植物保护学报 Journal of Plant Protection，2020，47(2)：355-364 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2019119

复合侵染水茄的两种菜豆金色花叶病毒属病毒基因组结构特征分析

赵丽玲 钟 静 施章吉 李婷婷 丁 铭* 张仲凯*

（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，
农业农村部西南农业基因资源与种质创制重点实验室，昆明 650223）

摘要：为明确水茄 *Solanum torvum* 植株叶片皱缩、褪绿是否由菜豆金色花叶病毒属病毒侵染引起，从云南省西双版纳傣族自治州田间采集具有疑似感染症状的水茄植株叶片样品，应用菜豆金色花叶病毒属病毒简并引物和特异性引物进行PCR扩增、克隆和测序，通过生物信息软件分析比较其核苷酸序列特征，并对其进行系统发育分析。结果显示，从采集的疑似病叶中共克隆获得了5条菜豆金色花叶病毒属病毒DNA-A全序列和3条DNA-B全序列，经全序列分析发现，侵染水茄的2种菜豆金色花叶病毒属病毒分离物分别属于中国南瓜曲叶病毒（squash leaf curl China virus，SLCCNV）和野苘蒿黄脉病毒（Crassocephalum yellow vein virus，CraYVV）。SLCCNV水茄分离物的基因组具有典型的菜豆金色花叶病毒属病毒双组分结构特征，与来自泰国的SLCCNV分离物（AB330078）亲缘关系最近，相似性最高达到99.0%；CraYVV水茄分离物的基因组具有典型的菜豆金色花叶病毒属病毒单组分结构特征，与来自云南省景洪市的CraYVV分离物（EF165536）亲缘关系最近，相似性最高达到97.6%。表明水茄是这2种菜豆金色花叶病毒属病毒的新寄主，并首次发现双组分和单组分菜豆金色花叶病毒属病毒可复合侵染水茄。

关键词：中国南瓜曲叶病毒；野苘蒿黄脉病毒；复合侵染；水茄；基因组结构

Characterization of the genome organization of two begomoviruses mixedly infecting wild eggplant *Solanum torvum*

ZHAO Liling ZHONG Jing SHI Zhangji LI Tingting DING Ming* ZHANG Zhongkai*

（Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Yunnan Province; Key Laboratory of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, Yunnan Province, China）

Abstract: In order to determine whether the crumpling and mosaic symptoms of wild eggplant *Solanum torvum* were caused by begomoviruses infection, leaf samples of *S. torvum* plants with suspected symptoms were collected from the fields in Xishuangbanna, Yunnan. PCR amplification of these samples was conducted using degenerate and virus-specific primer pairs of begomoviruses. Five complete DNA-A and three DNA-B genome sequences were obtained by cloning and characterized by genome organization and phylogenetic analyses. Sequence comparison revealed that these isolates identified from *S. torvum* consisted of squash leaf curl China virus (SLCCNV) and Crassocephalum yellow vein virus (CraYVV). These SLCCNV isolates from *S. torvum* had a genome organization typical of bipartite begomoviruses and were most closely related to the SLCCNV isolate (AB330078) identified from Thailand (with

基金项目：国家自然科学基金（31560501），国家重点研发计划（2017YFD0201604）

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：mingd73@163.com，zhongkai99@sina.com

收稿日期：2019-06-19

the highest sequence identity of 99.0%). These CraYVV isolates from *S. torvum* had a genome organization typical of monopartite begomoviruses and were most closely related to CraYVV-Jinghong (EF165536) (with the highest sequence identity of 97.6%). This study is the first report of *S. torvum* plants as new hosts of begomoviruses, with bipartite and monopartite begomoviruses simultaneously infecting *S. torvum* plants.

Key words: squash leaf curl China virus; Crassocephalum yellow vein virus; mixed infection; *Solanum torvum*; genome organization

双生病毒科 *Geminiviridae* 是由一类具有双联体孪生颗粒形态的植物病毒所构成。根据国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses,ICTV)最新分类报告,将其分为9个属:菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus*、玉米线条病毒属 *Mastrevirus*、甜菜曲顶病毒属 *Curtovirus*、番茄伪曲顶病毒属 *Topocuvirus*、伊朗甜菜曲顶病毒属 *Becurtovirus*、芜菁曲顶病毒属 *Turncurtovirus*、弯叶画眉草条纹病毒属 *Eragrovirus*、葡萄红斑病毒属 *Grablovirus* 和大戟小刺潜伏病毒属 *Capulavirus*(Zerbini et al.,2017)。其中菜豆金色花叶病毒属病毒包括的成员最多、分布最广、危害最重,分布在新世界(美洲)的该属病毒,其基因组结构包含DNA-A和DNA-B两种组分,即双组分病毒成员;分布在旧世界(亚洲、非洲、欧洲、澳大利亚和地中海)的该属病毒,基因组通常为类似于DNA-A的单组分,且常与卫星分子相伴随,即单组分病毒成员(Nawaz-ul-Rehman & Fauquet,2009)。近年来,菜豆金色花叶病毒属病毒对国内外经济作物都有着不同程度的危害,Koeda et al.(2016)在印度尼西亚班达其亚的病害调查发现,5个农场里有81%~100%的辣椒都表现出被该属病毒侵染的典型症状,即黄化和叶片卷曲,经分子检测发现这种病害主要由印度尼西亚辣椒黄曲叶病毒(pepper yellow leaf curl Indonesia virus,PepYLCIV)、北碧番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus,TYLCKaV)和胜红蓟黄脉病毒(Ageratum yellow vein virus,AYVV)以不同组合复合侵染引起,病害对印度尼西亚的辣椒产业造成严重危害。而在中国滇南烟区的部分烤烟上菜豆金色花叶病毒属病毒导致的病毒病发病率达15%~30%,重者达100%,导致烟草产量严重下降(董家红等,2007)。

菜豆金色花叶病毒属病毒在中国分布广泛,可侵染番木瓜(张鲁斌等,2005)、赛葵(阮涛等,2011)、烟草(Yang et al.,2013)及番茄(赵丽玲等,2016)等作物及杂草并造成严重危害。根据ICTV第九次分类报告,目前在中国共发现51种菜豆金色花叶病毒属病毒,其中双组分病毒仅有4种,其余均为单组分病毒(King et al.,2012)。这4种双组分病毒分别是野葛花叶病毒(kudzu mosaic virus,KuMV)、中国南瓜曲叶病毒(squash leaf curl China virus,SLCCNV)、新竹番茄曲叶病毒(tomato leaf curl Hsinchu virus,ToLCHsV)以及中国大青金色花叶病毒(Clerodendron golden mosaic China virus,ClGMCNV)。其中SLCCNV于2002年首次发现,目前在广西壮族自治区和海南省都有发生,可侵染南瓜和香瓜(GenBank数据库)。而单组分病毒野茼蒿黄脉病毒(Crassocephalum yellow vein virus,CraYVV)最早于2008年在中国野茼蒿上被发现(Dong et al.,2008),目前主要分布在云南省。多种杂草是菜豆金色花叶病毒属病毒的中间寄主,在病害侵染循环中具有重要作用(Mubin et al.,2012;Pramesh et al.,2013),加强对杂草中该属病毒的监测对病毒病防控具有重要意义。

水茄是多年生茄科杂草,广泛分布于我国云南、广东、广西和台湾等省区(匡可任和路安民,1978)。目前国内外已有许多有关菜豆金色花叶病毒属病毒侵染茄科植物的报道(田鹏等,2013;Kenyon et. al.,2014;Chiemsombat et al.,2018),但尚未发现该属病毒可以侵染水茄。本课题组前期在调查云南省西双版纳傣族自治州勐腊县双生病毒病时发现,水茄植株有叶片皱缩、褪绿症状,疑似由菜豆金色花叶病毒属病毒侵染引起,本研究拟应用该属病毒DNA-A、DNA-B简并引物进行PCR检测,并设计特异性引物进行全基因组PCR扩增、克隆和测序,通过生物信息软件分析其核苷酸序列特征、系统进化及重组特征,明确水茄是否属于菜豆金色花叶病毒属病毒的中间寄主,以期为该病毒病的防控研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样:2017年2月在云南省西双版纳傣族自治州勐腊县采集了3株具有皱缩、褪绿等疑似菜豆金色花叶病毒属病毒侵染症状的水茄病株叶片(图1),分别将样品编号为YN5945、YN5946、

YN5947。所有叶片样品均采自植株嫩叶部分，并在当天于4℃冰箱保存备用。

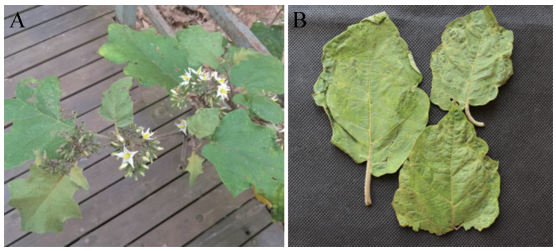

图1　2017年在云南省西双版纳田间表现皱缩及褪绿症状的水茄植株（A）和叶片（B）

Fig. 1　*Solanum torvum* plant（A）and leaves（B）showing crumpling and mosaic symptoms in the fields of Xishuangbanna，Yunnan Province in 2017

麦康凯（MacConkey agar，MAC）培养基：明胶胰酶水解物17 g、蛋白胨3 g、脱氧胆酸钠1.5 g、氯化钠5 g、乳糖10 g、结晶紫1 mg、中性红30 mg、琼脂13.5 g，蒸馏水定容至1 L。

试剂和仪器：*Taq* Plus DNA聚合酶，上海申能博彩生物科技有限公司；T4 DNA连接酶、快速DNA连接试剂盒，美国Thermo Scientific公司；大肠杆菌*Escherichia coli* DH5*α*感受态细胞、dNTP、DNA Ladder Maker，日本TaKaRa公司；KOD FX DNA聚合酶，日本东洋纺（上海）生物科技有限公司；Axy-Prep DNA凝胶回收试剂盒，美国Axygen公司；琼脂糖，德国Biofroxx公司；pGEM-Teasy载体，美国Promega公司；*p*EASY-Blunt Zero Cloning Kit、大肠杆菌*Trans*1-T1感受态细胞，北京全式金生物技术有限公司；环状DNA扩增试剂盒，美国GE Healthcare集团。1658001电泳槽，北京六一生物科技有限公司；iCycler PCR仪，美国Bio-Rad公司。

1.2　方法

1.2.1　水茄中菜豆金色花叶病毒属病毒PCR检测

利用CTAB法（Doyle & Doyle，1987）提取采集的水茄病叶总DNA。为了检测病叶中是否含有菜豆金色花叶病毒属病毒，分别利用该属病毒DNA-A简并引物PA（5′-TAATATTACGKGWKGVCCSC-3′）/PB（5′-TGGACYTTRCAWJJBCCGCACA-3′）（Xie et al.，2002）以及DNA-B简并引物PCRc1（5′-CATATTTACRARWATGCCA-3′）/PBL-1v2040（5′-CARTGRTCKATCTTCATACA-3′）（Rojas et al.，1993）对提取的DNA进行PCR检测。引物均由英潍捷基（广州）贸易有限公司合成。25 μL PCR反应体系：10×PCR反应缓冲液（含Mg^{2+}）2.5 μL、2.5 μmol/ L dNTPs 2 μL、20 μmol/L上下游引物各0.5 μL、5 U/μL *Taq* Plus DNA聚合酶0.5 μL、植物总DNA 125 ng，双蒸水定容至25 μL。扩增条件：94℃预变性2 min；94℃变性45 s，50℃/58℃退火45 s（PA/PB引物退火温度50℃，PCRc1/PBL1v2040引物退火温度58℃），72℃延伸45 s，35个循环；72℃再延伸10 min。应用1%琼脂糖电泳检测PCR扩增产物，并于紫外灯下割取目的片段。按照Axygen DNA凝胶回收试剂盒说明书将目的片段DNA回收纯化。利用快速DNA连接试剂盒将回收产物连接到pGEM-T Easy载体上，然后将连接产物转入大肠杆菌DH5*α*感受态细胞中，并将转化后的菌液涂布于麦康凯培养基上生长。最后挑选阳性克隆送英潍捷基（广州）贸易有限公司进行测序，并对测序所得序列进行BLAST比对分析。

1.2.2　菜豆金色花叶病毒属病毒基因组克隆及结构分析

为扩大样品中环状DNA成分含量，进一步获得高丰度的菜豆金色花叶病毒属病毒基因组，作为扩增全长序列的模板，按照环状DNA扩增试剂盒说明书对采集的水茄病叶DNA进行滚环扩增（rolling circle amplification，RCA）。首先于500 μL离心管中加入1 μL植物总DNA（约50 ng）、5 μL样品缓冲液，混匀后于95℃变性3 min，变性结束后将离心管立刻插入冰上放置10 min；然后再加入反应缓冲液5 μL、phi29 DNA聚合酶0.2 μL，轻弹混匀后于30℃反应18 h；最后于65℃加热10 min，终止反应。

根据1.2.1简并引物扩增克隆和测序结果，推测采集样品中的病毒分离物属于SLCCNV和CraYVV，应用GenBank数据库中SLCCNV的DNA-A和DNA-B全长序列设计特异性引物SLCCNV-DNA-A-F（5′-TACACGCCACTCTCTGCT-3′）/SLCCNV-DNA-A-R（5′-TATCTGGGAGGTTCCAAA-3′）和SLCCNV-DNA-B-F（5′-AACTCCATTCACTACGTTCGTG-3′）/SLCCNV-DNA-B-R（5′-TTCATTTCTGTAAGATGCTCGG-3′），分别用于扩增SLCCNV的DNA-A和DNA-B全长序列。同理设计特异性引物CraYVV-F（5′-GCTTTCCGCAGGTTGTAGTT-3′）/CraYVV-R（5′-AAGCGTTGGGGATACACAAG-3′）扩增CraYVV的DNA-A全长序列。50 μL PCR反应体系：2×

PCR反应缓冲液（含Mg^{2+}）25 μL、2 μmol/L dNTPs 10 μL、20 μmol/L上下游引物各1 μL、1 U/μL KOD FX DNA聚合酶1 μL、250 ng DNA（RCA产物），双蒸水定容至50 μL。扩增条件：98℃预变性2 min；98℃变性45 s，58℃退火45 s，68℃延伸3 min，30个循环；68℃再延伸10 min。利用1%琼脂糖电泳检测PCR扩增结果，并于紫外灯下割取目的片段。参照Axygen DNA凝胶回收试剂盒说明书将目的DNA片段回收纯化。利用*p*EASY-Blunt Zero Cloning Kit将回收产物DNA连接到*p*EASY-Blunt Zero载体上，然后将连接产物转入*Trans*1-T1感受态细胞中，并将转化后的菌液涂布于麦康凯培养基上生长，挑选阳性克隆送英潍捷基（广州）贸易有限公司进行测序。将测序所得序列采用DNASTAR Lasergene 7.1软件拼接获得全长序列，先采用BLAST（www.ncbi. nlm. nih. gov）进行比对，再利用SDT软件（Muhire et al.，2014）进行进一步的比较分析，根据SDT比较结果确定其分类地位。病毒种的划分标准依据ICTV对菜豆金色花叶病毒属病毒的分类标准，即DNA-A的核苷酸序列相似性大于91%则认为是同种病毒（Brown et al，2015）。所得全长序列开放阅读框的寻找通过DNAMAN 7和DNASTAR Lasergene 7.1软件完成。

1.2.3 水茄病毒分离物相似性比较

运用SDT软件对水茄病毒分离物基因组全序列与NCBI中的同种病毒分离物基因组全序列进行比对分析，根据结果确定其种以下的分类地位。划分标准根据ICTV对菜豆金色花叶病毒属病毒的分类标准，同种成员间的核苷酸相似性小于94%则表示这些成员属于不同株系，大于94%则属于同一株系（Brown et al，2015）。运用MegAlign中的Clustal W（DNASTAR Lasergene 7.1）对水茄中重要病毒分离物的各基因区段与NCBI其它相似性较高的同种或同属病毒对应区段进行深入比对分析。

1.2.4 水茄病毒分离物的系统进化分析

将水茄中获得的病毒分离物序列与来自GenBank中相似性较高以及相关的同属病毒相关序列，采用MEGA 6.0软件（Tamura et al.，2011），以最大似然法（maximum likelihood method）构建系统进化树，重复抽样次数设置为1 000次。

1.2.5 水茄病毒分离物的重组分析

将本研究中获得的水茄病毒分离物DNA-A序列与来自GenBank中相似性较高的分离物以及相关的同属病毒分离物进行重组分析。采用RDP 4.46软件（Martin et al.，2010）进行重组分析，分析方法包括RDP、GENECOV、Bootscan、MaxChi、Chimaera、SiScan和3Seq共7种。为了保证RDP分析结果的可靠性，每个方法所得*P*值需小于0.05且至少有3个方法都检测到重组事件才认为发生了重组。

2 结果与分析

2.1 水茄中菜豆金色花叶病毒属病毒PCR检测结果

以DNA-A简并引物PA/PB进行的PCR扩增结果显示，在水茄样品YN5946、YN5947中均扩增到约500 bp的目的片段，将YN5946样品中获得的目的条带进行克隆并随机选取4个克隆测序，测序所得序列经BLAST比对发现其中3条序列YN5946-1、YN5946-3、YN5946-8与CraYVV-Jinghong分离物（EF165536）的*cp*基因序列相似性高达97.1%~98.3%；1条序列YN5946-6与SLCCNV-Thailand分离物（AB330078）的*cp*基因序列相似性高达95.6%。以DNA-B简并引物PCRc1/PBL1v204进行的PCR扩增结果显示，在水茄样品YN5945、YN5946和YN5947中均未扩增到任何片段。表明菜豆金色花叶病毒属病毒能侵染水茄，且存在2种不同病毒复合侵染的现象。

2.2 水茄中复合感染病毒及其基因组结构分析

以水茄样品YN5946、YN5947的RCA产物为模板，利用SLCCNV-DNA-A-F/R全长引物扩增共获得2条全长序列YN5946-7和YN5947-9；利用SLCCNV-DNA-B-F/R全长引物扩增共获得3条全长序列YN5946-11、YN5946-14和YN5947-10；利用CraYVV-F/R全长引物扩增共获得3条全长序列YN5946-4、YN5946-5和YN5947-8。将这些全长序列与GenBank中其它菜豆金色花叶病毒属病毒相关序列进行SDT比对，发现序列YN5946-7、YN5947-9与SLCCNV-Thailand分离物（AB330078）的DNA-A序列相似性最高，达99.0%；序列YN5946-4、YN5946-5、YN5947-8与CraYVV-Jinghong分离物（EF165536）的DNA-A序列相似性最高，均为97.6%；序列YN5946-11、YN5946-14、YN5947-10与中国海南发现的SLCCNV DNA-B序列（MF062252）相似性最高，达91.0%。表明供试水茄病样中存在SLCCNV与CraYVV两种病毒复合侵染现象。

基因组结构分析结果显示，5条DNA-A全长序列YN5946-4、YN5946-5、YN5946-7、YN5947-8和YN5947-9都具有旧世界菜豆花叶病毒属病毒DNA-A典型的基因组结构特征，共编码7~8个开放阅读框，其中病毒链编码AV1/V1及AV2/V2，互补链编码AC1/C1、AC2/C2、AC3/C3、AC4/C4；

3 条 DNA-B 全长序列 YN5946-11、YN5946-14 和 YN5947-10 都具有菜豆花叶病毒属病毒 DNA-B 基因组结构特征，即病毒链编码 BV1，互补链编码 BC1（表1）。所有序列的基因间隔区或基因共同区都有双生病毒复制和转录必需的各种元件，包括 1 个含有 9 个核苷酸 TAATATT↓AC 的茎环结构、TATA Box 以及重复序列，其中 SLCCNV 的重复序列为 TGGGGT，CraYVV 的重复序列为 TGGTGTC。将本研究获得的序列 YN5946-4、YN5946-5、YN5946-8、YN5946-7、YN5946-9、YN5946-11、YN5946-14、YN5946-10 在 GenBank 上进行注释，获得对应的登录号分别为 MK595708、MK626650、MK626651、MK626654、MK626660、MK626662、MK626664、MK626666（表1）。

表1 水茄植株中分离到的菜豆金色花叶病毒属病毒基因组结构特征

Table 1 Characterization of genome organization of the begomoviruses isolated from diseased *Solanum torvum* plants

分离物 Isolate	所属病毒 Virus	登录号 Accession no.	核苷酸全序列 Full-length nucleotide sequence	所处位置（编码产物大小/aa） Position（coding capacity/aa）								
				AV1/V1	AV2/V2	AC1/C1	AC2/C2	AC3/C3	AC4/C4	AC5/C5	BV1	BC1
YN5946-4	CraYVV	MK595708	2 744	295–1 065（257）	135–491（119）	1 514–2 599（362）	1 207–1 611（135）	1 062–1 466（135）	2 149–2 442（98）	–	–	–
YN5946–5	CraYVV	MK626650	2 745	296–1 066（257）	136–492（119）	1 515–2 600（362）	1 208–1 612（135）	1 063–1 467（135）	2 150–2 443（98）	–	–	–
YN5947-8	CraYVV	MK626651	2 744	295–1 065（257）	135–491（119）	1 514–2 599（362）	1 207–1 611（135）	1 062–1 466（135）	2 149–2 442（98）	–	–	–
YN5946-7	SLCCNV	MK626654	2 737	280–1 050（257）	120–458（119）	1 499–2 584（362）	1 192–1 596（135）	1 047–1 457（137）	2 251–2 427（59）	310–828（173）	–	–
YN5947-9	SLCCNV	MK626660	2 719	405–1 031（209）	–	1 751–2 566（272）	1 173–1 577（135）	1 028–1 438（137）	2 233–2 409（59）	177–809（211）	–	–
YN5946-11	SLCCNV	MK626662	2 713	–	–	–	–	–	–	–	478–1 284（269）	1 338–2 183（282）
YN5946-14	SLCCNV	MK626664	2 713	–	–	–	–	–	–	–	478–1 284（269）	1 338–2 183（282）
YN5947-10	SLCCNV	MK626666	2 717	–	–	–	–	–	–	–	479–1 285（269）	1 339–2 184（282）

2.3 病毒 DNA-A 全基因组核苷酸序列相似性分析

运用 SDT 软件，将本研究获得的 SLCCNV 分离物 YN5946-7、YN5947-9 的 DNA-A 序列与 GenBank 中其它 SLCCNV 分离物的 DNA-A 序列进行相似性比对，结果显示本研究获得的 2 个分离物之间的相似性为 99.8%，与来自中国、越南、泰国的 SLCCNV 分离物的相似性在 94.4%~99.0% 之间，其中与泰国 SLCCNV-Thailand 分离物（AB330078）的相似性最高可达 99.0%，与来自印度、菲律宾的 SLCCNV 分离物的相似性在 93.0% 及以下，与来自马来西亚的 SLCCNV 分离物（EF197940）的相似性分别为 93.4% 和 93.7%，因此本研究分离到的 SLCCNV 分离物与来自中国、越南、泰国的 SLCCNV 分离物属同一株系。将本研究获得的 CraYVV 分离物 YN5946-4、YN5946-5 和 YN5947-8 的 DNA-A 序列与 GenBank 中其它 CraYVV 分离物的 DNA-A 序列进行相似性比对，发现本研究获得的 3 个分离物之间的相似性为 99.9%，与来自中国云南省景洪市的 CraYVV-Jinghong 分离物（EF165536）的相似性均为 97.6%，与 CraYVV-YYJi3 分离物（FN401520）的相似性均为 92.7%，因此本研究中分离到的 CraYVV 分离物与 CraYVV-Jinghong 分离物属同一株系。

因 SLCCNV 分离物 YN5946-7 与 YN5947-9 相似性较高，因此以分离物 YN5946-7 为代表进行基因组结构分析。应用 MegAlign 软件将 SLCCNV 分离物 YN5946-7 的 DNA-A 序列与 GenBank 中其它 SLCCNV 分离物的 DNA-A 序列进行深入比对，发现分离物 YN5946-7 与来自泰国的 SLCCNV-Thai-

land分离物(AB330078)在全基因组、非编码区及各基因编码区的相似性都最高,在98.3%~100.0%之间,与来自中国的其它双组分菜豆金色花叶病毒属病毒的相似性都较低,均小于71.0%(表2)。

表2 分离物YN5946-7与SLCCNV分离物及其它源自中国的同属病毒核苷酸及氨基酸序列相似性比较

Table 2 Nucleotide and amino acid identities of YN5946-7 with SLCCNV isolates and other begomoviruses identified from China

登录号 Accession no.	分离物 Isolate	病毒名 Virus	寄主 Host	国家 Country	区段序列相似性 Regional sequence identity/%													
					全序列 Total nt	基因间隔区 Intergenic region	AV1/V1		AV2/V2		AC1/C1		AC2/C2		AC3/C3		AC4/C4	
						nt	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
YN5946-7	MK626654	SLCCNV	水茄 *S. torvum*	CN														
ND	AB330078	SLCCNV	ND	TH	99.0	100.0	99.2	99.2	99.7	100.0	98.3	99.2	99.3	97.7	99.3	100.0	–	–
Hanoi	KC857509	SLCCNV	南瓜 Pumpkin	VN	98.0	100.0	98.8	100.0	99.7	99.1	96.8	97.5	97.8	94.8	98.1	97.8	–	–
ND	HM566112	SLCCNV	甜瓜 Melon	CN	95.9	96.9	97.3	98.8	97.1	99.1	94.3	95.3	96.3	92.6	96.4	96.4	–	–
ND	DQ026296	SLCCNV	ND	ND	95.8	96.7	90.5	97.3	88.5	83.2	93.8	95.0	92.6	85.9	92.0	85.7	–	–
G25	AM260206	SLCCNV	ND	CN	95.7	91.8	96.6	99.2	97.9	98.2	95.2	96.3	95.3	88.9	95.6	96.4	–	–
Guangxi2017	MG525551	SLCCNV	南瓜 Pumpkin	CN	95.5	92.6	96.5	99.2	97.9	98.2	95.0	95.9	96.0	91.1	95.4	97.1	–	–
HA3	KF184993	SLCCNV	甜瓜 Melon	CN	95.4	96.4	96.8	98.1	96.8	99.1	94.2	96.1	95.1	90.4	94.9	92.7	–	–
MC1	EF197940	SLCCNV	黄瓜 Cucumber	MY	93.9	93.3	96.4	99.2	95.6	93.8	93.2	95.6	–	–	–	–	95.5	88.1
P54	EU487031	SLCCNV	佛手瓜 Chayote	PH	93.4	90.7	96.1	98.1	97.3	98.2	92.4	92.0	91.9	85.2	91.5	90.5	97.2	93.2
ND	EU543562	SLCCNV	冬瓜 Wax gourd	TH	92.3	92.6	96.6	94.5	97.6	93.8	94.3	92.5	95.3	91.1	97.3	97.1	–	–
J1	MF102264	SLCCNV	茉莉 Jasmine	IN	92.7	94.9	90.4	95.8	88.2	93.2	94.5	96.1	91.9	86.7	92.7	89.1	95.5	86.4
Varanasi	GU967381	SLCCNV	南瓜 Pumpkin	IN	91.7	91.5	89.4	93.4	88.2	82.3	93.6	95.0	92.3	84.4	92.2	89.1	93.8	83.1
Pum	JN587811	SLCCNV	南瓜 Pumpkin	IN	90.8	94.9	90.3	94.9	88.5	83.2	89.7	93.9	91.4	83.7	91.2	87.6	–	–
ND	AB085793	SLCuPV	南瓜 Pumpkin	PH	90.1	80.0	96.4	98.1	96.2	96.5	86.4	84.2	93.3	86.7	91.7	89.8	–	–
Indonesia	LC335722	ToLCNDV	甜瓜 Melon	ID	88.4	80.0	96.2	98.8	94.1	92.9	84.3	87.0	84.2	75.6	88.6	86.1	89.3	71.2
HN7	MH891840	SLCMV	木薯 Cassava	CN	70.2	59.1	77.8	91.4	76.4	74.3	70.3	75.1	65.7	53.3	66.7	57.0	65.0	35.6
Fz7	FJ011668	CIGMCNV	大青 Woad	CN	70.2	62.9	71.6	82.1	70.6	61.1	71.5	74.6	68.4	54.1	68.4	63.0	75.7	52.5
YN1095	HQ317134	CIGMCNV	大青 Woad	CN	70.5	60.7	72.9	80.2	72.1	61.8	71.7	76.1	69.6	57.5	68.4	61.5	76.3	50.8
Yg3	FJ539014	KuMV	野葛 Kudzu	CN	65.0	54.2	68.1	74.3	61.1	51.3	67.3	66.9	60.0	48.9	60.5	40.3	74.6	49.2
YN4819	KU522487	RaYMV	苎麻 Ramie	CN	71.0	65.7	73.7	80.9	72.9	65.5	71.4	76.0	67.9	55.6	70.1	61.5	79.1	57.6
YN5958	MF327262	TYLCKaV	茄子 Eggplant	CN	67.5	62.4	67.4	72.4	57.2	47.8	72.1	76.3	63.2	49.6	65.9	56.3	76.3	52.5
Z1	FN396971	ToLCHsV	苎麻 Ramie	CN	70.3	67.1	72.2	80.9	70.8	63.7	72.9	76.7	65.9	50.4	66.9	57.0	78.5	59.3
Y64	AJ457823	TYLCCNV	ND	CN	72.8	66.1	73.4	78.2	74.0	61.9	75.4	77.1	68.6	53.3	68.4	62.2	78.5	57.6
Y282	AJ971266	TbCSV	胜红蓟 *Ageratum conyzoides*	CN	75.0	63.2	81.1	92.6	77.6	75.2	75.2	77.1	69.7	54.8	70.4	59.3	78.5	54.2

nt:核苷酸序列;aa:氨基酸序列;ND:未获得此信息;CN:中国;TH:泰国;VN:越南;MY:马来西亚;IN:印度;PH:菲律宾;ID:印度尼西亚。nt:Nucleotide sequence;aa:amino acid sequence;ND:not determined;CN:China;TH:Thailand;VN:Vietnam;MY:Malaysia;IN:India;PH:Philippines;ID:Indonesia.

2.4 水茄中病毒全基因组序列的系统进化分析

将本研究获得的SLCCNV和CraYVV分离物与其它菜豆金色花叶病毒属病毒构建系统进化树,发现单组分菜豆金色花叶病毒属病毒和双组分菜豆金色花叶病毒属病毒形成明显的2个进化分支。所有SLCCNV DNA-A分离物聚为1个大分支,根据地理差异形成3个明显的分支,来自中国、越南和泰国的分离物亲缘关系较近,聚为1个分支;来自印度和巴基斯坦的分离物亲缘关系较近,形成第2个分支;来自马来西亚的分离物单独形成1个分支(图2-A)。SLCCNV DNA-B分离物形成2个明显的分支,地理相邻或者接近的中国、越南和泰国分离物聚为1个分支;来自印度和巴基斯坦的分离物形成1个分支(图2-B);而来自马来西亚的分离物与这2个种群的

亲缘关系均较远。所有CraYVV分离物都聚于1个分支，和TbLCYnV共同聚于1个大分支中（图2-A），表明CraYVV与TbLCYnV亲缘关系较近。结合地理分布特征分析发现，SLCCNV的3个种群间遗传距离的远近与地理分布呈正相关；SLCCNV DNA-A和DNA-B的进化则表明2个组分间是协同进化关系。

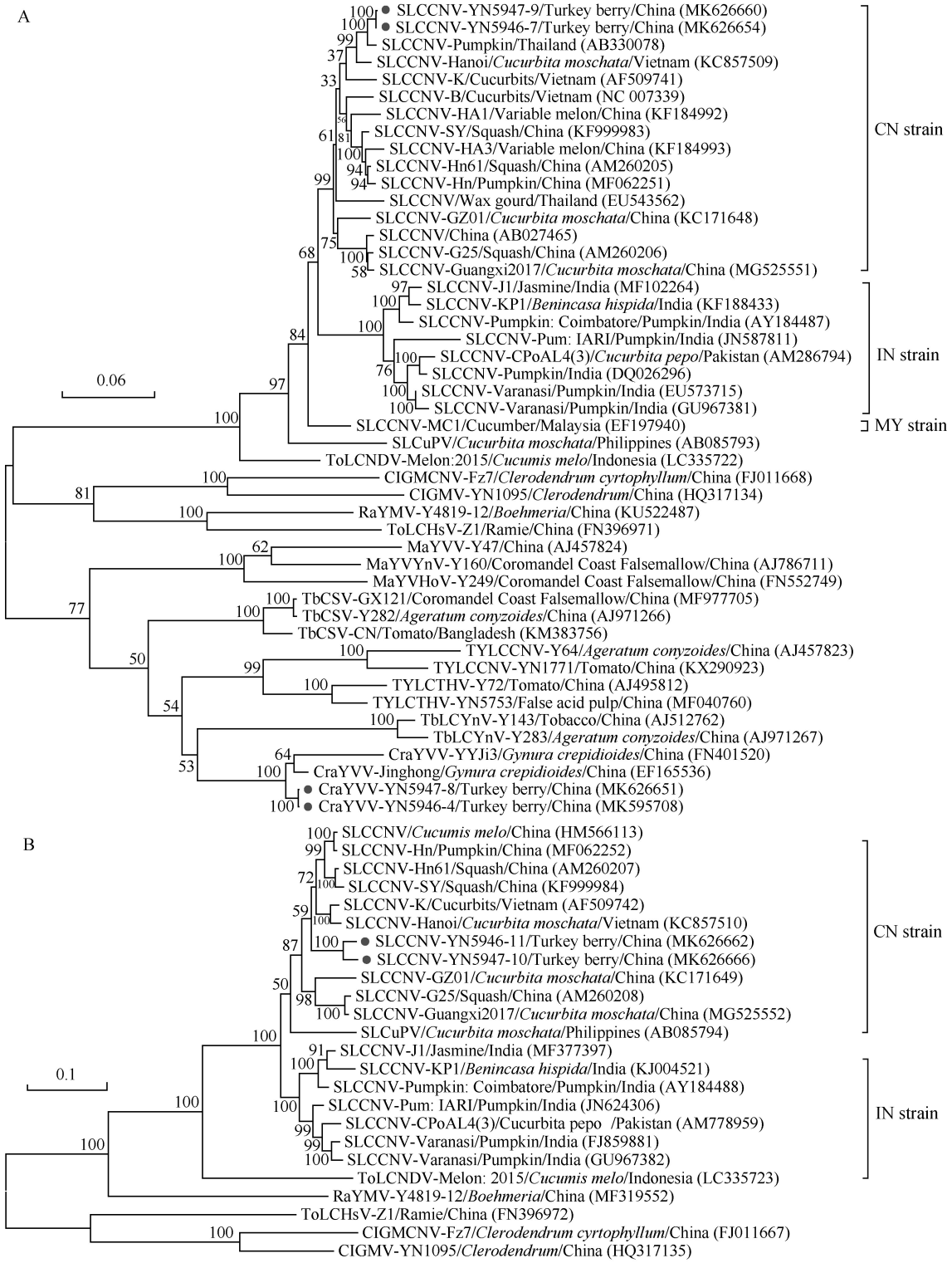

图2　基于本研究中发现的菜豆金色花叶病毒属病毒DNA-A（A）和DNA-B（B）序列与其它序列构建的系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic dendrograms based on alignments of the begomovirus DNA-A（A）and DNA-B（B）identified in this study with other selected species

图中内容表述形式为病毒–分离物/寄主/来源（登录号）。黑点标记分离物为本研究测定序列。The description is represented as the virus-isolate/host/origin（accession number）. The black dot indicates the sequence obtained in this study.

2.5 水茄中病毒DNA-A重组分析

RDP重组分析结果显示，本研究获得的SLCCNV分离物YN5946-7与YN5947-9没有重组事件发生；CraYVV分离物YN5946-4、YN5946-5和YN5947-8分离物在155~444 nt（部分V2和V1区段）有1种方法（GENECOV=4.458×10^{-10}）检测到重组的发生，在1 144~1 542 nt（部分C2区段）也有1种方法（3Seq=1.248×10^{-28}）检测到重组的发生。根据RDP分析方法的判断标准，需有3个方法都检测到重组事件才认为有重组事件发生，因此本研究中获得的CraYVV分离物被认为无重组事件发生。

3 讨论

本研究利用分子检测方法，从表现皱缩、褪绿症状的水茄中分离到双组分的SLCCNV以及单组分的CraYVV，系首次报道双组分和单组分菜豆金色花叶病毒属病毒复合侵染水茄，并对分离到的病毒核苷酸序列进行了基因组结构、相似性、系统进化及重组分析。Tahir et al.（2010）研究结果表明，SLCCNV不同株系进化方向并不相同，很可能是由于地理隔离造成的。本研究结果再次证明，SLCCNV在进化上表现出明显的地理分布特征，来自中国、越南、泰国的分离物亲缘关系最近；来自印度和巴基斯坦的分离物亲缘关系最近；而来自马来西亚的则与以上两者亲缘关系都较远。此外，本研究中还发现SLCCNV DNA-A和DNA-B具有协同进化的关系。这与Zhou et al.（2003）报道在单组分病毒中DNA-A与伴随性卫星分子DNAβ协同进化的结果相类似。

前期研究显示，杂草寄主中菜豆金色花叶病毒属病毒的多样性较为丰富（Castillo-Urquiza et al.，2008；Fiallo-Olivé et al.，2012；Mubin et al.，2012）。部分杂草在菜豆金色花叶病毒属病毒的侵染循环中起着重要作用，它们不仅是中间寄主，也是病毒变异、重组、重配的场所，极有可能在此形成新种或新分离物（Mubin et al.，2012；Zhao et al.，2018；Sohrab & Daur，2018）。此前研究还表明，菜豆金色花叶病毒属病毒复合侵染情况非常普遍，但是目前报道的复合侵染类型多数为单组分病毒之间或者双组分病毒之间的复合侵染（Yang et al.，2008；Leke et al.，2015；赵丽玲等，2016），而对于双组分与单组分菜豆金色花叶病毒属病毒的复合侵染还很少有报道。有研究表明，菜豆金色花叶病毒属病毒复合侵染容易造成该属病毒之间重组，从而有可能扩大其寄主范围，造成更加严重的危害（Zhou et al.，1997），所以对不同寄主中病毒的复合侵染进行监测能有效预防此类病害发生及流行。SLCCNV的主要寄主是葫芦科的瓜类作物，至今尚未有杂草寄主的报道，因此水茄作为SLCCNV在当地的一个中间寄主，在其侵染循环中所起到的作用值得进一步研究。

菜豆金色花叶病毒属病毒在全球多地危害程度逐年加重，发生面积不断增加，导致该类病毒正在全世界范围内扩散危害（Cai et al.，2010；Lefeuvre et al.，2010）。自2002年在中国广西壮族自治区首次发现SLCCNV为害以来，该病毒已在泰国（Ito et al.，2008）、印度（Singh et al.，2008；Mohammed et al.，2013；2015）、巴基斯坦（Tahir et al.，2010）、菲律宾（Kon et al.，2010）和东帝汶（Maina et al.，2017）等国家都有发现。CraYVV是本实验室首次报道的单组分菜豆金色花叶病毒（Dong et al.，2008），该病毒主要分布于云南省东南部热带亚热带地区。本研究发现，在CraYVV发生区域，双组分病毒SLCCNV可以协同CraYVV复合侵染水茄，而之前调查研究未发现此现象，是否2种病毒协同侵染才导致水茄感病，还需进一步开展致病性研究来验证。此外，当地或周边区域在番茄、辣椒或者瓜类作物中是否也存在这2种病毒复合侵染现象，还需要更广泛深入的调查监测。综上所述，云南省菜豆金色花叶病毒属病毒寄主范围和地理分布区域不断扩大，具有暴发流行的风险，必须进一步加强各类杂草中病毒病原的监测，为主要农业经济作物上该类病害的防控提供科学依据。

参 考 文 献（References）

BROWN JK, ZERBINI FM, NAVAS-CASTILLO J, MORIONES E, RAMOSSOBRINHO R, SILVA JCF, FIALLO-OLIVÉ E, BRIDDON RW, HERNÁNDEZ-ZEPEDA C, IDRIS A, et al. 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. Archives of Virology, 160(6): 1593−1619

CAI JH, XIE K, LIN L, QIN BX, CHEN BS, MENG JR, LIU YL. 2010. *Cotton leaf curl Multan virus* newly reported to be associated with cotton leaf curl disease in China. Plant Pathology, 59 (4): 794−795

CASTILLO-URQUIZA GP, BESERRA JEA Jr., BRUCKNER FP, LIMA ATM, VARSANI A, ALFENAS-ZERBINI P, ZERBINI MF. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in southeastern Brazil. Archives of Virology, 153(10): 1985−1989

CHIEMSOMBAT P, SRIKAMPHUNG B, YULE S. 2018. Begomovi-

ruses associated to pepper yellow leaf curl disease in Thailand. Journal of Agricultural Research, 3(7): 000183

DONG JH, LI GX, LUO YQ, DING M, ZHANG LZ, ZHANG ZK. 2007. Molecular detection of whiteflies-transmitted geminiviruses infecting uriental tobacco. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 20(3): 417−420 (in Chinese) [董家红, 李光西, 罗延青, 丁铭, 张丽珍, 张仲凯. 2007. 香料烟粉虱传双生病毒的分子检测. 西南农业学报, 20(3): 417−420]

DONG JH, ZHANG ZK, DING M, FANG Q, ZHOU H. 2008. Molecular characterization of a distinct *Begomovirus* infecting *Crassocephalum crepidioides* in China. Journal of Phytopathology, 156 (4): 193−195

DOYLE JJ, DOYLE JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19: 11−15

FIALLO-OLIVÉ E, NAVAS-CASTILLO J, MORIONES E, MARTÍNEZ-ZUBIAUR Y. 2012. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. Archives of Virology, 157(1): 141−146

ITO T, OGAWA T, SAMRETWANICH K, SHARMA P, IKEGAMI M. 2008. Yellow leaf curl disease of pumpkin in Thailand is associated with *Squash leaf curl China virus*. Plant Pathology, 57(4): 766

KENYON L, TSAI WS, SHIH SL, LEE LM. 2014. Emergence and diversity of begomoviruses infecting *solanaceous* crops in East and Southeast Asia. Virus Research, 186: 104−113

KING AMQ, ADAMS MJ, CARSTCNS EB, LEFKOWITZ EJ. 2012. Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. New York: Elsevier Academic Press, pp. 351−372

KOEDA S, KESUMAWTI E, TANAKA Y, HOSOKAWA M, DOI M, KITAJIMA A. 2016. Mixed infection of begomoviruses on pepper plants at northern Sumatra, Indonesia. Tropical Agriculture and Development, 60(2): 59−64

KON T, DOLORES LM, BAJET NB, HASE S, TAKAHASHI H, IKEGAMI M. 2010. Molecular characterization of a strain of *Squash leaf curl China virus* from the Philippines. Journal of Phytopathology, 151(10): 535−539

KUANG KR, LU AM. 1978. The Flora of China: Solanaceae. Beijing: Science Press, pp. 95 (in Chinese) [匡可任, 路安民. 1978. 中国植物志: 茄科. 北京: 科学出版社, pp. 95]

LEFEUVRE P, MARTIN DP, HARKINS G, LEMEY P, GRAY AJA, MEREDITH S, LAKAY F, MONJANE A, LETT JM, VARSANI A, et al. 2010. The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. PLoS Pathogens, 6(10): e1001164

LEKE WN, MIGNOUNA DB, BROWN JK, KVARNHEDEN A. 2015. Begomovirus disease complex: emerging threat to vegetable production systems of west and central Africa. Agricultural and Food Science, 4: 1

MAINA S, EDWARDS OR, DE ALMEIDA L, XIMENES A, JONES RAC. 2017. First complete *Squash leaf curl China virus* genomic segment DNA-A sequence from East Timor. Genome Announcements, 5(24): e00483-17

MARTIN DP, LEMEY P, LOTT M, MOULTON V, POSADA D, LEFEUVRE P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics, 26(19): 2462−2463

MOHAMMED RIYAZ SU, DEEPAN S, DHARANIVASAN G, JESSE MI, MUTHURAMALINGAM R, KATHIRAVAN K. 2013. First report on a variant of *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) infecting *Benincasa hispida* in India. New Disease Reports, 28: 20

MOHAMMED RIYAZ SU, DEEPAN S, JESSE MI, DHARANIVASAN G, KATHIRAVAN K. 2015. New record of bipartite *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) and *Croton yellow vein mosaic* beta satellite associated with yellow vein disease of ash gourd in India. New Disease Reports, 31: 3

MUBIN M, AKTHAR S, AMIN I, BRIDDON RW, MANSOOR S. 2012. *Xanthium strumarium*: a weed host of components of begomovirus-betasatellite complexes affecting crops. Virus Genes, 44: 112−119

MUHIRE BM, VARSANI A, MARTIN DP. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. PLoS ONE, 9(9): e108277

NAWAZ-UL-REHMAN MS, FAUQUET CM. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. FEBS Letters, 583(12): 1825−1832

PRAMESH D, MANDAL B, PHANEENDRA C, MUNIYAPPA V. 2013. Host range and genetic diversity of croton yellow vein mosaic virus, a weed-infecting monopartite begomovirus causing leaf curl disease in tomato. Archives of Virology, 158(3): 531−542

ROJAS MR, GILBERTSON RL, RUSSELL DR, MAXWELL DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain-reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Disease, 77(4): 340−347

RUAN T, YU YQ, BAO LY, ZHANG J, QING L. 2011. Identification and detection of mix-infection of whitefly-transmitted geminiviruses on *Malvastrum coromandelianum* in Miyi County of Sichuan Province. Journal of Plant Protection, 38(5): 419−424 (in Chinese) [阮涛, 于云奇, 包凌云, 张婧, 青玲. 2011. 四川米易赛葵上粉虱传双生病毒的分子鉴定及复合侵染检测. 植物保护学报, 38(5): 419−424]

SINGH R, RAJ SK, PRASAD V. 2008. Molecular characterization of a strain of *Squash leaf curl China virus* from north India. Journal of Phytopathology, 156(4): 222−228

SOHRAB SS, DAUR I. 2018. Identification of a monopartite begomovirus associated with yellow vein mosaic of *Mentha longifolia* in Saudi Arabia. 3 Biotech, 8: 92

TAHIR M, HAIDER MS, BRIDDON RW. 2010. First report of *Squash leaf curl China virus* in Pakistan. Australasian Plant Disease Notes, 5(1): 21−24

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics

analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10): 2731−2739

TIAN P, AI PF, SONG JJ, WANG LS, WANG RF. 2013. The progress of sequence analysis, spread and distribufion of whitefly-transmitted geminivirus in tomato in China. Chinese Agricultural Science Bulletin, 29(1): 60−64 (in Chinese) [田鹏, 艾鹏飞, 宋建军, 王琳珊, 王瑞飞. 2013. 番茄粉虱传双生病毒在中国的传播、分布及分子进化研究进展. 中国农学通报, 29(1): 60−64]

XIE Y, ZHOU XP, ZHANG ZK, QI YJ. 2002. *Tobacco curly shoot virus* isolated in Yunnan is distinct species of *Begomovirus*. Chinese Science Bulletin, 47(3): 197−200

YANG C, JIA S, LIU Z, CUI G, XIE L, WU Z. 2008. Mixed infection of two begomoviruses in *Malvastrum coromandelianum* in Fujian, China. Journal of Phytopathology, 156(9): 553−555

YANG CX, ZHENG LM, WU ZJ, XIE LH. 2013. *Papaya leaf curl Guangdong virus* and *Ageratum yellow vein virus* associated with leaf curl disease of tobacco in China. Journal of Phytopathology, 161(3): 201−204

ZERBINI FM, BRIDDON RW, IDRIS A, MARTIN DP, MORIONES E, NAVAS-CASTILLO J, RIVERA-BUSTAMANTE R, ROUMAGNAC P, VARSANI A. 2017. ICTV virus taxonomy profle: *Geminiviridae*. Journal of General Virology, 98(2): 131−133

ZHANG LB, ZHOU GH, LI HP, ZHANG SG. 2005. Molecular characterization of *Papaya leaf curl virus* infecting *Carica papaya* in Guangzhou and its biological test. Scientia Agricultura Sinica, 38(9): 1805−1810 (in Chinese) [张鲁斌, 周国辉, 李华平, 张曙光. 2005. 侵染广州番木瓜的曲叶病毒DNA-A分子特征及生物学测定. 中国农业科学, 38(9): 1805−1810]

ZHAO LL, ZHONG J, YIN YY, DING M, ZHANG ZK. 2016. Recombination and mixed infection of two distinct begomoviruses in tomato. Acta Horticulturae Sinica, 43(7): 1305−1314 (in Chinese) [赵丽玲, 钟静, 尹跃艳, 丁铭, 张仲凯. 2016. 两种菜豆金色花叶病毒属病毒复合侵染番茄及重组特征. 园艺学报, 43(7): 1305−1314]

ZHAO LL, ZHONG J, ZHANG XY, DING M, ZHANG ZK. 2018. Complete genome sequence of a new bipartite begomovirus infecting *Boehmeria leiophylla* in China. Archives of Virology, 163(7): 1989−1992

ZHOU XP, LIU YL, CALVERT L, MUNOZ C, OTIM-NAPE GW, ROBINSON DJ, HARRISON BD. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. Journal of General Virology, 78: 2101−2111

ZHOU XP, XIE Y, TAO XR, ZHANG ZK, LI ZH, FAUQUET CM. 2003. Characterization of DNAβ associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. Journal of General Virology, 84(1): 237−247

（责任编辑：李美娟）