

富贵竹中杆状 DNA 病毒湖北分离物的分子鉴定

陈 秀, 阮小蕾, 赵 芹, 李华平

(华南农业大学植物病毒研究室, 广州 510642)

摘要: 【目的】证明湖北发病富贵竹上是否存在杆状 DNA 病毒属 (*Badnavirus*) 病毒, 分析来自富贵竹及其它作物 *Badnavirus* 病毒不同分离物间的分子差异。【方法】通过分段克隆测序的方法获得湖北富贵竹中 *Badnavirus* 病毒基因组全序列, 利用 BLAST 工具及其它生物学软件进行序列分析。【结果】富贵竹 *Badnavirus* 病毒湖北分离物基因组为环状结构, 全长 7 522 bp; 基因组正链包含 7 个 ORFs, 推测其编码蛋白的分子量分别为 17.58、14.93、214.77、11.86、11.31、16.12 和 11.00 kD。获得的基因组与福建富贵竹斑驳病毒 (*Dracaena mottle virus*, DrMV) 大小仅相差 9 个核苷酸, 两者基因组核苷酸序列一致率为 99.7%, ORFs 1~3 编码氨基酸序列的一致率分别为 99.3%、100%、99.2%, 而与其它已报道的 14 种 *Badnavirus* 病毒分离物间的核苷酸全序列一致率为 32.0%~44.0%。【结论】叶片表现褪绿斑驳等症状的湖北富贵竹中存在 *Badnavirus* 病毒, 该病毒与 DrMV 为同种病毒, 已报道的富贵竹中 *Badnavirus* 病毒分离物间分子差异非常小, 这与已报道的其它作物中 *Badnavirus* 病毒不同分离物间存在非常大的分子差异不同。

关键词: 富贵竹; 杆状 DNA 病毒; 分子鉴定

Molecular Identification of Badnavirus in *Dracaena sanderiana* from Hubei of China

CHEN Xiu, RUAN Xiao-lei, ZHAO Qin, LI Hua-ping

(Laboratory of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: 【Objective】 In order to identify badnavirus in *Dracaena sanderiana* with typical mottle symptom from Hubei of China, and to compare the genome molecular variation between isolates of *Dracaena sanderiana* badnaviruses, the complete genome sequence of *Dracaena sanderiana* badnavirus Hubei isolate was obtained. 【Method】 The complete genome sequence was got through subsection cloning and sequencing, and the sequences were analyzed with BLAST and other softwares. 【Result】 The complete circular genome nucleotide sequence comprised 7 522bp, which contained 7 open reading frames (ORFs) on the plus-strand that potentially encoded proteins of 17.58 kD, 14.93 kD, 214.77 kD, 11.86 kD, 11.31 kD, 16.12 kD and 11.00 kD. The genome organization was highly similar with the newly reported badnavirus *Dracaena mottle virus* (DrMV). The size of Hubei isolate was 9 nucleotides shorter than DrMV. They shared 99.7% identities over the entire nucleotide sequences, and 99.3%, 100%, 99.2% over the presumed amino acid sequences of ORFs 1-3, respectively. 【Conclusion】 The genome organization and the comparison analysis of sequences between the genomes of badnaviruses revealed that *Dracaena sanderiana* with typical mottle symptom from Hubei of China contained badnavirus, and *Dracaena sanderiana* badnavirus Hubei isolate and DrMV belonged to the same species, and the genome molecular variation between isolates of *Dracaena sanderiana* badnavirus was very small, which was much different from previous results that significant molecular variation existed in badnavirus isolates from different plants.

Key words: *Dracaena sanderiana*; badnavirus; molecular identification

收稿日期: 2008-07-11; 接受日期: 2008-10-08

基金项目: 国家自然科学基金 (30671358)

作者简介: 陈 秀 (1983—), 女, 湖北黄冈人, 博士研究生, 研究方向为植物病毒学。Tel: 020-85280306; E-mail: chenxiuluoyue@163.com。通信作者李华平 (1961—), 男, 湖北天门人, 教授, 研究方向为植物病理学。Tel: 020-85281107; E-mail: huaping@scau.edu.cn

0 引言

【研究意义】富贵竹 (*Dracaena sandieriana*) 是一种常见的室内观赏植物, 也是中国重要的出口花卉之一。2005 年 5 月在湖北一苗木场调查发现富贵竹叶片出现褪绿斑驳和黄化等症状, 怀疑由 *Badnavirus* (杆状 DNA 病毒属) 病毒引起。为从本质上弄清病原, 进而有效防治该富贵竹病害, 本研究对富贵竹 *Badnavirus* 病毒进行了病原的分子检测和鉴定研究。同时鉴于 *Badnavirus* 病毒不同分离物间变异广泛, 本研究将比较分析侵染富贵竹的不同分离物间是否也存在较大的分子差异。【前人研究进展】富贵竹英文俗名 Lucky Bamboo, 又名叶仙龙血树, 为百合科龙血树属 (*Dracaena*) 亚灌木长绿观叶植物, 原产加利群岛及非洲和亚洲热带地区, 20 世纪 80 年代后期大量引进中国^[1-2]。富贵竹上病虫害发生非常少见, 目前为止, 仅在 2007 年有一篇关于中国福建富贵竹上存在 *Badnavirus* 病毒的报道^[3]。*Badnavirus* 属于花椰菜花叶病毒科 (Caulimoviridae), 病毒核酸为环状双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA), 是类逆转录病毒 (pararetrovirus)。病毒粒体为杆状, 大小为 25~30 nm×60~900 nm, 大多数为 30 nm×130 nm^[4]。*Badnavirus* 病毒基因组大小约为 7.1~8.0 kb, 典型的含有 3 个 ORFs^[4], 前两个 ORFs 编码 2 个小蛋白, 第 3 个 ORF 编码一个大的多聚蛋白, 推测 ORF3 编码的多聚蛋白被天冬氨酸蛋白酶水解产生与病毒运动、装配和复制相关的多个小蛋白^[5]。ORF3 上有 3 个高度保守的基序, 它们分别编码天冬氨酸蛋白酶 (aspartic protease, AP)、逆转录酶 (reverse transcriptase, RT) 和 RNA 酶 H (ribonuclease H, Rnase H), 有 3 个较保守的基序, 分别是运动蛋白编码区 (movement protein domain, MP)、富含半胱氨酸的锌指状的 RNA 结合区 (cysteine-rich zinc finger-like RNA-binding region, RB)、第二个富含半胱氨酸编码区 (second cysteine-rich region, 2nd CR)。在基因组正链的基因间隔区有一段保守序列, 是 tRNA^{met} (methionine tRNA) 结合位点^[4-11]。*Badnavirus* 病毒核酸和血清学水平都具有非常高的变异性^[12-18], 不同种的 *Badnavirus* 病毒基因组同源率非常低, 甚至同种的不同 *Badnavirus* 病毒分离物基因组同源率也非常低, 如现已在 GenBank 中登陆的香蕉 *Badnavirus* 病毒 6 个不同分离物间不仅基因组长度可相差近 500 个核苷酸, 而且其序列内部变异达 30% 以上^[19]。*Badnavirus* 病毒已

在香蕉、甘蔗、柑桔、芋头、可可树、薯蓣等多种热带、亚热带经济作物上发现, 其引起的症状多种多样, 包括黄化、花叶、褪绿斑驳、条状褪绿、叶缘卷曲、脉明、脉坏死、肿瘤、叶斑、落叶等^[4,6-11,20]。其中香蕉线条病毒 (*Banana streak virus*, BSV) 已成为一种世界性分布的病毒^[16-17]。*Badnavirus* 病毒主要由带毒寄主植物的无性繁殖材料传播, 传毒昆虫介体主要是粉蚧, 有些可由蚜虫传播^[21-23]。【本研究切入点】基因组序列与结构分析是病毒鉴定最准确和直接的方法。学者们已设计出有效的 *Badnavirus* 病毒基因组保守区序列的 PCR 简并引物^[10,18], 通过 PCR 和克隆的方法获得新 *Badnavirus* 病毒基因组序列是可行的。目前国内外在富贵竹上已报道 *Badnavirus* 病毒的一个福建分离物^[3], 笔者在湖北富贵竹病害调查中, 也发现富贵竹叶片上已产生褪绿斑驳等症状, 由 *Badnavirus* 病毒引起的可能性较大。【拟解决的关键问题】本研究旨在鉴定分析湖北富贵竹上是否也存在 *Badnavirus* 病毒的侵染、以及比较分析现已发现的富贵竹中 *Badnavirus* 病毒不同分离物间是否也存在如已报道的其它作物上 *Badnavirus* 病毒不同分离物间的分子差异。

1 材料与方 法

1.1 植物材料和克隆载体

植物材料: 疑似受杆状 DNA 病毒侵染的表现褪绿斑驳和黄化等症状的富贵竹采自湖北一苗木场 (该苗木场富贵竹为湖北省大冶县本地长期种植), 共采集病样 105 株。以常规 CTAB 法提取富贵竹总 DNA, 于 -20℃ 保存备用。

克隆载体: pMD18-T 载体, 购自大连宝生物生物工程公司。*Escherichia coli* JM109 菌株为华南农业大学植物病毒研究室保存。

1.2 PCR 和克隆

以富贵竹总 DNA 为模板, 根据 *Badnavirus* 病毒核酸序列的保守区域—RT 和 RNase H 编码区的简并引物 BadnaFP 和 BadnaRP^[18], PCR 扩增得片段 1。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 选取 3 个病样扩增产物用 DNA 凝胶回收试剂盒 (天根生物有限公司产品) 回收, 将回收产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化 *E.coli* JM109 后筛选阳性克隆, 取 3 个阳性克隆分别测序。测序由上海英骏生物有限公司在 ABI PRISMTM 377XL、3730 DNA 测序仪上完成。然后根据片段 1 的测序结果设计了正向特异引物 2-FP, 与

Badnavirus 病毒 tRNA^{met} 结合区的保守区的简并引物 BadnaT^[10]PCR 扩增得片段 2, 克隆测序方法同上。再根据片段 1 和片段 2 的序列拼接结果设计上游正向特异引物 FPL 和下游反向特异引物 RPL, 扩增得片段 3。回收片段 3 PCR 产物直接测序(由大连宝生物生物工程公司完成), 然后根据测序结果设计引物 FPL-R, 与引物 FPL PCR 扩增得片段 4; 设计引物 RPL-F, 与引物 RPL PCR 扩增得片段 5; 设计引物 6-FP 和 6-RP PCR 扩增得片段 6, 将扩增片段分别克隆、测序(方法同上)(引物序列见表 1)。

表 1 克隆 DrsBV-HB 基因组序列所用 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in cloning of the DrsBV-HB genome sequence

引物 Primer	序列 Sequence	位置 Position (nt)
BadnaFP	5' ATGCCITTYGGIAARAAYGCICC 3'	5536~5558
BadnaRP	5' CCAYTTRCA IACISICCCCAICC 3'	6088~6111
2-FP	5' CTGTGGCTATCGTCGAGA AAC 3'	5685~5740
BadnaT	5' MYMWNGCTCTGATACCA 3'	1~17
FPL	5' TATCTCGTCCTTCACTCACTAC 3'	7127~7148
RPL	5' ATGGTCCATCTTCCTTTGA 3'	5568~5586
FPL-R	5' CATCGTACCTGCATGTCTAC 3'	1589~1608
RPL-F	5' ACAAGGATGGGCCGAAGAAG 3'	3563~3582
6-FP	5' ACTCGTTCCGGTACATGCTC 3'	1563~1582
6-RP	5' CGTGAGGTTTCCCACGATAGT 3'	3608~3628

I: 稀有碱基次黄嘌呤, Rare base Hypoxanthine; Y: C/T; R: A/G; S: G/C; M: A/C; W: A/T; N: A/G/C/T

片段 1 的 PCR 扩增体系为: 25 μl 反应体系含 20~100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 的模板 1 μl , 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μl , 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs 2.5 μl , 4.6 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的引物各 2 μl , 5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 的 ExTaq 酶 0.2 μl , ddH₂O 14.8 μl ; 扩增参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 从变性到延伸进行 33 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。片段 2 的扩增体系与片段 1 不同的是: 5.7 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的引物 2-FP 1 μl , 5.9 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的引物 BadnaT 2 μl , ddH₂O 15.8 μl ; 扩增参数与片段 1 不同的是: 循环程序中 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2min。片段 3 的扩增体系与片段 1 不同的是: 2 \times GC Buffer I (Mg²⁺ plus) 12.5 μl , 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs 1 μl , 5.7 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的引物各 1 μl , 5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 的 LA Taq 酶 0.2 μl , ddH₂O 8.3 μl ; 扩增参数与片段 1 不同的是: 循环程序中 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5

min, 从变性到延伸进行 30 个循环, 最后 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。片段 4、5、6 的扩增体系和参数与片段 2 基本相同, 不同的是 5.9 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的引物各加 1 μl , 退火温度 52 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 序列分析

用 Contig1 软件进行序列拼接, 在 GenBank 中用 BLAST 工具进行同源序列搜索, 用 ClustalX 和 PHYLIP 3.63 软件包进行序列比对和进化树分析。

2 结果与分析

2.1 富贵竹杆状 DNA 病毒湖北分离物 (DrsBV-HB) 基因扩增和基因组序列

对所有表现病症的富贵竹标样进行片段 1 的 PCR 扩增表明, 在湖北长期种植的发病富贵竹植株中都含有 *Badnavirus* 病毒, 暂命名为富贵竹杆状 DNA 病毒湖北分离物 (*Dracaena sanderiana badnavirus* Hubei isolate, DrsBV-HB)。选取 3 个病样分别进行 PCR 分段克隆和测序。结果表明, 3 个病样克隆和测序的结果完全一致。片段 1 扩增产物(图 1-A) 序列全长 576 bp, 在 GenBank 中进行同源性搜索结果表明, 该片段与其它 *Badnavirus* 病毒相应核苷酸序列一致率为 58.0% (SCBV-IM, AJ297091) ~ 99.6% (DrMV, DQ473478) (结果未显示)。片段 2 扩增产物(图 1-B) 序列全长 1 855 bp, 与片段 1 576 bp 序列进行比对分析, 出现与预期相符的长 427 bp 的重叠部分, 说明片段 2 序列是在片段 1 序列基础上的正确延伸。片段 3 扩增产物大小约为 6 000 bp (图 1-C), 根据片段 3 PCR 产物测序结果设计引物, 对片段 3 进行分段(片段 4~6) 克隆测序验证, 最后得到长为 5 944 bp 的片段, 该片段与片段 1、2 能拼接成环状。

2.2 DrsBV-HB 基因组结构分析

序列拼接得到一环状结构的核苷酸序列(图 2), 全长为 7 522 bp, 该序列(GenBank 登陆号为 EF494181) 正链包含 7 个 ORFs, 前 2 个 ORFs 较小, 第 3 个 ORF 较大, 编码一个多聚蛋白, 这与典型 *Badnavirus* 病毒结构一致。将由 ORF3 推导的氨基酸序列在 NCBI 网站进行 BLASTp 分析, 发现 ORF3 含有与 *Badnavirus* 病毒 ORF3 编码的多聚蛋白一致的高度保守基序, 分别为天冬氨酸蛋白酶 (AP)、逆转录酶 (reverse transcriptase, RT)、RNA 酶 H (RNase H), 还含有几个 *Badnavirus* 病毒较为保守的基序, 分别为运动蛋白区 (MP)、富含半胱氨酸的锌指状的 RNA 结合区 (RB)、第二个富含半胱氨酸区 (2nd CR) (图 2)。

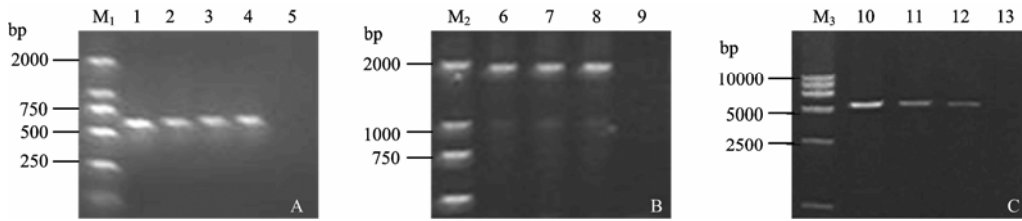
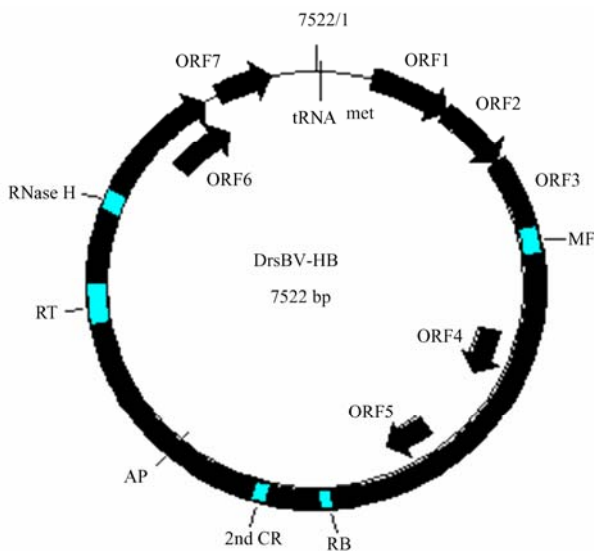


图 1 富贵竹杆状 DNA 病毒湖北分离物基因组 3 个片段 PCR 扩增产物的电泳检测
 M₁、M₂: DL 2000 marker, M₃: DL 15000 marker, 1~4: 片段 1 PCR 扩增产物, 6~8: 片段 2 PCR 扩增产物, 10~12: 3 PCR 扩增产物, 5、9、13: 无症病样 CK
 M₁、M₂ stands for DL 2000 marker, M₃: DL 15000 marker, 1-4: PCR product of segment 1; 6-8: PCR product of segment 2; 10-12: PCR product of segment 3; 5, 9, 13: Healthy CK

图 1 富贵竹杆状 DNA 病毒湖北分离物基因组 3 个片段 PCR 扩增产物的电泳检测

Fig. 1 Agarose electrophoresis analysis for the PCR products of the three segments from *Dracaena sandariana* badnavirus Hubei isolate genome



DrsBV-HB: 富贵竹杆状 DNA 病毒湖北分离物, 每个箭头代表一个 ORF。
 MP: 运动蛋白区, RB: 富含半胱氨酸的锌指状的 RNA 结合区, 2ndCR: 第二个富含半胱氨酸区, AP: 天冬氨酸蛋白酶区, RT: 逆转录酶区, RNase H: RNA 酶 H, 前 3 个为较保守基序, 后 3 个为高度保守基序。
 tRNA^{met}: 甲硫氨酸 tRNA 结合区

DrsBV-HB: *Dracaena sandariana* badnavirus Hubei isolate, one arrow stands for one ORF. MP: Movement protein domain, RB: Cysteine-rich zinc finger-like RNA-binding region, 2ndCR: Second cysteine-rich region, AP: Aspartic protease, RT: Reverse transcriptase, RNase H: Ribonuclease H. The first three ones are relative conserved motifs, the following three ones are highly conserved motifs. tRNA^{met} stands for methionine tRNA binding domain

图 2 DrsBV-HB 基因组结构示意图

Fig. 2 The genome organization of DrsBV-HB

该序列起始位点 (1nt) 位于基因间隔区, 为 tRNA^{met} 结合区, 该区长 18 个碱基 (TGGTATCAGAGCATGGTT), 其中 16 个碱基 (加下划线部分) 与植物胞

质起始 tRNA^{met} 保守区 (ACCATAGTCTCGGTCCAA) 互补, 该区是 *Badnavirus* 病毒所共有的特征。该序列的基因间隔区含有 TATATAA (7 338~7 344 nt) 的 TATA box 结构, 在其下游含有 AATAAA (7 461~7 466 nt) 的 poly (A) 结构, 这些都与已报道的 *Badnavirus* 病毒一致。该序列结构分析结果显示其为一 *Badnavirus* 病毒基因组, 说明发病的湖北富贵竹样品受到 *Badnavirus* 病毒感染。

2.3 DrsBV-HB 与其它 *Badnavirus* 病毒基因组序列的比较分析

将 DrsBV-HB 基因组全序列在 GenBank 中进行 nucleotide blast 分析, 搜索结果均为 *Badnavirus* 病毒的序列。其中与之同源性最高的为富贵竹斑驳病毒 (*Dracaena mottle virus*, DrMV, DQ473478), 二者核苷酸全序列一致率为 99.7%, ORF1、ORF2、ORF3 核苷酸序列一致率分别为 99.8%、99.7%、99.5%, 推导氨基酸序列一致率分别为 99.3%、100%、99.2% (表 2)。对 DrsBV-HB 和 DrMV 的 ORFs 位置及编码蛋白大小的比较表明 DrsBV-HB 基因组结构与 DrMV 高度相似。不同的是 DrsBV-HB ORF3 相对 DrMV 而言缺失了 9 个核苷酸。仔细比对核苷酸序列, 发现 DrsBV-HB 相对 DrMV 在 1 481 nt 处缺失 1 个核苷酸, 在 1 487~1 491 nt 处缺失 5 个核苷酸, 在 5 553~5 555 nt 处缺失 3 个核苷酸, 整个基因组存在 23 个核苷酸的变异, 但并不改变氨基酸编码序列。

DrsBV-HB 除与 DrMV 基因组高度相似外, 还与在 GenBank 中登陆的其它 *Badnavirus* 病毒或病毒不同分离物基因组存在一定相似性 (表 2)。这些病毒包括: 香蕉线条病毒 (*Banana streak virus Acuminata*

Vietnam strain, BSV-AV, NC007003; *Banana streak virus* Acuminata Yunnan strain, BSV-A, DQ092436; *Banana streak virus* isolate GD, BSV-GD, DQ451009; *Banana streak virus* strain Goldfinger, BSV-GF, AY493509; *Banana streak virus* Mysore strain, BSV-My, AY805074; *Banana streak virus* Obino l'Ewai strain, BSV-OL, NC003381)、可可肿枝病毒(*Cacao swollen shoot virus*, CSSV, NC001574)、鸭跖草黄斑驳病毒(*Commelina yellow mottle virus*, ComYMV, X52938)、伽蓝菜顶端斑点病毒(*Kalanchoe top-spotting virus*, KTSV, AY180137)、甘蔗杆状病毒(*Sugarcane bacilliform IM virus*, SCBV-IM, AJ297091; *Sugarcane bacilliform Mor virus*, SCbV-Mor, M89923)、柑桔黄花叶病毒(*Citrus yellow mosaic virus*, CYMV, AF347695)、芋头杆状病毒(*Taro bacilliform virus*, TaBV, AF357836)、薯蓣杆状病毒(*Dioscorea alata bacilliform virus*, DaBV, X94575-X94582; *Dioscorea*

sansibarensis bacilliform virus clone B39.4, DsBV-B39.4, DQ822073)。序列比较结果表明, DrsBV-HB 与这些 *Badnavirus* 病毒基因组核苷酸全序列一致率为 32.0% (BSV-GD) ~44.0% (CYMV), 其中 ORF1、ORF2 和 ORF3 核苷酸序列一致率分别为 22.1% (BSV-AV) ~51.7% (TaBV)、28.3% (TaBV) ~42.3% (CYMV)、38.4% (SCBV-Mor) ~46.6% (CYMV), 推导氨基酸序列一致率分别为 15.6% (ComYMV) ~42.7% (TaBV)、13.9% (SCBV-Mor) ~27.6% (CYMV)、28.3% (SCBV-IM) ~39.8% (TaBV)。ORF3 的一致率总体上比 ORF1 和 ORF2 的一致率高, 这与 *Badnavirus* ORF3 较保守是一致的。基于 DrsBV-HB 和其它 *Badnavirus* ORF3 编码氨基酸序列的进化树[以与 *Badnavirus* 病毒相似的东格鲁病毒属 (*Tungrovirus*) 病毒 RTBV (*Rice tungro bacilliform virus*, AF220561) 为参照]分析结果 (图 3) 显示 DrsBV-HB 与 DrMV 亲缘关系最近, 并且与 TaBV 形

表 2 DrsBV-HB 与其它 *Badnavirus* 病毒核苷酸序列同源性比较

Table 2 Nucleotide identities between DrsBV-HB and other Badnaviruses

病毒 Virus	基因组大小 Genome size (bp)	核苷酸全序列一致率 Nucleotide identity of complete genome (%)	前 3 个 ORFs 核苷酸/氨基酸序列一致率 Nucleotide acid identity of the first 3 ORFs (%)		
			ORF1/P1	ORF2/P2	ORF3/P3
BSV-AV	7801	34.1	22.1/19.1	35.2/20.2	41.2/32.7
BSV-AY	7722	35.0	29.2/24.7	35.2/20.2	41.5/32.5
BSV-GD	6950	32.0	27.5/23.4	29.4/15.9	40.4/33.0
BSV-GF	7263	33.5	31.0/21.3	32.5/21.7	40.3/32.6
BSV-My	7650	34.5	31.0/24.1	36.2/20.2	41.8/34.6
BSV-OL	7389	33.6	27.5/23.4	29.4/15.9	41.3/33.3
ComYMV	7489	34.4	28.9/15.6	32.4/18.0	40.9/31.8
CSSV	7161	41.2	46.6/31.3	28.9/20.5	41.0/36.7
CYMV	7559	44.0	44.2/34.6	42.3/27.6	46.6/36.3
DaBV	7437	41.7	42.6/24.7	37.8/24.2	45.7/37.4
DrMV	7531	99.5	99.7/99.3	99.7/100	99.5/99.1
DsBV-B39.4	7261	39.4	39.5/28.9	36.6/26.6	46.5/37.6
KTSV	7591	34.7	28.2/16.4	32.2/18.1	40.3/31.7
SCBV-IM	7687	33.1	30.0/19.1	33.5/17.4	38.5/28.3
SCBV-Mor	7568	33.3	31.1/20.2	34.0/13.9	38.4/29.4
TaBV	7458	37.1	51.7/42.7	28.3/17.1	41.6/39.8

成一个大的分支。

3 讨论

对 DrsBV-HB 基因组的分析表明其属于 *Badnavirus*,

进而说明叶片表现褪绿斑驳和黄化等症状的湖北富贵竹中存在 *Badnavirus* 病原。DrsBV-HB 的基因组大小和结构与其它已报道的 *Badnavirus* 病毒非常相似, 都具有典型的 3 个 ORFs, 前 2 个 ORFs 编码的蛋白较小,

第 3 个 ORF 编码一个大的多聚蛋白^[6-11]。DrsBV-HB 的 ORF4、ORF5 包含在 ORF3 里面，这与 TaBV 的 ORF4、CSSV 的 ORF4、DsBV-B39.4 的 ORF4、CYMV 的 ORF4 和 ORF5 是相似的^[6,9,11,19]；DrsBV-HB 的 ORF6 大部分与 ORF3 重叠，这与 CSSV 的 ORF5、CYMV 的 ORF6 相似；不同的是 ORF7 在 ORF3 下游，与 ORF3 之间有一段间隔序列，这与 RTBV（与 *Badnavirus* 病毒相似的病毒）的 ORF4 相似^[24]。DrsBV-HB ORF1 和 ORF2 连接处的序列是 ATGA（TGA 是 ORF1 的终止密码子，ATG 是 ORF2 的起始密码子），这与大多数 *Badnavirus* 病毒一致，ORF2 和 ORF3 连接处序列是 TAATG（TAA 是 ORF2 的终止密码子，ATG 是 ORF3 的起始密码子），这与 TaBV、BSV、SCBV 等 *Badnavirus* 病毒一致^[6,8,10]。在 DrsBV-HB 基因组序列的基因间隔区含有 TATATAA（7 338~7 344 nt）的 TATA box 结构，在其下游含有 AATAAA（7 461~7 466 nt）的 poly（A）结构，这些都与已报道的 ComYMV、BSV、CSSV、CYMV、SCBV 和 DaBV 等 *Badnavirus* 病毒一致（TaBV 除外）^[6]。DrsBV-HB 基因组序列含有类逆转录病毒基因间隔区上的保守的植物胞质 tRNA^{met} 结合区，该区区长 18 个碱基，其中 16 个碱基与植物胞质体 tRNA^{met} 互补，这同样揭示了在病毒本身编码的逆转录酶作用下，植物胞质 tRNA^{met} 在 *Badnavirus* 病毒的复制中作为病毒负链合成的引物。

已报道的 *Badnavirus* 病毒种间、分离物间均存在

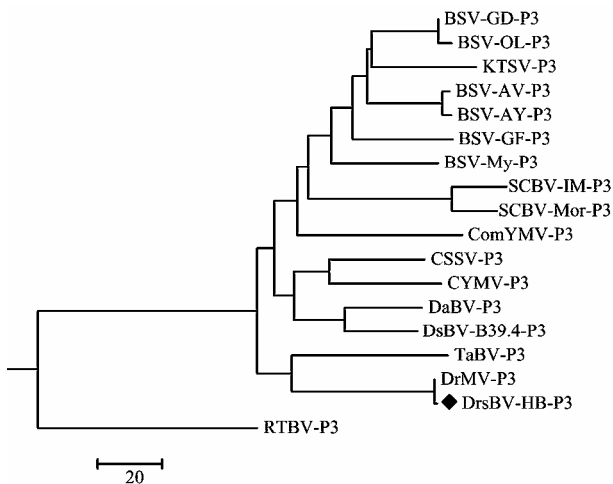


图 3 基于 DrsBV-HB 和其它 *Badnavirus* 病毒 ORF3 编码氨基酸序列的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequences from ORF3 of DrsBV-HB and other badnaviruses

非常高的分子变异。Harper 等^[14-15]通过免疫电镜、ELISA 和分子技术分析了整个乌干达的香蕉产地的 47 份样品，发现 BSV 存在着广泛的变异，序列分析表明，如将保守的复制酶区域的核苷酸同源率低于 80% 定为一个种，那么乌干达至少存在 12 个 BSV 新种。Jaufeerally-Fakim 等对毛里求斯 BSV 的多样性研究发现，BSV 分离物同样存在着广泛的多样性^[16]。本文对 GenBank 中已登陆 6 个的 BSV 不同分离物基因组序列进行比较分析发现 BSV 不同分离物基因组全序列核苷酸变异最高达 49.1%，最低 0.8%（但其基因组长度相差近 500 个核苷酸）（结果未显示）。另外，对已报道的其它 *Badnavirus* 病毒不同分离物基因组序列进行比较分析，结果为甘蔗杆状病毒 2 个分离物（SCBV-IM, AJ297091；SCBV-Mor, M89923）基因组全序列核苷酸一致率为 74.2%，且两者相差 119 个核苷酸；薯蓣杆状病毒 2 个分离物（DaBV, X94575-X94582；DsBV-B39.4, DQ822073）基因组全序列核苷酸一致率为 61.5%，且两者相差 161 个核苷酸；可可肿枝病毒（CSSV）6 个分离物（L14546, AJ534983, AJ608931, AJ609020, AJ781003, AJ609019）基因组全序列核苷酸一致率为 72.8%~98.3%，基因组长度相差 81~291 个核苷酸（结果未显示）。而序列比较分析发现 DrsBV-HB 与新近报道的来源于中国福建的富贵竹 *Badnavirus* 病毒 DrMV 基因组全序列核苷酸一致率为 99.7%，ORFs1-3 推导氨基酸序列一致率分别为 99.3%、100%、99.2%。两者基因组一致率非常高，核苷酸分子变异小于 1%，且两者基因组仅相差 9 个核苷酸，根据病毒分类的一般规则可知二者为同种病毒，并且可能为同一病毒。这与 BSV 等 *Badnavirus* 病毒分离物存在非常高的分子变异不同。这一现象说明 *Badnavirus* 病毒分子变异可能与寄主有关，可能侵染富贵竹的 *Badnavirus* 病毒分子变异都非常小，也可能是 *Badnavirus* 病毒侵染富贵竹的历史时间较香蕉等其它植物短很多，还不足以发生高的分子变异。这一推测还需要更多分离物基因组的比较分析结果来支持，我们准备采集更多不同地域的富贵竹样品做进一步研究。

DrsBV-HB ORFs1-3 推测编码的蛋白大小与其它 *Badnavirus* 病毒非常相似，推测其功能与其它 *Badnavirus* 病毒也相似。*Badnavirus* 病毒 ORF1 和 ORF2 编码蛋白的功能尚不清楚，有报道 ComYMV ORFs1-2 编码的蛋白可能与病毒粒体装配有关^[25]，推测 ORF1 编码的蛋白与粉蚧传毒有关^[5]，CSSV ORF2

的蛋白产物为核酸结合蛋白^[26]。DrsBV-HB ORF3 编码一个推测的 214.8 kD 的多聚蛋白, 包含 *Badnavirus* 病毒基因组的保守区域, 包括天冬氨酸蛋白酶 (AP)、逆转录酶 (RT)、RNA 酶 H (RNase H), 运动蛋白区 (MP)、富含半胱氨酸的锌指状的 RNA 结合区 (RB)、第二个富含半胱氨酸区 (2nd CR), 其中 AP、RT、RNase H 是 *Badnavirus* 病毒基因组的典型保守区, RB 区 (CXCXXCXXXXHXXXXC) 是病毒外壳蛋白的典型区域^[4-11]。下一步可以根据这些推测进一步进行 DrsBV-HB 基因功能的研究。DrsBV-HB 的 ORF4-7 是否为功能蛋白也有待分析和研究。

4 结 论

本研究获得了富贵竹杆状 DNA 病毒湖北分离物 (DrsBV-HB) 的基因组全序列。通过基因组序列和结构分析发现 DrsBV-HB 基因组具有 *Badnavirus* 病毒基因组的一般特征, 并且与中国福建富贵竹上的 *Badnavirus* 病毒 DrMV 基因组全序列核苷酸一致率为 99.7%, 认为二者为同种病毒, 确认了叶片表现褪绿斑驳等症状的湖北富贵竹中存在 *Badnavirus* 病原。与其它植物中 *Badnavirus* 病毒相比, 已发现的富贵竹中 *Badnavirus* 病毒分子差异非常小, 推测 *Badnavirus* 病毒分子变异可能与寄主有关, 也可能与侵染寄主的历史时间长短有关。

References

- [1] 张碧波, 刘舜清. 出口富贵竹的加工与栽培工艺流程. 林业实用技术, 2005, (11): 43.
Zhang B B, Liu Y Q. Process and water foster for exported plant Lucky Bamboo. *Practical Forestry Technology*, 2005, (11): 43. (in Chinese)
- [2] 林加耕, 张树河, 吴维坚, 周龙生. 银边富贵竹组织培养及植株再生. 广西热带农业, 2005, (6): 16-18.
Lin J G, Zhang S H, Wu W J, Zhou L S. Tissue culture and plant regeneration of silver-border Lucky Bamboo. *Guangxi Tropic Agriculture*, 2005, (6): 16-18. (in Chinese)
- [3] Su L, Gao S, Huang Y, Ji C, Wang D, Ma Y, Fang R, Chen X. Complete genomic sequence of *Dracaena* mottle virus, a distinct badnavirus. *Virus Genes*, 2007, 35: 423-429.
- [4] 洪 健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱. 北京: 科学出版社, 2001: 45-46.
Hong J, Li D B, Zhou X P. *Taxonomy and Mapping of Plant Viruses*. Beijing: Science Publishing Company, 2001: 45-46. (in Chinese)
- [5] Tzafirir I, Ayala-Navarrete L, Lockhart B E L, Olszewski N E. The N-terminal portion of the 216-kDa polyprotein of Commelina yellow mottle badnavirus is required for virus movement but not for replication. *Virology*, 1997, 232(2): 359-368.
- [6] Yang I C, Hafner G J, Dale J L, Harding R M. Genomic characterisation of *Taro bacilliform virus*. *Archives of Virology*, 2003, 148: 937-949.
- [7] Briddon R W, Philips S, Brunt A, Hull R. Analysis of the sequence of *Dioscorea Alata Bacilliform Virus*: comparison to other member of the Badnavirus group. *Virus Genes*, 1999, 18 (3): 277-283.
- [8] Geijakes R J, Braithwaite K S, Dale J L, Harding R M. Sequence analysis of an Australian isolate of *Sugarcane bacilliform badnavirus*. *Archives of Virology*, 2002, 147(12): 2393-2404.
- [9] Lot H, Djiekpor E, Jacquemond M. Characterization of the genome of *Cacao swollen shoot virus*. *Journal of General Virology*, 1991, 72 (7): 1735-1739.
- [10] Harper G, Hull R. Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. *Virus Genes*, 1998, 17(3): 271-278.
- [11] Seal S, Muller E. Molecular analysis of a full-length sequence of a new yam badnavirus from *Dioscorea sansibarensis*. *Archives of Virology*, 2007, 152(4): 819-825.
- [12] 费继锋, 肖火根, 李华平, 范怀忠. 香蕉线条病毒研究进展. 病毒学报, 2001, 17 (4): 381-385.
Fei J F, Xiao H G, Li H P, Fan H Z. Research development of *Banana streak virus*. *Chinese Journal of Virology*, 2001, 17(4): 381-385. (in Chinese)
- [13] Geering A D W, McMichael L A, Dietzgen R G, Thomas J E. Genetic diversity among *Banana streak virus* isolates from Australia. *Phytopathology*, 2000, 90(8): 921-927.
- [14] Harper G, Hart D, Moults S, Hull R. *Banana streak virus* is very diverse in Uganda. *Virus Research*, 2004, 100(1): 51-56.
- [15] Harper G, Hart D, Moults S, Hull R, Gering A, Thomas J. The diversity of *Banana streak virus* isolates in Uganda. *Archives of Virology*, 2005, 150 (12): 2407-2420.
- [16] Jaufeerally-Fakim Y, Khoruqdharry A, Harper G. Genetic variants of *Banana streak virus* in Mauritius. *Virus Research*, 2006, 115(1): 91-98.
- [17] Muller E, Sackey S. Molecular variability analysis of five new complete *Cacao swollen shoot virus* genomic sequences. *Archives of Virology*, 2005, 150 (1): 53-66.
- [18] Yang I C, Hafner G J, Reville P A, Dale J L, Harding R M. Sequence diversity of South Pacific of *Taro bacilliform virus* and the development of a PCR-based diagnostic test. *Archives of Virology*,

- 2003, 148(10): 1957-1968.
- [19] 何云蔚, 阮小蕾, 赵 芹, 陈 秀, 刘福秀, 李华平. 香蕉线条病毒遗传进化多样性分析. 中国植物病理学会2007年学术年会论文集, 270-271.
- He Y W, Yuan X L, Zhao Q, Chen X, Liu F X, Li H P.. Analysis of genetic diversity of *banana streak virus*. The Annual Academic Symposium in 2007 Organized by Chinese Phytopathological Society, 270-271. (in Chinese)
- [20] Huang Q, Hartung J S. Cloning and sequence analysis of an infectious clone of *Citrus yellow mosaic virus* that can infect sweet orange via *Agrobacterium*-mediated inoculation. *Journal of General Virology*, 2001, 82(Pt10): 2549-2558.
- [21] Kubiriba J, Legg J P, Tushemereirwe W, Adipala E. Vector transmission of *Banana streak virus* in the greenhouse in Uganda. *Annals of Applied Biology*, 2001, 139(1): 37-43.
- [22] Lockhart B E L, Kiratiya-Angul K, Jones P. Identification of *Piper yellow mottle virus*, a mealybug-transmitted badnavirus infecting *Piper* spp. in Southeast Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 1997, 103(4): 303-311.
- [23] Jones A T, McGavin W J, Geering A D W, Lockhart B E L. Identification of *Rubus* yellow net virus as a distinct badnavirus and its detection by PCR in *Rubus* species and in aphids. *Annals of Applied Biology*, 2002, 141(1): 1-10.
- [24] Nath N, Mathur S, Dasgupta I. Molecular analysis of two complete *Rice tungro bacilliform virus* genomic sequences from India. *Archives of Virology*, 2002, 147(6): 1173-1187.
- [25] Cheng C-P, Lockhart B E L, Olszewski N E. The ORF I and II proteins of *Commelina yellow mottle virus* are virion-associated. *Virology*, 1996, 223(2): 263-271.
- [26] Jacquot E, Hagen L S, Jacquemond M, Yot P. The open reading frame 2 product of *Cocoa swollen shoot badnavirus* is a nucleic acid-binding protein. *Virology*, 1996, 225(1): 191-195.

(责任编辑 毕京翠)