

# 侵染苜蓿菜的中国胜红蓟黄脉病毒及伴随的卫星基因组结构特征

赵丽玲, 钟静, 张晓云, 李婷婷, 丁铭\*

(云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 昆明 650223)

**摘要** 杂草是菜豆金色花叶病毒属病毒的重要中间寄主,常富集多种该属病毒及其卫星病毒。2014年,在云南红河常见杂草苜蓿菜 *Sonchus arvensis* 上出现了疑似菜豆金色花叶病毒属病毒病症状。利用克隆、测序和生物信息学分析技术对其所含病毒进行分离鉴定,结果从1株病样中共获得了两条菜豆金色花叶病毒属病毒全序列、两条 $\beta$ 卫星全序列和一条 $\alpha$ 卫星全序列。序列分析显示,两条菜豆金色花叶病毒属病毒全序列与中国胜红蓟黄脉病毒相似性最高,分别为99%和96%,确定为胜红蓟黄脉病毒的分离物。两条 $\beta$ 卫星全序列与赛葵黄脉 $\beta$ 卫星相似性最高,为97%,确定为赛葵黄脉 $\beta$ 卫星的一个分离物。 $\alpha$ 卫星全序列与中国番茄黄化曲叶 $\alpha$ 卫星相似性最高,为86.3%,是中国番茄黄化曲叶 $\alpha$ 卫星的一个分离物。这是菜豆金色花叶病毒属病毒病害复合体在中国侵染苜蓿菜的首次报道。

**关键词** 菜豆金色花叶病毒属病毒;  $\alpha$ 卫星;  $\beta$ 卫星; 苜蓿菜

**中图分类号:** S 436.43 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.05.010

## Molecular characterization of Ageratum yellow vein China virus infecting *Sonchus arvensis* in Yunnan, China and associated satellites

Zhao Liling, Zhong Jing, Zhang Xiaoyun, Li Tingting, Ding Ming

(Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Yunnan Province, Kunming 650223, China)

**Abstract** Weeds are crucial intermediate hosts of begomoviruses and frequently harbor multiple begomoviruses and associated satellites. *Sonchus arvensis*, a common weed in Honghe, Yunnan Province, showed symptoms typical of begomovirus infection in 2014. Begomoviruses associated with *S. arvensis* was studied using cloning, sequencing and bioinformatic analysis. Two full-length begomoviruses, two betasatellites and one alphasatellite were isolated from one sample. Sequence analysis showed that these begomovirus sequences shared the highest identity (99% or 96%) with Ageratum yellow vein China virus (AYVCNV), confirming both of them as an isolate of AYVCNV. These two betasatellite sequences shared 97% identity with Malvastrum yellow vein betasatellite (MaYVB), confirming all of them as isolates of MaYVB. The alphasatellite sequence shared 86.3% identity with Tomato yellow leaf curl China alphasatellite (TYLCCNA), confirming it as an isolate of TYLCCNA. This is the first report of begomovirus disease complex associated with *S. arvensis* in China.

**Key words** begomoviruses; alphasatellite; betasatellite; *Sonchus arvensis*

菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus* 是双生病毒科 *Geminiviridae* 中包含种类最多,分布范围最广,造成经济损失最重的一个属<sup>[1-3]</sup>。按地理分布,菜豆金色花叶病毒属病毒可分为新世界和旧世界病毒。新世界菜豆金色花叶病毒属病毒为双组

分病毒,即基因组包含 DNA-A 和 DNA-B 两种组分;旧世界菜豆金色花叶病毒属病毒既有双组分病毒也有单组分病毒。单组分的菜豆金色花叶病毒属病毒基因组仅包含 DNA-A 组分,有些单组分病毒与 $\beta$ 卫星(betasatellite)或既与 $\beta$ 又与 $\alpha$ 卫星(alphasatel-

lite)相伴形成病害复合体<sup>[4-5]</sup>。 $\beta$ 卫星基因组大小约为辅助病毒的一半(约 1.3 kb),需要依赖辅助病毒进行复制、包装、移动和介体传播,其互补链编码一个 C1 蛋白(即  $\beta$ C1),该蛋白能够引起典型的病毒侵染症状,并能抑制寄主植物的 RNA 沉默反应<sup>[6-7]</sup>。 $\alpha$ 卫星基因组大小也约为辅助病毒的一半(约 1.3 kb),其病毒链编码一个 Rep 蛋白,该蛋白使其能自我复制,但需要辅助病毒进行包装、移动和介体传播<sup>[4,8]</sup>。

中国胜红蓟黄脉病毒 *Ageratum yellow vein China virus*(AYVCNV)属于菜豆金色花叶病毒属成员,其基因组仅含 DNA-A 组分,与中国胜红蓟黄脉  $\beta$  卫星(*Ageratum yellow vein China betasatellite*, AYVCNB)相伴随<sup>[9-10]</sup>。DNA-A 组分大小为 2.7~2.8 kb,含有 6 个 ORF,分别编码 V1、V2、C1、C2、C3 和 C4 基因。 $\beta$ 卫星大小约 1.3 kb,含有 1 个 ORF,编码  $\beta$ C1 蛋白,该卫星是引起胜红蓟黄脉症状所必需的,并能增加辅助病毒 AYVCNV 的积累量。AYVCNV 于 2006 年首次报道,该病毒与 AYVCNB 卫星相伴随,引起海南省海口地区的胜红蓟黄脉病<sup>[9]</sup>。随后,在广西表现黄脉症状的胜红蓟中也发现存在大量的 AYVCNV/AYVCNB<sup>[10]</sup>。近年的研究发现,该病毒不仅侵染胜红蓟,也侵染番茄(GenBank 登录号:KC172826, KU975392, KU954377),威胁着番茄作物的生产。

苜蓿菜 *Sonchus arvensis* 为菊科苦苣菜属多年生草本植物,几乎全世界均有分布,在我国常作为野菜被广泛食用,临床也常用于治疗咽喉肿痛、急性痢疾、炎症、产后出血、痔疮肿痛等症<sup>[11-13]</sup>。目前印度已有报道空心莲子草黄脉病毒 *Alternanthera yellow vein virus* (AIYVV) 病害复合体侵染苜蓿菜,引起苜蓿菜黄脉症状<sup>[14]</sup>;中国广西有 AYVCNV 侵染该属另一植物苦苣菜的报道<sup>[15]</sup>,但国内尚未有菜豆金色花叶病毒属病毒侵染苜蓿菜的报道。本研究采集了表现叶脉黄化和增厚的苜蓿菜病株,从中首次分离到菜豆金色花叶病毒属病毒,并对分离到的病毒核苷酸序列进行了比对和进化重组分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 病害样品采集

2014 年 10 月在云南省红河州河口县采集了 1 株苜蓿菜病株(YN4368)。该病株具有明显叶脉黄化、增厚等疑似菜豆金色花叶病毒属病毒侵染的症状。

### 1.2 植物总 DNA 提取及 PCR 检测

采用 CTAB 法提取苜蓿菜病株叶片总 DNA<sup>[16]</sup>。利用菜豆金色花叶病毒属病毒简并引物 PA/PB 进行 PCR 检测,该引物扩增的目的条带为该属病毒基因共同区及外壳蛋白保守区约 500 bp 的基因片段<sup>[17]</sup>。与此同时,利用  $\beta$  卫星通用引物  $\beta$ 01/ $\beta$ 02 和  $\alpha$  卫星通用引物 UNA101/UNA102 对苜蓿菜病株进行 PCR 检测,这两对引物的目的条带分别为其卫星全长<sup>[18-19]</sup>。PCR 反应体系:10×PCR 反应缓冲液(含  $Mg^{2+}$ )2.5  $\mu$ L、2.5  $\mu$ mol/L dNTPs 2  $\mu$ L、20  $\mu$ mol/L 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L、*Taq* Plus DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L,上海申能博彩生物科技有限公司)0.5  $\mu$ L、植物总 DNA 125 ng,加双蒸水定容至 25  $\mu$ L。扩增条件:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 45 s,50℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 50 s(PA/PB 引物)或 90 s( $\beta$ 01/ $\beta$ 02 和 UNA101/UNA102 引物),30 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。紫外灯下割取目的片段,利用 Axygen DNA 凝胶回收试剂盒分离纯化,回收产物连接到 pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI)载体上,通过热击法将连接产物转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,挑选阳性克隆,送上海立菲生物技术有限公司进行测序。

### 1.3 滚环扩增

为了获得高纯度的菜豆金色花叶病毒属病毒及其卫星基因组,对苜蓿菜病样进行了滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)。按照 Templiphi™ Kit(GE Healthcare)说明书上的步骤进行环状 DNA 的扩增。首先将 1  $\mu$ L 植物总 DNA 样品(约 50 ng)加入到 5  $\mu$ L 样品缓冲液中,95℃ 变性 3 min,立刻插入冰上放置 10 min;然后加入 5  $\mu$ L 反应缓冲液和 0.2  $\mu$ L 酶(phi29 DNA 聚合酶),在 30℃ 反应 18 h;最后在 65℃ 下加热 10 min,终止反应。

### 1.4 病毒 DNA-A 全长基因组克隆

根据测序获得的部分 DNA-A 序列,设计特异引物 AYVCNV-F: 5'-GACCCGCCGATATAGT-CAT-3'和 AYVCNV-R: 5'-CGCTTCGACATAAT-TGCGA-3'扩增 DNA-A 全长。PCR 反应体系:2×PCR 反应缓冲液(含  $Mg^{2+}$ )25  $\mu$ L、2  $\mu$ mol/L dNTPs 10  $\mu$ L、20  $\mu$ mol/L 上、下游引物各 1  $\mu$ L、KOD FX DNA 聚合酶(1 U/ $\mu$ L,日本东洋纺)1  $\mu$ L、250 ng 植物总 DNA,加双蒸水定容至 50  $\mu$ L。扩增条件:98℃ 预变性 2 min;98℃ 变性 45 s,46℃ 退火 45 s,68℃ 延

伸 3 min, 30 个循环; 68℃ 延伸 10 min。按 1.2 中的方法进行克隆测序。

## 1.5 病毒 DNA-A 及其卫星基因组结构和进化重组分析

通过 DNASTAR Lasergene 7.1 软件完成核酸序列拼接, 运用 DNAMAN 5.22 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada) 和 EditSeq (DNASTAR Lasergene 7.1) 共同完成开放阅读框的寻找。序列相似性比对先通过 BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) 进行初步比对, 再选用 MegAlign 中的 Clustal W 方法 (DNASTAR Lasergene 7.1) 进行深入比对。进化树构建采用 MEGA 5 中的邻接法 (neighbor-joining) 完成, 步差值设置为 1 000<sup>[20]</sup>。重组分析通过 RDP 4.46 完成<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒检测

以 PA/PB 为引物从 YN4368 样品中扩增到约 500 bp 的目的条带; 以  $\beta 01/\beta 02$  和 UNA101/UNA102 为引物从 YN4368 样品中均扩增到约 1 300 bp 的目的条带。将获得的目的条带进行克隆测序, 最终获得 5 条序列 (YN4368-32、YN4368-34、YN4368-28 $\beta$ 、YN4368-32 $\beta$  和 YN4368-69 $\alpha$ )。经 BLAST 比对后结果显示: YN4368-32 与中国胜红蓟黄脉病毒 YN1995 (AYVCNV-YN1995, KU663132) 的 CP 基因序列相似性高达 98%, 而 YN4368-34 与一点红黄脉病毒越南分离物 *Emilia yellow vein virus isolate Vietnam* (EmYVV-Vietnam, KC878472) 相似性高达 97%; YN4368-28 $\beta$  和 YN4368-32 $\beta$  与赛葵黄脉  $\beta$  卫星 Y249 分离物 (MaYVB-Y249, AJ971703) 相似性高达 97%; YN4368-69 $\beta$  与中国番茄黄化曲叶  $\alpha$  卫星 Y244 分离物 (TYLCCNA-Y244, AJ888449) 相似性高达 86.3%。以上结果表明, 在苜蓿菜病株 YN4368 中存在菜豆金色花叶病毒属病毒以及  $\beta$  和  $\alpha$  卫星复合侵染。

### 2.2 病毒 DNA-A 全基因组结构及相似性比较

利用全长引物 AYVCNV-F/R, 以 YN4368 样品总 DNA 为模板未扩增到相应条带。改用 RCA 产物为模板, 扩增到大小约为 2 800 bp 的条带。将目的条带进行克隆、测序后共获得 2 条 DNA-A 全长序列 (YN4368-84 和 YN4368-88)。两条 DNA-A 都具有旧世界单组分菜豆花叶病毒属病毒典型的

基因组结构特征, 编码 7 个开放阅读框 (ORF)。YN4368-84 (GenBank 登录号: KX759646) 全基因组包含 2 744 个核苷酸 (nucleotides, nt), 其病毒链编码 AV1 (293~1 066 nt) 和 AV2 (133~483 nt), 其互补链编码 AC1 (1 515~2 603 nt)、AC2 (1 208~1 615 nt)、AC3 (1 063~1 467 nt)、AC4 (2 153~2 575 nt)、AC5 (271~543 nt), 在 AC1 和 AV2 间含有一个 273 nt 的基因间隔区 (intergenic region, IR)。YN4368-88 (GenBank 登录号: KX759647) 全基因组包含 2 752 nt, 其病毒链编码 AV1 (294~1 067 nt) 和 AV2 (134~484 nt), 互补链编码 AC1 (1 516~2 604 nt)、AC2 (1 209~1 616 nt)、AC3 (1 064~1 468 nt)、AC4 (2 190~2 447 nt)、AC5 (272~544 nt), 在 AC1 和 AV2 间含有一个 281 nt 的 IR。

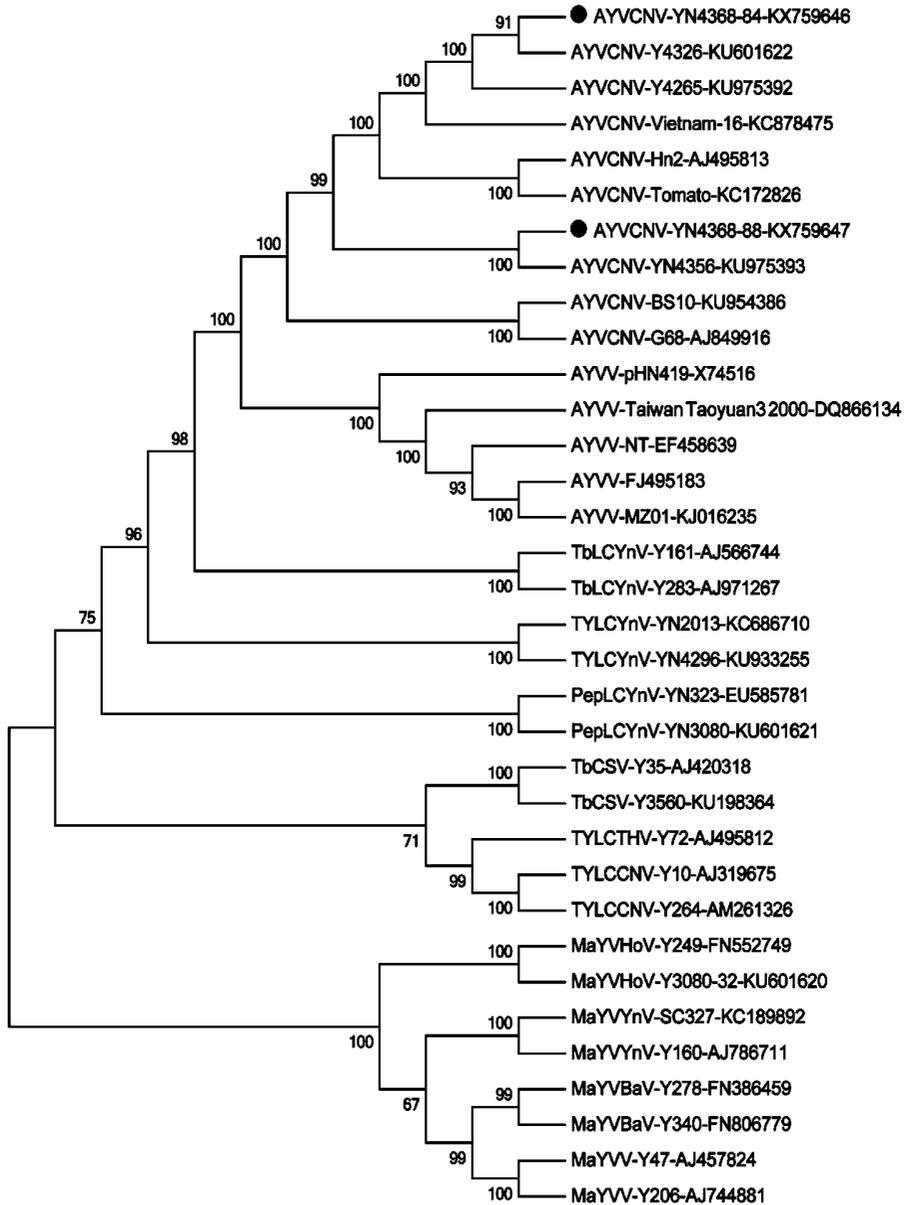
将序列 YN4368-84 与 YN4368-88 进行比对发现, 两条序列相似性为 90.8%。将这两条序列与 GenBank 中的其他病毒序列进行比对, 发现序列 YN4368-84 与当地发现的中国胜红蓟黄脉病毒分离物 Y4326 (AYVCNV-Y4326, KU601622) 和分离物 YN4265 (AYVCNV-YN4265, KU975392) 相似性最高, 为 99%; 序列 YN4368-88 与中国胜红蓟黄脉病毒分离物 YN4356 (AYVCNV-YN4356, KU975393) 相似性最高, 为 96%。根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 确定的菜豆金色花叶病毒属病毒种的分类标准, DNA-A 的核苷酸相似性小于 89% 则认为是病毒新种, 大于 89% 则确定为同种不同分离物<sup>[3]</sup>。另外, 根据 Fauquet 等对同种不同成员间的分类标准, 同种成员间的核苷酸相似性小于 93% 则表示这些成员属于不同的株系<sup>[22]</sup>。因此, YN4368-84 DNA-A 和 YN4368-88 DNA-A 都属于中国胜红蓟黄脉病毒, 但二者属于不同的株系, 分别为中国胜红蓟黄脉病毒分离物 YN4368-84 (AYVCNV-YN4368-84) 和中国胜红蓟黄脉病毒分离物 YN4368-88 (AYVCNV-YN4368-88)。以上结果表明, 苜蓿菜病株 YN4368 中存在中国胜红蓟黄脉病毒两种株系的共同侵染。

### 2.3 病毒 DNA-A 的进化和重组分析

将分离物 AYVCNV-YN4368-84 和 AYVCNV-YN4368-88 与其他菜豆金色花叶病毒属病毒构建进化树。结果显示, AYVCNV-YN4368-84 与 AYVCNV-Y4326 聚于一个小分支, 和其余 AYVC-

NV 等又共同聚于一个分支; AYVCNV-YN4368 - 88 与 AYVCNV-YN4356 独自在一个小的分支, 和其余 AYVCNV 等又共同聚于一个分支(图 1)。该结果表明 AYVCNV-YN4368 - 84 和 AYVCNV-Y4326 亲缘关系最近; AYVCNV-YN4368 - 88 与 AYVCNV-YN4356 亲缘关系最近; 虽然 AYVCNV-

YN4368 - 84 和 AYVCNV-YN4368 - 88 分离自同一寄主、属于同一种病毒, 但两者在遗传进化中存在一定的距离。RDP 重组分析显示, 分离物 AYVCNV-YN4368 - 84 和 AYVCNV-YN4368 - 88 中并无明显的重组事件发生。



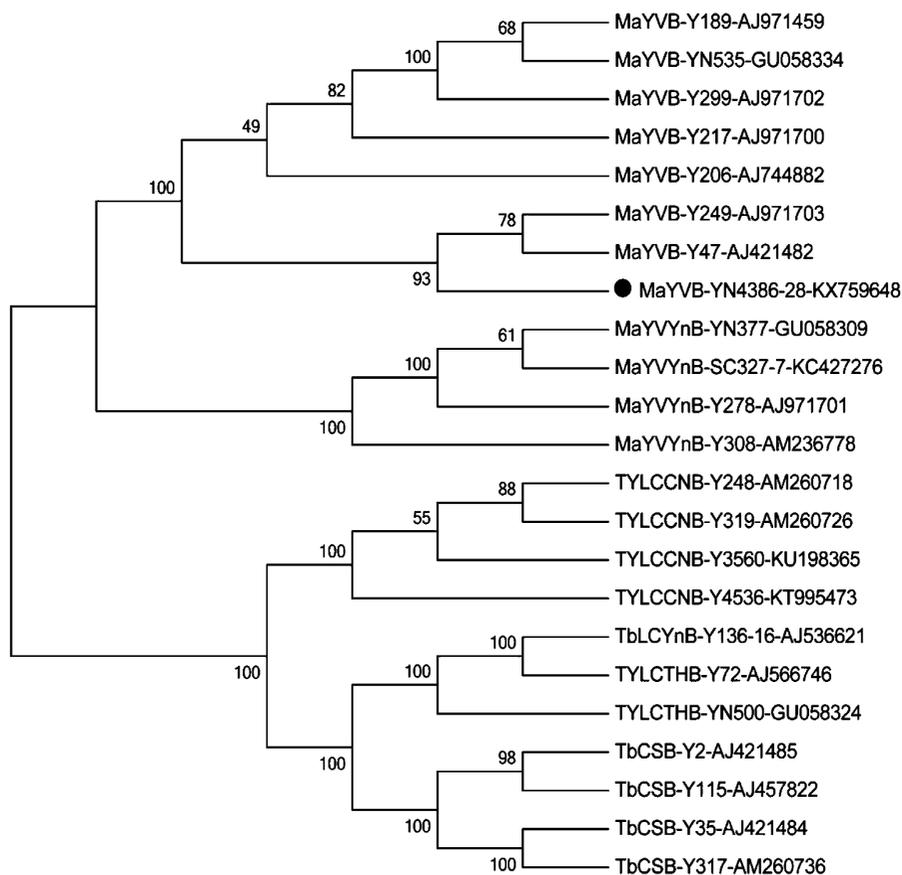
AYVCNV: 中国胜红蓟黄脉病毒; AYVV: 胜红蓟黄脉病毒; TbLCYnV: 云南烟草曲叶病毒; PepLCYnV: 云南辣椒曲叶病毒; TbCSV: 烟草曲茎病毒; TYLCTHV: 泰国番茄黄化曲叶病毒; TYLCCNV: 中国番茄黄化曲叶病毒; MaYVHoV: 红河赛葵黄脉病毒; MaYVnV: 云南赛葵黄脉病毒; MaYVBaV: 保山赛葵黄脉病毒; MaYVV: 赛葵黄脉病毒  
 AYVCNV: *Ageratum yellow vein China virus*; AYVV: *Ageratum yellow vein virus*; TbLCYnV: *Tobacco leaf curl Yunnan virus*; PepLCYnV: *Pepper leaf curl Yunnan virus*; TbCSV: *Tobacco curly shoot virus*; TYLCTHV: *Tomato yellow leaf curl Thailand virus*; TYLCCNV: *Tomato yellow leaf curl China virus*; MaYVHoV: *Malvastrum yellow vein Honghe virus*; MaYVnV: *Malvastrum yellow vein Yunnan virus*; MaYVBaV: *Malvastrum yellow vein Baoshan virus*; MaYVV: *Malvastrum yellow vein virus*

图 1 AYVCNV-YN4368 - 84 和 AYVCNV-YN4368 - 88 与报道的其他菜豆金色花叶病毒属病毒基于 DNA-A 的系统进化树  
 Fig. 1 Phylogenetic dendrogram based upon DNA-A nucleotide sequence alignment of AYVCNV-YN4368 - 84 and AYVCNV-YN4368 - 88 with other selected begomoviruses from GenBank

## 2.4 病毒伴随的 $\beta$ 卫星分子结构及其相似性比较

序列 YN4368-28 $\beta$ (KX759648) 和 YN4368-32 $\beta$  全长都为 1 359 nt, 序列同源率为 99.9%, 仅有 2 个核苷酸的差异, 因此选择 YN4368-28 $\beta$  进行基因注释和分析。YN4368-28 $\beta$  互补链上编码一个 C1 基因(196~585 nt), 在 1 275~1 359 nt 和 1~14 nt 区域有 1 个包含着茎环结构在内的卫星保守区域(satellite conserved region, SCR), 在 766~970 nt 区域内有一个富含 A 的区域(A 含量为 60.49%)。将 YN4368-28 $\beta$  序列与 GenBank 中的其他  $\beta$  序列进行比对发现, 该序列与 MaYVB-Y249(AJ971703) 相似性最高, 为 97%, 与 MaYVB 其他分离物相似性为 95%~96%, 与其他  $\beta$  卫星序列相似性  $\leq$  83%。

根据 ICTV  $\beta$  卫星分类标准, 全序列核苷酸同源性小于 78% 则认为是新的  $\beta$  卫星, 大于则确定该分离物属于同一种  $\beta$  卫星<sup>[3]</sup>, 因此 YN4368-28 $\beta$  卫星属于 MaYVB 的一个分离物, 即赛葵黄脉  $\beta$  卫星分离物 YN4368-28(MaYVB-YN4368-28)。将 MaYVB-YN4368-28 与分布在云南的其他  $\beta$  卫星构建进化树, 结果显示 MaYVB-YN4368-28 与 MaYVB-Y47 和 MaYVB-Y249 聚于一个小分支, 又与其他 MaYVB 共同聚于一个分支(图 2)。该进化分析结果表明, MaYVB-YN4368-28 与 MaYVB-Y47 和 MaYVB-Y249 亲缘关系较近。RDP 重组分析结果显示, MaYVB-YN4368-28 卫星序列中无明显的重组现象。



MaYVB: 赛葵黄脉病毒  $\beta$  卫星; MaYVYnB: 云南赛葵黄脉病毒  $\beta$  卫星; TYLCCNB: 中国番茄黄化曲叶病毒  $\beta$  卫星; TbLCYnB: 云南烟草曲叶病毒  $\beta$  卫星; TYLCTHB: 泰国番茄黄化曲叶病毒  $\beta$  卫星; TbCSB: 烟草曲茎病毒  $\beta$  卫星

MaYVB: Malvastrum yellow vein betasatellite; MaYVYnB: Malvastrum yellow vein Yunnan betasatellite; TYLCCNB: Tomato yellow leaf curl China betasatellite; TbLCYnB: Tobacco leaf curl Yunnan betasatellite; TYLCTHB: Tomato yellow leaf curl Thailand betasatellite; TbCSB: Tobacco curly shoot betasatellite

图 2 基于 MaYVB-YN4368-28 与云南报道的其他  $\beta$  卫星分子构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic dendrogram based upon alignment of MaYVB-YN4368-28 with other betasatellites identified in Yunnan Province

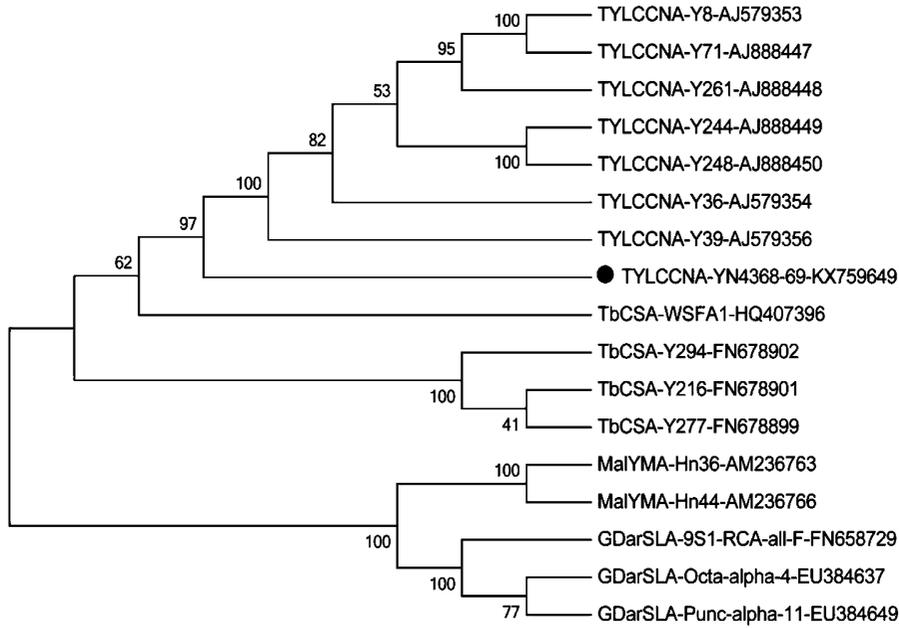
## 2.5 病毒伴随的 $\alpha$ 卫星分子结构及其相似性比较

序列 YN4368-69 $\alpha$ (KX759649) 全长为 1 359

nt, 病毒链上编码一个 Rep 基因(79~1 026 nt), 具有一个包含 TAGTATTAC 序列的茎环结构, 在

1 025~1 214 nt 区域内有一个富含 A 的区域(A 含量为 48.95%)。将 YN4368-69 $\alpha$  与 GenBank 中的其他  $\alpha$  序列进行比对发现,该序列与 TYLCCNA-Y244 相似性最高,为 86.3%,与其他  $\alpha$  卫星序列相似性 $\leq 85\%$ 。根据 ICTV  $\alpha$  卫星分类标准,全序列核苷酸同源性小于 83%则认为新的  $\alpha$  卫星,大于则确定该分离物属于同一种  $\alpha$  卫星<sup>[3]</sup>,因此 YN4368-69  $\alpha$  卫星属于 TYLCCNA(TYLCCNA-YN4368-69)。将 TYLCCNA-YN4368-69 与 GenBank 中其他  $\alpha$  卫星构建进化树,结果显示 TYLCCNA-YN4368-

69 独自成一支,与其他 TYLCCNA 共同聚于一个分支(图 3)。该结果表明,TYLCCNA-YN4368-69 与 TYLCCNA 的其他分离物亲缘关系相对较近,但又存在一定的距离。RDP 重组分析结果显示,TYLCCNA-YN4368-69 是由 TYLCCNA-Y261 和 TbCSA-Y216 重组而来,TYLCCNA-Y261 是主要的母本,而 TbCSA-Y216 则是次要的母本(RDP,  $P=3.539 \times 10^{-0.4}$ ; SiScan,  $1.107 \times 10^{-0.6}$ )。重组主要发生在 TYLCCNA-YN4368-69 的 306~958 nt 区段(Rep),该区段来自 TbCSA-Y216。



TYLCCNA: 中国番茄黄化曲叶 $\alpha$ 卫星; TbCSA: 烟草曲茎 $\alpha$ 卫星; MalYMA: 赛葵黄花叶 $\alpha$ 卫星; GDarSLA: 达尔文氏棉无症 $\alpha$ 卫星  
 TYLCCNA: Tomato yellow leaf curl China alphasatellite; TbCSA: Tobacco curly shoot alphasatellite; MalYMA: Malvastrum yellow mosaic alphasatellite; GDarSLA: Gossypium darwinii symptomless alphasatellite

图 3 基于 TYLCCNA-YN4368-69 与云南报道的其他  $\alpha$  卫星分子构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic dendrogram based upon alignment of TYLCCNA-YN4368-69 with other alphasatellites identified in Yunnan Province

### 3 结论与讨论

本研究从表现黄脉症状的苜蓿菜中分离到中国胜红蓟黄脉病毒,利用分子克隆手段和生物信息学技术对该病毒进行分析,结果表明,该病毒与赛葵黄脉  $\beta$  卫星和中国番茄黄化曲叶  $\alpha$  卫星相伴随,这是菜豆金色花叶病毒属病毒复合体侵染中国苜蓿菜的首次报道。

杂草是菜豆金色花叶病毒属病毒及其传播介体烟粉虱的重要中间寄主,能同时被多种该属病毒及其卫星复合侵染。本研究从 1 株苜蓿菜中分离到了两种株系的中国胜红蓟黄脉病毒、一种  $\beta$  卫星以及

一种  $\alpha$  卫星,表明苜蓿菜是菜豆金色花叶病毒属病毒的寄主之一,能被该属病害复合体侵染。已有研究表明,杂草如同收纳菜豆金色花叶病毒属病毒的容器,通常一株杂草中能同时被多种病毒及其卫星复合侵染<sup>[14, 23-24]</sup>。菜豆金色花叶病毒属病毒复合体侵染增加了重组和组分互换发生的频率,导致产生新分离物和新病毒<sup>[25-27]</sup>。因此需进一步对红河州河口县杂草开展系统调查和检测,加强对 AYVCNV/MaYVB/TYLCCNA 病害复合体发生率及病害严重度的调查研究,以防该类型的复合体造成病害的暴发流行。

AYVCNV 在海南省海口和广西胜红蓟中最先

发现<sup>[9-10]</sup>, 2012 年在越南胜红蓟中也发现该病毒 (AYVCNV-Vietnam 16, KC878475)。云南河口处于元江-红河流域向越南的出境处, 是云南海拔最低的区域。本研究中发现来自云南红河的分离物 AYVCNV-YN4368-84、AYVCNV-Y4326、AYVCNV-YN4265 与 AYVCNV-Vietnam 16 亲缘关系最近。该结果表明, 云南河口地区的 AYVCNV-YN4368-84 这一株系是 AYVCNV-Vietnam 16 的一个新的变种, 且该株系很有可能是 AYVCNV-Vietnam 16 株系跨境传播传入该地。

假重组是导致菜豆花叶病毒属病毒遗传变异的一个重要原因之一, DNA-A 和卫星之间的交换也称为假重组。已有研究表明, AYVCNV 与 AYVCNB 形成 AYVCNV/AYVCNB 病害复合体或与 AYVCNA 形成 AYVCNV/AYVCNA 复合体<sup>[9-10, 28]</sup>。本研究从黄脉症状的苜蓿菜中分离到了 AYVCNV/MaYVB/TYLCCNA 病害复合体, 这表明 AYVCNV 在自然条件下也能与其他异源  $\beta$  卫星和  $\alpha$  卫星相伴随, 并且该复合体的形成很有可能是通过假重组实现的。MaYVB 最早于 2008 年从具有黄脉症状的赛葵上分离到, 与 MaYVV 相伴随, 参与植株典型症状反应, 并能增加 MaYVV 在本氏烟中的积累<sup>[29]</sup>。本研究中, MaYVB 是否是症状所必需, 以及能否加强 AYVCNV 在苜蓿菜中的积累还需进一步的研究。

## 参考文献

- [1] Harrison B D, Barker H, Book K R, et al. Plant viruses with circular single-stranded DNA [J]. *Nature*, 1977, 270(5639): 760 - 762.
- [2] Varma A, Malathi V G. Emerging geminivirus problems; a serious threat to crop production [J]. *Annals of Applied Biology*, 2003, 142(2): 145 - 164.
- [3] Brown J K, Fauquet C M, Briddon R W, et al. Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012: 351 - 373.
- [4] Nawaz-ul-Rehman M S, Fauquet C M. Evolution of geminiviruses and their satellite [J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(12): 1825 - 1832.
- [5] Xie Yan, Wu Peijun, Liu Pei, et al. Characterization of alpha satellites associated with monopartite begomovirus / beta satellite complexes in Yunnan, China [J]. *Virology Journal*, 2010, 7: 178.
- [6] Briddon R W, Stanley J. Subviral agents associated with plant single stranded DNA viruses [J]. *Virology* 2006, 344(1): 198 - 210.
- [7] Zhou Xueping. Advances in understanding begomovirus satellites [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2013, 51: 357 - 381.
- [8] Saunders K, Bedford I D, Stanley J. Adaptation from whitefly to leafhopper transmission of an autonomously replicating nanovirus-like DNA component associated with ageratum yellow vein disease [J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83(4): 907 - 913.
- [9] Xiong Qing, Fan Sanwei, Wu Jianxiang, et al. Ageratum yellow vein China virus is a distinct begomovirus species associated with a DNA  $\beta$  molecule [J]. *Phytopathology*, 2007, 97(4): 405 - 411.
- [10] Jiao Xiaoyang, Gong Huanran, Liu Xuejian, et al. Etiology of Ageratum yellow vein diseases in South China [J]. *Plant Disease*, 2013, 97(11): 1497 - 1503.
- [11] 石铸. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 60 - 69.
- [12] 邵成雷. 苜蓿菜的营养及药理作用 [J]. *食品与药品*, 2005, 7(6): 63 - 65.
- [13] 李宁, 李锐, 杨世林. 过山蕨中有机酸类化学成分 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(7): 427.
- [14] Mubin M, Shahid M S, Tahir M N, et al. Characterization of begomovirus components from a weed suggests that begomoviruses may associate with multiple distinct DNA satellites [J]. *Virus Genes*, 2010, 40(3): 452 - 457.
- [15] 徐幼平. 广西双生病毒的分子鉴定 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [16] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemistry Bulletin*, 1987, 19: 11 - 15.
- [17] Xie Yan, Zhou Xueping, Zhang Zhongkai, et al. *Tobacco curly shoot virus* isolated in Yunnan is distinct species of *Begomovirus* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(3): 197 - 200.
- [18] Briddon R W, Bull S E, Mansoor S, et al. Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA beta-a molecule associated with some monopartite begomoviruses [J]. *Molecular Biotechnology*, 2002, 20(3): 315 - 318.
- [19] Bull S E, Briddon R W, Markham P G. Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA 1: a satellite-like molecule associated with begomovirus-DNA  $\beta$  complexes [J]. *Molecular Biotechnology*, 2003, 23: 83 - 86.
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731 - 2739.
- [21] Martin D P, Lemey P, Lott M, et al. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2462 - 2463.
- [22] Fauquet C M, Briddon R W, Brown J K, et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature [J]. *Archives of Virology*, 2008, 153(4): 783 - 821.

量效应,乙酸乙酯萃取物活性最强。以上结果表明,‘K326’中抗 TMV 化学防御物质可能存在于根部甲醇提取物的乙酸乙酯萃取物中,在今后的研究中我们将对根部甲醇提取物的乙酸乙酯萃取物进行跟踪提取分离鉴定,对其抗 TMV 化学防御物质进一步研究发掘。

## 参考文献

- [1] 耿召良,商胜华,陈兴江,等. 植物源抗烟草花叶病毒天然产物研究进展[J]. 中国烟草科学,2011,32(1):84-91.
- [2] 吴艳兵,颜振敏,谢荔岩,等. 天然抗烟草花叶病毒大分子物质研究进展[J]. 微生物学通报,2008,35(7):1096-1101.
- [3] 夏纬跃. 吉林省烟草重要病害防治关键技术研究[D]. 长春:吉林农业大学,2014.
- [4] 许良忠,郭玉晶,张书圣. 植物病毒病化学防治研究进展[J]. 青岛化工学院学报,2000,21(4):293-297.
- [5] 吴艳兵,谢荔岩,谢联辉,等. 毛头鬼伞多糖 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白的影响[J]. 植物资源与环境学报,2008,17(3):63-66.
- [6] 祝雯,林志铿,吴祖建,等. 河蚬中活性蛋白 CfP-a 的分离纯化及其活性[J]. 中国水产科学,2004,11(4):349-353.
- [7] 耿召良,商胜华,陈兴江,等. 植物源抗烟草花叶病毒天然产物研究进展[J]. 中国烟草科学,2011,32(1):84-91.
- [8] 郭亮,蔡海林,何命军,等. 植物源活性天然提取物抗烟草花叶病毒的研究进展[J]. 湖南农业科学,2012(23):77-79,83.
- [9] 陈丕庭,马树杰,殷培军,等. 植物源抗病毒剂 VFB-1 防治烟草花叶病毒病研究[J]. 中国烟草学报,2015,21(3):93-99.
- [10] 王人元. PEG-一蔗糖正反浓度梯度离心法提纯植物病毒的研究[J]. 东北农业大学学报,1990,21(3):298-302.
- [11] 徐晓庆,张秀丽,郭勃予,等. 15 种中草药抗烟草花叶病毒活性的研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(6):1691-1693.
- [12] 田兆丰,刘伟成,刘霆,等. 小链霉菌 Yn168 发酵产物抗植物病毒活性的研究[J]. 中国生物防治学报,2011,27(4):569-572.
- [13] 操海群,岳永德,彭镇华,等. 竹提取物的抗真菌作用[J]. 植物保护学报,2003,30(1):35-39.
- [14] 谢鑫,桑维钧,张新强,等. 6 种病毒抑制剂对烟草花叶病毒的抑制作用及其机制初探[J]. 河南农业科学,2011,40(5):104-107.
- [15] 李在国,黄润秋. 植物病毒防治剂的作用机制[J]. 植物保护,1999,25(3):37-39.
- [16] 陈齐斌,李重九,滕晓红,等. 24 种中草药提取物抗病毒活性筛选[J]. 云南农业大学学报,2012,27(1):19-22.
- [17] Velioglu Y S, Mazza G, Gao L, et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46 (10):4113-4117.
- [18] Zheng W, Wang S Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49 (11): 5165-5170.
- [19] Owen R W, Giacosa A, Hull W E. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil [J]. European Journal of Cancer, 2000, 36 (10): 1235-1247.
- [20] Sala A, Redo M D, Giner R M, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum* [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2002,54 (3): 365-371.
- [21] 高锦明,张鞅灵,张康健,等. 绿原酸分布、提取与生物活性研究综述[J]. 西北林学院学报,1999,14(2):73-82.
- [22] 周恒,许自成,赵会纳,等. 烟草多酚类物质的研究进展[J]. 浙江农业科学,2009(5):949-953.
- (责任编辑:田喆)
- 
- (上接 73 页)
- [23] 刘培. 云南赛葵上双生病毒的分子鉴定[D]. 杭州:浙江大学,2008.
- [24] 李静. 我国六种双生病毒的分子鉴定及两种病毒的致病性研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.
- [25] Garcia-Andres S, Tomas D M, Sanchez-Campos S, et al. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses [J]. Virology, 2007, 365(1): 210-219.
- [26] Albuquerque L C, Varsani A, Fernandes F R, et al. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil [J]. Archives of Virology, 2012, 157(4): 747-752.
- [27] Rocha C S, Castillo-Urquiza G P, Lima A T M, et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location [J]. Journal of Virology, 2013, 87(10): 5784-5799.
- [28] She Xiaoman, He Zifu, Yin Guohua, et al. A New alpha satellite molecule associated with Ageratum yellow vein China virus in the Philippines [J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163 (1): 54-57.
- [29] Guo Wei, Jiang Tong, Zhang Xian, et al. Molecular variation of satellite DNA  $\beta$  molecules associated with *Malvastrum yellow vein virus* and their role in pathogenicity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(6): 1909-1913.
- (责任编辑:田喆)