



农业科学技术理论研究丛书

植物病毒： 病理学与分子生物学

ZHIWUBINGDUBINGLIXUEYUFENZISHENGWUXUE

谢联辉 林奇英 吴祖建 著



科学出版社
www.sciencep.com

农业科学技术理论研究丛书

植物病毒：病理学与分子生物学

谢联辉 林奇英 吴祖建 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书汇集了福建农林大学植物病毒研究所 30 年来有关病毒研究的原创性论文,其中包括水稻、甘薯、马铃薯、甘蔗、烟草、番茄、黄瓜、水仙、香蕉、柑橘等植物病毒和其他水体病毒及对虾病毒的病理学及分子生物学的科研成果。

本书可供从事有关病毒病理学、分子生物学、检疫学及生物技术的科研人员、高校师生和农业推广人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物病毒:病理学与分子生物学/谢联辉等著. —北京:科学出版社, 2009

(农业科学技术理论研究丛书)

ISBN 978-7-03-024623-3

I. 植… II. 谢… III. 植物病毒-文集 IV. S432.4-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 080321 号

责任编辑:甄文全/责任校对:钟 洋

责任印制:张克忠/封面设计:北极光视界

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>

双 青 印 刷 厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 6 月第 一 版 开本:A4 (880×1230)

2009 年 6 月第一次印刷 印张:51 3/4

印数:1—1 000 字数:1 450 000

定价:130.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈双青〉)

前 言

福建农林大学植物病毒研究所，其前身为福建农学院植物病毒研究室（1979~1994）、福建农业大学植物病毒研究所（1994~2000），2000 年改为现名。

本所成立 30 年来，先后获得植物病理学科的硕士学位授予点（1984）、博士学位授予点（1990）、博士后科研流动站（1994）、福建省 211 重点学科（1995）、农业部重点学科（1999）和国家重点学科（2001，2006），获准建设福建省植物病毒学重点实验室（1993）、福建省植物病毒工程研究中心（2003）、教育部生物农药与化学生物学重点实验室（2004）、财政部植物病原学特色专业实验室（2007）和农业部亚热带农业生物灾害与治理重点开放实验室（2008）。

30 年来本所以一个中心（培养高层次人才）、三个推动（科技进步、经济发展和社会文明）为宗旨，以“献身、创新、求实、协作”为所训，以“敬业乐群、达士通人”为目标，主要从事以水稻为主的植物病毒和病毒病害的研究，期间随着学科发展和生产实际的需要，拓展了植物病害和天然产物的研究，先后主持和参加这些研究的有谢联辉、林奇英、吴祖建、周仲驹、胡方平、王宗华、欧阳明安、徐学荣和王林萍等教授，参与研究的博士后有蒋继宏等 7 位（已出站 5 位）、博士研究生有周仲驹等 68 位（已毕业 51 位）、硕士研究生有陈宇航等 136 位（已毕业 94 位），发表学术论文 440 多篇，出版专著、教材 6 部，为了及时总结、便于查阅，特将论文部分汇成三集出版，即《植物病毒：病理学与分子生物学》（其中 2001 年上半年以前发表的水稻病毒论文，已于 2001 年 10 月由福建科学技术出版社出版）、《植物病害：经济学、病理学与分子生物学》和《天然产物：纯化、性质与功能》。

考虑到全书格式的一致性，将原文中的作者简介和通讯作者予以删除。在编辑出版过程中，本所何敦春、高芳銮、张宁宁、欧阳明安、徐学荣、陈启建、庄军、出泽宏、蔡丽君、胡梅群、周剑雄、祝雯、丁新伦、林白雪、郑璐平、谭庆伟等同志做了大量工作，并得到科学出版社甄文全博士的指导和支持，谨此致以衷心的感谢！

谢联辉

2009 年 4 月 16 日

目 录

前言

I 综述·评论

植物病毒分子群体遗传学研究进展	2
植物病毒 RNA 间重组的研究现状	8
植物呼肠孤病毒的基因组结构和功能	14
呼肠孤病毒科的系统发育分析	19
黄化丝状病毒属 (<i>Closterovirus</i>) 病毒及其分子生物学研究进展	24
纤细病毒属病毒的分子生物学研究进展	31
纤细病毒属病毒病害特异蛋白的研究进展	37
幽影病毒属病毒的研究现状与展望	41
幽影病毒引起的几种主要植物病害	47
农杆菌介导的病毒侵染方法在禾本科植物转化上的研究进展	52
介体线虫传播植物病毒专化性的研究进展	56
植物病毒疫苗的研究与实践	62
PCR-SSCP 技术在植物病毒学上的应用	70
PCR-SSCP 分析条件的优化	76
酵母双杂交系统在植物病毒学上的应用	80
天然砂与修饰砂对病毒的吸附与去除	85
灰飞虱胚胎组织细胞的分离和原代培养技术	91
一种实用的双链 RNA 病毒基因组克隆方法	96
类病毒的分子结构及其复制	99
Pathway tools 可视化分析水稻基因表达谱	104

II 水稻病毒

我国水稻病毒病的回顾与前瞻	112
福建水稻病毒病的诊断鉴定及其综合治理意见	113
热带水稻和豆科作物病毒病国际讨论会简介	115
水稻矮缩病毒的检测和介体传毒能力初步分析	118
水稻矮缩病毒的外壳蛋白的序列变异	122
单引物法同时克隆 RDV 基因组片段 S11、S12 及其序列分析	123
水稻瘤矮病毒基因组 S8 片段全序列测定及其结构分析	127
水稻瘤矮病毒基因组 S9 片段的基因结构特征	132
水稻草矮病毒基因组 ν RNA3 NS3 基因的克隆、序列分析及原核表达	136
农杆菌介导的水稻草矮病毒 NS6 基因的转化	143
农杆菌介导获得转水稻草矮病毒 NS3 基因水稻植株	148
转 RGSV-SP 基因水稻植株的再生	153
水稻草矮病毒在水稻原生质体中的表达	156
水稻齿叶矮缩病毒的研究进展	160

水稻条纹病毒的分子生物学·····	165
Molecular variability in coat protein and disease-specific protein genes among seven isolates of <i>Rice stripe virus</i> in China ·····	174
寄主植物与昆虫介体中水稻条纹病毒的检测·····	175
我国水稻条纹病毒 7 个分离物的致病性和化学特性比较·····	180
我国水稻条纹病毒种群遗传结构初步分析·····	185
我国水稻条纹病毒 RNA3 片段序列分析——纤细病毒属重配的又一证据 ·····	187
水稻条纹病毒 RNA4 基因间隔区序列分析——混合侵染及基因组变异证据 ·····	194
水稻条纹病毒 NS2 基因遗传多样性分析 ·····	202
水稻条纹病毒中国分离物和日本分离物 RNA2 节段序列比较 ·····	208
水稻条纹病毒中国分离物和日本分离物 RNA1 片段序列比较 ·····	215
中国水稻条纹病毒两个亚种群代表性分离物全基因组核苷酸序列分析·····	220
水稻条纹病毒病害特异性蛋白基因克隆及其与纤细病毒属成员的亲缘关系分析·····	226
水稻条纹病毒云南分离物 CP 基因克隆及序列比较分析 ·····	228
利用酵母双杂交系统研究水稻条纹病毒三个功能蛋白的互作·····	232
水稻条纹病毒胁迫下抗病、感病水稻品种胼胝质的沉积·····	239
RSV 编码的 4 种蛋白在“AcMNPV-sf9 昆虫细胞”体系中的重组表达 ·····	243
GFP 与水稻条纹病毒病害特异蛋白的融合基因在 sf9 昆虫细胞中的表达·····	250
水稻条纹病毒 CP、SP 进入叶绿体与褪绿症状的关系 ·····	256
水稻条纹病毒 CP、SP 基因克隆及其植物表达载体的构建·····	257
水稻条纹病毒 CP、SP 在水稻原生质体内的表达·····	258
实时荧光定量 PCR 检测 RSV 胁迫下抗、感水稻中与脱落酸相关基因的差异表达·····	259
水稻条纹病毒 CP 与叶绿体 Rubisco SSU 引导肽融合基因的构建及其原核表达 ·····	265
利用免疫共沉淀技术研究 RSV CP、SP 和 NSvc4 三个蛋白的互作情况 ·····	273
水稻条纹病毒与水稻互作中的生长素调控·····	279
应用 real-time RT-PCR 鉴定 2 个水稻品种（品系）对水稻条纹病毒的抗性差异 ·····	286
水稻条纹病毒胁迫下的水稻全基因组表达谱·····	290
Anti-viral activity of <i>Ailanthus altissima</i> crude extract on <i>Rice stripe virus</i> in rice suspension cells ·····	299
Genetic diversity and population structure of <i>Rice stripe virus</i> in China ·····	303
Pc4, a putative movement protein of <i>Rice stripe virus</i> , interacts with a type I DnaJ protein and a small Hsp of rice ·····	316

Ⅲ 甘薯病毒

甘薯羽状斑驳病毒研究进展·····	328
甘薯脱毒研究进展·····	334

Ⅳ 马铃薯病毒

福建马铃薯 A 病毒的分子鉴定及检测技术 ·····	340
马铃薯 A 病毒 CP 基因的克隆与序列分析 ·····	346
福建马铃薯 S 病毒的分子鉴定及发生情况 ·····	350
马铃薯 S 病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达 ·····	355
核酸斑点杂交检测马铃薯 X 病毒 ·····	359
马铃薯卷叶病毒福建分离物的 CP 基因克隆与序列分析·····	362

V 甘蔗病毒

福建蔗区甘蔗斐济病毒的鉴定·····	368
甘蔗褪绿线条病的研究 I. 病名、病状、病情和传播·····	371
甘蔗褪绿线条病的研究 II. 病原形态及其所致甘蔗叶片的超微结构变化·····	375
甘蔗花叶病毒株系研究初报·····	378
甘蔗花叶病的发生及甘蔗品种的抗性·····	379
甘蔗叶片感染甘蔗花叶病毒后 ATPase 活性定位和超微结构变化 ·····	384
甘蔗花叶病在钾镁不同施用水平下对甘蔗产质的影响·····	387
甘蔗花叶病毒的提纯及抗血清制备·····	388
利用斑点杂交法和 RT-PCR 技术检测甘蔗花叶病毒 ·····	391
甘蔗花叶病毒 3'端基因的克隆及外壳蛋白序列分析比较 ·····	395

VI 烟草病毒

福建烟草病毒病原鉴定初报·····	404
福建烟草病毒种群及其发生频率的研究·····	405
烟草花叶病毒运动蛋白的表达及特异性抗体制备·····	411
TMV 诱导心叶烟细胞程序性死亡 ·····	416
TMV 在不同水体与温度条件下的灭活动力学 ·····	417
烟草花叶病毒复制酶介导抗性的研究进展·····	422
烟草花叶病毒弱毒株的致弱机理及交互保护作用机理的研究现状·····	427
烟草花叶病毒弱毒株的筛选及其交互保护作用·····	435
烟草花叶病毒强、弱毒株对烟草植株的影响·····	441
烟草花叶病毒及其弱毒株基因组的 cDNA 克隆和序列分析 ·····	447
烟草病毒带毒种子及其脱毒处理·····	453
烟草品种对病毒病的抗性鉴定·····	456
烟草花叶病的有效激抗剂的筛选·····	458
激抗剂协调处理对烟草花叶病的防治效应·····	460
烟草扁茎簇叶病的病原体·····	464

VII 番茄病毒

福建番茄病毒病的病原鉴定·····	466
-------------------	-----

VIII 黄瓜病毒

黄瓜花叶病毒分子生物学研究进展·····	470
黄瓜花叶病毒亚组研究进展·····	475
我国黄瓜花叶病毒及其病害研究进展·····	484
应用 A 蛋白夹心酶联免疫吸附法鉴定黄瓜花叶病毒血清组 ·····	492
黄瓜花叶病毒两亚组分离物寄主反应和血清学性质比较研究·····	497
黄瓜花叶病毒亚组 I 和 II 分离物外壳蛋白基因的序列分析与比较·····	503
侵染西番莲属 (<i>Passiflora</i>) 植物的五个黄瓜花叶病毒分离物的特性比较 ·····	510
黄瓜花叶病毒 M 株系 RNA3 的变异分析及全长克隆的构建 ·····	516
黄瓜花叶病毒三个毒株对烟草细胞内防御酶系统及细胞膜通透性的影响·····	522
黄瓜花叶病毒西番莲分离物 RNA3 的 cDNA 全长克隆和序列分析 ·····	528

黄瓜花叶病毒香蕉株系 (CMV-Xb) RNA3 cDNA 的克隆和序列分析	536
Evaluation of biological and genetic diversity of natural population of <i>Cucumber mosaic virus</i> in California and their possibility to overcome transgenic resistance	541

IX 水仙病毒

水仙病毒病原鉴定初报	544
中国水仙病毒病的病原学研究	545
水仙潜隐病毒病原鉴定	546
水仙上分离出的烟草脆裂病毒的鉴定	550
水仙病毒血清学研究 I. 水仙花叶病毒抗血清的制备及其应用	554
水仙病毒病及其研究进展	559

X 香蕉病毒

香蕉束顶病的病原研究	564
香蕉束顶病的研究 I. 病害的发生、流行与分布	568
香蕉束顶病的研究 II. 病害的症状、传播及其特性	573
香蕉束顶病的研究 III. 传毒介体香蕉交脉蚜的发生规律	577
香蕉束顶病的研究 IV. 病害的防治	583
香蕉束顶病的研究 V. 病株的空间分布型及其抽样	589
香蕉束顶病毒的提纯和血清学研究	594
香蕉束顶病毒株系的研究	599
我国香蕉束顶病的流行趋势与控制对策	603
香蕉束顶病毒的寄主及其在病害流行中的作用	609
香蕉束顶病毒基因克隆和病毒检测	614
香蕉束顶病毒分子生物学研究进展	615

XI 柑橘病毒

Detection of a pathogenesis related protein associated with <i>Citrus tristeza virus</i> infection in mexican lime plants	622
Development of western blotting procedure for using polyclonal antibodies to study the proteins of <i>Citrus tristeza virus</i>	628
<i>In situ</i> immunoassay for detection of <i>Citrus tristeza virus</i>	634
Prereaction of <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV) specific antibodies and labeled secondary antibodies increases speed of direct tissue blot immunoassay for CTV	641
橘蚜传播柑橘衰退病毒的研究进展	649

XII 其他病毒

玉米线条病毒 V1 基因产物的检测及其在大肠杆菌中的表达	658
从福建省杂草赛葵上分离到两种双生病毒	663
Molecular characterization of <i>Malvastrum leaf curl Guangdong virus</i> isolated from Fujian, China	668
Molecular characterization of a distinct <i>Begomovirus</i> species isolated from <i>Emilia sonchifolia</i>	673
Mixed infection of two begomoviruses in <i>Malvastrum coromandelianum</i> in Fujian, China	678
花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的基因表达调控	682
福建长汀小米椒病毒病的病原鉴定	689

西番莲死顶病病原病毒鉴定·····	695
RT-PCR 检测南方菜豆花叶病毒·····	702
南方菜豆花叶病毒菜豆株系在非寄主植物豇豆中的运动·····	705
南方菜豆花叶病毒 (SBMV) 两典型株系特异 cDNA 和 RNA 探针的制备及应用 ·····	709
First report of <i>Ageratum yellow vein virus</i> causing tobacco leaf curl disease in Fujian Province, China ·····	713
Molecular variability of <i>Hop stunt viroid</i> : identification of a unique variant with a tandem 15-nucleotide repeat from naturally infected plum tree ·····	715
Identification and characterization of a new coleviroid (CbVd-5) ·····	724
Molecular characterization of <i>grapevine yellow speckle viroid-2</i> (GYSVd-2) ·····	731
Genetic diversity and phylogenetic analysis of <i>Australian grapevine viroid</i> (AGVd) isolated from different grapevines in China ·····	739
百合扁茎簇叶病的病原体观察·····	747
水体环境的植物病毒及其生态效应·····	748
PV ₁ 、B. fp 在不同水样及温度条件下的灭活动力学研究 ·····	754
Two novel bacteriophages of thermophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal fields ·····	760
Deep-sea thermophilic <i>Geobacillus</i> bacteriophage GVE2 transcriptional profile and proteomic characterization of virions ·····	766
福州地区对虾暴发性白斑病的病原鉴定·····	779
福州地区对虾白斑病病毒的超微结构·····	784
对虾白斑病毒病的流行病学·····	791
附录·····	795

I 综述·评论

评述有关植物病毒病理学和分子生物学的研究现状、研究进展、问题和展望。主要包括：①植物病毒的分子群体遗传学、RNA 间重组和疫苗研制；②几个植物病毒属——植物呼肠孤病毒属 (*Phytoreovirus*)、黄化丝状病毒属 (*Closterovirus*)、纤丝病毒属 (*Tenuivirus*)、幽影病毒属 (*Umbravirus*) ——病毒的研究动态；③介体传播植物病毒的专化性；④植物病毒研究的若干方法与技术；⑤类病毒的分子结构及其复制。

植物病毒分子群体遗传学研究进展*

魏太云, 林含新, 谢联辉

(福建农林大学植物病毒研究所, 福建福州 350002)

摘要: 植物病毒群体遗传学的 2 个中心任务是定量描述病毒种群内的遗传变异及阐明该变异的机制。植物病毒自然种群遗传结构通常包括 1~2 种优势的序列变异类型和一些低频率的序列变异类型, 即具有准种遗传结构特征。植物病毒种群遗传多样性水平和病害暴发以及流行时间有一定的相关性。另外, 植物病毒种群遗传结构中还存在超种群类型。一些生物学特性可能取决于准种内的不同变种间的相互作用。如决定适应能力、寄主范围及致病性变异等。植物寄主—昆虫介体—病毒三者间的协同进化关系是植物病毒种群遗传结构保存相对稳定的主要因素。描述植物病毒种群遗传结构特征为构建更有效的病害防治策略提供了依据。

关键词: 植物病毒; 种群遗传; 准种; 互作

中图分类号: S432.4⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7817 (2003) 04-0453-05

Advance in molecular population genetics of plant virus

WEI Tai-yun, LIN Han-xin, XIE Lian-hui

(Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: The two main objectives of population genetics of plant virology are describing the genetic variation in virus population and their mechanisms. Generally, genetic structure of natural population of plant virus includes a main sequence type and many minor quantity sequence types caused by variation. That is characterized as quasispecies genetic structure. The level of population genetic diversity of plant virus is related to the outbreak of viral disease and its epidemic. Furthermore, the metapopulation structure also exists in natural population genetic structure of plant virus. Different sequences and their proportion in quasispecies may be some implications on biological function such as determining adapting ability, host range and pathogenicity variation and so on. The evolutionary relationship among plant host-insect vector-virus cooperating with each other is the main factor that leads to the relative stabilization of population genetic structure of plant virus. Describing the population genetic structure of plant virus can provide effective control strategy for virus disease.

Key words: plant virus; population genetics; quasispecies; interaction

福建农林大学学报 (自然科学版), 2003, 32 (4): 453-457

收稿日期: 2002-07-31

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30000002)、高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金 (200150)

在农业生态系统中,利用抗病品种控制植物病毒病害是针对病毒群体而言的。病毒群体是变化的,会随着人们的生产活动及其生存环境的变化而变化。因此,揭示植物病毒群体遗传结构及其动态演化规律,弄清两者相互作用的群体遗传机制,并从寄主—病毒互作的角度研究病毒在不同环境条件下适应寄主而导致寄主抗性丧失的原因,对植物病毒病害的流行监测和生态控制具有重要的指导意义。

群体遗传学的2个中心任务是定量描述种群内的遗传变异并阐明该变异的机制^[1]。而病毒被认为是研究群体遗传学的最佳材料,这是因为:①病毒是地球上目前所有已知生物中结构最为简单的微生物;②病毒,特别是RNA病毒,在所有生物中具有最快的变异速度,这主要是因为RNA病毒依赖于RNA的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)或复制酶缺乏校正功能,从而导致RNA基因组在复制过程中不可避免地频繁出错。据估计,RNA病毒的突变率约为每个复制循环 10^{-4} nt^[2]。

近10年来国外学者对植物病毒群体遗传学进行了大量的研究。然而,我国这方面的研究才刚开始。

1 植物病毒种群遗传结构分析方法

病毒种群遗传多样性可定义为,从种群中随机获取2个不同类型分离物的概率。估计病毒种群遗传多样性值至少需要3个参数;种群内单元型(haplotype)的数目、不同单元型在种群内的频率和单元型间的遗传距离。而植物病毒自然种群遗传结构内单元型的数目和频率2个参数通常采用以下方法来定性、定量评价:①dsRNA电泳图谱分析;②T1核酸酶酶切后寡核苷酸的双向电泳图谱分析,也称为RNA指纹;③核酸酶保护分析(ribonuclease protection assay, RPA);④限制性酶切图谱分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP);⑤单链构象多态性分析(single-strand conformation polymorphisms, SSCP);⑥异源双链分析(heteroduplex mobility assay, HMA);⑦变性梯度凝胶电泳分析(temperature-gradient gel electrophoresis, TGGE);⑧核苷酸序列分析。

这些方法中,核苷酸序列分析是最精确的方法,但种群结构分析需大量样品,而序列测定既耗

时又昂贵,因此仅作为一种必要的补充手段。SS-CP和RPA由于兼具快速简单、灵敏且价格低廉等优点,已在植物病毒种群遗传多样性分析中得到广泛应用,但RPA偏向于在分析卫星病毒或卫星RNA中应用^[3]。

2 植物病毒种群遗传结构特征

RdRp产生的突变主要是点突变。而植物RNA病毒采用的变异方式或进化机制是多种多样的,除点突变外,主要还有缺失、插入、重组(recombination)和重配(reassortment)等^[2,4]。这些因素导致了RNA基因组的高度多样性。值得注意的是,尽管所有的RNA病毒的突变率几乎都是一致的,但不同病毒之间,突变频率相差悬殊。有意思的是,变异上的差异反映出寄主范围的不同。有些病毒,如烟草花叶病毒(TMV)变异频率低,而黄瓜花叶病毒(CMV)的突变频率很高。CMV有很广的寄主范围,而TMV的寄主范围相对狭窄^[2]。在黄症病毒属(*Luteovirus*)中,马铃薯卷叶病毒(PLRV)有一个相当窄的寄主范围和很小的变异,而甜菜西方黄化病毒(BWYV)具有较广的寄主范围和更高的变异^[2]。这是容易理解的,因为所有的生物都是在与不同环境的相互作用中协同进化的。当寄主改变时,病毒的群体也随之改变,以克服这种选择压力。

通过归纳已有的植物病毒种群遗传结构分析数据,总结出目前植物病毒种群遗传结构分析有以下几个特点。

(1)最早被描述的植物病毒种群遗传结构是烟草轻型绿花叶病毒(TMGMV)^[5]。通过十几年的研究,发现尽管RNA病毒的一个共同特征是可以快速地进化,但已分析过的植物病毒自然种群遗传结构在时空上的变异一般都较为稳定,包括植物DNA病毒和类病毒^[6,7]。

(2)植物病毒的种群遗传结构通常包括1~2种优势的序列变异类型和一些低频率的序列变异类型,这种遗传结构已在动物病毒报道过,也就是通常所认为的准种遗传结构特征^[6]。

(3)植物病毒种群遗传结构分析多集中于正单链RNA病毒,DNA病毒、类病毒和卫星RNA也有报道,但未见负单链RNA植物病毒种群遗传结构的报道。

(4)植物病毒种群遗传多样性值较低,尽管类病毒和卫星RNA在理论上存在较高的突变率,但

其种群遗传多样性值也较低。

(5) 柑橘疱叶病毒 (CLBV) 的西班牙种群遗传多样性值在已报道的植物病毒中最低, 可能与 CLBV 在西班牙属于单一起源, 而且是刚引进有关^[8]。

(6) 植物病毒种群遗传多样性水平和病害暴发、流行时间有一定的相关性。如水稻东格鲁病毒 (RTV) 种群在病害常发区内比暴发区内具有更高的遗传多样性^[9,10]。Moya 等^[11]的试验结果也表明, 柑橘速衰病毒 (CTV) 种群遗传多样性在病害引进地区最大, 而在最近侵染的区域或病害不是特别普遍的区域则较低。

(7) 植物病毒种群遗传结构中还存在一类随机变异的现象。如西班牙的 CMV 种群遗传结构与采样的地区、年份和寄主植物种类没有相关, 因此, CMV 在西班牙被认为是一个超群种群 (metrapopulation), 即一个暂时的, 要经过反复消亡 (extinction) 和再定殖 (recolonization) 的种群^[12]。

3 植物病毒准种的遗传结构

单个病毒分离物不是单个序列, 而是略有变异的序列群。病毒序列只能由病毒 RNA 或 DNA 的直接测序而获得。病毒生物学功能取决于突变群体或准种, 这使自然选择得以发生。种群围绕着一个或几个最适峰中心变化, 使适应能力大大提高的变异将从群体的周围产生。当环境发生较大变化时, 如一种植物病毒传播到可以复制的介体昆虫中, 将可能发生较大变化。植物病毒准种的本质生物学意义尚不清楚。一些生物学特性可能取决于种群内不同变种间的相互作用。

最常用于植物病毒准种遗传结构特征分析的方法是, 将适应于某一特定寄主的病毒在不同寄主或不同抗性水平或类型品种上分别连续传递, 由于瓶颈效应或寄主适应性 (host adaptation) 的改变导致了病毒准种遗传结构的变化。如植物寄主种类的改变或经昆虫介体连续传播后会迅速导致 CTV^[13]、玉米线条病毒 (MSV)^[14]、葡萄扇叶病毒 (GFLV)^[15]及小麦线条花叶病毒 (WSMV)^[16]准种遗传结构的变化。

突变可造成病毒复制、运动、聚集、介体传播及症状等性状的改变, 因此突变体的构建是目前确定基因功能最常用的方法。对于负链 RNA 病毒, 由于其 RNA 不能直接作为 mRNA, 不具备侵染性, 无法采用直接突变或反向遗传学的技术来确定

此类病毒的基因功能。但一些人工诱导的缺陷突变体为研究此类病毒的基因功能提供了极有价值的研究体系, 并因此取得了一些突破。如水稻矮缩病毒 (RDV)^[17]在寄主植物上经多次的连续人工接种传代后, 逐渐失去其介体传播特性, 从而获得非介体传播的病毒准种, 依此确定病毒基因组相应片段的功能。

最新研究结果表明, 植物病毒所具有的准种结构是作物品种抗性丧失的主要原因之一^[6]。如将 MSV 通过摩擦接种连续传递到抗性品种上后, 会得到一个致病力较强的分离物, 其准种遗传结构依然保持稳定, 但含有几个亚种群, 可能是病毒准种在耐病的环境中, 新的突变有较强的适应能力^[14]。这种在同一分离物内不同致病型的序列变异类型共存的现象已在菊花褪绿斑驳类病毒 (CChMVd)^[18]、甜菜曲顶病毒 (BCTV)^[19]、李痘病毒 (PPV)^[20]、桃潜隐花叶类病毒 (PLM-Vd)^[21]及马铃薯纺锤形块茎类病毒科 (*Pospiviroidae*) 的某些种中被报道过^[22,23]。准种结构中的生物学暗示在 *Pospiviroidae* 的葡萄黄斑类病毒 (GYSVd) 准种中表现得最为明显^[23], GYSVd 准种中的不同变异类型和黄斑及脉带症状是相关联的。其中, 黄斑症状只在含有变异类型 II 的 GYSVd 处在 32℃ 和持续光照条件下才能被诱导出来, 而无症状和脉带症状类型也分别与各自的变异类型相对应。

Schneider 等^[24]首先对植物病毒的准种变异特征进行了系统研究。将 TMV、CMV 和豇豆褪绿斑驳病毒 (CCMV) 这 3 种具有共同进化联系的病毒侵染同种寄主植物后分别分析其准种变异水平, 结果发现这 3 种病毒准种变异水平与其寄主范围是相对应的。这表明病毒的准种特征具有重要的进化暗示, 如 CMV 准种的高度多样性可以使其较易地适应新的选择压力进入新的生境, 造成更大的危害。进一步的研究发现, 准种变异水平随着侵染寄主的不同而相应地改变^[25]。这表明, 病毒的准种变异水平是由病毒与寄主互作控制的。

寄主植物的感病性和病原的致病性是由病原物和寄主的互作决定的。病毒作为一种生物大分子则是研究病原物与其寄主之间互作的最佳模式材料, 因而受到极大的重视。因此, 用病毒所具有的准种结构特征来研究植物病毒的致病性变异机理, 将为农作物品种抗性丧失和病害流行提供

理论依据。

4 植物寄主和昆虫介体对病毒种群遗传结构的影响

Garcia-Arenal 等^[6]对植物病毒的进化机制进行了详尽的分析,认为植物病毒种群遗传结构的变异机制主要有奠基者效应(founder effect)、选择(selection)和互补(complementation)。而选择又可分为负选择(negative selection)和正选择(positive selection)。其中正选择和互补两种因素尚未有详细的试验证据,仅有助于解释可能的变异类型。影响植物病毒种群遗传结构的因素主要是负选择和奠基者效应,其中负选择主要是在维持病毒与寄主植物或介体昆虫的有效互动中起作用,而奠基者效应主要与病毒侵染新寄主或新地域后所造成的群体瓶颈(bottlenecks)有关,可用于解释某一病毒分离物在不同寄主植物或介体昆虫上经连续传递后所造成的准种变异类型改变的现象。

在一个侵染有性和无性泽芸属(*Eupatorium*)寄主植物群体的联体病毒属(*Geminivirus*)病毒种群遗传结构的比较试验中,Ooi 等^[26]发现,在有性寄主植物群体中,尽管由于存在可能的进化上的瓶颈致使病毒的侵染率较低,但其遗传多样性较高,暗示了病毒已进化出针对植物寄主群体遗传多样性的防卫策略。实际上,有关病毒和寄主间协同互作的一个方面内容就是,寄主植物对侵染性病毒存在防卫反应,其机制主要是通过转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)来实现的,植物利用其自身这一机制抑制外源基因的入侵^[27]。而植物病毒与寄主植物长期协同进化过程中,形成了一种能抑制体内 PTGS 的机制。当植物病毒入侵植物细胞后,利用其编码的抑制因子(suppressor)来抑制 PTGS,从而使该防卫机制遭到破坏,病毒在植物体内得以复制、运输^[28]。

病毒与介体昆虫的互动对虫传病毒来说是至关重要的,植物虫传病毒的种群遗传多样性在很大程度上要受维持病毒与介体昆虫间的特异性互作关系所限制。最近一些有关虫传病毒及其介体昆虫的种群遗传结构的研究结果证实了这个结论。如棉花曲叶病毒(CLCuV)自然种群有较高的遗传多样性但不同植物寄主种类和地区间的分离物几乎没有遗传差别,而负责昆虫介体传播作用的基因变异率远

低于复制酶基因的变异率,这表明与介体传播相关的基因变异决定了介体传播的特异性^[29]。从这个角度看,CLCuV 的遗传多样性要受维持有效的昆虫介体传播所限制。系统进化关系分析也表明了长线病毒属(*Closterovirus*)^[30]、菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)^[31]病毒与它们的昆虫介体是共同化的。有趣的是,CMV 传毒介体蚜虫在西班牙也是一个超群种群,暗示了 CMV 极可能也是与其介体昆虫同进化的^[32]。

5 研究植物病毒群体遗传学的意义及展望

植物病毒群体遗传学研究可为追踪病毒的起源、进化和流行途径提供重要依据。同样,认识植物病毒种群遗传结构特征对抗病育种、抗病基因的合理布局以及构建更为有效的病害防治策略也具有重要意义。特别是用植物病毒所具有的准种遗传结构特征来研究病毒的致病性变异机理,将为农作物品种抗性丧失提供必要的理论依据。

对于应用较广的弱毒株介导的交互保护和 RNA 介导的转基因抗性策略,其机理与 PTGS 相似一般都要选择同源性较高的株系或分离物。而植物病毒自然种群遗传结构一般都较为稳定,因此,利用这两个策略防治病毒是可行的。但也有例外的情况,如西班牙 CMV 自然种群属于超群种群的特征则限制了这两个策略的应用。另外,在抗病毒转基因过程中,还有可能发生转基因片段和侵入病毒间由于组或重配而产生新病毒的危险。重组或重配在植物病毒自然种群遗传结构中并不占竞争优势,它们对转基因抗病毒策略一般都不会造成很大的威胁。因此,这个策略也是可行的。

需要指出的是,对植物病毒种群遗传结构的研究远没有植物病原真菌和细菌深入。另外,在物病毒中,很大一类的病毒都属于虫传病毒,而在虫传病毒中,特别需要指出的是,有关循环型持久性虫传病毒在某种意义上,同时也是昆虫病毒^[33],对这类病毒种群遗传结构的研究需要涉及的问题更为复杂,难度也更大。目前国际上也仅对摩擦接种或非持久性虫传病毒进行过这类问题的研究。如何选择有效体系来研究不同寄主对循环型持久性虫传病毒种群遗传结构的影响是值得关注的问题。

当然,作为病毒生态系统的部分研究内容,

仅对植物病毒、寄主植物及介体昆虫种群遗传结构进行分析是不够的。如要深入地研究病毒的灾变规律，还需系统调查病毒病害和介体昆虫的发生规律以及种植结构和当地的地理气候等因素。只有在对所收集的数据进行系统分析的基础上，才有可能初步弄清病害流行因素间的内在联系和相互作用，为病害防治策略提供可行的科学依据。

参考文献

- [1] Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. PNAS, 1979, 76(9): 5269-5273
- [2] Roossinck MJ. Mechanisms of plant virus evolution. Ann Rev Phytopathol, 1997, 35: 191-209
- [3] 魏太云, 林含新, 吴祖建等. PCR-SSCP 技术在植物病毒学上的应用. 福建农业大学学报, 2000, 29(2): 181-186
- [4] Aranda MA, Fraile A, Dopazo J. Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. J Mol Evol, 1997, 44(1): 81-88
- [5] Rodryguez-Cerezo E, Garcya-Arenal F. Genetic heterogeneity of the RNA genome population of the plant virus U5-TMV. Virology, 1998, 170(2): 418-423
- [6] Garcia-Arenal F, Fraile A, Malpica JM. Variability and genetic structure of plant virus populations. Ann Rev Phytopathol, 2001, 39: 157-186
- [7] Holland JJ, Domingo E. Origin and evolution of viruses. Virus Genes, 1998, 16(1): 13-21
- [8] Vives MC, Rubio L, Galipienso L, et al. Low genetic variation between isolates of citrus leaf blotch virus from different host species and of different geographical origins. J Genl Virol, 2002, 83(10): 2587-2591
- [9] Azzam O, Arboleda M, Umadhayk ML. Genetic composition and complexity of virus populations at tungroendemic and outbreak rice sites. Arch Virol, 2000, 145(12): 2643-2657
- [10] Azzam O, Yambao MLM, Muhsin M, et al. Genetic diversity of *Rice tungro spherical virus* in tungro-endemic provinces of the Philippines and Indonesia. Arch Virol, 2000, 145(6): 1183-1197
- [11] Moya A, Arenal-Garcia F. Population genetics of viruses. Gibbs AJ, Calisher CH, Arenal-Garcia F. Molecular basis of evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, 213-223
- [12] Garcia-Arenal F, Escriu F, Aranda MA, et al. Molecular epidemiology of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. Virus Res, 2000, 71(1-2): 1-8
- [13] Ayllon MA, Rubio L, Moya A, et al. The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. Virology, 1999, 255(1): 32-39
- [14] Isnard M, Granier M, Frutos R, et al. Quasispecies nature of three *Maize streak virus* isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. J Gen Virol, 1998, 79(12): 3091-3099
- [15] Naraghi-Arani P, Daubert S, Rowhani A. Quasispecies nature of the genome of *Grapevine fanleaf virus*. J Gen Virol, 2001, 82(7): 1791-1795
- [16] Hall JS, French R, Morris TJ, et al. Structure and temporal dynamics of populations within *Wheat streak mosaic virus* isolates. J Virol, 2001, 75(21): 10231-10243
- [17] Omura T, Maruyama W, Ichimi K. Involvement in virus infection to insect vector cells of the P2 outer capsid proteins of rice gall dwarf and rice dwarf phytoeviruses. Phytopathol, 1997, 87: 72
- [18] Delapena M, Navarro B, Flores R. Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop within the *in vivo* branched RNA conformation. PNAS, 1999, 96(18): 9960-9965
- [19] Stenger DC, McMahon CL. Genotypic diversity of *Beet curly top virus* population in the western United States. American Phytopathological Society Monograph Series, 1997, 87(2): 737-744
- [20] Saenz P, Quiot L, Quiot JB, et al. Pathogenicity determinants in the complex virus population of a plum pox virus isolate. MPMI, 2001, 14(3): 278-287
- [21] Ambros S, Hernandez C, Flores R. Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of *Peach latent mosaic viroid* in its natural host. J Gen Virol, 1999, 80(8): 2239-2252
- [22] Gora-Sochacka A, Candresse T, Zagorski W. Genetic variability of *Potato spindle tuber viroid* RNA replicon. Acta Biochemistry Pol, 2001, 48(2): 467-476
- [23] Szychowski JA, Credi R, Reanwarakorn K, et al. Population diversity in *Grapevine yellow speckle viroid-1* and the relationship to disease expression. Virology, 1998, 248(2): 432-44
- [24] Schneider WL, Roossinck MJ. Evolutionarily related Sindbis-like plant viruses maintain different levels of population diversity in a common host. J Virol, 2000, 74(7): 3130-3134
- [25] Schneider WL, Roossinck MJ. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. J Virol, 2001, 75(14): 6566-6571
- [26] Ooi K, Yahara T. Genetic variation of geminivirus; comparison between sexual and asexual host plant population. Mol Ecol, 1999, 8(1): 89-97
- [27] Li HW, Lucy AP, Guo HS, et al. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant genesilencing defense mechanism. EMBO J, 1999, 18(10): 2683-2691
- [28] Voineet O, Pinto YM, Baulcomber DC. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. PNAS, 1999, 96(24): 14147-14152
- [29] Sanz AI, Fraile A, Gallego JM, et al. Genetic variability of natural populations of *Cotton leaf curl geminivirus*, a single-

- stranded DNA virus. J Mol Evol, 1999, 49(5): 672-681
- [30] Karasev AV. Genetic diversity and evolution of *Closterovirus*. Ann Rev Phytopathol, 2000, 38: 293-324
- [31] Harrison BD, Robinson DJ. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted Geminivirus (*Begomovirus*). Ann Rev Phytopathol, 1999, 37: 369-398
- [32] Martınez-Torres D, Carrio R, Latorre A, et al. Assessing the nucleotide diversity of three aphid species by RAPD. J Evol Biol, 1997, 10(2): 459-477
- [33] 谢联辉, 魏太云, 林含新等. 水稻条纹病毒的分子生物学. 福建农业大学学报, 2001, 30(3): 269-279

植物病毒 RNA 间重组的研究现状

王海河, 谢联辉

(福建农业大学植物病毒研究所, 福建福州 350002)

摘要: 根据近几年来研究的最新资料, 从植物病毒 RNA 间的重组位点的特征以及重组体亲本链双方的来源的角度对植物病毒 RNA 的重组类型作了介绍, 并对其重组机制作了综述。

关键词: 植物病毒 RNA; RNA 重组; 重组机制

中图分类号: S432.41

The RNA recombination between plant viruses

WANG Hai-he, XIE Lian-hui

(Institute of Plant Virology, Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002)

Abstract: According to the latest data of the RNA recombination of plant viruses, the recombination types were illustrated on behalf of the sequence feature of crossover-sites and the resources of parent strands. In addition, the recombination mechanisms were also reviewed.

Key words: plant virus RNA; RNA recombination; recombination mechanism

由于植物病毒 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) 在 RNA 复制过程中没有校对功能^[1,2], 因而在病毒基因组复制过程中容易出现较高频率的错误, 从而产生相似基因组的新病毒^[3,4]。有时候, 这些变化导致病毒基因组功能丧失。有人认为病毒 RNA 在进化过程中产生的突变型与野生型基因通过重组来达到保持基因组功能的完整性^[5], 从而保持病毒基因组的稳定性。由此可以推断, 植物病毒在进化过程中可能有重组现象发生。虽然这种现象最初发现仅限于几种动物病毒, 如流感病毒、蓝舌病毒^[6,7], 但随着对植物病毒的不断深入研究, 研究者们相继在雀麦花叶病毒 (BMV)^[8]、烟草脆裂病毒 (TRV)^[9]、苜蓿花叶病毒 (AIMV)^[10]、番茄丛矮病毒 (ToBSV)^[11,12] 和

烟草花叶病毒 (TMV)^[13,14] 中发现了自然重组现象。因此, 病毒 RNA 间的重组被认为是植物病毒进化的主要动力之一^[15]。同时研究表明, 通过重组产生的病毒在某些情况下比原来病毒具有更好的适应性^[16]。本文根据近几年的研究成果对植物病毒 RNA 间重组的类型及重组机制等方面予以简要介绍。

1 植物病毒 RNA 重组的类型

病毒 RNA 的重组按重组区域的序列特征可分为同源重组 (homologous recombination)、不正常同源重组 (aberrant homologous recombination) 和非同源重组 (nonhomologous recombination) 等 3 种类型^[17]。