

9712(3)  
193-202  
第12卷第3期  
1997年9月

30152(1)

1997/925/0A/012/003

193-283

# 黄化丝状病毒属 (*Closterovirus*) 病毒及其分子生物学研究进展

徐平东<sup>1,2</sup> 谢联辉<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(厦门华侨亚热带植物引种园国家植物引种隔离检疫基地, 厦门 361002)

<sup>2</sup>(福建农业大学植物病毒研究所, 福州 350002)

Q939.4

## Advances on Molecular Biology of *Closterovirus*

Xu Pingdong<sup>1,2</sup> Xie Lianhui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(National Plant Introduction Quarantine Base, Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen 361002)

<sup>2</sup>(Institute of Plant Virology, Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002)

病毒

关键词 黄化丝状病毒属, 分子生物学, 研究进展

Key words *Closterovirus*, Molecular biology, Research advance

黄化丝状病毒属 (*Closterovirus*) 由德国学者 Brandes 于 1965 年建立, 并得到 1966 年在莫斯科召开的国际病毒命名委员会 (ICNV) 的承认。该属包括粒体长度为 1200~2200 nm、直径 12 nm、非常弯曲的一类丝状正链 RNA 病毒<sup>[1]</sup>。多数成员为单体基因组 (Monopartite genome), 大小为 14~20 kb。其外壳蛋白 (Coat protein, CP) 由单一亚基组成, 分子量为 23~43 kD<sup>[1]</sup>。最近的研究发现莴苣侵染性黄化病毒 (Lettuce infectious yellows virus, LIYV) 为双分体基因组 (Bipartite genome)<sup>[2]</sup>。本属多数病毒通过蚜虫以半持久方式传播, 有些可通过粉虱 (*Trialeurodes*, *Bemisia*) 和粉蚧 (*Planococcus* 和 *Pseudococcus*) 传播<sup>[1]</sup>。主要引起植物黄化和木本植物的陷点和/或沟<sup>[1]</sup>。一些能引起重要果树 (如葡萄、柑桔等) 和甜菜等的严重病害<sup>[3,4]</sup>。

近年来, 随着 cDNA 合成、PCR 方法和体外无细胞翻译体系的建立等分子生物学技术的成功应用, 黄化丝状病毒属分子生物学研究取得长足的进展, 如基因组最大的植物病毒——柑桔衰退病毒 (Citrus tristeza virus, CTV)——的全序列已被测定<sup>[5]</sup>。

### 1 黄化丝状病毒属的成员和性质

“植物病毒描述” (CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses) (1982) 收录黄化丝状病毒组成员和可能成员 14 个, 分为 3 个亚组, 即以苹果退绿叶斑病毒 (Apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV, 720 nm) 为典型成员的亚组 A; 以甜菜黄化病毒 (Beet yellow virus, BYV, 1245~1450 nm) 为典型成员的亚组 B; 以柑桔衰退病毒 (CTV, 2000 nm) 为典型成员的亚组 C<sup>[6]</sup>。但是, 近年来黄化丝状病毒属的成员变化很大。国际病毒分类委员会 (ICTV) “病毒分类与命名” 第五

次报告(1991)将苹果茎沟病毒(Apple stem grooving virus, ASGV)和马铃薯病毒 T(Potato virus T, PVT)独立出来,建立了发样病毒组(Capillovirus)<sup>[7]</sup>。ICTV“病毒分类与命名”第六次报告(1995)又将苹果退绿叶斑病毒(ACLSV)等5种病毒分出来,重新建立一个新属,即鬃发病毒属(*Trichovirus*)<sup>[1]</sup>。在 ICTV“病毒分类与命名”第五和第六次报告中,黄化丝状病毒属成员及可能成员都有较大变动,在第五次报告中本属收录成员10个、可能成员12个,但在第六次报告中本属成员仅剩6个,可能成员则增至19个。第五次报告中属本属成员的葡萄病毒 A(Grapevine virus A, GVA)在第六次报告中被划入鬃发病毒属;CTV和羊茅坏死病毒(*Festuca necrosis virus, FNV*)在第五次报告中为本属成员,但在第六次报告中被列为可能成员;在第五次报告中属本属成员的三叶草黄化病毒(*Clover yellows virus, CYV*),在第六次报告中却被排除在本属之外<sup>[1,7]</sup>。此外,在第五、六次报告中,黄化丝状病毒属均未分亚组<sup>[1,7]</sup>。表1列出 ICTV“病毒分类与命名”第六次报告收录为黄化丝状病毒属成员和可能成员的部分性质。

表1 黄化丝状病毒属的一些性质

Table 1 Some properties of definitive and possible members of *Clavovirus*

病 毒	粒体长度 (nm)	CP 分子量 (kD)	RNA 大小 (kb)	BYV 型包裹	介体	引用文献
Beet yellows virus(BYV)*	1250~1450	22	15.5	有	AP	8,9
Beet yellows stunt virus(BYSV)*	1400	25	16.1	有	AP	10,11
Burdock yellows virus(BuYV)*	1600~1750	-	-	有	AP	12
Carnation necrotic fleck virus(CNFV)*	1400~1500	23.5	14.5	有	AP	13
Carrot yellow leaf virus(CYLV)*	1600	-	-	有	AP	14
Wheat yellow leaf virus(WYLV)*	1600~1850	-	-	有	AP	15
Alligatorweed stunting virus(AWSV)**	1700	-	-	有	VU	16
Beet pseudoyellows virus(BPYV)**	1500~1800	-	-	-	WF	17
Citrus tristeza virus(CTV)**	2000	26,27~28	20	有	AP	5,18
Cucumber chlorotic spot virus(CCSV)**	-	28	17	-	WF	19
Cucumber yellows virus(CuYV)**	1000	-	-	有	WF	20
Dendrobium vein necrosis virus(DVNV)**	1865	-	-	无	AP	21
Diodia vein chlorosis virus(DVCV)**	-	-	-	有	WF	22
Festuca necrosis virus(FNV)**	1725	-	-	-	VU	23
Grapevine corky bark-associated virus(GCBaV)**	1200~2000	24	-	-	VU	24
Grapevine leafroll-associated virus 1(GLRaV-1)**	1400~2200	39	15.6	有	VU	25
Grapevine leafroll-associated virus 2(GLRaV-2)**	1400~1800	26	15.6	3	VU	25,26
Grapevine leafroll-associated virus 3(GLRaV-3)**	1400~2200	43	20	有	MB	27,28
Grapevine leafroll-associated virus 4(GLRaV-4)**	1400~2200	36	15.6	有	VU	29
Grapevine leafroll-associated virus 5(GLRaV-5)**	1400~2200	36	-	-	VU	26
Heracleum virus 6(HV-6)**	1400	-	-	-	AP	30
Lettuce infectious yellows virus(LIYV)**	1800~2000	28	16	有	WF	2,31
Muskmelon yellows virus(MYV)**	-	-	-	-	WF	1
Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV)**	1200	23.8	-	-	MB	32
Sugarcane mild mosaic virus(SMMV)**	1500~1600	-	-	-	MB	33

\* 黄化丝状病毒属成员 Definitive members of *clavovirus* defined by Murphy *et al.* (1995)\*\* 黄化丝状病毒属可能成员 Possible members of *clavovirus* defined by Murphy *et al.* (1995)

AP:蚜虫 Aphid MB:粉蚧 Mealybug MF:粉虱 Whitefly VU:介体不详 Vector unknown

## 2 黄化丝状病毒属的基因组结构和功能

最近,甜菜黄化病毒(BYV)、莴苣侵染性黄化病毒(LIYV)和柑桔衰退病毒(CTV)的基因组全序列已被测定<sup>[2,5,9]</sup>。比较分析这三种病毒的基因组,发现它们有非常相似的结构(图

1)。它们包括一个编码木瓜蛋白酶类蛋白酶(Papain-like proteinase, PRO) - 甲基转移酶(Methyltransferase, MTE) - 解旋酶(Helicase, HEL) - 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)(PRO - MTR - HEL - RdRp) 和一个编码热休克蛋白 70(Heat shock protein, HSP70) - HSP90 - 外壳蛋白相关蛋白(Coat protein related protein, CPr) - 外壳蛋白(CP)(HSP70 - HSP90 - CPr - CP) 的结构<sup>[2,5,9]</sup>。在产生 HEL - RdRp 融合多蛋白(Fusion polyprotein)时, ORF1a 和 1b 之间是通过 +1 移码表达(Frameshift)的<sup>[2,5,9]</sup>。此外,首先在 BYV 基因组中发现的编码 HSP70 的特异结构<sup>[34]</sup>,最近发现在 CTV<sup>[19]</sup>、LIYV<sup>[2]</sup>、黄瓜退绿斑病毒(Cucumber chlorotic spot virus, CCSV)<sup>[19]</sup>、甜菜黄矮病毒(Beet yellows stunt virus, BYSV)<sup>[36]</sup>和香石竹坏死斑病毒(Carnation necrotic fleck virus, CNFN)<sup>[36]</sup>、葡萄卷叶病毒 3(Grapevine leafroll-associated virus 3, GLRaV-3)(Ling, 私人通讯)等病毒中均存在。图 1 表示 BYV、CTV 和 LIYV 基因组的结构。

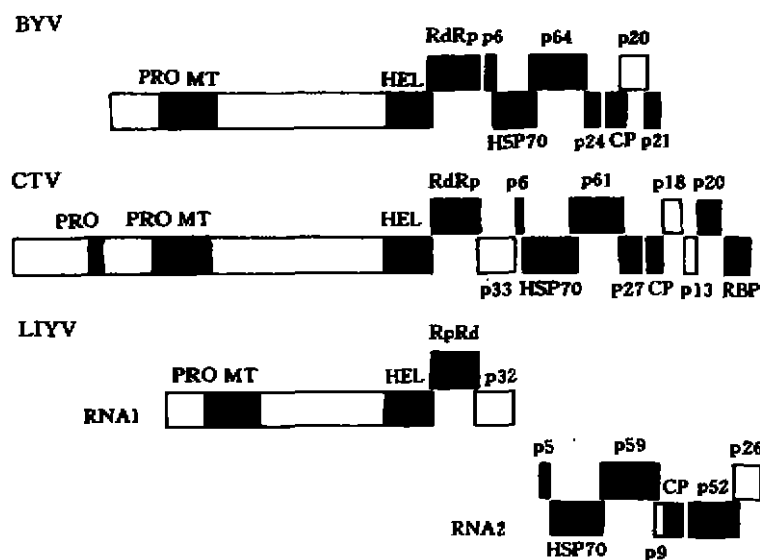


图 1 BYV、CTV 和 LIYV 基因组图解<sup>[2,5,9]</sup>

Fig. 1 Schematic representation of the genomes of BYV, CTV and LIYV<sup>[2,5,9]</sup>

## 2.1 甜菜黄化病毒(BYV)

BYV 基因组全长 15480 个核苷酸(nt),具 5'帽式结构(Capped structure),但无 3' poly(A)尾<sup>[9,37]</sup>。序列分析表明 BYV 基因组包含 9 个开放读框(ORF)(图 1)<sup>[9]</sup>。ORF1a 约占整个基因组长度的一半,起始于 107 nt,终止于 8000 nt 位置,编码一个含 2630 个氨基酸残基、分子量为 295 kD 的蛋白质(p295),p295 具甲基转移酶(MTR)、解旋酶(HEL)及木瓜蛋白酶类蛋白酶(Papain-like proteinase, PRO)的活性。PRO 类似于马铃薯 Y 病毒科(*Potyviridae*)的辅助成份蛋白酶(Helper component - proteinase, HC-PRO);HC-PRO 与 *Potyviridae* 的蚜虫传染及病毒复制有关;PRO 可能也有相似的功能<sup>[9]</sup>。ORF1b 起始于 ORF1a 中,重叠序列至少 113 nt,ORF1b 编码一个含 420 个氨基酸残基、分子量为 48 kD 的蛋白质(p48),p48 具依赖 RNA

的RNA聚合酶活性<sup>[9]</sup>。在ORF1a/1b之间,通过+1移码表达产生一个含3094个氨基酸残基、分子量为348 kD的融合多蛋白<sup>[9]</sup>。ORF2编码一个高度疏水的6.4 kD蛋白质(p6),p6具膜蛋白作用。ORF3起始密码重叠ORF2终止密码一个核苷酸,编码一个65 kD的热休克蛋白(HSP70)<sup>[34]</sup>。HSP70普遍存在于从低等细菌到高等动物的细胞中,可能具移动蛋白作用<sup>[9]</sup>。ORF4与ORF3重叠序列达92 nt,编码一个64 kD的蛋白质(HSP90)<sup>[34]</sup>。ORF5编码一个24 kD蛋白质(p24),p24与病毒侵染时在细胞间的移动有关。ORF6编码一个22 kD的外壳蛋白<sup>[34]</sup>。ORF7和ORF8分别编码20 kD和21 kD两个蛋白质(p20,p21),但这两个蛋白质的功能还不清楚<sup>[9,34]</sup>。BYV RNA包含一个181 nt的3'末端非编码序列,有86 nt折叠形成茎-环结构(Stem-loop)<sup>[34]</sup>。

## 2.2 柑桔衰退病毒(CTV)

CTV基因组全长19296 nt,与BYV相似,其基因组包括5'帽式结构,无3' poly(A)尾<sup>[5,35]</sup>。序列分析表明CTV基因组包含12个ORF(图1)<sup>[5]</sup>。ORF1a始于108 nt,终止于9480 nt,编码一个含3124个氨基酸残基、分子量为348 kD的蛋白质(p348)。p348具甲基转移酶(MTR),解旋酶(HEL)及木瓜蛋白酶类蛋白酶(PRO)的活性;ORF1b起始于9355 nt,终止于10855 nt,重叠ORF1a为123 nt;ORF1b编码一个含500个氨基酸残基、分子量为57 kD的蛋白质(p57),p57具依赖RNA的RNA聚合酶活性。在ORF1a与1b之间,与BYV、LIYV相似,通过+1移码表达产生一个含3582个氨基酸残基、分子量为401 kD的融合多蛋白;ORF2编码一个33 kD蛋白质(p33);ORF3编码一个含51个氨基酸残基、分子量为6 kD的疏水蛋白(p6)<sup>[5]</sup>;ORF4编码一个含594个氨基酸残基、分子量为65 kD的蛋白质(p65),即HSP70;ORF5编码一个535个氨基酸残基、分子量为61 kD的蛋白质(p61),即HSP90;ORF6编码一个含240个氨基酸残基、分子量为27 kD的蛋白质;ORF7编码一个分子量为27 kD的蛋白质,即外壳蛋白(CP);ORF8编码一个含167个氨基酸残基、分子量为18 kD的蛋白质(p18);ORF9编码一个含139个氨基酸残基、分子量为13 kD的蛋白质(p13);ORF10编码一个含182个氨基酸残基、分子量为20 kD的蛋白质(p20);ORF11编码一个含209个氨基酸残基、分子量为23 kD的蛋白质(p23)。在3'末端还有一长为277 nt的非编码序列<sup>[35]</sup>。

CTV、BYV和LIYV的序列比较研究发现,CTV有4个基因为BYV和LIYV所没有,即编码p33、p18、p13和p23的4个基因,这4个基因的功能尚不清楚。Karasev等(1995)将CTV基因组分为两个基因区域(Gene block),第一区域包括编码MTR、HEL和RdRp的基因;第二区域包括5个ORF,即编码p33、p6、HSP70、p61、p27的基因,第二区域在黄化丝状病毒属各成员中高度保守<sup>[5]</sup>。

## 2.3 莴苣侵染性黄化病毒(LIYV)

LIYV为双分体基因组,RNA1全长8118 nt,包括3个ORF;RNA2全长7193 nt,包括6个ORF(图1)。与BYV、CTV相似,LIYV的基因组包含5'帽式结构,无3' poly(A)尾<sup>[2]</sup>。

LIYV RNA1包含3个ORF,即ORF1a、ORF1b、ORF2。ORF1a起始于98 nt,编码一个含1873个氨基酸残基、分子量为217 kD的蛋白质(p217),p217具木瓜蛋白酶类蛋白酶(PRO)、甲基转移酶(MTR)、解旋酶(HEL)的活性;ORF1b起始于5808 nt,编码一个含515个氨基酸残基、分子量为55.5 kD的蛋白质(p55),p55具依赖于RNA的RNA聚合酶(RdRp)活性,在ORF1a和1b之间,LIYV与BYV、CTV相似,具+1移码表达;ORF2起始于7075 nt,编码一

个 32 kD 的蛋白质(p32)。RNA1 的 3' 末端还包含一个 219 nt 长的非编码序列<sup>[2]</sup>。

LIYV RNA2 包含 6 个 ORF, 即 ORF1 至 6。ORF1 起始于 327 nt, 编码一个含 39 个氨基酸残基、分子量为 4.65 kD 的蛋白质(p5), p5 类似于 BYV、CTV 和 BYSV 的疏水蛋白; ORF2 起始于 693 nt, 编码一个含 554 个氨基酸残基、分子量为 62.3 kD 的蛋白质(p62), 即 HSP70, HSP70 具 ATP 酶活性, 可能与蛋白质间相互作用有关; ORF3 起始于 2449 nt, 编码一个含 514 个氨基酸残基、分子量为 59 kD 的蛋白质(p59); ORF4 重叠 ORF3 为 19 nt, 编码一个含 80 个氨基酸残基、分子量为 9 kD 的蛋白质(p9); ORF5 起始于 4221 nt, 编码一个含 249 个氨基酸残基、分子量为 27.8 kD 的蛋白质, 即外壳蛋白。LIYV 的 CP 基因与 BYV、CTV 高度同源; ORF6 重叠 ORF5 为 7 nt, 起始于 4964 nt, 编码一个含 254 个氨基酸残基、分子量为 52.3 kD 的蛋白质(p52); ORF7 起始于 6319 nt, 编码一个含 227 个氨基酸残基、分子量为 26 kD 的蛋白质(p26)。目前, p32、p9、p52、p26 等 4 种蛋白质的功能尚不清楚。RNA2 的 3' 末端包含一个 187 nt 长的非编码序列<sup>[2]</sup>。

#### 2.4 黄化丝状病毒属病毒 HSP70 比较

黄化丝状病毒属病毒具编码 HSP70 相关蛋白的基因, 在植物病毒中独一无二。该基因已发现存在于 BYV<sup>[34]</sup>、CTV<sup>[35]</sup>、LIYV<sup>[2]</sup>、CCSV<sup>[19]</sup>、BYSV<sup>[36]</sup>、CNFV<sup>[36]</sup> 及 GLRaV-3 (Ling 等, 私人通讯) 等病毒中。HSP70 分子包括一个 N 端 ATP 酶位点和 C 端蛋白质相互作用位点, 而且 HSP70 基因在所有类型生物中均表现十分保守<sup>[4]</sup>。在黄化丝状病毒属中, HSP70 的 ATP 酶位点上表现高度同源, 但 C 端则表现较大差异<sup>[2]</sup>。从 HSP70 氨基酸序列系统进化分析表明, BYV 和 BYSV 关系最近, CTV 与 BYV、BYSV 关系比 LIYV 近(图 2)。

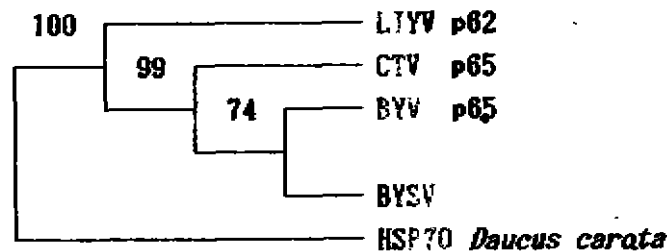


图 2 黄化丝状病毒属 HSP70 系统树<sup>[2]</sup>

Fig. 2 Tentative phylogenetic tree for the HSP70 of *Clustrovirus*<sup>[2]</sup>

### 3 黄化丝状病毒属基因组的表达机制

#### 3.1 移码翻译(Translational frameshift)

BYV、CTV 和 LIYV 的序列分析表明, 这三种病毒在 ORF1a 和 1b 之间, 通过 +1 移码翻译产生一个融合多蛋白<sup>[2,5,9]</sup>。研究发现, BYV 和 CTV 在 HEL 区位的 C 端氨基酸序列和 RdRp 区位的 N 端氨基酸序列具很高的保守性(图 3)<sup>[5]</sup>。

+1 移码翻译在植物病毒中仅存在于黄化丝状病毒属, 但在大麦黄矮病毒属(*Luteovirus*)、香石竹病毒属(*Dianthovirus*) 等植物病毒中, 存在 -1 移码翻译机制<sup>[38]</sup>。在典型的 -1 移码区存在茎-环(Stem-loop)和假结(Pseudoknot)结构, 这两种结构对移码有重要作

```

CTV-HEL      P D S G N L I E P A R V
                CTV-RdRp G V V R S Q A I P P R K A
CTV(9380-9455nt) ccT gAc tCG ggt AcC tta CAC GAa CUg gct CCc GTTc gGC gta gla aGg TCa Cta Cta ATT CCT cca AGa AAA aCG
BYV(7368-7443nt) gTt aAc aAG tCG AcC gat CAC GAc CCG caG CCg GTTt aGC tCG aIt cGc TCG CAg CCg ATT CTT aag AGg AAA cCG
BYV-HEL      V N K S T D H D P Q R V
                BYV-RdRp S S I R S Q A I P K R K P

```

图3 BYV和CTV基因组RNA的移码位点(ORF 1a/1b)<sup>[5]</sup>

Fig.3 The frameshift site in the genome RNA of BYV and CTV (ORF 1a/1b)<sup>[5]</sup>

用<sup>[38]</sup>。在BYV的移码区发现存在“滑动”(Slippery)序列(GGGUUUA)及茎-环和假结结构,但这些结构的功能尚不清楚<sup>[9]</sup>。

### 3.2 先导蛋白酶(Leader protease)策略

BYV、CTV和LIYV的序列分析表明,BYV和LIYV在ORF1a的N端包括一个木瓜蛋白酶类蛋白酶位点<sup>[2,9]</sup>,CTV包括两个该酶位点<sup>[5]</sup>。此外,三种病毒在该区域的核苷酸序列相当保守<sup>[2,5,9]</sup>。定点诱变显示,催化的半胱氨酸(Cys 509)和组氨酸(His 569)残基能消除蛋白酶解,于是确证了蛋白酶特性<sup>[9]</sup>。BYV的先导蛋白酶在两个Gly残基(Gly588~589)之间切割<sup>[9]</sup>;CTV有两个先导蛋白酶,半胱氨酸残基位点为Cys896和403,组氨酸残基位点为His956和464,切割位点为Gly976~977和Gly484~485两个<sup>[5]</sup>。

### 3.3 亚基因组表达

BYV的内开放读框(Internal ORF, ORF2-8)产物通过形成一个亚基因组RNA(Subgenome RNA, sgRNA)的3'共同末端的网状结构来表达。这些sgRNA存在于被病毒感染的细胞中,但不被外壳蛋白所包被<sup>[37]</sup>。最大的BYV sgRNA可以直接合成60 kD和65 kD的两个蛋白质<sup>[9]</sup>。在感染CTV的植物中,发现了编码p33、p65、p61、p27、p18、p20和p23的ORF的sgRNA,其中以编码p20的ORF的sgRNA最丰富<sup>[39]</sup>。LIYV的RNA2也是通过sgRNA策略来表达的<sup>[2]</sup>。

## 4 分子生物学研究成果在黄化丝状病毒属分类中的应用

近年来,随着黄化丝状病毒属分子生物学研究的深入,已能在分子水平上研究这些病毒的系统进化关系。ICTV“病毒分类与命名”第六次报告(1995)便将原来的黄化丝状病毒组分成3个属,即发样病毒属(*Capillovirus*)、鬃发病毒属(*Trichovirus*)和黄化丝状病毒属(*Closterovirus*)<sup>[1]</sup>。发样病毒属以ASGV为典型成员,包括两个成员柑桔碎叶病毒(*Citrus tatter leaf virus*, CTLV)、丁香退绿叶斑病毒(*Lilac chlorotic leafspot virus*, LCLV)和一个可能成员南天竹茎痘病毒(*Nandina stem pitting virus*, NSPV);鬃发病毒属以ACLSV为典型成员,包括一个成员与马铃薯病毒T(*Potato virus T*, PVT)和3个可能成员葡萄病毒A(*Grapevine virus A*, GVA)、葡萄病毒B(*Grapevine virus B*, GVB)、白芷潜隐病毒(*Haracleum latent virus*, HLV);黄化丝状病毒属的典型成员为BYV,包括25个成员和可能成员(表1)<sup>[1]</sup>。病毒基因组结构分析

发现,发痒病毒属和鬃发病毒属病毒均含有 3' poly(A)尾<sup>[40,41]</sup>,而黄化丝状病毒属病毒不包含 3' poly(A)尾。此外,BYV、CTV 和 LIYV 等黄化丝状病毒属基因组中都包含一个编码 HSP70 的特殊结构<sup>[2,5,9,19,34-36]</sup>,而发痒病毒属和鬃发病毒属病毒却不包含此结构。所以将原属于黄化丝状病毒属的部分成员从该属分出来建立新属,这种分类更为合理,并反映了它们之间的进化关系。根据正链 RNA 病毒的系统进化关系,Dolja 等(1994)建议建立黄化丝状病毒科(*Closteroviridae*),科下分 3 个属,即以 BYV 为典型成员的黄化丝状病毒属(*Closterovirus*),以 CTV 为典型成员的柑桔衰退病毒属(*Citrivirus*),以 LIYV 为典型成员的双分体基因组黄化丝状病毒属(*Biclovirus*)(表 2)<sup>[5]</sup>。

表 2 正链 RNA 病毒 Rubivirata 的系统分类草案<sup>[4]</sup>Table 2 Draft of phylogenetic taxonomy for the proposed class Rubivirata of positive-strand RNA viruses<sup>[4]</sup>

Order	Family	Genus/Group	Hosts
Tabamovirales	Tobamoviridae	<i>Tobamovirus</i>	Plants
		<i>Tobravirus</i>	Plants
		<i>Hordeivirus</i>	Plants
		<i>Furovirus</i> (SBWMV <sup>a</sup> )	Plants
		<i>Bromovirus</i>	Plants
	Bromoviridae	<i>Cucumovirus</i>	Plants
		<i>Alfamovirus</i>	Plants
		<i>Ilarivirus</i>	Plants
		<i>Idaeovirus</i> (RBDV <sup>b</sup> )	Plants
	Closteroviridae	<i>Closterovirus</i> (BYV)	Plants
		<i>Citrivirus</i> (CTV)	Plants
		<i>Biclovirus</i> (LIYV)	Plants

a. SBWMV—Soilborne wheat mosaic virus, b. RBDV—Raspberry bushy dwarf virus

## 5 分子生物学研究成果在黄化丝状病毒属病毒病害诊断中的应用

黄化丝状病毒属病毒病害的常规诊断方法主要是采用指示植物症状反应、电镜观察病毒粒体和泡囊。但是,指示植物诊断所需时间长,一般需 2~3 年;电镜观察需要电镜等昂贵的设备。同时,病毒在寄主细胞中的分布不均匀,易引起误诊。所以诊断此类病害相当困难。近十年来,随着本属病毒提纯方法的改进,人们得到了足够量的纯化病毒制备抗血清,并建立了 ELISA、ISEM 等血清学检测方法。于是,血清学方法成为近十年来诊断此类病害特别有用的方法<sup>[3,42]</sup>。最近,随着部分本属病毒的基因组序列被测定,核酸探针、PCR 等技术已应用于检测。Saldarelli 等<sup>[43]</sup>应用核酸探针检测 GLRaV-3 意大利分离物。Minafra 和 Hadidi<sup>[44]</sup>应用 PCR 方法诊断 GVA、GVB 和 GLRaV-3 等几种病毒引起的葡萄病害。Ling 等<sup>[45]</sup>应用 PCR 方法检测 GLRaV-3 纽约分离物。Coffin 和 Coutts<sup>[46]</sup>应用 PCR 和核酸杂交方法检测 BPYV。最近,Karasev 等<sup>[36]</sup>根据 BYV 的 HSP70 序列合成了一组简并引物(Degenerate primer),采用简并引物 PCR 方法(Degenerate primer-mediated PCR),能检测 BYV、CTV 和 BYSV 等病毒。分子生物学方法为有效诊断黄化丝状病毒属病毒病害开辟了新途径。

## 6 问题与展望

黄化丝状病毒属病毒的基因组为目前已发现的植物病毒中最大的一类,其分子量大的达

20 kb,难以应用基因组的体外重组、基因定点突变等一些成熟的分子生物学技术,其基因组难以克隆。最近,随着 cDNA 合成、PCR 方法和体外无细胞翻译体系的建立等分子生物学技术的成功应用,黄化丝状病毒属基因组的序列分析、结构和功能及表达机制的研究取得飞快的进展,并已在一些病毒,如 BYV、CTV 和 LIYV 的研究上取得了令人瞩目的成绩<sup>[2,5,9]</sup>。但是,同其它一些植物病毒(如马铃薯 Y 病毒科等)相比,黄化丝状病毒属的研究还显得相对落后,目前对多数该属成员和可能成员的基因组结构还不清楚,虽然 BYV 等几个病毒的基因组全序列已被测定,但对其中一些基因的功能尚不了解,还没有获得病毒基因组的全长克隆和具侵染性的 cDNA<sup>[2,5,9]</sup>。此外,本属的分类研究也存在一些困难,分类状况还很混乱。近年来由此类病毒引起的病害也越来越严重,但是其诊断还主要依靠传统方法<sup>[36]</sup>。

随着黄化丝状病毒属病毒分子生物学研究的深入,更多病毒的基因组序列将被测定,使本属分类更为合理,并能反映其系统进化,也使分子诊断(如 cDNA 探针、PCR 等)成为可能,分子生物学研究成果可进一步用于此类病害的防治。美国康奈尔大学 Gonsalves 博士领导的研究小组已将葡萄卷叶病毒 3(GLRaV-3)的 HSP90 基因片段通过 pBin19 转移到烟草植株中,并表达获得转基因烟草(Ling,私人通讯)。虽然迄今还没有将该属病毒的基因转到其寄主植物上,但随着研究的不断深入,相信在不远的将来会诞生能有效控制这类病害的转基因植株。

### 参 考 文 献

- 1 Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL *et al* eds. Classification and nomenclature of viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1995, Suppl, 10.
- 2 Klaassen VA, Boeshore ML, Koonin EV *et al*. Genome structure and phylogenetic analysis of lettuce infectious yellows virus, a whitefly-transmitted, bipartite closterovirus. Virology, 1995, 208: 99-110
- 3 Lister RM, Bar-Joseph M. Closteroviruses. In: Kurstak E ed. Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis. Amsterdam: Elsevier 1981. 809-844
- 4 Dolja VV, Karasev AV, Koonin EV. Molecular biology and evolution of closteroviruses; Sophisticated build-up of large RNA genomes. Annu Rev Phytopathol, 1994, 32: 261-285
- 5 Karasev AV, Boyko VP, Gowda S *et al*. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. Virology, 1995, 208: 511-520
- 6 Bar-Joseph M, Murrant AF. Closteroviruses. CMI/AAB Descrip Plant Viruses, 1982, No. 260
- 7 Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL *et al* eds. Classification and nomenclature of viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1991, Suppl, 2.
- 8 Russell GE. Beet yellows virus, CMI/AAB Descrip Plant Viruses, 1970, No. 13
- 9 Agranovsky AA, Koonin EV, Boyko VP *et al*. Beet yellows closterovirus: Complete genome structure and identification of a papain-like thiol protease. Virology, 1994, 198: 311-324
- 10 Duffus JE. Beet yellows stunt virus. CMI/AAB Descrip Plant Viruses, 1979, No. 207
- 11 Reed RR, Falk BW. Purification and partial characterization of beet yellow stunt virus. Plant Dis, 1989, 73: 358-362
- 12 Nakano M, Inouye T. Burdock yellows virus, a closterovirus from *Arctium lappa* L. Ann Phytopathol Soc Japan, 1980, 46: 7-10
- 13 Inouye T. Carnation necrotic fleck virus. CMI/AAB Descrip Plant Viruses, 1976, No. 136
- 14 Yamashita S, Ohki S, Doi Y, *et al*. Two yellows-type viruses detected from carrot. Ann Phytopathol Soc Japan, 1976, 42: 382-390
- 15 Inouye T. Wheat yellow leaf virus. CMI/AAB Descrip Plant viruses, 1976, No. 157



- 16 Hill HR, Zetter LW. A virus-like stunting of alligator weed from Florida. *Phytopathology*, 1973, 63:443
- 17 Liu HY, Duffus JE. Beet pseudo-yellow virus: purification and serology. *Phytopathology*, 1990, 80:866-869
- 18 Bar-Joseph M, Lee RF. Citrus tristeza virus. *CMI/AAB Descrip Plant Viruses*. 1989, No.353
- 19 Woudt LP, de Rover AP, de Haan PT *et al.* Sequence analysis of the RNA genome of cucumber chlorotic spot virus (CCSV), a whitefly transmitted closterovirus. *Int Congr Virol*, 9th, Glasgow, 1993, 326
- 20 Yamashita S, Doi Y, Yora K *et al.* Cucumber yellows virus: its transmission by the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), and the yellowing disease of cucumber and muskmelon caused by the virus. *Ann Phytopathol Soc Japan*, 1979; 45:484-496
- 21 Lesemann DE. Long filamentous virus-like particles associated with vein necrosis of *Dendrobium phalaenopsis*. *Phytopathol Z*, 1977, 89:330-334
- 22 Larsen RC, Kim KS, Scott HA. Properties and cytopathology of Diodia vein chlorosis virus—a new whitefly transmitted virus. *Phytopathology*, 1991, 81:227-232
- 23 Schmidt HB, Richter J, Hertsch W *et al.* Untersuchungen über eine virusbedingte Nekrose an Futtergräsern. *Phytopathol Z*, 1963, 47:66-74
- 24 Namba S, Boscia D, Azzam O *et al.* Purification and properties of closterovirus-like particles associated with grapevine corky bark disease. *Phytopathology*, 1991, 81:964-970
- 25 Gugerli P, Brugger JJ, Bovey R. L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev Suisse Vitic Arboric Hort*, 1984, 16:299-304
- 26 Zimmermann D, Bass P, Legin R *et al.* Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine. *J Phytopathol*, 1990, 130:205-218
- 27 Rosciglione B, Gugerli P. Maladies de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et serologique. *Rev Suisse Vitic Arboric Hort*, 1986, 18:207-211
- 28 Zee F, Gonsalves D, Gobeem A *et al.* Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated closterovirus-like particles. *Phytopathology*, 1987, 77:1427-1434
- 29 Hu JS, Gonsalves D, Teliz D. Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *J Phytopathol*, 1990, 128:1-14
- 30 Bem F, Murant AF. Transmission and differentiation of six viruses infection hogweed (*Heracleum sphondylium*) in Scotland. *Ann Appl Biol*, 1979, 92:237-242
- 31 Duffus JE, Larsen RC, Liu HY. Lettuce infectious yellows virus—a new type of whitefly-transmitted virus. *Phytopathology*, 1986, 76:97-100
- 32 Gunasinghe UB, German TL. Purification and partial characterization of a virus from pineapple. *Phytopathology*, 1989, 79:1337-1341
- 33 Lockhart BEL, Autrey LJC, Comstock JC. Partial purification and serology of sugarcane mild mosaic virus, a mealybug-transmitted closterovirus-like virus. *Phytopathology*, 1992, 82:691-695
- 34 Agranovsky AA, Boyko VP, Karasev AV *et al.* Nucleotide sequence of the 3'-terminal half of beet yellows closterovirus RNA genome: unique arrangement of eight virus genes. *J Gen Virol*, 1991, 72:15-23
- 35 Pappu HR, Karasev AV, Anderson EJ *et al.* Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology*, 1994, 199:35-46
- 36 Karasev AV, Nikolaeva OV, Koonin EV *et al.* Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. *J Gen Virol*, 1994, 75:1415-1422
- 37 Karasev AV, Agranovsky AA, Rogov VV *et al.* Virion RNA of beet yellows closterovirus: cell-free translation and some properties. *J Gen Virol*, 1989, 70:241-245
- 38 Ten Dam EB, Pleij CW, Bosch L. RNA pseudoknots: Translational frameshifting and read through on viral RNAs. *Vir Gen*, 1990, 4:121-136
- 39 Hill ME, Karasev AV, Pappu HR *et al.* Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virolo-*

- gy. 1995, 208:576~582
- 40 German S, Candresse T, Lanneau M *et al.* Nucleotide sequence and genomic organization of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology*, 1990, 179:104~112
- 41 Yoshikawa N, Sasaki E, Kato M *et al.* The nucleotide sequence of apple stem grooping capillovirus genome. *Virology*, 1992, 191:98~105
- 42 Hu JS, Gonsalves D, Boscia D *et al.* Comparison of rapid detection assays for grapevine leafroll disease associated closteroviruses. *Vitis*, 1991, 30:87~95
- 43 Saldarelli P, Minafra A, Martelli GP *et al.* Detection of grapevine leafroll - associated closterovirus III by molecular hybridization. *Plant Pathol*, 1994, 43:91~96
- 44 Minafra A, Hadidi A. Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll - associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *J Virol Methods*, 1994, 74:175~188
- 45 Ling KS, Hu JS, Gonsalves D. Molecular cloning and detection of grapevine leafroll virus by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction (Abst). *Phytopathology*, 1993, 83:245
- 46 Coffin RS, Courtts RHA. DsRNA cloning and diagnosis of beet pseudo - yellows virus by PCR and nucleic acid hybridization. *Intervirolgy*, 1992, 33:197~203

欢迎订阅 欢迎投稿

## 《应用与环境生物学报》(季刊)

刊号  $\frac{\text{ISSN } 1006 - 687X}{\text{CN } 51 - 1482/Q}$  邮发代号:62-15

《应用与环境生物学报》是由国家科委批准,中国科学院主管,中国科学院成都生物研究所主办并于 1995-03-25 由科学出版社出版的全国学术性科技期刊(学报级)。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊特约的综述或述评。

《应用与环境生物学报》是我国科学研究所、研究所、各大专院校以及各科技情报所、图书馆必备的科技刊物,是我国科学工作者、大专院校师生以及有关科技工作者进行科学交流的良好园地。

《应用与环境生物学报》为季刊,季末月 25 日出版,每期 96 页,期定价 11.00 元。全国各地邮局(所)均可订阅。新订户可向本刊编辑部补购 1995、1996、1997 各卷(卷价分别为 32.00 元、44.00 元和 44.00 元)。编辑部地址:610041 成都市人民南路 4 段 9 号;中国科学院成都生物研究所学报编辑部 电话:(028)5229903 (联系人:刘东渝)