从云南分离的烟草曲顶病毒为菜豆金色花叶病毒属的一个新种

谢 艳^① 周雪平^{①*} 张仲凯^② 戚益军^①

(^①浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029; ^②云南省农业生物技术重点实验室, 昆明 650223. * 联系人, E-mail: xzhou@mail.hz.zj.cn)

摘要 从我国云南省保山地区烟草上表现曲顶症状的植株上分离获得病毒分离物 Y₁, 经粉虱传毒及粒子形态观察, 证明为菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)病毒. 用 14 种单克隆抗体进行三抗体夹心 ELISA 测定, 结果表明 Y₁ 与我国及巴基斯坦、印度等国报道的双生病毒的抗原表位型均不同. 对 Y₁ 基因组 DNA-A 的全序列进行了分析, 全长 2746 个核苷酸, 其中病毒链含有两个 ORF, 互补链含有 4 个 ORF. Y₁ 与其他双生病毒基因组 DNA-A 全序列、基因间隔区序列及各 ORF 编码的氨基酸序列的比较分析表明, Y₁ 是一种新的 *Begomovirus* 病毒, 定名为烟草曲顶病毒, 英文名为 *Tobacco curly top virus*, 简称 TCTV. TCTV 全基因组与印度报道的番茄曲叶病毒和番木瓜曲叶病毒的同源性最高, 达 85%, 而其 CP 基因与巴基斯坦棉花曲叶病毒分离物 72 b 高度同源, 氨基酸水平的同源性达 98%.

关键词 烟草曲顶病毒 *Begomovirus* 新种 重组

粉虱传双生病毒是一类具有孪生颗粒形态的植物 DNA 病毒, 由烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播. 该类病毒分类上属双生病毒科(Geminiviridae)中的菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*). 近年来, 这类病毒已在 39 个国家的番茄、木薯和棉花等多种作物上造成毁灭性危害^[1~3]. 已有的研究表明, 这类病毒基因组变异很快, 特别是存在着病毒基因组重组, 基因组重组后产生的新病毒可造成病毒的大流行^[4~6].

我国对粉虱传双生病毒基因组结构及变异进化等尚没有深入研究. 鉴于这类病毒正在全球范围内日益猖獗危害, 深入开展这类病毒的基因组变异进化研究可望了解我国粉虱传双生病毒的变异进化规律, 以防范因重组等产生新病毒而造成病毒突发性流行. 为此我们首先对云南烟草双生病毒开展了研究, 并发现了 *Begomovirus* 的一个新种, 定名为烟草曲顶病毒(*Tobacco curly top virus*, TCTV). 本文报道了该病毒的血清学特性及 DNA-A 基因组结构.

1 材料与方法

(i) 病毒. 病毒分离物 Y₁ 采自云南保山地区, 病株表现植株矮化、茎秆顶部扭曲等症状. 其他病毒分离物均由英国苏格兰作物研究所 Harrison 教授提供.

(ii) 粉虱传毒试验. 按 Harrison 等人^[7]的方法进行.

(iii) 粒子形态观察. 采用免疫电子显微镜观察. 将南瓜曲叶病毒抗体(苏格兰作物研究所提供)吸附铜网后, 捕捉病叶初汁液中的粒子, 然后用 pH 6.0 的醋酸铀染色后电子显微镜观察粒子形态.

(iv) 三抗体夹心 ELISA 测定. 按 Zhou 等人^[5]的方法进行. 非洲木薯花叶病毒(ACMV)多克隆抗体及双生病毒的单克隆抗体 SCR14-SCR68 均由英国苏格兰作物研究所 Harrison 教授提供.

(v) DNA 提取及 PCR 扩增. 取 10 mg 烟草病叶, 加 100 μL 0.5 mol/L NaOH, 匀浆后低速离心, 上清液用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)稀释 100 倍, 取 1 μL 作为模板进行 PCR 扩增. 根据双生病毒共同区及外壳蛋白基因保守序列设计引物 PA(TAATATTACCKGWKGVCCSC)和 PB(TGGACYTTTRCAWGGGCC-TTCACA), 扩增 DNA-A 部分区域, 并进行克隆及序列测定, 然后根据测出的序列设计引物 TLCV/R(ATCTGCTGGTCGCTTCGACAT)和 TLCV/F(CCGCGCTCTCAACTTCGACAG), 扩增近全长的 DNA-A. PCR 反应条件参照 Zhou 等人^[5]的方法.

(vi) 序列测定及分析. 参照周等人^[8]的方法. 除通用引物外, 根据测出序列设计了 3 个引物 TLCV/F1(GTGACTGGTGGACAATATGC), TLCV/F3(ATCTTGAATAGAGGGGATT)和 TLCV/R1(ACGG-ATGGCCGCTTTTGGAT), 用于序列测定.

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SS2001-0417-1459>

2 结果

2.1 病毒病症状及粒子形态

据 1998 和 1999 年调查, 在云南保山香料烟田中, 烟草曲顶病发生较为普遍, 植株得病后的主要症状为植株矮化, 植株茎秆顶部扭曲, 叶脉微突, 呈墨绿色, 植株叶片没有明显的曲叶症状(图 1). 取 Y₁ 病株, 传毒试验表明, 烟粉虱可传播该病害, 并在烟草上产生植株矮化、茎秆顶扭曲等类似田间病株的症状; 利用免疫电子显微镜, 可观察到病毒粒子形态为孪生状, 大小约为 20 nm × 30 nm(图 2), 证明该病害的病原为粉虱传双生病毒.

图 1 田间烟草曲顶病毒感染的烟草曲顶症状

图 2 烟草曲顶病毒粒子形态

2.2 抗原表位型比较

利用 ACMV 及印度木薯花叶病毒(ICMV)的单抗进行三抗体夹心 ELISA(TAS-ELISA)测定, 结果见表 1. 从表 1 可知 Y₁ 与我们在云南分离的烟草曲叶病毒 Y₃ 分离物(TLCV-Y₃)、巴基斯坦的烟草曲叶病毒(TLCV-PK)、印度的烟草曲叶病毒(TLCV-IN)及我国已报道的番茄黄化曲叶病毒(TYLCV-CN)和烟草曲叶病毒(TLCV-CN)^[9]的抗原表位型均有明显的差异. 说明 Y₁ 在抗原上与这些病毒有较大的差异.

2.3 病毒基因组 DNA-A 结构

序列测定表明, Y₁ DNA-A 全长 2746 个核苷酸(nt) (GenBank 登录号: AF240675). DNA-A 共编码 6 个可读框(ORF), 其中病毒链编码 AV₁(CP)和 AV₂ 2 个 ORF, 互补链编码 AC₁(Rep), AC₂, AC₃ 和 AC₄ 4 个 ORF. DNA-A 还含有一个较长的非编码区, 并含有保守序列 TAATATTAC 及 TATA 盒(核苷酸 2660~2663 位), 还有重复序列 CAATCGGG(核苷酸 2637~2644 位, 重复于核苷酸 2609~2616 位)和 GGGTCG(核苷酸 2649~2655 位, 重复于 2614~2620 位). Y₁ 的基因组结构为典型的粉虱传双生病毒.

2.4 DNA-A 与其他双生病毒的比较

基因库检索表明, Y₁ 基因组与亚洲报道的粉虱传双生病毒的基因组同源性最高, 而与非洲、地中海地区及美洲报道的粉虱传双生病毒的同源性相对较低. 对 Y₁ 与在亚洲报道的 14 个粉虱传双生病毒基因组做了比较分析(表 2). 从全基因组看, Y₁ 与印度报道的番木瓜曲叶病毒(PapLCV-IN)和番茄曲叶病毒(ToLCV-IN)的同源性最高, 达 85%, 与其他病毒的同源性均在 81% 以下. 从基因间隔区序列看, Y₁ 除和泰国报道的番茄黄化曲叶病毒(TYLCV-TH)有较高同源性(81%)外, 与其他 13 种病毒间均有较大的差异, 同源性仅为 56%~80%. Y₁ 的 CP 氨基酸序列与多种病

表 1 烟草曲顶病毒与其他双生病毒的抗原表位型比较^{a)}

病毒	单克隆抗体(SCR 号)													
	14	17	18	20	23	32	53	54	55	56	58	62	66	68
Y1	0	0	2	0	0	0	0	3	2	2	0	1	1	0
TLCV-Y3	0	0	4	4	0	0	1	2	2	3	3	0	2	0
TLCV-PK	0	0	4	0	0	0	0	4	4	3	0	3	4	3
TLCV-IN	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0

a) 14~32 为 ACMV 的单抗; 53~68 为 ICMV 的单抗. 表中数值表示 405 nm 的吸光值, 4 示>1.8, 3 示 1.21~1.8, 2 示 0.61~1.2, 1 示 0.31~0.6, 0 示<0.3

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2001-46-17-1459>

表 2 烟草曲顶病毒与其他双生病毒 DNA-A 的核苷酸及氨基酸序列同源性比较/%

病毒	全序列	IR	AV ₂	AV ₁ (CP)	AC ₁ (Rep)	AC ₂	AC ₃	AC ₄	基因库登录号
Y3	79	80	96	81	79	63	66	46	AF240674
AYVV	77	71	78	82	76	60	68	43	X74516
CLCuV-a	75	62	69	93	73	71	70	49	Zhou 等 ^[2]
CLCuV-26	76	62	69	93	75	71	70	52	AJ002458
CLCuV-72b	81	58	95	98	76	79	79	47	AJ002448
CLCuV-804a	72	59	69	94	68	67	69	36	AJ002452
ICMV	74	58	71	91	73	59	68	47	Z24758
OLCV-311	75	62	70	93	73	70	70	49	AJ002459
OYVV-201	74	56	70	94	73	66	68	47	AJ002451
OYVV-301	74	55	69	93	75	65	69	46	AJ002453
PapLCV-IN	85	71	92	97	70	87	86	37	Y15934
PepLCV-TH	78	72	71	79	79	67	65	77	AF134484
ToLCV-IN	85	61	73	93	73	58	65	60	U38239
TYLCV-TH	81	81	77	78	83	71	67	91	X63015

毒都有较高的同源性(> 94%), 特别是与巴基斯坦的棉花曲叶病毒 72b 分离物(CLCuV-72b)和 PapLCV-IN 有极高的同源性, 分别为 98%和 97%(氨基酸水平). Y₁ 的 AV₂ 基因与 TLCV-Y₃ 具有较高同源性, 达 96%(氨基酸水平). Y₁ 的 AC₁ 基因与其他病毒的同源性均在 83%以下. Y₁ 的 AC₂ 和 AC₃ 除与 PapLCV-IN 有较高同源性(87%和 86%)外, 其余均在 79%以下. Y₁ 的 AC₄ 基因除与 TYLCV-TH 有 91%的同源性外, 其余均在 77%以下.

2.5 分子进化分析

根据外壳蛋白氨基酸序列及 AC₁ 基因编码的氨基酸序列分别构建了系统关系树(图 3). 从图 3 可以

看出 Y₁ 基因组在进化上与亚洲报道的双生病毒相近. 就 AC₁ 而言, Y₁ 与 PepLCV-TH 的亲缘关系最近, 与 TYLCV-TH 也较近, 这 3 个病毒形成一个亚分支. 从 CP 看, Y₁ 与亚洲报道的大多双生病毒一起形成一分支, Y₁ 与 CLCuV-72b 和 PapLCV-IN 的亲缘关系最近形成一亚分支, 而我国报道的 SqLCV-CN^[10] 与 ToLCV-IN 形成一亚分支. 我国报道的另一病毒 TLCV-CN^[11] 则与 ToLCV-AU, AYVV 和 PepLCV-TH 一起形成另一分支. Y₁ 的 AC₁ 和 CP 氨基酸序列的系统关系树表明 Y₁ 的不同基因起源于不同的祖先, 并且很可能是由 CLCuV-72b 相近的病毒及其他病毒之间重组产生的.

图 3 双生病毒各基因的系统关系树

3 讨论

我们对从云南烟草上分离到的烟草曲顶病毒 Y₁ 分离物进行了研究, 粒子形态观察、血清学测定及 DNA-A 全序列分析表明, Y₁ 为典型的 *Begomovirus* 病毒。

Begomovirus 病毒种类很多, 并且存在许多变株。目前这类病毒的分类主要依据是基因组全序列, 特别是 DNA-A 全序列, 因为该属中有些病毒缺乏 DNA-B^[3]。一般双生病毒科病毒全基因组核苷酸序列同源性小于 90%, 往往定为不同的病毒, 大于 90% 则认为是同一病毒的不同株系^[12]。经基因库检索, 我们发现 Y₁ 与亚洲报道的粉虱传双生病毒关系较近。因此, 我们将 Y₁ 与这些病毒做了深入的比较。Y₁ DNA-A 全基因组核苷酸序列除与 PapLCV-IN 和 ToLCV-IN 有 85% 同源性外, 与其他病毒均在 81% 以下, 说明 Y₁ 是一种新的双生病毒。Y₁ 基因组上不同区域分别与不同的病毒具有亲缘性, 说明 Y₁ 基因组不同区域起源于不同病毒。Y₁ 的 CP 与 CLCuV-72b 和 PapLCV-IN 有极高的同源性(分别为 98% 和 97%), 说明这些病毒的 CP 基因起源于同一病毒祖先, 且很可能是由于与不同的双生病毒重组及进一步分化而形成了不同的病毒。

侵染烟草的 *Begomovirus* 病毒, 往往引起曲叶症状, 但 Y₁ 分离物并不引起曲叶症状, 却引起典型的曲顶症状, 根据病毒分类委员会第 7 次报告的命名原则^[13], 我们将该病毒命名为烟草曲顶病毒, 英文名为 *Tobacco curly top virus*, 简称为 TCTV。

致谢 本工作作为教育部“跨世纪优秀人才培养计划”基金、教育部“高等学校优秀青年教学和科研奖励基金”、浙江省青年人才专项资金及国家自然科学基金(批准号: 3996005)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Moffat A S. Plant pathology-geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science*, 1999, 286: 1835
- 2 Zhou X P, Liu Y L, Robinson D J, et al. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 915~923
- 3 Harrison B D, Robinson D J. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (*Begomoviruses*). *Annual Review of Phytopathology*, 1999, 37: 369~398
- 4 Padidam M, Sawyers F C M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 1999, 265: 218~225
- 5 Zhou X P, Liu Y L, Calvert L, et al. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology*, 1997, 78: 2101~2111
- 6 Harrison B D, Zhou X, Otim-Nape G W, et al. Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. *Ann Appl Biol*, 1997, 131: 437~448
- 7 Harrison B D, Liu Y L, Khalid S, et al. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Ann Appl Biol*, 1997, 130: 61~75
- 8 薛朝阳, 周雪平, 陈青, 等. 烟草花叶病毒蚕豆株系基因组全序列分析及结构特征. *中国科学, C 辑*, 1999, 29(6): 655~662
- 9 刘玉乐, 蔡健和, 李冬玲, 等. 中国番茄黄化曲叶病毒——双生病毒的一个新种. *中国科学, C 辑*, 1998, 28(2): 148~153
- 10 洪益国, 蔡健和, 王小凤, 等. 中国南瓜曲叶病毒: 一个双生病毒新种. *中国科学, B 辑*, 1994, 24(7): 608~613
- 11 洪益国, 蔡健和, 王小凤, 等. 烟草曲叶双生病毒分子进化的初步研究. *科学通报*, 1994, 39(2): 165~168
- 12 Padidam M, Beachy R N, Fauquet C M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology*, 1995, 76: 249~263
- 13 van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*. London: Academic Press, 2000. 15~297

(2001-02-27 收稿, 2001-06-25 收修改稿)