

我国斯里兰卡木薯花叶病毒的分子特征及致病性分析

王国芬¹, 李超萍¹, 时涛¹, 吴会杰², 蔡吉苗¹, 李博勋¹, 陆翠梅¹, 黄贵修^{1*}

1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南海口 571101; 2. 中国农业科学院郑州果树研究所, 河南郑州 450009

摘要: 为进一步探究我国斯里兰卡木薯花叶病毒 (*Sri Lankan cassava mosaic virus*, SLCMV) 的分子特征及致病性。以感染 SLCMV 的木薯叶片基因组 DNA 为模板, PCR 扩增获得 DNA-A 和 DNA-B 基因组全长, 通过生物信息软件分析比较其核酸及氨基酸序列特征; 构建了强、弱致病力分离物 (SLCMV-Colombo 和 SLCMV-DG1922) 的侵染性克隆, 分别将 2 种致病力分离物的 DNA-A 和 DNA-B 组分进行重组, 接种烟草 (*Nicotiana tabacum*), 比较 2 种分离物的致病性差异。结果显示: 我国 SLCMV 为“旧世界”双组份菜豆花叶病毒, 编码包括 AV2 基因在内的 8 个开放阅读框 (ORFs); 具有双生病毒典型的共同序列 (CR)、重复序列、TATABox 和 TAATATT↓AC 茎环结构, Rep 蛋白羧基末端有 7 个氨基酸缺失; 我国 SLCMV 的基因组、编码和非编码区与柬埔寨、泰国和越南分离物的相似性在 97.0%~100.0% 之间, 与印度和斯里兰卡早期的分离物相似性为 86.5%~98.6%, DNA-B 组份与印度木薯花叶病毒株系 (ICMV) 编码区序列相似性为 95.0%~97.6%, 与其他 9 个非洲木薯花叶病毒株系序列之间的序列相似性均低于 80.0%。侵染性克隆接种结果证实, 强致病力分离物 SLCMV-Col 的 DNA-A (Col-A) 组份在烟草叶片表现典型花叶症状中起主要作用, 而我国分离物的 DNA-B (DG1922-B) 能协同 Col-A 对烟草产生强致病性。本研究分析了我国 SLCMV 的全基因组结构, 建立的侵染性克隆及其技术为进一步解析 SLCMV 致病性机理提供重要的研究基础。

关键词: 斯里兰卡木薯花叶病毒; 分子特征; 侵染性克隆; 致病性

中图分类号: S435.33 文献标识码: A

Molecular Characterization and Pathogenicity of the SLCMV Chinese Isolates

WANG Guofen¹, LI Chaoping¹, SHI Tao¹, WU Huijie², CAI Jimiao¹, LI Boxun¹, LU Cuimei¹, HUANG Guixiu^{1*}

1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450009, China

Abstract: To further explore the molecular characteristics and pathogenicity of *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) isolates in China. Mosaic cassava leaves were detected, and the domestic SLCMV isolates full-length genomes of DNA-A and DNA-B were obtained by PCR amplification. Its nucleic acid and amino acid sequence characteristics were analyzed by bioinformatics software. The infectious clones of strong and weak pathogenic isolates (SLCMV-Colombo and SLCMV-DG1922) were constructed. The DNA-A and DNA-B components of the two virulence isolates were recombined, and the pathogenicity differences of the two isolates were compared by tobacco (*Nicotiana tabacum*) inoculation. The results showed that SLCMV isolates belong to “Old World begomoviruses” encoding 8 open reading frames (ORFs) including the AV2 gene. It has a typical common region (CR), repeat sequence, TATA Box and

收稿日期 2022-12-14; 修回日期 2023-04-03

基金项目 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 2019RC285); 国家重点研发计划项目 (No. 2020YFD1000600); 国家木薯产业技术体系项目 (No. CARS-11)。

作者简介 王国芬 (1978—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 热带作物病害植保。*通信作者 (Corresponding author): 黄贵修 (HUANG Guixiu), E-mail: hgxiu@vip.163.com。

TAATATT↓AC stem-loop structure of Geminiviruses, and 7-amino-acid are missing at the carboxyl terminal of Rep protein. Domestic SLCMV genome, coding and non-coding region sequences were 97.0%–100.0% similar to the isolates from Cambodia, Thailand and Vietnam, and 86.5%–98.6% similar to the early isolates from India and Sri Lanka. Coding region of DNA-B were 95.0%–97.6% similar to Indian cassava mosaic virus strain (ICMV), were less than 80.0% to the other 9 African cassava mosaic virus strains. Infection clone inoculation showed that the DNA-A (ColA) component of the strong virulent isolate SLCMV-Col played an important role in the typical mosaic symptoms of *N. tabacum* leaves, while the DNA-B (DG1922-B) of the domestic isolate could cooperate with Col-A to produce strong pathogenicity to tobacco plants. This study analyzed the whole genome structure of SLCMV in China, the infectious clone and its technology provide an important research basis for further pathogenesis research of SLCMV.

Keywords: Sri Lankan cassava mosaic virus; molecular characterization; infectious clone; pathogenicity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.01.020

木薯是热带地区薯芋类作物，为世界第六大粮食作物，是世界热区 10 余亿人口的主要粮食。全球有 100 多个国家种植木薯，2021 年木薯总收获面积超过 3000 万 hm^2 ，总产量达 3.06 亿 $\text{t}^{[1]}$ ；我国木薯种植主要集中在广西、广东、云南、海南、福建和江西等华南及西南地区，以生产淀粉、变性淀粉和乙醇等为主。但我国的木薯原料生产仍然供不应求，每年向东南亚进口的木薯淀粉及木薯干片占世界木薯贸易量的 70% 以上^[2]。

由双生病毒引起的木薯花叶病毒病 (cassava mosaic disease, CMD) 是世界木薯种植业中危害最严重的病害之一，病原属双生病毒科 (*Geminiviridae*) 菜豆金黄色花叶病毒属 (*Begomovirus*) 木薯花叶双生病毒 (*Cassava mosaic geminiviruses*, CMGs)，共有 9 个种多个重组变种^[3]。双生病毒的基因组结构为环状单链 DNA (ssDNA)，根据其数量分为单组份和双组份病毒。单组份双生病毒只包含 1 条长度为 2.6~2.8 kb 的环状 ssDNA，双组份则包含 2 条长度为 2.5~2.8 kb 的环状 ssDNA，即 DNA-A 和 DNA-B，木薯花叶双生病毒 CMGs 大部分都是双组份病毒^[4]。双组份双生病毒的基因组结构包括编码区和非编码区，DNA-A 编码外壳蛋白 (coat protein, CP)、运动蛋白 (movement protein, MP)、复制相关蛋白 (replication-associated protein, Rep)、转录激活子 (transcriptional activator, TrAP)、复制增强子 (replication enhancer, REn)，以及 C4 蛋白；DNA-B 编码核穿梭蛋白 (nuclear shuttling protein, NSP) 和 MP。双组份双生病毒以 DNA-A 中是否含有 AV2 编码的运动蛋白 (movement protein, MP) 区分“旧世界”和“新世界”病毒^[5]。

木薯花叶双生病毒 (CMGs) 最早在非洲中西部发生危害，现在广泛分布于非洲大陆、马达加

斯加半岛、西亚半岛、印度洋诸岛及东南亚^[6]，2018 年，我国海南、云南、广东、广西、福建和贵州等地陆续发现木薯花叶病毒病^[7-8]，经检测发现由斯里兰卡木薯花叶病毒 (SLCMV) 引起^[9]。也有报道发现由其他双生病毒，如烟草曲茎病毒 (TbCSV)、中国胜红蓟黄脉病毒 (AYVCNV) 及其卫星分子在云南红河地区引起木薯叶片皱缩、畸形等症^[10]。WANG 等^[11]报道了福建分离物 HN7 的基因组序列，经过分析不同来源 SLCMV 分离物全基因组序列，发现 AC1 序列及其编码的氨基酸序列有部分差异。但由于国内病毒分离物较少，尚未就国内分离物和东南亚分离物在基因结构及其致病性差异做深入分析。本研究对来自海南、贵州的 SLCMV 分离物进行全基因组测序，并通过侵染性克隆的构建，比较 SLCMV 不同致病力分离物对普通烟草的致病能力差异，为进一步分析不同来源的 SLCMV 分离物之间的序列结构特征及其致病性提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品 2020—2021 年，分别在海南海口、儋州和贵州兴义的木薯种植基地采集具有皱缩、褪绿等表现疑似感染木薯花叶病毒病的木薯叶片样品 136 个，无症状健康叶片样品 10 个，经检测鉴定阳性样品序列高度相似，因此分别从海口地区的样品中选取 3 个、儋州和贵州兴义各选取 1 个代表性样品进行全基因组序列及结构分析。

1.1.2 载体及植物材料载体 pCambia1300 (p1300)，具有 kan 和 Rif 抗性，由中国农业科学院郑州果树研究所吴会杰副研究员馈赠。pGEM-T Easy 载体购自北京全式金生物技术有限

公司。野生型普通烟 (*N. tabacum*) 种子由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所提供，于白天气温 28 ℃，夜间 23 ℃，相对湿度 75%和光周期 L : D=14 h : 10 h 的人工气候室中种植，生长 2~4 周后进行接种试验。

1.1.3 试剂 农杆菌感受态细胞 GV3101，上海唯地科技有限公司；*Taq* DNA 及 *LA* 聚合酶、*Alkaline Phosphatase* 去磷酸化酶、*Hind* III、*Pst* I 和 *Bam*H I 等内切酶，宝日医生物技术（北京）有限公司；DNA 凝胶回收试剂盒，生工生物工程（上海）股份有限公司；dNTPs、DNA Ladder

Maker，天根生化科技（北京）有限公司；*T₄* DNA 连接酶，南京诺唯赞生物科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。引物及参考序列 SLCMV-Colombo 的 DNA-A（AJ314737）及 DNA-B（AJ314738）全基因序列合成由华大基因股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成 通过特异性引物 SL12/13 扩增样品目标序列，目标序列测序后，设计背靠背测序引物对 SLCMV 全基因进行扩增、测序，并进一步设计 SLCMV 的侵染性克隆所需引物(表 1)。

表 1 用于病毒检测、测序及侵染性克隆所需引物
Tab. 1 Primers for virus detection, sequencing and infectious cloning

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)	用途 Uage
SL12	CACGGTTTCCGGTGTATGCT	SLCMV detection
SL13	CCTGGCGTTTCTTGAGGGTAT	
HN-YF2-F1	CTGTCAGTCCCAGCGATTAC	
HN-YF2-R1	GCTGACCGAATCGTAGAAGTAG	
HN-YF2-F2	TCAGTATGCGAGCAAG	
HN-YF2-R2	AGTAAGCCCAACTCCACGAG	DNA-A sequencing
YJ-BF	ATTTGGATCCTATTAGACTTGGG	
YJ-BR	TAATAGGATCCAAATCCATGAGAT	
DNA-BF-F1	TATGTATGGCTCAGCGACG	
DNA-BR-1463:	TAACCAATGACTCAACCGAC	
0.6A- <i>Hind</i> III -F	GTAAAACGACGGCCAGTGCC <u>AAGCTT</u> CGGAAGAACTCGAGTAAG*	DNA-A infectious cloning
A- <i>Pst</i> I-R	CGGGGATCCTCTAGAGTCGAC <u>CTGCAGCT</u> CAGGCGATGAATGGCGTAT	
1A- <i>Pst</i> I-F	ATACGCCATTATCGCCTGAG <u>CTGCAG</u> TGATGAGTTCCCCTG	
0.6B- <i>Hind</i> III -F	GTAAAACGACGGCCAGTGCC <u>AAGCTT</u> TCGCGATGTAAGGTTGATGTCTGC	
B- <i>Bam</i> H I-R	CGAATTCGAGCTCGGTACCCGG <u>GGATCC</u> AAATCCATGAGATATACT	
1B- <i>Bam</i> H I-F	AGTATATCTCATGGATT <u>GGATCC</u> TATTAGACTTGGGCCTTG	DNA-B infectious cloning

注：带有下划线的为酶切位点。
Note: The underline is the restriction site.

1.2.2 病毒的检测、克隆及全基因组测序 采用改良 CTAB 一步法提取病样基因组 DNA^[9]。分别对 SLCMV DNA-A/B 进行扩增，将获得的序列进行测序，拼接后获得 SLCMV DNA-A/B 的基因组全长序列，应用 Lasergene-MegAlign、LaserGene-EditSeq 和 MEGA 7.0 软件对基因组分子特征和序列及氨基酸相似性进行分析。

1.2.3 构建 SLCMV 侵染性克隆质粒 以编号为 SLCMV-DG1922 分离物 DNA 为模板，分别用 0.6 A-*Hind* III-F/A-*Pst* I-R 和 0.6 B-*Hind* III-F/B-*Bam*H I-R 扩增 DG1922 DNA-0.6 A/0.6 B 目的片段，用相应的 *Hind* III、*Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切后分别

与 pCAMBIA1300(p1300)载体连接,转化 *E. coil*；阳性转化子用相应的引物检测，并提取质粒酶切验证；分别用 1A-*Pst* I -F/A-*Pst* I -R1 和 B-*Bam*H I -F/B-*Bam*H I -R 扩增 DG1922 DNA-A/B 目的片段，与经过酶切及磷酸化处理后的 DG1922-0.6A/0.6 B 连接，转化 *E. coil*，检测 DG1922-1.6 A/1.6 B 阳性克隆，提取质粒进行酶切验证。分别获得 SLCMV-DG1922 pCAM-BIA1300-1.6 A（DG1922-A）及 SLCMV-DG1922 pCAMBIA1300-1.6 B（DG1922-B）的侵染性克隆质粒。为比较不同分离物的致病性，同步进行 SLCMV-Colombo pCAMBIA1300-1.6 A（Col-A）

和 SLCMV-Colombo pCAMBIA1300-1.6 B (Col-B) 的构建试验。

1.2.4 SLCMV 侵染性克隆致病力评价 将经双酶切和测序筛选确认的侵染性克隆 DG1922-A/B 和 Col-A/B 阳性质粒, 通过冻融法 (冰浴 5 min, 液氮 5 min, 37 °C 水浴 5 min, 4 °C 冰水浴 5 min) 分别转入 100 μ L GV3101 (pSoup) 农杆菌感受态细胞中, 菌落 PCR 筛选验证阳性转化子。然后接种于含有卡那霉素 (100 μ g/mL) 和利福平 (25 μ g/mL) 的 LB 培养基内, 28 °C 摇床过夜培养, 4000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 弃上清, 沉淀用农杆菌悬浮缓冲液 (10 mmol/L MES、10 mmol/L MgCl₂、150 μ mol/L As) 重悬, 利用紫外分光光度计将菌液 OD₆₀₀ 调至 1.0。28 °C 培养箱静置 4 h, 用浸润法接种 5~6 叶期的普通烟 (*N.*

tabacum), 接种量为 200 μ L/叶, 每株接种 3 片叶。定期观察记录烟草症状的变化, 以接种不带质粒的空载宿主缓冲液及清水处理为对照。每处理接种植株 6 株, 试验重复 3 次。参照 1.2.2 方法, 提取各处理的病毒 DNA, 并进行分子检测。

2 结果与分析

2.1 样品采集及检测

2020—2021 年, 在海南海口、儋州和贵州兴义的木薯种植基地调查发现, 部分木薯种质叶片呈现明显的花叶斑驳、叶片卷曲等疑似感染 SLCMV 症状。共采集有症状叶片样品 136 个, 无症状样品 10 个, 经核酸抽提 PCR 检测后, 结果显示部分有症状的样品可检测到大小为 1 kb 左右的特异性条带。无症状样品则无目的条带 (图 1)。



A: 健康无症状木薯叶片; B: 感染 SLCMV 木薯叶片; C: SLCMV 特异性引物 PCR 检测电泳图; M: DL2000 DNA marker; 1~4: 无症状样品; 5~14: 有症状样品; CK⁻: 水对照; CK⁺: SLCMV 阳性质粒对照。

A: Healthy asymptomatic cassava leaf; B: Cassava leaves infected with SLCMV alone; C: Electropherogram of SLCMV specific primers PCR detection; M: DL2000 DNA marker; 1~4: Healthy asymptomatic samples; 5~14: CMD symptomatic samples; CK⁻: Water; CK⁺: SLCMV positive plasmid control.

图 1 木薯花叶病毒病症状及病毒检测电泳结果

Fig. 1 Symptoms of cassava mosaic virus disease and virus detection electrophoresis results

2.2 我国 SLCMV 基因组序列相似性分析

将检测阳性样品分离物编号, 并用自行设计的环状 DNA 背靠背测序引物进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行测序、拼接, 获得 DNA-A 和 DNA-B 双链全基因组序列并上传 GenBank 获得序列登录号 (表 2)。序列相似性比对结果表明 5 个代表性分离物之间 DNA-A 序列的相似性为 99.5%~

99.8%, DNA-B 序列的相似性为 99.6%~100%; WANG 等^[11]报道的 SLCMV-HN7 福建分离物 DNA-A 和 DNA-B 的序列相似性为 99.6%~99.9% 和 99.6%~100%; 斯里兰卡早期报道^[12]的 SLCMV-Colombo 分离物之间的相似性较低, 仅为 93.2%~93.4% 和 96.4%~96.5%。

以 SLCMV-DG1922 分离物为代表, 与不同地

表 2 我国 SLCMV 分离物基因组全长及其序列相似性
Tab. 2 Genome length and sequence similarity of domestic SLCMV isolates

SLCMV 分离物 来源地 SLCMV Origin isolates	DNA-A		DNA-B		与 SLCMV-DG1922 序列相似性 Nucleotide identity with SLCMV-DG1922/%		与 SLCMV-HN7 序列 相似性 Nucleotide identity with SLCMV-HN7/%		与 SLCMV-Colombo 序列相似性 Nucleotide identity with SLCMV-Colombo/%	
	全长	登录号	全长	登录号	DNA-A	DNA-B	DNA-A	DNA-B	DNA-A	DNA-B
	Length/bp	Accession No.	Length/bp	Accession No.						
Comb 海口	2757	ON455001	2737	ON455002	99.6	99.6	99.7	99.6	93.2	96.4
HN2123 海口	2758	ON455003	2738	ON455004	99.5	99.7	99.6	99.6	93.2	96.5
HN2124 海口	2759	ON455005	2737	ON455006	99.8	99.80	99.9	99.7	93.4	96.5
DG1922 儋州	2757	MN688214	2737	MN688215			99.9	100.0	93.2	96.5
GZ1924 贵州	2758	MN688216	2737	MN688217	99.8	100.0	99.9	100.0	93.4	96.5

区 SLCMV 分离物及其他 10 个木薯双生花叶病毒进行基因和氨基酸序列比对,分析其序列相似性。结果表明,DG1922 双组份的 DNA 序列与柬埔寨、泰国和越南的 SLCMV 分离物在全基因组、非编码区及各基因编码区序列的相似性在 97.0%~100.0%之间,与印度和斯里兰卡早期的 SLCMV 分离物的相似性较低为 86.5%~98.6%; SLCMV-DG1922 的 DNA-B 组份与印度木薯花叶病毒株系 (ICMV) 的编码区序列相似性较高,为 95.0%~97.6%。除了 ICMV, DG1922 的两个组份与其他 9 个非洲木薯花叶病毒序列之间的相似性均低于 80.0% (表 3)。

2.3 我国 SLCMV 基因组结构特征

基因组结构分析结果显示,我国的几个 SLCMV 分离物都属于典型的“旧世界”双组份菜豆花叶病毒 (*Old world bipartite begomoviruses*),具有双组份单链 DNA(ssDNA)。DNA-A 组份全长 2757~2758 bp, DNA-B 组份全长 2737~2738 bp。共编码 8 个开放阅读框 (ORFs),病毒 DNA-A 正义链 AV1 编码外壳蛋白 (CP), AV2 编码运动蛋白 (MP), 互补链 AC1 编码复制相关蛋白(Rep)、AC2 编码转录激活子(TrAP)、AC3 编码复制增强子(REN)和 AC4 蛋白;DNA-B 正义链 BV1 编码核穿梭蛋白(NSP)、互补链 BC1 编码运动蛋白(MP)。双组份的 DNA-A 和 DNA-B 的 LIR 中存在一段约 200 bp 的保守序列,为基因间隔区 (IR) / 共同序列 (CR) 都含有 AATTGGAGACA 重复序列、TATABox 和 TAATATT↓AC 茎环结构 (图 2A)。序列差异显示,我国 SLCMV 分离物与其他 SLCMV 的主要结构性差异显示在基因间隔区 (IR)、AV1、AV2

及 AC3 四个区域,与 SLCMV-Colombo 和 SLCMV-Erode 的基因序列相似性低于 95.0%,而 DNA-B 则和其他不同来源的 SLCMV 分离物一样与 ICMV 保持了较高的同源性,序列同源性均高于 95.0% (表 3)。

进一步分析不同来源 SLCMV DNA-A 上编码复制相关蛋白 (Rep) 的 AC1 基因,发现本研究的几个 SLCMV 分离物 DG1922、GZ1924、Comb、HN2123、HN2124 以及 WANG 等^[1]报道的 SLCMV-HN7,在 AC1 基因序列的 3'末端都有一致的 C→T 点突变,从而使其编码的氨基酸末端的提前终止 (CAA→TAA),导致 Rep 蛋白羧基端缺失了 7 个氨基酸。包括 SLCMV-Colombo 和 SLCMV-Erode 在内的多个东南亚 SLCMV 分离物在该位点都保守地存在 QGPTQGS 七个氨基酸序列 (图 2B)。

2.4 侵染性克隆在烟草上的致病性

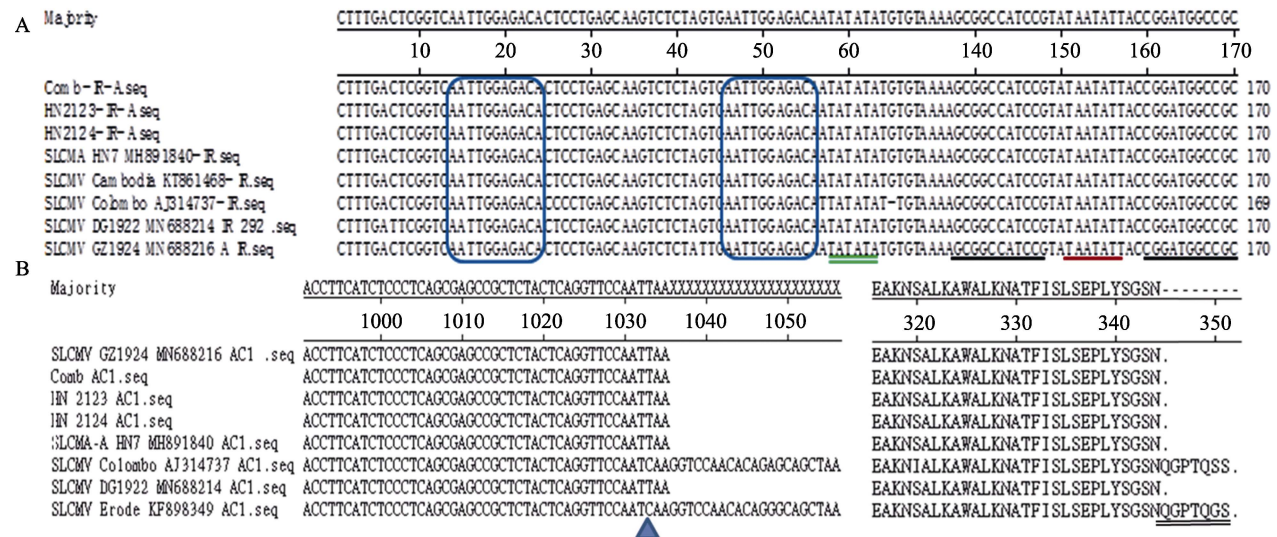
为验证 SLCMV-DG1922 和 SLCMV-Colombo 致病性上的差异,试验对构建的侵染性克隆 DG1922-A/B 和 Col-A/B 进行烟草接种,分别对 2 个分离物的 A/B 组份进行重组和交叉重组接种,Mock 为接种农杆菌悬浮缓冲液空白对照。结果如图 3 所示。第一,接种 7 d 后,所有接种的烟草叶片都表现出叶片向下卷曲,接种点附近叶片组织黄化褪绿现象。第二,Col-A/B 致病性强,接种 17 d 和 27 d 后,以 Col-A 为主的重组体植株症状典型,接种 Col-A/B 和 Col-A/DG1922-B 的植株新抽叶片均为叶片向下卷曲,叶背出现耳突,扭曲变形和植株矮化。第三,DG1922-A/B 致病性弱,接种 17 d 和 27 d 后,以 DG1922-A 组份为主的重组体症状不典型,致病性弱,接种 DG1922-

表 3 SLCMV-DG1922 与其它 CMGs 核苷酸及氨基酸序列相似性比较

登录号 Accession No.	分离物 Isolate	病毒 Virus	国家 Country	DNA-A		A-IR		AV1		AV2		AC1		AC2		AC3		AC4		DNA-B		BV1		BC1		%
				nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	
ON455001/2	Comb	SLCMV	China	99.6	99.3	99.7	99.6	99.7	98.3	99.7	99.7	99.7	99.8	99.3	99.3	97.0	99.6	99.7	99.6	99.7	99.3	99.6	99.7	99.3	99.3	
ON455003/4	HN2123	SLCMV	China	99.5	99.3	99.6	99.2	99.7	99.2	99.5	99.4	99.8	98.5	99.8	99.3	99.3	97.0	99.7	99.7	99.6	99.4	98.6	99.7	99.6	98.6	
ON455005/6	HN2124	SLCMV	China	99.8	99.3	99.9	99.5	99.7	99.2	99.9	99.4	100.0	99.3	100.0	99.3	100.0	99.0	99.8	100.0	99.6	99.7	99.3	99.6	99.7	99.3	
MN688216/7	GZ1924	SLCMV	China	99.8	98.6	100	99.6	100.0	99.2	99.9	99.4	100.0	99.3	100.0	99.3	100.0	99.0	100.0	99.9	99.6	100	99.7	99.6	99.7	99.3	
LC312131/0	VTN6	SLCMV	Vietnam	99.7	99.3	99.9	99.2	99.7	98.3	99.9	99.4	99.8	98.5	99.8	99.3	100.0	100.0	99.7	99.6	98.9	99.8	99.3	99.6	99.7	99.3	
MH891840/1	HN7	SLCMV	China	99.7	99.7	99.9	99.6	99.7	98.3	99.9	99.4	100	99.3	99.8	99.3	100.0	99.0	100.0	99.6	100.0	99.7	99.6	99.7	99.3	99.3	
AJ314737/8	Colombo	SLCMV	Sri Lanka	93.2	86.5	92.3	96.5	87.0	90.3	97.8	97.7	96.1	95.6	92.8	89.6	98.3	95.0	96.5	98.0	98.1	95.7	94.1	95.7	94.1	94.1	
KT861468/9	Cambodia	SLCMV	Cambodia	99.8	99.3	100	99.6	100.0	99.2	99.8	99.4	99.8	99.3	99.8	99.3	100.0	99.0	99.9	99.9	99.6	99.9	99.7	99.6	99.7	99.3	
AJ579307/8	Ker20	SLCMV	India	99.1	97.3	99.6	99.2	99.7	98.3	99.0	98.6	99.5	99.3	99.5	98.5	99.0	97.0	98.6	98.6	96.9	98.6	98.3	99.6	98.3		
KP455484/5	Attur2	SLCMV	India	93.9	87.0	92.9	96.9	91.9	91.6	97.3	97.1	96.8	97.8	94.6	91.9	98.3	95.0	98.6	98.5	96.9	98.1	97.6	98.1	97.6		
LC586845/ LC588395	Burirum	SLCMV	Thailand	99.2	99.0	99.7	99.2	99.2	98.3	98.9	98.6	99.8	99.3	99.0	97.0	99.0	97.0	99.7	99.9	99.6	99.8	99.3	99.6	99.3	99.3	
KF898349/50	Erode	SLCMV	India	98.9	97.6	99.1	99.2	99.7	98.3	98.9	98.8	99.5	98.5	99.0	97.8	98.3	95.0	98.3	98.2	96.2	98.5	97.9	98.5	97.9	97.9	
AJ314739/40	Maharashtra	ICMV	India	84.0	79.2	93.1	97.3	91.3	89.9	75.7	77.7	88.7	86.8	89.6	83.7	74.6	49.5	95.8	97.6	95.0	97.3	96.5	97.3	96.5	96.5	
AF155806/7	SACMV	SACMV	South Africa	71.2	62.5	74.4	78.2	75.9	70.1	73.3	78.8	75.5	61.0	69.1	63.7	73.5	48.5	48.2	41.9	23.9	55.6	41.8	55.6	41.8	41.8	
HE616777/8	BFOuaBF12708	ACMBFV	Burkina Faso	70.8	55.1	74.2	74.7	75.2	69.3	73.3	74.8	73.3	60.3	74.2	9.6	40.1	15.8	46.3	43.3	24.1	52.4	38.0	52.4	38.0	38.0	
AJ427910/1	NV	ACMV	Nigeria	71.5	66.0	75.3	74.3	76.4	72.8	77.7	80.9	73.0	61.0	69.9	63.0	80.9	56.4	46.4	43.5	25.7	52.7	39	52.7	39	39	
HE617299/300	MGTol06	CMMGV	Madagascar	71.6	63.8	75.2	58.6	75.3	69.7	72.4	73.6	73.0	61.0	69.9	64.4	73.9	39.5	47.2	41.6	23.2	55.4	41.8	55.4	41.8	41.8	
JN165089/7	Ghana	EACMCV	Ghana	67.4	62.5	73.5	75.9	70.3	59.7	65.9	69.6	70.8	58.8	70.1	59.3	70.2	9.7	47.1	40.6	23.1	55.1	41.8	55.1	41.8	41.8	
NC_011583/4	Kenya	EACMKV	Kenya	70.8	60.6	74.8	76.3	71.7	61.3	73.2	77.7	74.3	61.0	68.4	62.2	38.7	51.5	48.6	42.2	23.2	56.5	42.2	56.5	42.2	42.2	
JX658685/ JN165087	[MA078s]	EACMMV	Malawi	67.1	61.4	73.0	58.8	75.7	53.8	65.3	29.0	-	-	-	-	39.4	9.9	47.6	41.3	23.8	54.5	41.5	54.5	41.5	41.5	
NC_004674/6	EACMV	EACMV	Uganda	68.2	63.5	73.3	74.7	72.0	63.0	66.4	70.7	75.0	61.8	69.1	64.4	59.0	30.8	48.6	42.5	23.6	56.3	41.8	56.3	41.8	41.8	
AF422174/5	Zanzibar	EACMV	Tanzania	71.3		74.5	76.3	72.5	63.0	72.5	74.5	75.7	62.5	69.9	66.7	70.2	41.9	49.0	41.6	24.3	55.4	41.5	55.4	41.5	41.5	
AJ717535/ AJ704961	UG[K282]	EACMV	Kenya	68.1	62.1	73.6	74.7	72.0	63.0	65.8	70.4	74.8	60.3	69.6	64.4	58.5	30.8	48.4	42.1	23.6	56.4	41.8	56.4	41.8	41.8	
AJ717560/ AJ704944	[K3]	EACMZV	Kenya	70.8	62.6	74.5	77.0	72.3	61.3	71.6	73.6	74.8	61.8	68.9	63.7	70.2	40.7	49.1	41.9	23.8	55.2	41.8	55.2	41.8	41.8	

注: nt 表示核苷酸序列; aa 表示氨基酸序列; - 表示无此信息。

Note: nt means Nucleotide sequence; aa means amino acid sequence; - means no information.



A: 基因间隔区 (IR) 特征; 蓝色框为 AATTGGAGACA 重复序列, 绿色双下划线为 TATABox; 黑线和红线分别为茎环结构的茎和环部分。B: AC1 末端核酸序列 (▲) 的 C→T 的点突变及氨基酸序列 (==) 7 个氨基酸序列的差异。
A: Sequence comparison of intergenic regions; The blue box is the AATTGGAGACA repeat sequence and the green double underline is the TATABox; The black and red underlines are the stem and loop parts of the stem-loop structure, respectively. B: The point mutation of C→T of the nucleic acid sequence at the end of AC1 (▲) and the amino acid sequence (==) 7 amino acid sequence differences.

图 2 SLCMV 中国和部分东南亚分离物 IR、AC1 序列结构比较分析

Fig. 2 Comparative analysis of IR and AC1 sequence structure of SLCMV China isolations and some Southeast Asia

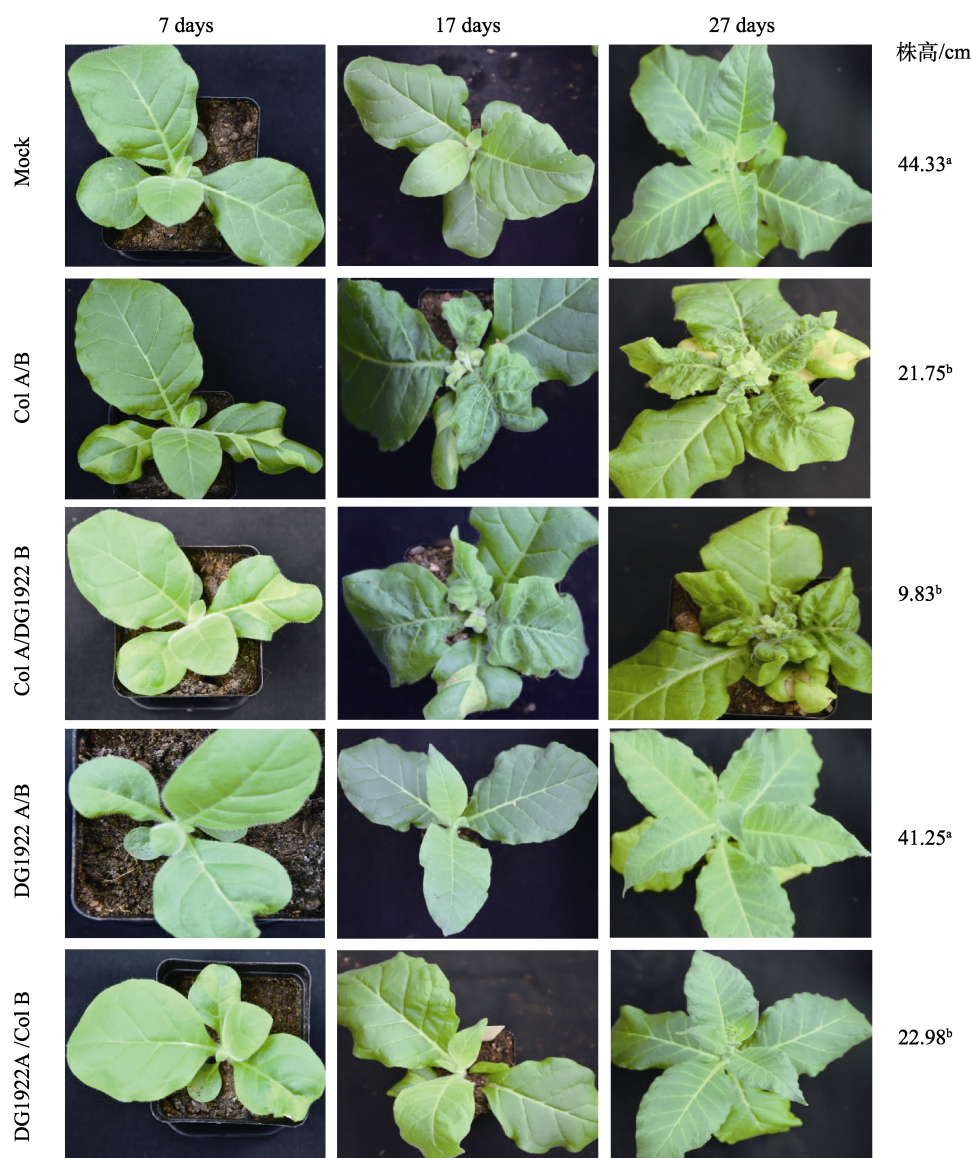
A/B 和 DG1922-A/Col-B 的植株新抽叶片无明显症状, 植株生长正常。第四, 感病症状越典型, 植株生长越矮, 强致病株系的 DNA-A 影响症状产生, 而 DNA-B 则可能协同 DNA-A 组份影响株高, 各重组体接种对株高影响大小顺序为 Col-A/DG1922-B>Col-A/B>DG1922-A/Col-B>DG1922-A/B。值得一提的是, 接种 Col-A/B 和 DG1922-A/Col-B 的植株, 虽然症状表现为明显的典型和不典型, 但是平均株高分别为 21.75 cm 和 22.98 cm, 差异不显著, 接种 DG1922-A/B 对烟草的症状和株高的影响均不明显。分别取接种后的叶片进行 PCR 检测, 结果表明, 仅显示症状的 2 个接种植株 (Col-A/B 和 Col-A/DG1922-B) 能检测到目标病毒的 DNA, 对照及其他组份的接种体植株均未检测到目标病毒。

3 讨论

本研究对木薯地自然发病的木薯花叶病株进行了 PCR 检测、病毒分离物全基因组序列测定及致病性验证。PCR 检测样品存在 SLCMV 侵染, 全基因组序列分析表明, 病毒分离物 Comb、HN2123、HN2124、DG1922 和 GZ1924 都含有双组份 DNA-A 和 DNA-B, 属于典型的“旧世界”烟粉虱传双生病毒。全基因组序列与中国 HN7

MH891840、柬埔寨 Cambodia KT861468 和越南 VTN6 LC312131 三个分离物相似性均在 99.7% 以上, AV2 和 AC2 编码区氨基酸序列的相似性较低为 98.3~98.5%, 其余的均在 99.0% 以上; 与斯里兰卡、印度的部分分离物编码区和氨基酸序列的相似性在 87.0% 以上; 与印度木薯花叶病毒株系的相似性在 86.5%~99.7% 之间; 与其他非洲木薯花叶病毒的相似性均在 80.9% 以下, 具有较强的种系差别。聚类分析能将包括本研究的 5 个 SLCMV 与其他 10 个 CMGs 进行严格的种系分类^[3,9]。

本研究中的 SLCMV 分离物具有 DNA-A 和 DNA-B 双组份结构特征, 编码 8 个 ORFs, 包括 AV2 基因, 属于典型的“旧世界”类病毒^[4]。根据国际病毒分类委员会 (ICTV, 2021) 最新分类, 菜豆金黄色花叶病毒属 (*Begomovirus*) 作为双生病毒科 (*Geminivirus*) 最大的一个属, 具有双组份和单组份的基因组结构特征, 双组份的 begomoviruses 中, 具有 AV2 编码基因的为“旧世界” (Old World) 类病毒, 不具有 AV2 编码的为“新世界” (New World) 类病毒^[4]。DNA-A 链编码的 6 个蛋白分别为 CP 蛋白的 AV1 基因, 参与病毒移动的 AV2 基因, 互补链上编码 Rep 蛋白的 AC1 基因, 编码 TrAP 蛋白的 AC2 基因, 编码 REn 的 AC3 基因和参与症状及病毒系统运动的



株高为接种第 27 天的株高；不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

The plant height is the height on the 27th day post inoculation; Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 3 DG1922A/B 和 ColA/B 侵染性克隆组合及交叉组合接种普通烟的发病症状

Fig. 3 *Nicotiana tabacum* plants infected with infectious clone of ColA/B and DG1922A/B combinations and cross combinations inoculation

AC4 基因；DNA-B 链编码 2 个蛋白，BV1 编码核穿梭蛋白 (NSP)，互补链的 BC1 编码运动蛋白 (MP) [13]。

本研究较为详细地比较了我国 SLCMV 与其他 SLCMV 的主要结构性差异，而且证实了现阶段引起我国木薯斯里兰花叶病毒病的病原主要为 SLCMV 弱致病力株系。双生病毒的 Rep 蛋白由 AC1 编码，是病毒在植物中复制不可缺少的蛋白质，Rep 蛋白通过与宿主蛋白和其他病毒蛋白的相互作用，对病毒 DNA 复制的起始、延伸和终止进行调控 [14]。2020 年 WANG 等 [11] 比较研究了

SLCMV-HN7 和 SLCMV-Colombo 对本氏烟的致病能力，并通过序列比对 AC1 编码 Rep 基因缺失互补突变验证，推测 SLCMV-HN7 致病力弱是由于 Rep 蛋白在 C 末端缺失了 7 个氨基酸，导致其致病力降低。本研究对我国分离物 Comb、HN2123、HN2124、DG1922 和 GZ1924 的序列分析发现，所有分离物都在编码 Rep 蛋白的 AC1 基因序列的 3' 端存在 C→T 点突变，使得 Rep 蛋白的翻译提前终止 (CAA→终止密码子 TAA)，导致 Rep C 末端缺失 7 个氨基酸。试验进一步通过 SLCMV-Colombo 和 SLCMV-DG1922 侵染性克隆

接种普通烟的症状表现,也得到了类似的结果,SLCMV-DG1922 双组份接种烟草 17 d 以后,不能使新抽叶片产生致病症状,而 SLCMV-ColA/B 重组体和 Col A/DG1922 B 交叉重组体则表现出典型的叶片向下翻卷和植株矮化的现象。

中国 SLCMV 分离物的 DNA-A 组份致病力弱,但是 DNA-B 组份可能协同强致病力株系的 DNA-A 组份起到增强其致病性,并对株高产生影响。GenBank 中已经公布的 SLCMV 与 SLCMV-Colombo 分离物在序列上均存在较大差异性,来自柬埔寨、越南和泰国的多个分离物中也存在 Rep 蛋白羧基端的差异,均对当地的木薯产业造成了严重影响^[15]。SAUNDERS 等^[12]研究发现 SLCMV Colombo 的 DNA-A 组份可以单独引起烟草产生症状,而且与 SLCMV DNA/B 和 ICMV DNA/B 的重组体和交叉重组体其致病率和致病力都显著高于 ICMV。PATIL 等^[16]则在用其他的 SLCMV 分离物接种烟草的研究中指出,SLCMV DNA-B 和 ICMV DNA-B 在与 DNA-A 重组接种烟草后,能侵染烟草产生叶片向上翻卷和叶脉增厚的症状特征,是由于接种后会产生一些缺陷 DNA (def DNA),这些 def DNA 可影响(增强或者减弱)双生病毒对烟草的症状反应。而本研究 3 次重复试验都显示交叉组合的 Col A/DG1922 B 表现出更强的致病力和植株矮化现象,表明我国分离物的 DNA-B 组份在 Col DNA-A 致病能力上可能起到了一定的增强作用,但从症状上,均为出现叶片向上蜷曲和叶脉增厚的现象,在 PCR 检测中也未发现 def DNA。

SLCMV 属于双生病毒,在田间木薯的感染经由媒介昆虫烟粉虱传播,病毒与介体和寄主之间的相互影响会导致不同分离物在寄主上的症状表现^[13],WANG^[11]、SAUNDERS^[12]、PATIL^[16]及本研究的接种都仅在烟草叶片上完成,无法通过浸润法接种木薯叶片引起花叶症状。本研究中弱致病分离物 DG1922 双组份 DNA-A/B 在接种烟草后的第 7 天,接种叶片是有症状的,但是在第 17 和 27 天以后,植株就恢复正常生长状态了,且随着老叶掉落,新抽出来的叶片上检测不到病毒,表明弱致病分离物在病毒转运过程中受阻,不能成功从接种点运送到其他叶片上,从而不能成功引起新抽叶片的症状。另一方面,基因和氨基酸序列比对结果显示,相比 AC1 (97.8%) 的基因及氨基酸序列相似性,SLCMV-DG1922 与 SLCMV-

Colombo 还有 5 个基因 (AC2、BC1、AC3、AV1 和 AV2) 序列的相似性较 AC1 低。因此 SLCMV 不同致病力株系在烟草上产生的致病性差异除了 Rep 蛋白羧基端的缺失外,是否可能还存在其他的影响因素,如参与病毒移动的 AV2、参与症状及病毒系统运动的 AC4 基因和编码运动蛋白 (MP) 等;而作为弱致病力株系的我国多个分离物,在我国存在一定的分布 (福建、海南、贵州等地),加上其症状不一定非常典型,增加了其调查和监测的难度,需进一步引起足够重视。

参考文献

- [1] 杨伟. 全球和中国木薯收获面积、产量及发展趋势分析 [EB/OL]. (2020-08-05)[2022-12-14]. <https://www.chyxx.com/industry/1120534.html>.
YANG W. Analysis of global and Chinese cassava harvest area, yield, and development trends [EB/OL]. (2020-08-05) [2022-12-14]. <https://www.chyxx.com/industry/1120534.html>. (in Chinese)
- [2] 羊兴爱, 李开绵, 陈松笔. 30 份木薯种质资源农艺性状和品质特性的表型综合评价[J]. 分子植物育种, 2022, 20(18): 9.
YANG X A, LI K M, CHEN S B. Phenotypic comprehensive evaluation of agronomic and quality characteristics of 30 cassava germplasm resources[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(18): 9. (in Chinese)
- [3] LEGG J P, KUMAR PL, MAKESHKUMAR T, TRIPATHI L, FERGUSON M, KANJU E, NTAWURUHUNGA P, CUELLAR W. Cassava virus diseases: biology, epidemiology, and management.[M]//advances in virus research. Academic Press, 2015: 85-142.
- [4] ZERBINI F M, BRIDDON R W, IDRIS A, MARTIN D P, MORIONES E, NAVAS-CASTILLO J, RIVERA-BUSTAMANTE R, ROUMAGNAC P, VARSANI A. ICTV virus taxonomy profile: geminiviridae[J]. Journal of General Virology, 2017, 98(2): 131-133.
- [5] HANLEY B L, SETTLAGE S B, OROZCO B M, NAGAR S, ROBERTSON D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1999, 18(1): 71-106.
- [6] 时涛, 王国芬, 李超萍, 蔡吉苗, 李博勋, 黄贵修. 柬埔寨木薯主要病害及从中国引进品种花叶病发生情况[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(11): 91-95.
SHI T, WANG G F, LI C P, CAI J M, LI B X, HUANG G X. Occurrence of main cassava diseases in Cambodia and mosaic disease of introduced varieties from China[J]. China Plant Protection, 2019, 39(11): 91-95. (in Chinese)

- [7] WANG D, YAO X M, HUANG G X, SHI T, WANG G F, YE J. First report of *Sri Lankan cassava mosaic virus* infected cassava in China[J]. *Plant Disease*, 2018, 103(6): 1437.
- [8] 时涛, 王国芬, 李超萍, 林兆威, 黄贵修. 木薯花叶病在中国发生的首次报道[J]. *热带农业科学*, 2018, 38(10): 102-103.
SHI T, WANG G F, LI C P, LIN Z W, HUANG G X. First report of *Sri Lankan cassava mosaic virus* infected cassava in China[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2018, 38(10): 102-103. (in Chinese)
- [9] 王国芬, 李超萍, 时涛, 周司珊, 李博勋, 蔡吉苗, 林兆威, 黄贵修. 我国木薯花叶病毒病的发生危害及其病原鉴定[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(6): 1668-1677.
WANG G F, LI C P, SHI T, ZHOU S S, LI B X, CAI J M, LIN Z W, HUANG G X. Distribution and pathogen detection of cassava mosaic virus disease in China[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(6): 1668-1677. (in Chinese)
- [10] 钟静, 赵丽玲, 封庆红, 李婷婷, 丁铭. 侵染木薯的两种单组分菜豆金色花叶病毒属病毒及卫星分子基因组结构特征分析[J]. *植物病理学报*, 2021, 51(2): 171-183.
ZHONG J, ZHAO L L, FENG Q H, LI T T, DING M. Molecular characterization of two monopartite begomoviruses associated satellites from *Manihot esculenta* Crantz[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2021, 51(2): 171-183. (in Chinese).
- [11] WANG D, ZHANG X, YAO X M, ZHANG P, FANG R X, YE J. A 7-amino-acid motif of rep protein essential for virulence is critical for triggering host defense against *Sri Lankan cassava mosaic virus*[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2020, 33(1): 78-86.
- [12] SAUNDERS K, SALIM N, MALI V R, MALATHI V G, BRIDDON R, MARKHAM P G, STANLEY J. Characterisation of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and *Indian cassava mosaic virus*: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite *Begomovirus*[J]. *Virology*, 2002, 293(1): 63-74.
- [13] 邹驰. 双生病毒 β 卫星分子在菜豆金黄色花叶病毒属-植物-烟粉虱三者互作中的机制探究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
ZOU C. The role of geminivirus betasatellite in begomovirus-plant-whitefly tripartite interactions[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021. (in Chinese)
- [14] RIZVI I, CHOUDURY N R, TUTJA N. Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(2): 375-387.
- [15] SIRIWAN W, JIMENEZ J, HEMNIAM N, SAOKHAM K, CUELLAR W J. Surveillance and diagnostics of the emergent *Sri Lankan cassava mosaic virus* (Fam. *Geminiviridae*) in Southeast Asia[J]. *Virus Research*, 2020, 285: 197959.
- [16] PATIL B L, DUTT N, BRIDDON R W, BULL S E, ROTHENSTEIN D, BORAH B K, DASGUPTA I, STANLEY J, JESKE H. Deletion and recombination events between the DNA-A and DNA-B components of Indian cassava-infecting geminiviruses generate defective molecules in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Virus Research*, 2007, 124(1): 59-67.