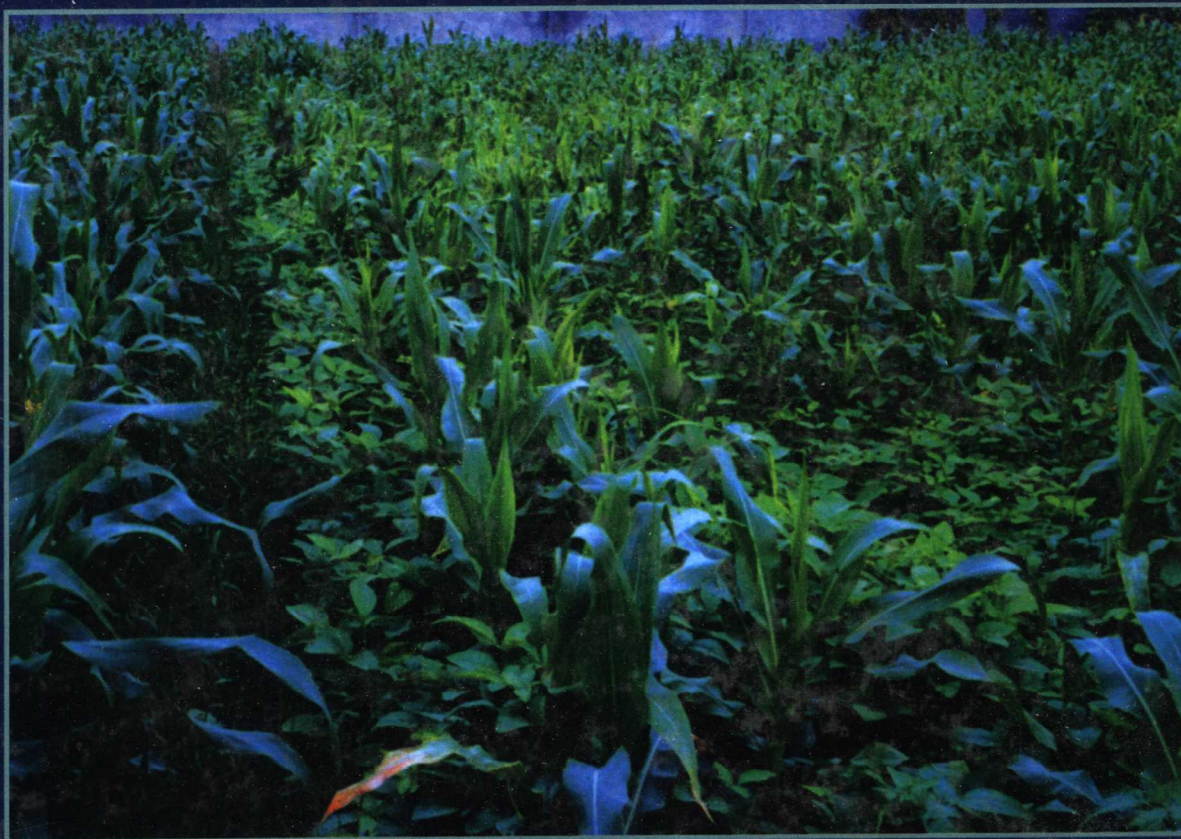


陈 炯 陈剑平 著

植物病毒 种类分子鉴定

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PLANT VIRUSES

By Jiong Chen & Jianping Chen



科学出版社

www.sciencep.com

植物病毒种类分子鉴定

Molecular Characterization of Plant Viruses

陈 炯 陈剑平 著
By Jiong Chen & Jianping Chen

科 学 出 版 社
北 京

内 容 简 介

本书是我国首部植物病毒种类分子鉴定专著。全书共分 17 章,以作者多年来在植物病毒研究领域取得的成果为主写成,共涉及 9 个属 47 种植物病毒,其中 6 种可能为新种。前 15 章描述了这些病毒相应的细胞病理学和病毒的基因组序列特征,并对它们的起源、变异、分化及与相关病毒的系统进化关系做了详细分析;第 16 章介绍了马铃薯 Y 病毒科特异性简并引物 PCR 检测方法和基因组全序列扩增技术,最后 1 章对线状植物病毒的研究概况做了简明的综述。此外,书后还附了有关病毒基因组序列和 68 版制作精美、特征明显的病害症状彩色照片,以及病毒粒子、内含体电子显微镜照片。

本书可供从事植物病毒学、植物病理学、分子生物学、植物检疫和生物技术的科研教学工作、高等院校师生和农业生产技术指导人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物病毒种类分子鉴定/陈炯,陈剑平著. —北京:科学出版社,2003.4

ISBN 7-03-011326-8

I. 植... II. ①陈... ②陈... III. 植物病毒-鉴定
IV. S432.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 022567 号

责任编辑:潘志坚 李 瑾/责任校对:连秉亮

责任印制:刘 学 /封面设计:一 明

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

江苏句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003 年 4 月第 一 版 开本:889×1194 1/16

2003 年 4 月第一次印刷 印张:30 插页 4 1/4

印数:1—700 字数:857 000

定价:150 元

序

植物病毒学的发展已有近百年的历史。植物病毒种类鉴定和分类随着本学科和相关学科的发展,从症状表现、寄主范围、传播途径、粒子形态、理化和血清学特性,进入到基因组数量、序列和结构等分子水平。植物病毒种类鉴定是研究植物病毒病理学的基础,也是研究植物病毒分子生物学和制定防治新策略的基础。可是,我国存在的植物病毒种类至今尚未完全搞清,也没有一本介绍我国植物病毒种类的研究专著。近 10 年来,浙江省农业科学院陈剑平研究员和他的研究生们针对我国效益农业发展、作物相改变以及随之出现新的病毒病害的现状,采用病毒基因组序列比较和系统进化分析的方法,对国内外一些作物上发生的植物病毒种类进行分子鉴定。业已鉴定 9 个属共 47 种植物病毒,其中可能有 6 个植物病毒新种。有些植物上的病毒过去从未作过研究,他们对这些病毒还开展了结构基因组学和分子系统进化树研究。现在,陈炯和陈剑平二位研究员已将他们的研究成果和资料整理成《植物病毒种类分子鉴定》专著,它对植物病毒的种类鉴定、分子生物学、病理学和防治研究都具有重要的理论意义和实际应用价值。

此专著的一个显著特点是设计了马铃薯 Y 病毒科、香石竹潜隐病毒属和葱属 X 病毒属等 8 个重要植物病毒科、属特异性简并 PCR 引物,并建立了这些科、属成员切实可行的 RT-PCR 检测;同时改进了 RACE 技术,建立了马铃薯 Y 病毒属成员的基因组全序列扩增体系。这些成果为这些科、属成员的检测、鉴定和基因组学研究提供了有效的方法,可供植物病毒学、植物检疫、分子生物学等相关领域的研究人员和生产技术指导人员参考。

此专著还提供了作者测定的一些植物病毒基因组序列,多为国际首次测定,已被美国国家生物技术信息中心(NCBI)确定为有关病毒标准序列,部分序列尚没有释放。这是献给同行和社会的一份很有价值的资料,将有助于弄清楚这些病毒的分类以及它们在国内外的分布和变异。

此专著在相当的深度和广度上反映了近几年来我国植物病毒种类鉴定和结构基因组学研究的重大进展,反映了我国年轻一代植物病毒学工作者高昂的研究热情和新的研究思路。毋庸置疑,它的出版对于我们全面系统地认识我国植物病毒种类,植物病毒学及其相关学科的发展,我国植物病毒研究在国际学术界地位的提高,必将产生重要的影响。我作为同行,乐于为其作序,并借此机会谨向此专著的作者表示诚挚的祝贺!

中国科学院院士
中国科学院微生物所研究员



2002 年 10 月 30 日

前 言

以往,植物病毒种类的鉴定和分类主要以形态学、生物学和血清学等特性为依据,但是,由于有关信息的局限,对于有些病毒的鉴定和分类比较困难,因而往往会出现同种异名或异种同名的现象。近20年来,随着分子生物学的迅速发展,植物病毒种类鉴定和分类所赖的信息更全面、更实在,主要包括病毒基因组结构和序列、形态学、生物学和血清学等特性。

根据2000年出版的国际病毒分类委员会(ICTV)第7次报告,迄今世界上已鉴定的植物病毒种类达909种,分属于15个科72个属。我国经过几代植物病毒学工作者的努力,已报道有上百种的植物病毒。但是,由于研究力量、研究手段和有关知识的局限,至今尚不能对我国发生的植物病毒种类有一个全面系统的了解。近年来,由于发展效益农业和调整农业产业结构的需要而开展的国内外广泛引种,导致一些外来病毒的入侵;作物相的改变也引发了病毒种类和地理分布的变化。因此,对我国植物病毒种类进行系统全面的调查,显得非常重要。基于这个想法,近10年来,我和我的研究生们在国家和浙江省有关部门的资助下,应用现代分子生物学技术,在植物病毒种类鉴定和结构基因组学方面做了一些工作。其中陈炯博士(现在浙江省农业科学院农业部动植物病毒学重点实验室工作,下称本实验室)主要开展大麦黄花叶病毒(BaYMV)、小麦黄花叶病毒(WYMV)、燕麦花叶病毒(OMV)、小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)、韭葱黄条病毒(LYSV)、洋葱黄矮病毒(OYDV)、甘蔗花叶病毒(SCMV)、高粱花叶病毒(SrMV)、芋花叶病毒(DsMV)、菜豆普通花叶病毒(BCMV)、大豆花叶病毒(SMV)、菜豆黄花叶病毒(BYMV)、葱黄条病毒(SYSV)、芜菁花叶病毒(TuMV)、百合斑驳病毒(LMoV)、莴苣花叶病毒(LMV)、甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)、马铃薯A病毒(PVA)、小西葫芦黄花叶病毒(ZYMV)、芹菜花叶病毒(CeMV)、水仙迟季黄化病毒(NLSYV)、水仙黄条病毒(NYSV)、水仙病毒1(PY1)、薤花叶病毒(ScaMV)、大蒜潜隐病毒(GarLV)、马铃薯M病毒(PVM)、百合无症病毒(LSV)、水仙普通潜隐病毒(NCLV)、虎眼万年青花叶病毒(OrMV)、薤X病毒(ScaVX)、大蒜X病毒(GarV-X)、大蒜A病毒(GarV-A)、大蒜D病毒(GarV-D)、大蒜E病毒(GarV-E)、雀麦线条花叶病毒(BrStMV)、小麦线条花叶病毒(WSMV)、冰草花叶病毒(AgMV)和黑麦草花叶病毒(RgMV)等的研究;郑滔博士(现在本实验室工作)主要开展大麦和性花叶病毒(BaMMV)、中国小麦花叶病毒(CWMV)、OMV和LMV等的研究;郑红英硕士(现在本实验室工作)主要开展BCMV、ScaMV和GarLV等工作;赵明富博士主要开展ZYMV、马铃薯Y病毒(PVY)、马铃薯S病毒(PVS)、LMoV和LSV等的研究;叶荣博士(现在美国工作)、徐磊硕士(现在美国工作)和杨建平博士(现在美国工作)主要开展CWMV研究;朱洪庆博士(现在法国工作)主要开展长叶车前花叶病毒(RMV)研究;刁爱坡博士(现在英国工作)主要开展土传禾谷类花叶病毒(SBCMV)研究;张恒木博士(现在清华大学工作)主要开展水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)研究;本人除指导学生研究外,还独自开展了土传小麦花叶病毒(SBWMV)、燕麦金色条纹病毒(OGSV)、BaYMV、BaMMV、WYMV、WSSMV、CWMV和SBCMV等病毒的研究,取得了诸多研究结果和相关资料。在研究过程中英国IACR-Rothamsted的MJ Adams博士帮助进行部分病毒序列分析;浙江大学电镜室洪健教授协助拍摄部分病毒的电镜照片;本实验室陈声详研究员提供RBSDV症状和电镜照片;浙江大学生命科学学院陈集双教授提供DsMV电镜照片;山东省农业科学院植物保护所尚佑芬研究员提供了SMV材料和部分照片。有关结果多数已发表在*Virology*、*Journal of General Virology*、*Virus Research*、*Phytopathology*、*European Journal of Plant Pathology*、*Plant Pathology*、*Archives of Virology*、*Journal of Phytopathology*、*Mycological Research*、*Agronomie*、《中国科学》、《科学通报》和《生物化学与生物物理学报》等国内外SCI收录的学术刊物上。在上述涉及9个属共47种植物病毒中,CWMV、SBCMV、GarV-E、ScaVX、

ScaMV 和 NCLV 为本实验室鉴定和命名的可能新病毒, OGSV、OMV、CWMV、SBCMV、LYSV、SCMV、SrMV、DsMV、ScaMV、ScaVX、GarV-E、GarLV 和 RBSDV 的基因组全序列为国际上首次测定与报道, 并被美国国家生物技术信息中心确定为有关病毒标准序列, 其余病毒的序列多数也为国内首次报道。通过这些研究, 我们认识到我国植物病毒不但种类多、变异大、分布广, 而且存在不少新种; 同时由于研究手段和知识的局限, 昔日鉴定的某些病毒种类尚需要作进一步探讨。

在研究过程中, 我们一直得到浙江省农业科学院前任院长陈传群先生和金胜荣先生的关心和支持, 得到田波院士、卢良恕院士、谢联辉院士、范云六院士、陈子元院士、郭予元院士、洪孟民院士、曾士迈院士、李振歧院士、于善谦教授、龚祖坝研究员、周广和研究员、成卓敏研究员和杜继曾教授的鼓励与指教, 以及欧洲共同体、国家科技部、国家农业部、国家教育部、国家人事部、国家自然科学基金委员会、浙江省科技厅、浙江省自然科学基金委员会和浙江省财政厅等资助, 在此一并予以致谢。

为了便于同行之间的交流, 我们将上一阶段的研究成果和资料整理撰写成《植物病毒种类分子鉴定》一书, 并请田波院士作序, 并得到浙江省财政厅出版专项资助。书中病毒的英文全称参照 ICTV 第 7 次报告中的书写规范, 确定成员用斜体, 暂定成员用正体。另外, 根据《现代汉语词典(修订版)》(1998)中的最新规定, “黏菌”中的“黏”不再使用“粘”, 所以本书中的“禾谷多黏菌”中的“黏”字均按此例, 特此说明。希望此书能起到抛砖引玉的作用, 使国内有更多的同行能和我们一起来深入开展这方面的研究, 共同努力, 以进一步探明我国植物病毒的种类、变异及其分布。

限于我们的学识和水平, 加之植物病毒学研究发展快速, 书中一定会存在一些疏漏、不当或舛误之处, 敬请同行专家和广大读者批评指正!

陈剑平

2002 年 10 月 1 日于杭州

浙江省农业科学院

目 录

序

前言

第 1 章 禾谷多黏菌传麦类病毒	1
1.1 大麦黄花叶病毒属(<i>Bymovirus</i>)	2
1.1.1 <i>Bymovirus</i> 属成员病害症状、病毒粒子形态和细胞病理学特征	2
1.1.2 大麦黄花叶病毒(<i>Barley yellow mosaic virus</i> , BaYMV)	2
1.1.3 大麦和性花叶病毒(<i>Barley mild mosaic virus</i> , BaMMV)	6
1.1.4 小麦黄花叶病毒(<i>Wheat yellow mosaic virus</i> , WYMV)和小麦梭条斑花叶 病毒(<i>Wheat spindle streak mosaic virus</i> , WSSMV)	8
1.1.5 燕麦花叶病毒(<i>Oat mosaic virus</i> , OMV)	15
1.1.6 <i>Bymovirus</i> 属成员相互关系及结构特征分析	19
1.2 真菌传杆状病毒属(<i>Furovirus</i>)	26
1.2.1 土传小麦花叶病毒(<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i> , SBWMV)	26
1.2.2 中国小麦花叶病毒(<i>Chinese wheat mosaic virus</i> , CWMV)	28
1.2.3 燕麦金色条纹病毒(<i>Oat golden stripe virus</i> , OGSV)和欧洲小麦花叶 病毒(<i>European wheat mosaic virus</i> , EWMV)	30
1.2.4 <i>Furovirus</i> 属成员特征和系统进化关系	33
1.3 <i>Furovirus</i> 属、 <i>Bymovirus</i> 属成员与禾谷多黏菌介体间的相互关系	37
1.3.1 禾谷多黏菌的分类地位	37
1.3.2 介体与病毒的关系	38
1.3.3 多黏菌传毒相关蛋白	39
1.4 麦类作物对 <i>Furovirus</i> 属和 <i>Bymovirus</i> 属成员的抗性机理研究	43
1.4.1 小麦对 SBWMV 的抗性机理	43
1.4.2 大麦对 BaYMV 和 BaMMV 的抗性机理	43
1.4.3 小麦对 WSSMV 的抗性机理	44
第 2 章 一些十字花科作物上的芜菁花叶病毒基因组差异及同源重组的证据	48
2.1 芜菁花叶病毒(<i>Turnip mosaic virus</i> , TuMV)分离物基因组 3'端序列差异	48
2.2 系统进化树分析	52
第 3 章 马蹄莲和芋艿上芋花叶病毒的分子鉴定和序列差异分析	54
3.1 芋花叶病毒(<i>Dasheen mosaic virus</i> , DsMV)病样	54
3.2 DsMV-M13 普通生物学特征	55
3.3 DsMV-M13 基因组结构	56
3.4 DsMV 分离物序列比较	59
3.5 DsMV-M13 和马铃薯 Y 病毒属(<i>Potyvirus</i>)其他成员的比较	59
第 4 章 长豇豆线状病毒病原的分子鉴定	65
4.1 长豇豆病害线状病毒病原普通生物学特征	65

4.2	菜豆普通花叶病毒(<i>Bean common mosaic virus</i> , BCMV) 长豇豆 R 和 Y 分离物 基因组结构特征	66
4.3	基因组全序列差异	67
4.4	系统进化树分析	68
第 5 章	大豆和半夏上的大豆花叶病毒鉴定和分子差异	72
5.1	大豆花叶病毒(<i>Soybean mosaic virus</i> , SMV) Y5 株系	72
5.1.1	SMV Y5 株系普通生物学特征	72
5.1.2	SMV Y5 株系的基因组结构	73
5.2	SMV 杭州大豆分离物基因组结构	73
5.3	杭州半夏植株上的 SMV 分离物(SMV-P)	73
5.3.1	SMV-P 与 SMV Y5 株系在大豆品种反应上的差异	73
5.3.2	半夏病症、病毒粒子形态学和细胞病理学特征	74
5.3.3	SMV-P 基因组部分序列特征	74
5.4	SMV 分离物基因组 3'端部分序列差异及系统进化树分析	75
5.5	SMV 分离物基因组序列与致病性差异的可能关系	77
第 6 章	玉米和甘蔗花叶病害线状病毒病原的分子鉴定	80
6.1	甘蔗和玉米花叶病害症状、病毒粒子形态和细胞病理学特征	81
6.1.1	病害田间症状	81
6.1.2	病毒粒子形态及细胞病理学特征	81
6.2	病原的分子鉴定	81
6.2.1	基因组全序列及结构特征分析	82
6.2.2	甘蔗花叶病毒(<i>Sugarcane mosaic virus</i> , SCMV)亚组成员序列比较	84
6.2.3	进化树分析和分类学思考	91
6.2.4	SCMV 亚组成员分离物序列重组分析	93
6.3	我国玉米和甘蔗花叶病毒病原鉴定问题思考	93
第 7 章	大蒜线状病毒分子鉴定	96
7.1	大蒜花叶病害症状、病毒粒子形态和细胞病理学特征	96
7.2	香石竹潜隐病毒属(<i>Carlavirus</i>)成员的分子鉴定	97
7.2.1	大蒜潜隐病毒(<i>Garlic latent virus</i> , GarLV)浙江 ZJ1 分离物基因组全序列 测定及其编码蛋白功能推测	98
7.2.2	GarLV 分离物的分子差异	99
7.2.3	GarLV 分离物的系统进化树分析	101
7.3	马铃薯 Y 病毒属(<i>Potyvirus</i>)成员的分子鉴定	103
7.3.1	洋葱黄矮病毒(<i>Onion yellow dwarf virus</i> , OYDV)分离物的分子差异及系统 进化树分析	103
7.3.2	韭葱黄条病毒(<i>Leek yellow stripe virus</i> , LYSV)分离物的分子差异及系统进化 树分析	104
7.3.3	OYDV 和 LYSV 分子差异与地理分布及寄主的可能关系	109
7.4	葱属 X 病毒属(<i>Allexivirus</i>)的分子鉴定	110
7.4.1	大蒜 X 病毒(<i>Garlic virus X</i> , GarV-X)	110
7.4.2	大蒜 E 病毒(<i>Garlic virus E</i> , GarV-E)	112

7.4.3	<i>Allexivirus</i> 属成员基因组编码蛋白功能	112
7.4.4	<i>Allexivirus</i> 属成员编码蛋白的比较及系统进化树分析	113
7.4.5	我国一些大蒜病样中 <i>Allexivirus</i> 属成员的鉴定	119
7.5	注释	119
第 8 章	薤线状病毒的分子鉴定	123
8.1	薤花叶病毒(<i>Scallion mosaic virus</i> , ScaMV)	123
8.1.1	ScaMV 基因组全序列特征	124
8.1.2	<i>Potyvirus</i> 属成员的分子差异及 ScaMV 的分类地位	124
8.2	薤 X 病毒(<i>Scallion virus X</i> , ScaVX)	130
8.2.1	ScaVX 基因组全序列特征	130
8.2.2	马铃薯 X 病毒属(<i>Potexvirus</i>)成员的分子差异及 ScaVX 的分类地位	131
8.3	注释	141
第 9 章	大葱和分葱上的葱黄条病毒分子鉴定和差异分析	143
9.1	症状、病毒粒子形态及细胞病理学特征	143
9.2	葱黄条病毒(<i>Shallot yellow stripe virus</i> , SYSV)基因组部分序列特征	143
9.3	SYSV 分离物分子差异及系统进化关系	144
9.4	侵染葱属植物的 <i>Potyvirus</i> 属成员进化关系	145
第 10 章	莴苣线状病毒的分子鉴定	148
10.1	症状、病毒粒子形态及细胞病理特征	148
10.2	莴苣花叶病毒(<i>Lettuce mosaic virus</i> , LMV)浙江分离物基因组序列特征	148
10.3	LMV 分离物的分子差异	149
10.4	系统进化树分析	150
10.5	注释	151
第 11 章	水仙线状病毒病原的分子鉴定	153
11.1	马铃薯 Y 病毒科(<i>Potyviridae</i>)成员的分子鉴定	153
11.2	<i>Carlavirus</i> 属成员的分子鉴定	155
第 12 章	人参果上的马铃薯 M 病毒分子鉴定	159
12.1	马铃薯 M 病毒(<i>Potato virus M</i> , PVM)人参果分离物基因组序列特征	159
12.2	与其他相关病毒分离物的同源性比较和系统进化分析	160
第 13 章	其他线状植物病毒的分子鉴定	164
13.1	小麦花叶病毒属(<i>Tritimovirus</i>)	164
13.1.1	雀麦线条花叶病毒(<i>Brome streak mosaic virus</i> , BrStMV)	164
13.1.2	小麦线条花叶病毒(<i>Wheat streak mosaic virus</i> , WSMV)	165
13.2	黑麦草花叶病毒属(<i>Rymovirus</i>)	166
13.2.1	冰草花叶病毒(<i>Agropyron mosaic virus</i> , AgMV)	166
13.2.2	黑麦草花叶病毒(<i>Ryegrass mosaic virus</i> , RgMV)	166
13.3	马铃薯 Y 病毒属(<i>Potyvirus</i>)	167
13.3.1	芹菜花叶病毒(<i>Celery mosaic virus</i> , CeMV)	167
13.3.2	马铃薯 A 病毒(<i>Potato virus A</i> , PVA)	168
13.3.3	甘薯羽状斑驳病毒(<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> , SPFMV)	169

13.3.4	菜豆黄花叶病毒(<i>Bean yellow mosaic virus</i> , BYMV)	171
13.3.5	菜豆普通花叶病毒花生条纹株系(<i>Bean common mosaic virus-strain Peanut stripe virus</i> , BCMV-PStV)	172
13.3.6	马铃薯 Y 病毒(<i>Potato virus Y</i> , PVY)	172
13.3.7	百合斑驳病毒(<i>Lily mottle virus</i> , LMoV)	173
13.3.8	小西葫芦黄花叶病毒(<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> , ZYMV)	175
13.4	香石竹潜隐病毒属(<i>Carlavirus</i>)	177
13.4.1	百合无症状病毒(<i>Lily symptomless virus</i> , LSV)	177
13.4.2	马铃薯 S 病毒(<i>Potato virus S</i> , PVS)	178
第 14 章 长叶车前花叶病毒上海分离物的分子特征及其与油菜花叶病毒的相似性		
14.1	长叶车前花叶病毒(<i>Ribgrass mosaic virus</i> , RMV)上海分离物的基因组序列特征	181
14.2	相关病毒序列同源性比较	182
14.3	侵染十字花科植物的烟草花叶病毒属(<i>Tobamovirus</i>)成员系统进化树分析	183
第 15 章 我国玉米粗缩病、小麦绿矮病和水稻黑条矮缩病病原的分子鉴定		
15.1	水稻黑条矮缩病毒(<i>Rice black-streaked dwarf virus</i> , RBSDV)浙江水稻分离物	187
15.1.1	基因组全序列特征	187
15.1.2	RBSDV 基因组各片段的结构及编码蛋白可能功能	188
15.2	我国玉米粗缩病和小麦绿矮病病原均为 RBSDV	195
15.2.1	基因组片段 S7 序列分析	196
15.2.2	基因组片段 S8 序列分析	196
15.2.3	基因组片段 S9 序列分析	197
15.2.4	基因组片段 S10 序列分析	197
15.2.5	系统进化分析	197
15.3	呼肠孤病毒科(<i>Reoviridae</i>)成员系统进化关系	199
第 16 章 马铃薯 Y 病毒属成员的基因组全序列的扩增方法		
16.1	马铃薯 Y 病毒属(<i>Potyvirus</i>)简并引物的设计	202
16.1.1	<i>Potyvirus</i> 属基因组编码蛋白氨基酸序列的多重序列比较分析	203
16.1.2	<i>Potyvirus</i> 属成员简并 PCR 引物的设计	225
16.2	<i>Potyvirus</i> 属成员基因组全序列 PCR 扩增流程	226
16.2.1	模板 RNA 制备	226
16.2.2	第一链 cDNA 合成	226
16.2.3	基因组 RNA 3'端序列的快速扩增	227
16.2.4	简并引物 PCR	229
16.2.5	病毒基因组 RNA 5'端序列的快速扩增(5'-RACE)	229
第 17 章 线状植物病毒概论		
17.1	马铃薯 Y 病毒科(<i>Potyviridae</i>)	232
17.1.1	马铃薯 Y 病毒属(<i>Potyvirus</i>)	235
17.1.2	大麦黄花叶病毒属(<i>Bymovirus</i>)	242
17.1.3	甘薯病毒属(<i>Ipomovirus</i>)	242

17.1.4 桑橙病毒属 (<i>Macluravirus</i>)	242
17.1.5 黑麦草花叶病毒属 (<i>Rymovirus</i>)	243
17.1.6 小麦花叶病毒属 (<i>Tritimovirus</i>)	243
17.2 马铃薯 X 病毒属相似病毒 (“Potex-like” viruses)	243
17.2.1 马铃薯 X 病毒属 (<i>Potexvirus</i>)	243
17.2.2 香石竹潜隐病毒属 (<i>Carlavirus</i>)	246
17.2.3 葱属 X 病毒属 (<i>Allexivirus</i>)	248
17.2.4 凹陷病毒属 (<i>Foveavirus</i>)	249
17.3 发形病毒属 (<i>Capillovirus</i>)	250
17.4 纤毛病毒属 (<i>Trichovirus</i>)	251
17.5 葡萄病毒属 (<i>Vitivirus</i>)	251
17.6 长线形病毒科 (<i>Closteroviridae</i>)	251
17.6.1 长线形病毒属 (<i>Closterovirus</i>)	252
17.6.2 毛形病毒属 (<i>Crinivirus</i>)	253
17.6.3 热休克蛋白 70 类似蛋白	254
17.7 一些病毒编码蛋白的主要功能	254
17.7.1 外壳蛋白 (coat protein, CP)	254
17.7.2 复制酶 (replicase)	255
17.7.3 运动蛋白 (movement protein, MP)	255
17.7.4 辅助蛋白 (auxiliary protein)	256
附录 I : 本研究测定的重要植物病毒序列	262
附录 II : 本研究发表的主要论文	378
附录 III : 本研究获得的资助	385
图版	

TABLE OF CONTENTS

Preface	
Foreword	
Chapter 1	Cereal viruses transmitted by <i>Polymyxa graminis</i> 1
Chapter 2	Genomic variation and the evidence of recombination between isolates of <i>Turnip mosaic virus</i> from some <i>Cruciferae</i> crops 48
Chapter 3	Characterization and sequence analysis of <i>Dasheen Mosaic Virus</i> isolates from <i>Zantedeschia aethiopica</i> and dasheen 54
Chapter 4	Molecular characterization of the filamentous viruses from yardlong bean in China 65
Chapter 5	Characterization and sequence variations of <i>Soybean mosaic virus</i> isolates from soybean and <i>Pinellia ternata</i> (Thunb) Breit. in China 72
Chapter 6	Molecular characterization of the filamentous viruses from maize and sugarcane in China 80
Chapter 7	Molecular characterization of the filamentous viruses from garlic in China 96
Chapter 8	Molecular characterization of the filamentous viruses from scallion in China 123
Chapter 9	Molecular characterization of <i>Shallot yellow stripe virus</i> from welsh onion and bunching onion 143
Chapter 10	Molecular characterization of the filamentous virus from lettuce 148
Chapter 11	Molecular characterisation of the filamentous viruses from <i>Narcissus</i> 153
Chapter 12	Molecular characterization of <i>Potato virus M</i> from <i>Solanum</i> <i>muricatum</i> 159
Chapter 13	Molecular Characterization of Other Filamentous Plant Viruses 164
Chapter 14	Molecular characterization of <i>Ribgrass mosaic virus</i> Shanghai isolate and its similarity to <i>Youcai mosaic virus</i> 181
Chapter 15	Molecular characterization of viral pathogen of maize rough dwarf, wheat green dwarf and rice black-streaked dwarf diseases in China 186
Chapter 16	PCR amplification method of complete genomic sequence of genus <i>Potyvirus</i> 202
Chapter 17	An introduction to the filamentous plant viruses 232
Appendix I	: Sequences of plant viruses determined in this study 262
Appendix II	: Published papers on this study 378
Appendix III	: Sustentation fund for this study 385
Plates	

第 1 章 禾谷多黏菌传麦类病毒

Chapter 1 Cereal viruses transmitted by *Polymyxa graminis*

Abstract: During 1997~1999, the barley and wheat leaves with typical mosaic symptoms of bymoviruses were collected from 25 sites in China and 5 sites in Europe and North America. Partial sequence analysis of the 3'-terminal region (1.2 kb, including the coat protein gene) of RNA1 indicated that all 14 wheat virus isolates from Anhui, Henan, Hubei, Jiangsu, Sichuan, Shandong, Shanxi and Zhejiang provinces were *Wheat yellow mosaic virus* (WYMV) rather than *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV). Results also showed that WYMV was widely distributed in Asia and WSSMV in Europe and North America. Partial sequence analysis of 10 isolates from Zhejiang, Jiangsu and Shanghai indicated that the barley mosaic disease was mainly caused by *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV), and in some cases was co-infected by *Barley mild mosaic virus* (BaMMV). The complete nucleotide sequences of two isolates of WYMV (Ya'an and Yangzhou, where differences in cultivar response occurred) and the Yancheng isolate of BaYMV were determined and compared with published sequences. 5'-UTRs shared higher homology than 3'-UTRs of genus *Bymovirus*. The viral-encoded proteins of genus *Bymovirus* with transmembrane structures were analysed and discussed. Results showed that P2 of RNA2 was directly related to fungal-transmission, but the function of P3 and 14K of RNA1 remained unclear. The complete nucleotide sequence of a UK isolate of *Oat mosaic virus* (OMV) was determined. RNA2 was 2 284 nts in length, substantially smaller than those of other bymoviruses sequenced. It appeared that most of the P2 region had been deleted during repeated mechanical transmission of the isolate. The 3'-UTR of RNA2 was very long (>1.25 kb) and proved to have a 532 nts slightly overlapping repeat. Phylogenetic analysis confirmed that OMV is an independent member of the genus *Bymovirus*. A natural deletion mutant of *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) RNA2 was studied and a hypothesis of deletion mechanism was predicted. The complete nucleotide sequences of both RNAs of *Oat golden stripe virus* (OGSV) (UK isolate) and two furoviruses from wheat in Shandong Province (China), France and Italy were determined. The genome organization of all the viruses was similar to that of SBWMV but there was only 62%~70% nucleotide identity between them. The wheat viruses have been named Chinese wheat mosaic virus (CWMV) and European wheat virus (EWMV) [later renamed as Soil-borne cereal mosaic virus (SBC-MV)] respectively. Phylogenetic analysis of different genome regions supported the recognition of these viruses as distinct members of the genus *Furovirus*. Analysis of the coat protein readthrough domain on RNA2 of all four furoviruses, using several software packages, strongly predicted two mutually compatible conserved transmembrane domains. The second of these domains was either absent or disrupted in the deletion mutants reported for these viruses. It was proposed that these domains may be functionally significant in fungus transmission.

真菌传植物病毒在世界范围内广泛分布,其中由禾谷多黏菌(*Polymyxa graminis*)传播的有大麦黄花叶病毒属(*Bymovirus*)、真菌传杆状病毒属(*Furovirus*)和花生丛簇病毒属(*Pecluvirus*)成员。我国自 20 世纪 70 年代陆续报道发生 *Bymovirus* 属和 *Furovirus* 属成员引起的病害,至今已成为河南、四川、湖北、陕西、山东、江苏、浙江、安徽和上海等省市大、小麦的重要病害,全国发病面积估计达 3 000 万亩(1 亩 = 1/15 hm²),每年减产在 150 亿千克以上。造成病害迅速蔓延、危害日益加重的原因在于:①传播介体禾谷多黏菌具有厚壁休眠孢子,抗逆性极强,且能在土壤中存活许多年,携带的病毒十多年后还具有侵染力;②病毒种类和株系复杂,变异快,病原研究较少,因此很难培育优质、高产且具有广谱抗性的大、小麦品种。因此,这类病毒病害经济意义重大。同时,由于病毒-真菌介体-寄主植物三者关系复杂,也使得这类病毒在学术上具有重要的研究价值。

1.1 大麦黄花叶病毒属(*Bymovirus*)

侵染麦类作物的 *Bymovirus* 属成员主要分布在亚洲、欧洲和北美洲,包括大麦黄花叶病毒(*Barley yellow mosaic virus*, BaYMV)、大麦和性花叶病毒(*Barley mild mosaic virus*, BaMMV)、小麦黄花叶病毒(*Wheat yellow mosaic virus*, WYMV)、小麦梭条斑花叶病毒(*Wheat spindle streak mosaic virus*, WSSMV)和燕麦花叶病毒(*Oat mosaic virus*, OMV),严重危害冬大、小麦、燕麦和黑麦等粮食作物的生产。自20世纪70年代起,这类病害开始在我国主要的冬大、小麦栽种区发生,且发病率和发病面积日趋扩大。近年来,采用分子生物学技术,我们已明确鉴定我国相关病原为 BaYMV(大麦)、BaMMV(大麦)和 WYMV(小麦)。

1.1.1 *Bymovirus* 属成员病害症状、病毒粒子形态和细胞病理学特征

BaYMV 和 BaMMV 侵染的大麦病株症状在12月下旬到次年3月上旬出现,新叶上出现褪绿斑点并逐渐发展成狭长黄色条纹,在某些品种上条纹进一步发展为坏死症状;夏季症状消失,但是会引起植株矮化或分蘖减少。产量损失根据栽种品种、气候和土壤类型等不同而不同,一般在10%~90%。WYMV 侵染的小麦在2月中旬显症,嫩叶上呈现褪绿条纹或黄花叶症状,在老叶上也常出现坏死斑。3~5月间气温升高后,花叶症状逐渐消失,新叶无症,但是植株分蘖减少。通常感病植株麦穗短小,发育不全。WSSMV 症状通常为短褪绿或坏死斑点及梭条状条纹,引起小麦分蘖减少及矮化。温度是该类病害发展及症状表现的主要决定因素。症状表现由于大、小麦品种不同而有所差别:通常感病品种症状严重,而抗病品种则无症或症状轻微。

五种病毒的病毒粒子形态学特征基本一致,线状略弯曲的病毒粒子多具有两个典型峰值:WSSMV 粒子典型长度为275~300 nm 和 600~625 nm,直径为12~13 nm;WYMV 为275~300 nm 和 575~600 nm,直径13~14 nm;BaYMV 为250~350 nm 和 600~700 nm,直径11~12 nm;BaMMV 为270 nm 和 568 nm,直径12 nm;OMV 为650~750 nm,直径12~14 nm。提纯的线状病毒长度常常超过2 000 nm,可能是由于病毒粒子两端线性化聚集引起,且不同提纯方法略有差异。

病毒侵染后引起的细胞病理学特征很相似:最明显的变化是出现大量柱状(风轮状)内含体,横切面呈现为若干个曲臂绕轴伸展;另一个显著特征是膜状体,由许多相互连接的小管组成,切面似蜂巢状,呈三维空间分布,大小不一,内质网呈辐射状与膜状体相连。

1.1.2 大麦黄花叶病毒(*Barley yellow mosaic virus*, BaYMV)

BaYMV 最早于1940年在日本有过报道(Ikata & Kawai, 1940),现今已成为日本传播最广、农业经济上最重要的冬大麦病毒,同时也是我国及欧洲西北部国家(特别是德国、法国和英国)的一个主要大麦病原(Adams, 1998; Bendiek et al., 1993; Huth et al., 1984; Hill & Evans, 1980)。在我国, BaYMV 发生的第一次记录出现于20世纪50年代的浙江省宁海县珠海农场,然而,直到70年代中期该病害才引起人们重视。六七十年代我国在长江中下游及东部沿海地区(包括湖北、安徽、江苏、上海和浙江)因耕作制度改变,大力推广种植大麦品种——早熟3号,该品种生长期短且产量高,但高感 BaYMV,从而迅速导致此类病害在这些地区大面积流行。在欧洲,近年来由于 BaYMV 抗性克服株系(BaYMV-2)的发生,使得原有的抗病品种(携带有 *ym 4* 抗性基因,定位于第3条染色体上)大规模感病,再一次引起了人们的重视。

1.1.2.1 病样信息

1994 年 3 月,从我国 10 个大麦病区采集 BaYMV 病样(表 1-1)。8 个试点(不包括杭州和宁波)广泛分布在中国东部主要大麦栽培区(图 1-1),且病害严重程度和品种反应存在显著差异,表明可能存在 BaYMV 的不同株系(Chen et al. , 1996a; 陈剑平等, 1998)。江苏省盐城 2 病样在 1998 年采集于盐城另一个大麦病区。

表 1-1 我国 BaYMV 分离物来源及国际基因数据库登录号

分 离 物	CP 基因序列	P2 基因部分序列
江苏省阜宁 ^b	AJ224625	AJ224629
江苏省海安 ^b	AJ224628	AJ224630
浙江省杭州 ^b	AJ224619	AJ224631
浙江省嘉善 ^b	AJ224624	AJ224632
江苏省南通 ^b	AJ224621	AJ224633
浙江省宁波	AJ224626	AJ224634
江苏省如东 ^b	AJ224623	AJ224635
上海 ^b	AJ224620	AJ224636
江苏省盐城 ^b	AJ224622	AJ224637
江苏省扬州 ^b	AJ224627	AJ224638
江苏省盐城分离物 2	AJ132268 ^a	AJ132269 ^a

a RNA1 或 RNA2 基因组全序列;b 田间试验点(Chen et al. , 1996a)。

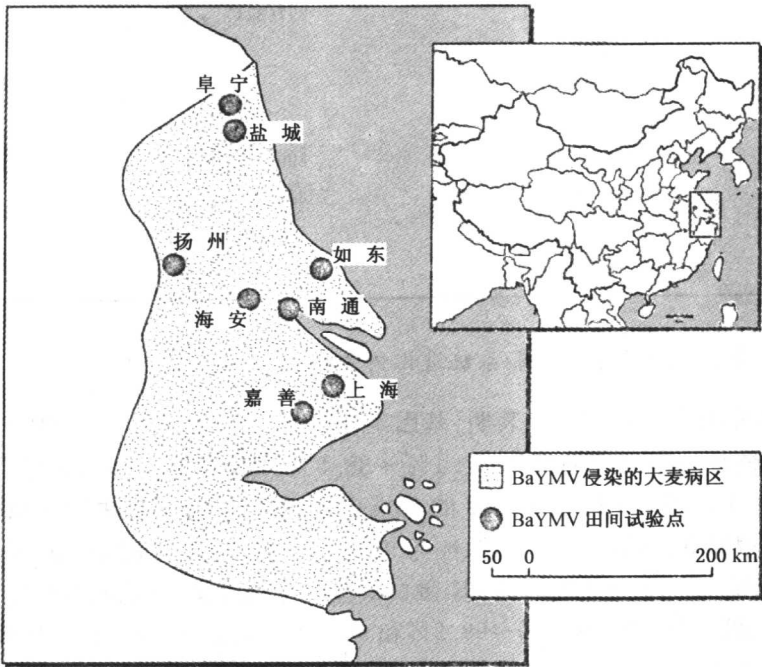


图 1-1 我国 BaYMV 病害分布及田间试验点

1.1.2.2 BaYMV 盐城分离物 2 基因组全序列特征

我国 BaYMV 盐城分离物 2 的 RNA1 和 RNA2 分别由 7 637 个和 3 582 个核苷酸组成,基因组结

构、核酸序列及编码蛋白氨基酸序列都与日本及德国分离物相似(表 1-2, 图 1-2) (Kashiwazaki et al., 1991; Davidson et al., 1991; Peerenboom et al., 1992)。开读框(opening reading frame, ORF) ORF1 编码一个分子质量为 271 kDa 的多聚蛋白, 切割后产生 P3、7K、CI、14K、NIa-VPg、NIa-Pro、NIb 和 CP 等 8 个成熟产物。CI 蛋白 NTP 结合模式 GXXGXGKS 位于第 487~494 位氨基酸, 序列为 GHTGSGKS。NIb 蛋白中 RNA 依赖性的 RNA 聚合酶活性位点的保守模式 SGX₃TX₃NTX_{18~37}GDD 位于第 1 922~1 967 位氨基酸, 序列为 QRX₃TX₃NTX₃₂GDD。ORF2 编码的多聚蛋白分子质量为 98 kDa, 切割后产生 P1 和 P2 两个功能性蛋白。P1 蛋白在第 141~144 位氨基酸处具有一个蛋白酶保守基序 GYCY, P2 蛋白可能与禾谷多黏菌传播有关。

表 1-2 BaYMV 盐城分离物 2 的基因组全序列特征

基因组结构	核苷酸位置/nt	氨基酸数目(分子质量/kDa)	切割位点
RNA1			
5'-UTR	1~171		
多聚蛋白	172~7 404	2 410(270.9)	
P3	172~1 155	328(37.6)	IVLQ/A
7K	1 156~1 353	66(7.3)	YGLQ/A
CI	1 354~3 330	659(73.3)	IGLQ/A
14K	3 331~3 696	122(13.7)	IGLE/G
NIa-VPg	3 697~4 257	187(21.7)	ITLE/A
NIa-Pro	4 258~4 929	224(25.2)	IHMQ/A
NIb	4 930~6 510	527(59.8)	IWLQ/A
CP	6 511~7 401	297(324)	
3'-UTR	7 402~7 637		
RNA2			
5'-UTR	1~154		
多聚蛋白	155~2 827	890(98.2)	
P1	155~919	255(28.0)	GIVG/S
P2	920~2 824	635(70.3)	
3'-UTR	2 828~3 582		

1.1.2.3 BaYMV 分离物的分子差异和系统进化树分析

和德国及日本分离物的序列比较表明, 基因组变异最大的区域为 5'-UTR 区域, 3 个分离物间 RNA1 的 5'-UTR 核苷酸序列同源性为 87.1%~88.9%, RNA2 的 5'-UTR 核苷酸序列同源性为 84.4%~91.6%; 在 P1、P3、CI、NIa、CP 的 5'端以及 RNA1 的 3'最末端区域也存在一些变异。RNA1 的 3'-UTR 很保守, 核苷酸序列同源性为 98.2%~99.1%; 但 RNA2 的 3'-UTR 相对差异较大。10 个不同编码蛋白中, 3 个分离物的 7K 蛋白氨基酸序列完全一致; 较保守的为 NIb 和 HC-Pro 蛋白, 氨基酸序列同源性分别为 98.3%~99.2%和 98.2%。显然, RNA2 的变异要大于 RNA1, 且我国分离物和日本分离物的同源性较高(图 1-2)。

对于我国 10 个 BaYMV 分离物(江苏阜宁、扬州、海安、如东、盐城、南通, 上海, 浙江嘉善、杭州和宁波)的 CP 全长基因和 P2 基因的 3'端约 600 个核苷酸序列的点相似性分析表明, CP 差异主要集中于 N 端, P2 区域差异分布分散(图 1-3)。显然 RNA2 序列的变异要大于 RNA1 序列, 这与 BaMMV 报道结果类似(Peerenboom et al., 1997a)。

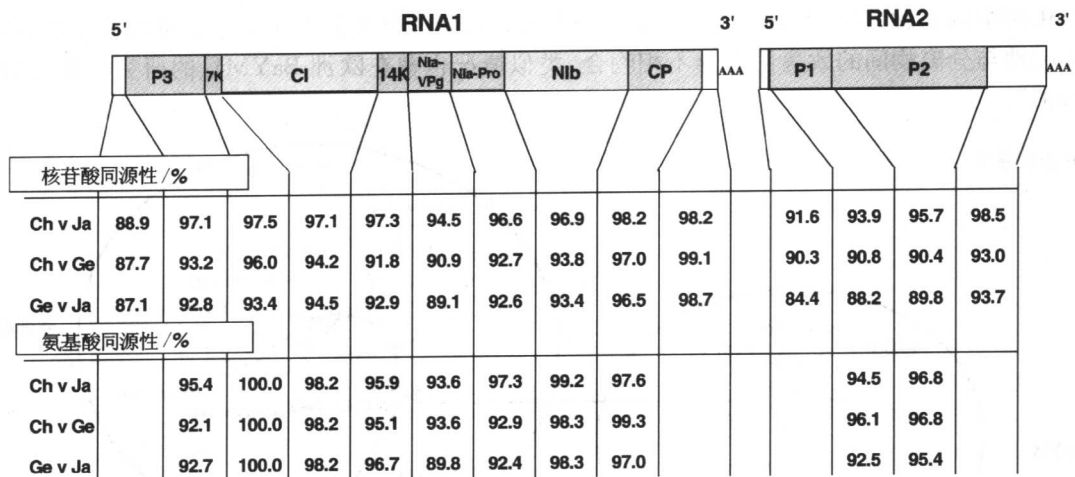


图 1-2 BaYMV 盐城分离物 2(Ch)基因组结构及与德国分离物(Ge)(RNA1: X69757; RNA2: D01099) 和日本分离物(Ja)(RNA1: D01091; RNA2: D01092)各编码区域的同源性百分比

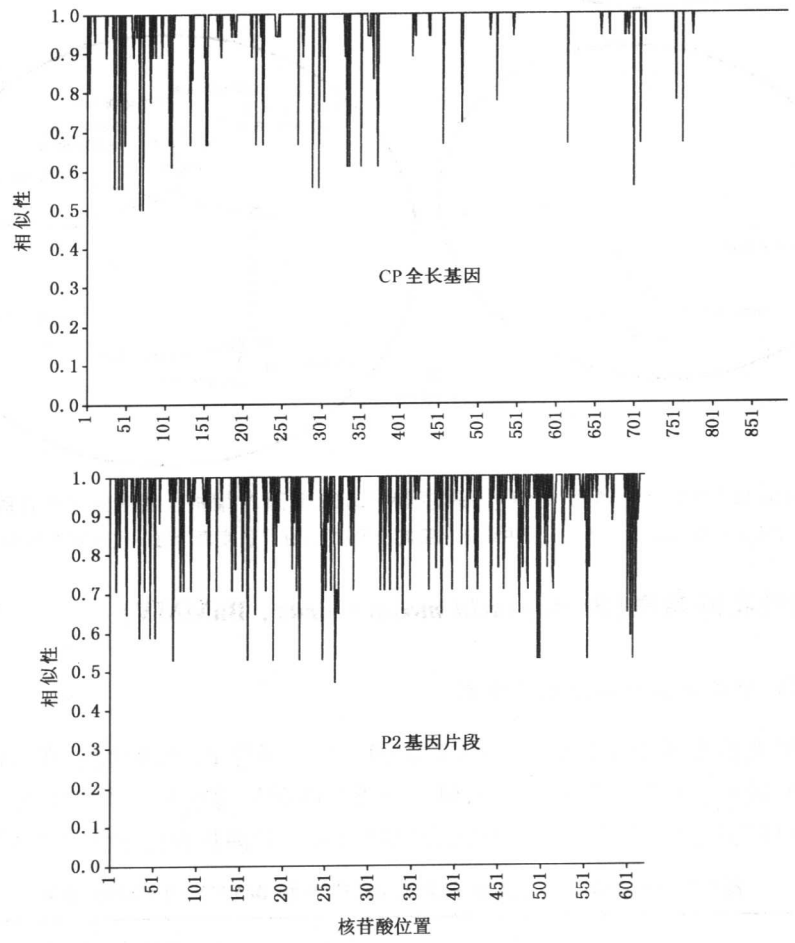


图 1-3 BaYMV 分离物 CP 基因(RNA1)和 P2 基因 5'端(RNA2)核苷酸序列的点相似性分析 采用 GCG Plotsimilarity 软件

核苷酸序列系统进化树分析表明,BaYMV 分离物类群分化与其地理分布紧密相关,亚洲和欧洲分离物均表现为独立分化(图 1-4)。分离物间进化关系在 P2 区域和 CP 区域序列分析中略有差异;