNA 的分子结构及特征

新型分子 CLCR GX1 为闭合环状单链 DNA, 将 CLCR GX1 与同一毒源的 CLCuMV GX1 分离物伴随的 DNA $\beta$  (GQ906588) 进行序列比对, 发现 CLCR GX1 的 345 - 777 nt 序列对应 DNA $\beta$  的 657 - 1080 nt, 同源率高达 98%。

分析比较 CLCR GX1 与 CLCuMV GX1 的 DNA-A (GQ924756) 的序列, 可以找到 CLCR GX1 的 1 -

332 nt, 1054 - 1384 nt 分别对应双生病毒 DNA-A 的 1 - 332 nt, 2410 - 2738 nt, 相似性分别为 99%, 100%; 而 CLCR GX1 的 775 - 1055 nt 序列则反向互补对应于 DNA-A 的 1102 - 1382 nt, 相似性为 100% (表 1)。可知 CLCuMV 新型 DNA 分子是由 CLCuMV GX1 的 DNA-A 发生基因删除、倒位和插入伴随卫星分子 DNA $\beta$  重组而成。

表 1 CLCuMV 的新型重组 DNA 分子与 DNA-A, DNA $\beta$  的核苷酸序列比对  
Table 1 Identities of nucleotide sequences in recombinant DNA molecules of CLCuMV

Name	Homolog (bp, Identities in parentheses)					Full length (nt)
CLCR GX1	1 - 332 (100%)	333 - 344	345 - 777 (98%)	775 - 1055 (100%)	1054 - 1384 (99%)	1384
CLCuMV DNA $\beta$	-	?	657 - 1080	-	-	1346
CLCuMVDNA-A	1 - 332	?	-	1382 - 1102	2410 - 2738	2738

Question mark indicates unknown origins.

对 CLCR GX1 进行功能域分析, 推导 CLCR GX1 含有 5 个长度大于 200bp 的开放阅读框 (ORFs), 分别对应 CLCuMV 编码序列的一部分, 包括病毒链上的 AV2 基因 (117 - 365 nt), AC3 基因 (757 - 1101 nt), AC2 基因 (829 - 1101 nt), 互补链上的 AC1 基因 (1019 - 1318 nt), 以及 1 个未知功能的基因 (表 2)。重组分子缺失 DNA-A 的 332 - 1102 nt 和 1382 - 2410 nt 片段, 只包含 AV1, AV2, AC1, AC2 和 AC3 编码区的一部分, 无法判断这些 ORFs 是否能表达出相应蛋白。在 AV2 和 AV1 之间有 267 nt (1234 - 116 nt) 的非编码区, 即基因间隔区 (Intergenic region, IR), 含有病毒复制和转录所需的调控元件, 包括茎环结构和保守的 TAATATTAC 序列等。另外, CLCR GX1 没有编码 C1 蛋白的功能域和保守区域 (Conserved region, CR), 但在与 DNA $\beta$  同源的序列 (763 - 962 nt) 区间有 1 个富含 A 的区域 (460 - 659 nt), A 的含量为 56%。

表 2 CLCuMV 的重组 DNA 分子的 ORFs

Table 2 ORFs in recombinant DNA molecules of CLCuMV

ORF	AV2	AC1 (Rep)	AC2	AC3	Novel ORF
CLCuMV (a)*	121	363	151	134	
CLCR GX1 (a)*	82	99	90	114	84
Homolog (a)*	74	59	60	96	
Similarity%	97	98	99	97	

\* Figures are the number of amino acid residues in the predicted protein of the corresponding ORFs. + The number of amino acid residues derived from the CLCuMV ORF. a: Amino Acid.

## 2.3 CLCR GX1 与其它 CLCuMV 重组分子的同源率比较分析

Briddon 等人在寻找棉花曲叶病毒致病因子的过程中, 分离到 1 个 1346 nt 的棉花曲叶病毒重组分子 (AJ242974, cotton leaf curl recombinant 01, 即 CLCR01), 是由 CLCuMV 的基因间隔区和部分 DNA $\beta$  组成<sup>[4]</sup>。Liu 等人在实验条件下将 CLCuV-PK 用烟粉虱接种的方法, 使烟草呈现曲叶病症状, 病毒分离物的双链 DNA 分子产物中发现有一系列 DNA-A 缺陷型分子<sup>[10]</sup>, 其中 1 个缺陷型分子插入了未知来源的序列, 后经证实为 DNA $\beta$  序列。这个 1246 nt 的 CLCuV-PK 重组分子, 命名为 CLCR02 (AJ222705)。

将 CLCR GX1 与 CLCR01 和 CLCR02 分别进行比对 (表 3), 在 CLCR GX1 的 1059 - 1371 nt 序列区域均有较高的同源性 (76%), 对应为 CLCuMV DNA-A 的基因间隔区, 推测这段序列在 DNA-A 和 DNA $\beta$  重组现象中很保守。

表 3 CLCR GX1 与其他 CLCuV 重组分子的同源率比较  
Table 3 Comparison of sequence identities of CLCR GX1 and other CLCuV recombinant molecules

CLCR	GenBank	Homolog and Identities* (nt)	
GX1	Accession No.		
CLCR01	AJ242974	1 - 86 (93%)	1059 - 1384 (76%)
CLCR02	AJ222705	66 - 329 (95%)	498 - 697 (90%) 1059 - 1371 (76%)

\* Figures are nucleotide positions in the sequence of CLCR GX1; Figures in parentheses are the identities of CLCR GX1 and equivalent sequences in CLCR01 or CLCR02.

### 2.4 CLCuMV 重组分子的可能重组机制

CLCR GX1 除了插入的 11 nt 未知来源片段, 在 DNA-A 拼接片段之间, 以及与 DNA $\beta$  拼接部分都存在着重合位点。这种全新的接头分子 (junctions) 表明新型的 CLCuMV 分子很可能是由于分子间重组形成。图 1 显示接头的附近序列与 CLCuMV 拼接片段完全一致。

	TAGATAATttgtc	TAATCCAacaAa
J1	TAGATAATCCCCT	J2 TAATCCATGGAG
	TtccaAATCCCCT	atgagCATGGAG

图 1 CLCuMV CLCR GX1 重组接头附近的核苷酸序列

Fig. 1 Nucleotide Sequences around novel conjunctions of CLCuMV sequences in CLCR GX1. Junction J1 is between the third and fourth sequence elements listed in Table 1 for each PCR product, J2 between the fourth and fifth. For each junction, the middle line shows the sequence of CLCR GX1 and the upper and lower lines show the sequences of the regions of CLCuMV DNA-A or DNA $\beta$  that have apparently been joined, with residues they share with CLCR GX1 capitalized. Residues shared by all three sequences at the junction point are underlined.

为了进一步研究 CLCuMV 重组 DNA 分子的重

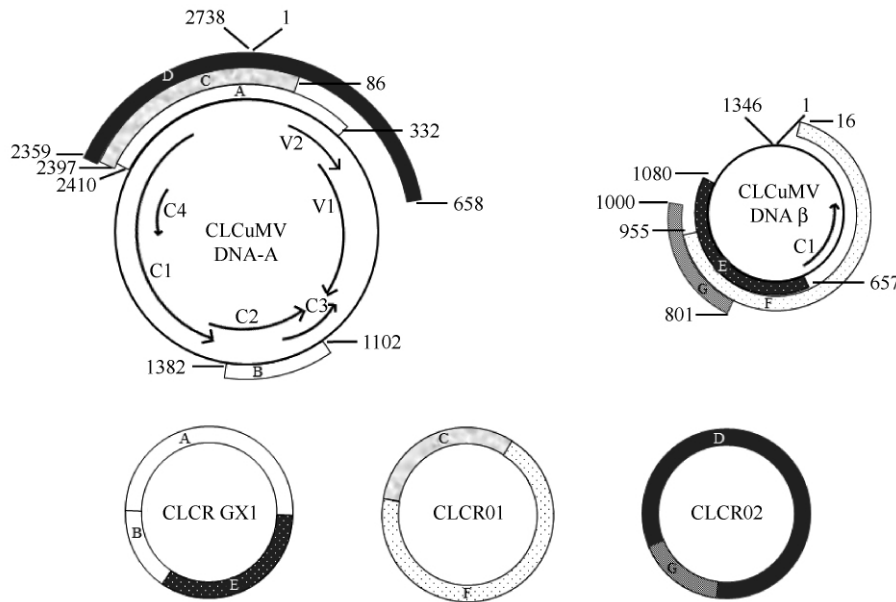


图 2 CLCuMV 的不同重组 DNA 分子的序列来源

Fig. 2 Genome maps of CLCuMV DNA-A and DNA $\beta$  showing the origins of sequences found in recombinant molecules: CLCR GX1, CLCR01 and CLCR02. The fragments are labeled as A, B, C and D (originating from CLCuMV DNA-A), and E, F and G (originating from DNA $\beta$ ).

该分子缺失了 DNA $\beta$  的 438 - 1036 nt 部分, 即大部分的 C1 蛋白序列、小部分 A-rich 区及相邻区域 (图 2)。对 CLCD $\beta$  进行功能域分析, 推导其含有

重组机制, 将 CLCR01、CLCR02、CLCR GX1 分别与来重组来源 CLCuMV 的 DNA-A 和卫星 DNA 两个序列作比对分析。为简化比对, 我们统一将重组分子与 CLCuMV GX01 分离物序列进行比较 (表 4)。3 种重组分子来源于 DNA-A 的片段, 均含有一段约 414 nt 的序列 (即 2410 - 2738 nt 和 1 - 86 nt 片段首尾相接), 包含部分基因间隔区和 AC1 基因。来源于病毒 DNA $\beta$  的片段, 均含有 154 nt 序列 (801 - 955 nt), 为富含 A 的区域。

### 2.5 CLCuMV DNA $\beta$ 发生缺失突变

利用 DNA $\beta$  特异引物  $\beta$ -F 和  $\beta$ -R 扩增黄秋葵病株的 CLCuMV Okra1 分离物基因组, 得到大小分别约为 1350 bp、750 bp 的小片段, 而对照样本无任何扩增条带。克隆后进行测序, 发现大分子全长为 1354nt, 与 CLCuMV DNA $\beta$  序列几乎完全相同。小分子全长为 754 nt, 与 CLCuMV Okra1 DNA $\beta$  的 1 - 437 nt 和 1037 - 1353 nt 序列相似度高达 99.9%, 应该为 DNA $\beta$  缺失突变形成。将该小分子命名为 CLCD $\beta$  (Cotton leaf curl defection, GenBank 序列号: JQ716368)。

1 个 ORF, 长度为 41 个氨基酸, 与 CLCuMV 编码 C1 蛋白的核苷酸相似度为 62%。

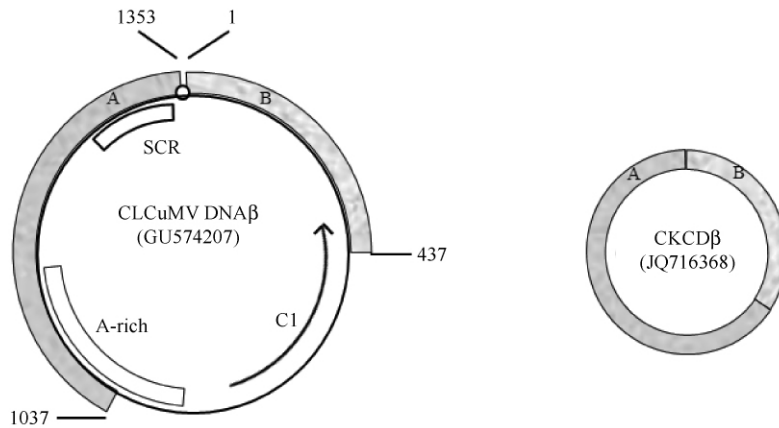


图3 CLCuMV DNA $\beta$ 与CLCD $\beta$ 的基因示意图

Fig. 3 Genome map of CLCuMV DNA $\beta$  showing the origins of sequences found in molecules CLCD $\beta$ . The fragments are labeled as A and B (originating from CLCuMV DNA $\beta$ ).

### 3 讨论

本研究从广西南宁棉花曲叶病的病株中鉴定到2种新的DNA $\beta$ 相关的小分子。经过序列比对和BLAST分析发现,除了含有DNA-A和DNA $\beta$ 全长序列,还存在1种新型分子CLCR GX1,与GX1 DNA-A和DNA $\beta$ 的同源序列相似性均在98% - 100%,可推测小分子是由这2个组分经过删除、倒位重组而成。其中大部分来源于DNA-A的基因间隔区,以及部分AC1和AV2的5'端序列,保留了AC3基因的大部分序列但为倒位拼接。其余部分(除了11 nt的未知来源序列)来自于DNA $\beta$ 序列,包含1个约200个核苷酸的A-rich区。

推测CLCR GX1含有5个开放阅读域,分别含有AC1, AC2, AC3和AV2的部分编码区,可能与表达部分功能蛋白有关。研究表明AV2能编码衣壳蛋白,AC3编码复制增强蛋白(REN),AC2编码控制晚期基因表达的转录激活蛋白(TrAP),与病毒的复制和介体传播有关,重组分子含有AV2, AC3和AC2的大部分基因,推测这些基因片段有编码蛋白的可能性,并且包含的部分AC1基因很可能编码出复制蛋白(Rep)的N端区域,行使一定的功能。

在实验条件下,Liu等人用棉花曲叶病毒侵染烟草,产生系列缺陷型的CLCuV的DNA-A分子,以及与部分DNA $\beta$ 重组的分子,能伴随DNA-A通过嫁接或烟粉虱在烟草和番茄之间相互传播<sup>[10]</sup>。Bridson等人在棉花病株分离物中也得到了重组分

子CLCR01,但这样的重组子在基因组中所占的比例很小<sup>[4]</sup>。Amin等人发现棉花曲叶病毒还能与番茄中的卫星分子进行重组,可能在卫星分子的进化中起作用<sup>[11]</sup>。与我们报道的重组分子类似,这些重组分子均保留了基因间隔区。IR区含有复制起始所必需的9碱基序列“TAATATT/AC”,能产生缺口并与AC1编码的复制蛋白结合从而起始滚环复制<sup>[12-13]</sup>。因此,含有IR区的重组分子能随DNA-A复制而协同复制和传播。

CLCuV病毒重组分子均含有A-rich区,可能与重组分子包装过程中的尺寸限制有关<sup>[14]</sup>。双生病毒在病毒包装和运动过程中对分子大小的选择比较严格,一般长度为与典型组份相当、其一半或者四分之一。有研究表明,DNA1和DNA $\beta$ 很可能是通过增加A-rich区长度<sup>[15]</sup>,从而被双生病毒CP包裹并随病毒移动。通过插入A-rich序列,重组分子能够被CLCuMV病毒的衣壳蛋白所包裹,进而在宿主间被传播。与之前发现的CLCuV病毒重组分子不同的是,CLCR GX1还含有AC3基因部分序列的反转互补序列,可能对于重组分子的增强复制起作用。

病毒重组型分子大小大多在1400 nt,为基因组DNA-A一半的大小,在其他双生病毒中也非常普遍,如TGMV、ACMV、TYLCV和AYVV<sup>[16-19]</sup>。这些缺陷型分子有的全部来源于DNA-A(均包括Rep基因的5'端和基因间隔区)或者DNA-B,有的由DNA-A与卫星DNA重组形成,大小正好适合被衣壳蛋白包裹,并由烟粉虱传播。这些环状分子保留有复制起始位点以及与病毒复制蛋白(Rep)互作的序列,

甚至可能与重组分子自身编码的复制蛋白的 N 端区域互作, 再通过病毒 DNA-A 的正常复制机制实现自身复制。叶蝉传甜菜卷顶病毒 (BCTV) 也存在着类似于双生病毒 DNA-A 的缺陷型分子<sup>[20-21]</sup>, 包含基因间隔区和部分 Rep 基因, 但与 CLCuMV 所不同的是, 其重组事件只包含删除, 而没有序列倒位和重排发生。

通过分析拼接序列的接头核苷酸, 可以推测不同片段间发生了重组, 从而产生新型小分子。Liu 等人在不同的缺陷型 DNA-A 分子发现了不同接头序列<sup>[10]</sup>, 连同我们在 CLCuMV GX1 上得到的接头序列, 说明缺陷型分子和重组分子的产生需要两条来源序列含有 1-7 个相同的核苷酸, 但在这些序列中并没有发现显著规律。

双生病毒在田间复合侵染和病毒基因组之间的重组现象较为普遍<sup>[22-23]</sup>, 而重组在双生病毒的进化中起着非常重要的作用<sup>[24-25]</sup>。虽然 CLCuV 和伴随的 DNA $\beta$  重组 DNA 分子具有的生物学功能目前仍不清楚, 我们推测不同组份间的重组能够增加病毒多样性, 为适应寄主提供更多机会, 使病毒更好地适应新的生态环境。已经报道在巴基斯坦的 CLCuV-PK 有多个变异种, 均伴随核苷酸序列重组现象, 重组小分子很可能在产生同一病毒不同变异种或者全新病毒中起作用<sup>[26]</sup>。另外, 病毒侵染植物时能将病毒自身序列整合到寄主植物基因组中<sup>[27]</sup>, 其整合序列通常也包含基因间隔区和 AC1 基因。因此重组小分子很可能作为前体分子存在于病毒基因组中。已发现的 CLCuV 重组分子均缺乏致病因子  $\beta$ C1 基因, 而  $\beta$ C1 基因编码的产物与症状调节相关, 可推测病毒基因与伴随卫星分子发生重组并不是为了增强毒性, 更可能是为了自身的适应和进化, 以及扩大寄主范围。

此外, 本研究还首次在中国田间分离到 CLCuMV DNA $\beta$  缺失变异型小分子, 长度为 754 nt。缺失序列为大部分的 beta C1 蛋白编码区, 以及小部分的 A-rich 区。小分子保留了卫星分子保守区 (Satellite conserved region, SCR), 其中含有 9 碱基序列“TAATATT/AC”的茎环结构, 为复制起始所必需, 推测该类小分子能够随着 DNA-A 的复制而复制。另外, 我们用双生病毒伴随的 DNA 1 的通用引物 PCR 扩增棉花和黄秋葵病叶没有产生任何片段, 推测这些材料中没有与 CLCuMV 伴随的 DNA 1 (结

果未显示)。由于致病因子 C1 蛋白的缺失, 推测该小分子无法与 CLCuMV DNA 共侵染使植物产生典型病症, 然而有可能与 DNA $\beta$  或 DNA-A 互作影响病毒症状。其存在的生物学意义仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Briddon RW, Markham PG. Cotton leaf curl virus disease. *Virus Research*, 2000, 71 (1-2): 151-159.
- [2] Mansoor S, Bedford I, Pinner MS, Stanley J, Markham P. A whitefly-transmitted geminivirus associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 1993, 25: 105-107.
- [3] Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, Stanley J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology*, 2003, 148 (2): 405-421.
- [4] Briddon RW, Mansoor S, Bedford ID, Pinner MS, Saunders K, Stanley J, Zafar Y, Malik KA, Markham PG. Identification of dna components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*, 2001, 285 (2): 234-243.
- [5] 毛明杰, 何自福, 虞皓, 李华平. 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. 病毒学报 (*Chinese Journal of Virology*), 2008, 24 (1): 64-68.
- [6] 董迪何, 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. 植物保护 (*Plant Protection*), 2010, 36 (1): 65-68.
- [7] Xie K, Cai J, Hu D, Wei X, Jia Q, Qin B, Chen B, Meng J, Liu Y. First report of okra leaf curl disease in China. *Journal of Plant Pathology*, 2010, 92 (S4): 109-109.
- [8] Cai JH, Xie K, Lin L, Qin BX, Chen BS, Meng JR, Liu Y. Cotton leaf curl Multan virus newly reported to be associated with cotton leaf curl disease in China. *Plant Pathology*, 2010, 59 (4): 794-795.
- [9] Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 13-15.
- [10] Liu Y, Robinson DJ, Harrison BD. Defective forms of cotton leaf curl virus DNA-A that have different combinations of sequence deletion, duplication, inversion and rearrangement. *Journal of General Virology*, 1998, 79 (6): 1501-1508.

- [11] Amin I, Mansoor S, Amrao L, Hussain M, Irum S, Zafar Y, Bull SE, Briddon RW. Mobilisation into cotton and spread of a recombinant cotton leaf curl disease satellite. *Archives of virology*, 2006, 151 (10) :2055-2065
- [12] Laufs J, Traut W, Heyraud F, Matzeit V, Rogers SG, Schell J, Gronenborn B. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92 (9) :3879-3883.
- [13] Stanley J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, 1995, 206 : 707-712.
- [14] Zhou X, Xie Y, Tao X, Zhang Z, Li Z, Fauquet CM. Characterization of DNAbeta associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. *Journal of General Virology*, 2003, 84 (1) :237-247.
- [15] Saunders K, Stanley J. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology*, 1999, 264 (1) :142-152.
- [16] MacDowell SW, Coutts RH, Buck KW. Molecular characterisation of subgenomic single-stranded and double-stranded DNA forms isolated from plants infected with tomato golden mosaic virus. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14 (20) :7967-7984.
- [17] Stanley J, Townsend R. Characterisation of DNA forms associated with cassava latent virus infection. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13 (7) :2189-2206.
- [18] Czosnek H, Ber R, Navot N, Antignus Y, Cohen S, Zamir D. Tomato yellow leaf curl virus DNA forms in the viral capsid, in infected plants and in the insect vector. *Journal of Phytopathology*, 1989, 125 :47-54.
- [19] Stanley J, Saunders K, Pinner MS, Wong SM. Novel defective interfering DNAs associated with *Ageratum yellow vein geminivirus* infection of *Ageratum conyzoides*. *Virology*, 1997, 239 (1) :87-96.
- [20] Frischmuth T, Stanley J. Characterization of beet curly top virus subgenomic DNA localizes sequences required for replication. *Virology*, 1992, 189 (2) :808-811.
- [21] Stenger DC, Stevenson MC, Hormuzdi SG, Bisaro DM. A number of subgenomic DNAs are produced following agroinoculation of plants with beet curly top virus. *Journal of General Virology*, 1992, 73 (2) :237-242.
- [22] Sanz AI, Fraile A, Gallego JM, Malpica JM, Arenal FG. Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *J Mol Evol*, 1999, 49 :672-681.
- [23] Sanz AI, Fraile A, Garcia FA. Multiple infection, recombination and genomic relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology*, 2000, 81 (7) : 1839-1849.
- [24] Briddon RW, Bedford ID, Tsai JH, Markham PG. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology*, 1996, 219 (2) : 387-394.
- [25] Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 1999, 265 (2) :218-225.
- [26] Zhou X, Liu Y, Robinson DJ, Harrison BD. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology*, 1998, 79 (4) : 915-923.
- [27] Bejarano ER, Khashoggi A, Witty M, Lichtenstein C. Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93 (2) :759-764.

# Novel DNA- $\beta$ associated molecules produced by sequence recombination and deletion of cotton leaf curl Multan virus complex

Yizhen Lai<sup>1</sup>, Ke Xie<sup>1</sup>, Jianhe Cai<sup>2</sup>, Bixia Qin<sup>2</sup>, Yule Liu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

<sup>2</sup> Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

**Abstract:** [Objective] Cotton leaf curl disease (CLCuD) is a major constraint to cotton production, causing great economic losses in Pakistan and India. In China, CLCuD has been discovered in the field of Nanning, Guangxi. To better understand this disease, we sequenced the virus-associated small DNA molecules. [Methods] We purified total DNA from cotton and okra plants exhibiting leaf curl symptoms; PCR amplified and sequenced CLCuMV satellite DNA (DNA $\beta$ )-related small DNA molecules. [Results] We identified 2 novel recombinant DNA molecules with 1384 nucleotides in cotton and 754 nucleotides in okra. The 1384 nt molecule contains partial DNA- $\alpha$  and DNA $\beta$  of CLCuMV GX1. It includes the intergenic region, adjacent AV2 and AC1 coding sequences, and reverse complementary AC3 of DNA- $\alpha$  and A-rich region of DNA $\beta$ . Common nucleotides were found around the junction points of DNA- $\alpha$  and DNA $\beta$  sequences, suggesting they were the sites of recombination. Comparison with previous reported CLCuMV recombinants produced in lab showed that the intergenic region of DNA- $\alpha$  and A-rich region of DNA $\beta$  were conserved on the recombination process. The 754 nt molecule was produced by deletion of CLCuMV DNA $\beta$  in the C1 open reading frame and A-rich region. [Conclusion] We identified a novel recombinant molecule originated from CLCuMV DNA- $\alpha$  and DNA $\beta$  and a small defective molecule of DNA $\beta$ . This is the first report of sequence recombination and deletion of CLCuMV in China, which may be helpful to understand the CLCuMV evolution and host adaptation.

**Keywords:** cotton leaf curl Multan virus, begomoviruses, DNA- $\alpha$ , satellite DNA $\beta$ , recombination, deletion

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800594,30725002) and by the Science and technology Development Foundation of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (200902Z)

\* Corresponding author. Tel /Fax: +86-40-62794013; E-mail: yuleliu@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 7 March 2012/Revised: 29 March 2012