

## 广东烟草花叶病毒株系研究

付鸣佳\* 高乔婉 范怀忠

(华南农业大学植保系, 广州 510642)

5432.4  
5435.72

A

**摘要** 烟草花叶病毒(TMV)引起的烟草花叶病在广东不同的烟草主产区存在着症状的差异。从广东梅州和南雄烟区采集的138个TMV标样中,选取6个不同症状的分离物作为研究对象,发现它们在不同种属寄主和不同烟草品种上表现明显的TMV普通株特征症状,虽然在某些寄主上其症状也有一些差异,但未能反映株系间的差异。这6个分离物具有几乎相同的病毒粒子形态、电泳迁移率、钝化温度以及紫外吸收特征。经琼脂双扩散法和间接ELISA法的血清学反应,表明它们具较强的血清学关系。因而它们有很强的同源性。经病毒粒体外壳蛋白的氨基酸分析,在氨基酸总数上,分离物GD<sub>1</sub>和GD<sub>3</sub>各有156个氨基酸,GD<sub>2</sub>和GD<sub>4</sub>各有159个,GD<sub>5</sub>和GD<sub>6</sub>分别有158和157个氨基酸。上述分析试验结果初步表明,在广东不同烟草主产区引起的症状有所差异的6个分离物均属TMV普通株。

**关键词** 烟草花叶病毒; 株系; 鉴定

植物病毒

在不同寄主植物上, TMV具有很多株系<sup>[1]</sup>, 主要有普通株、番茄株、车前株、豆类株、葫芦科株、兰花株、U<sub>2</sub>株等。但在烟草上则包括OM株(日本)、U<sub>1</sub>株(美国)和Vulgare株(西德)。这三个普通株的病毒外壳蛋白(CP)氨基酸序列已进行了分析比较<sup>[2]</sup>。

广东梅州和南雄两大烟区由TMV引致的烟草花叶病的症状呈现绿岛、脉带、斑驳和蕨叶等不同类型。不同症状类型有可能是不同株系的反映。本研究对上述两烟区不同症状的6个TMV分离物的生物学、形态特征、血清学和部分理化特性进行了初步的株系研究。在理论上、病害防治上(特别在转基因工程方面)有其重要意义。

## 材料与amp;方法

## 1 分离物的来源

TMV 6个分离物分别采自广东烟草主产区表现不同症状类型的代表性标样,经心叶烟及TMV抗血清鉴定证明是属于TMV的138个标样中选取的。分离物GD<sub>1</sub>为绿岛(梅县松源),GD<sub>2</sub>为大面积褪绿(大埔党坪),GD<sub>3</sub>为脉带(大埔西河),GD<sub>4</sub>为脉带(蕉岭广福),GD<sub>5</sub>为橡叶症(大埔青溪),GD<sub>6</sub>为小黄斑症(南雄湖口)。经心叶烟三次单斑纯化后,保存于哈瓦那38号烟草上作试验材料。

## 2 鉴别寄主

## 2.1 不同科属的寄主谱

以常规摩擦接种法把六个分离物分别接种下列寄主植物:茄科(Solanaceae)的心叶烟(*Nicotiana glauca*); 苋科(Amaranthaceae)的千日红(*Gomphrena globosa*); 葫芦科(Cucurbitaceae)的西葫芦(*Cucurbita pepo*); 车前科(Plantaginaceae)的车前草(*Plantago asiatica*); 十字花科(Cruciferae)的小白菜(*Brassica chinensis*); 豆科

收稿日期:1996-07-22, 修回日期:1996-08-06

\* 现在通讯地址:江西上高宜春农校,江西宜春,邮编336400

(Leguminosae)的豇豆(*Vigna sinensis*)。

## 2.2 烟草不同品种的寄主谱

以常规摩擦接种法将6个分离物分别接种下列不同品种的烟苗:K326(*Nicotiana tabacum* var. k326)、哈瓦那38号(*N. tabacum* var. *havana*<sub>38</sub>)、G28(*N. tabacum* var. G28)、白腊烟KY21(*N. tabacum* var. *White Barley* KY21)、黄花烟(*N. rustica*)、红花大金元(*N. spp.*)。

## 3 病毒的提纯

按常规方法,将各分离物的澄清液采用PEG沉淀结合超离心法提取粗提纯液。按文献<sup>[3]</sup>采用20~50%蔗糖密度梯度离心,制备精提纯液。

## 4 病毒颗粒大小

按常规方法测定。

## 5 血清学方法

按常规方法制备分离物GD<sub>4</sub>的抗血清。SPA-ELISA方法按文献方法<sup>[4]</sup>。

## 6 病毒颗粒迁移率比较

采用琼脂糖电泳,胶浓度为0.5%,电泳缓冲液为pH7.2的0.02 mol/L磷酸缓冲液,每孔点样10 μL,电压控制在60 V,电泳约90 min。

## 7 病毒外壳蛋白亚基分子量测定

### 7.1 病毒外壳蛋白(CP)的提取

采用Fraenkel-Conrat(1957)醋酸法,略加修改。4℃的纯化病毒液(病毒含量为1~5 mg/mL)加二倍体积的4℃冰醋酸,冰浴时搅拌或振荡15 min,5000 r/min离心15 min除去RNA沉淀,取上清液加等体积蒸馏水,4℃冰箱中透析3 d(每天换水数次),当TMV CP接近等电点时开始聚集,加入数滴3 mol/L NaAc缓冲液(pH4.7),使其沉淀完全,12000 r/min离心30 min, pH7~8的NaOH溶液溶解沉淀,4000 r/min离心10 min,上清液即为病毒CP液。

### 7.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

参照Laemmli(1970)方法。浓缩胶浓度为3%,分离胶浓度7.5%。标准蛋白分别是:乳过氧化物酶(MW 92000, Sigma公司产品)、牛血清白蛋白(MW 67000, 上海生化试剂站分装)、卵清蛋白(MW 43000, 华美生物工程公司产品)、乳酸脱氢酶(MW 38000, Serva公司产品)、RNA酶(MW 13700, 华美生物工程公司产品)。

## 8 CP氨基酸组成分析

病毒CP氨基酸组成分析主要在日立831-50型氨基酸自动分析仪上进行。色氨酸和半胱氨酸用化学法分析。按文献,色氨酸的分析用二甲基苯甲醛法<sup>[7]</sup>,半胱氨酸的分析用Ellman-DTNB法<sup>[8]</sup>。

# 结 果

## 1 鉴别寄主

### 1.1 不同科属寄主植物上的人工接种症状

在千日红上6个分离物呈现三类症状类型:分离物GD<sub>1</sub>在接种叶上产生局部坏死斑;GD<sub>2</sub>和GD<sub>6</sub>产生局部坏死斑、花叶和系统性坏死斑;GD<sub>3</sub>、GD<sub>4</sub>和GD<sub>5</sub>除花叶和系统性坏死斑外,还有系统性红色脉带症。6个分离物不侵染西葫芦、车前草、小白菜和豇豆。

### 1.2 不同烟草品种的人工接种症状

在K326、G28和红花大金元烟上6个分离物均表现田间所呈现的不同类型的花叶症状和畸形症状。在KY21和黄花烟接种叶上均产生局部枯斑,但在黄花烟上它们还会产生顶端坏死的系统性症状。在哈瓦那38号烟上,它们都产生稳定的脉带症状。上述症状出现的时间和

发病程度各分离物在各供试烟草品种上基本相同。可见这6个分离物的致病力基本相同。

表1 在不同品种烟上六个分离物症状

Table 1 Symptoms induced in different tobacco varieties by the 6 TMV isolates

寄主 Host	GD <sub>1</sub>	GD <sub>2</sub>	GD <sub>3</sub>	GD <sub>4</sub>	GD <sub>5</sub>	GD <sub>6</sub>
K326 烟 ( <i>N. tabacum</i> var. K326)	M, Vb	M, Vb	M, Vb	M, Vb	M, Vb	M, Vb
红花大金元烟( <i>N. spp</i> )G28 烟 ( <i>N. tabacum</i> var. G28)	DL, GI Vb	DL, GI Vb	DL, Vb DL, Vb	DL, Vb Mo, Vb	DL, Vb Vb	DL, Vb Vb
KY21 烟( <i>N. tabacum</i> var. <i>White Barley</i> KY21)	o/NS'	o/NS	o/NS	o/NS	o/NS	o/NS
黄花烟( <i>N. rustica</i> ) 38 号烟( <i>N. tabacum</i> var. <i>Haruma</i> 38)	N/NS Vb	TN/NS Vb	TN/NS Vb	TN/NS Vb	TN/NS Vb	TN/NS Vb

注:系统性症状/局部症状;DL:畸叶;GI:绿岛症;M:花叶;Mo:斑驳;NS:坏死斑;TN:顶端坏死;Vb:脉带;O:无症;

Notes: systemic symptoms/local symptoms; DL:distorting leaf; GI:green island; M:mosaic; Mo:mottle; NS:necrotic spot; TN:top necrosis; Vb:vein banding; O:symptomless

## 2 病毒的纯度

经蔗糖密度梯度离心以后,6个分离物用DU-7紫外分光仪扫描,紫外吸收曲线均为典型TMV曲线,吸收低峰和吸收高峰分别都在(或非常接近)248 nm处和260 nm处;A<sub>280</sub>/260均很接近0.84, A<sub>260</sub>/248均很接近1.09(表2)。这与文献报道TMV紫外吸收特征基本吻合。

表2 六个分离物紫外吸收特征值

Table 2 Values of ultraviolet light absorbing characteristics of the 6 TMV isolates

分离物 Isolate	A 最高吸收(nm) Highest A(nm)	A 最低吸收(nm) Lowerest A(nm)	A <sub>280</sub> /260	A <sub>260</sub> /248
GD <sub>1</sub>	260	248.2	0.836	1.097
GD <sub>2</sub>	260	248	0.835	1.106
GD <sub>3</sub>	260	248.2	0.835	1.103
GD <sub>4</sub>	260.2	248	0.835	1.104
GD <sub>5</sub>	259.7	248	0.828	1.098
GD <sub>6</sub>	260	247.5	0.835	1.100

## 3 6个分离物的病毒粒体大小

经电镜观察,6个分离物都为杆状空心结构(图1),它们的大小差别不大,经分别测量100个粒体长度,取平均值,GD<sub>1</sub>为309×18 nm, GD<sub>2</sub>为313×18 nm, GD<sub>3</sub>为314×18 nm, GD<sub>4</sub>为307×18 nm, GD<sub>5</sub>为311×18 nm, GD<sub>6</sub>为305×18 nm。但经精提纯后,病毒粒子间互相连接成长杆状。

## 4 6个分离物的血清学关系

TMV 6个分离物在琼脂双扩反应中,所形成的沉淀带互相吻合;它们经SPA-



图1 GD<sub>1</sub>精提纯后的粒体电镜图

Fig 1 Electron micrograph of refined purified GD<sub>1</sub> virions (magnified 100000×)

ELISA 测定后,与 GD<sub>1</sub> 抗血清均呈阳性反应,酶标仪上读数均很接近,表明它们之间具非常密切的血清学关系。

#### 5 6个分离物电体迁移率

这6个分离物经电泳以后,每个分离物只形成一条带,6条带基本处在同一条直线上(图2),表明它们的迁移率基本相同,这只能说明这六个分离物是同一株系。

#### 6 6个分离物的钝化温度(TIP)

经三次实验结果表明,6个分离物的 TIP 均在 90~95℃ 之间,无显著差异。

#### 7 6个分离物 CP 亚基分子量

经三次 SDS-PAGE 后的结果表明(图3),6个分离物的 CP 经电泳后均表现一条带,为单一组份,且迁移距离基本相同。根据标准蛋白工作曲线,可见分离物 GD<sub>1</sub> 的 CP 分子量(三次平均值)为 16800、GD<sub>2</sub> 的为 17000、GD<sub>3</sub> 的为 16800、GD<sub>4</sub> 的为 17000、GD<sub>5</sub> 的为 17100、GD<sub>6</sub> 的为 16900Da(误差在 ±10% 之内)。

#### 8 6个分离物 CP 氨基酸组份比较

根据实验结果,6个分离物的 CP 氨基酸组成(表3)有一定差异,分离物 GD<sub>1</sub> 的氨基酸总数为 156、GD<sub>2</sub> 的为 159、GD<sub>3</sub> 的为 156、GD<sub>4</sub> 的为 159、GD<sub>5</sub> 的为 157、GD<sub>6</sub> 的为 157。在各氨基酸的数目上比较,完全相同的有:Gly(均为 7 个)、Try(3 个)、Phe(8 个)、Arg(11 个)、Pro(8 个)、Lys(2 个)、Cys(1 个),它们均没有 Met 和 His。在其它氨基酸的数目上比较,它们或完全相同或相差 1~2 个。



图2 TMV6个分离物病毒粒体的迁移率

Fig 2 The electrophoretic mobilities of virions of the 6 TMV isolates

A:GD<sub>1</sub> B:GD<sub>2</sub> C:GD<sub>3</sub> D:GD<sub>4</sub>  
E:GD<sub>5</sub> F:GD<sub>6</sub>

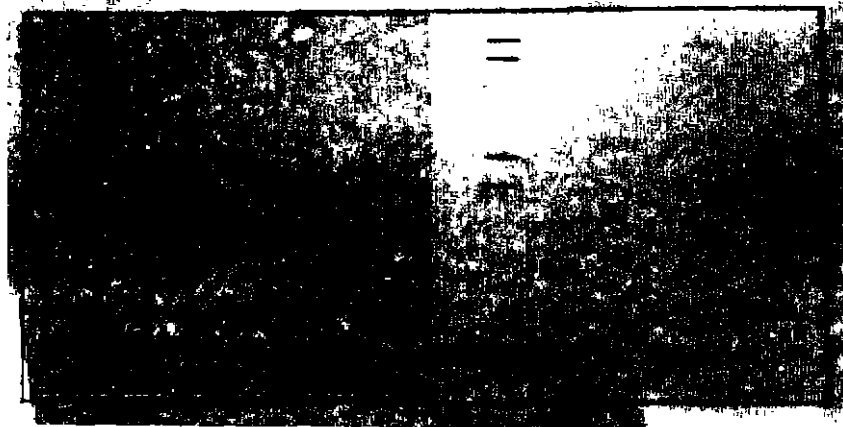


图3 SDS-PAGE 测 TMV6个分离物 CP 分子量

Fig 3 Molecular weight measurement of coat protein of the 6 isolates on SDS-polyacrylamides gels

A:GD<sub>1</sub> B:GD<sub>2</sub> C:GD<sub>3</sub> D:GD<sub>4</sub> E:GD<sub>5</sub> F:GD<sub>6</sub>

这6个分离物与文献报道的德国 Vulgare 株系的氨基酸组成比较相近,但也存在着一些微小差异(表3)。CP 氨基酸数有增加和减少,CP 氨基酸数中有所增加主要集中在 Glu、Gly 和

Leu 上,而氨基酸数有所减少主要集中在 Thr, Ser 和 Tyr 上。

表3 6个分离物与其它 TMV 株系 CP 氨基酸组份比较<sup>[9]</sup>

Table 3 Coat protein amino acid composition of the 6 TMV isolates compared with other strains<sup>[9]</sup>

氨基酸 Amino acid	Vu	Da	U2	HR	ORSV	C3	C4	Cc	Cw	GD <sub>1</sub>	GD <sub>2</sub>	GD <sub>2</sub>	GD <sub>4</sub>	GD <sub>5</sub>	GD <sub>6</sub>
Cys	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Asp	18	17	22	17	20	17	18	20	18	18	18	18	20	18	18
Thr	16	17	19	13	21	12	12	10	12	14	15	15	15	15	15
Ser	16	16	10	13	12	22	23	24	21	13	14	14	14	14	14
Glu	16	19	16	22	15	10	10	10	10	17	18	17	18	18	17
Gly	6	6	5	4	7	5	5	9	5	7	7	7	7	7	7
Ala	14	11	17	18	11	18	20	21	18	14	15	14	14	14	14
Val	14	15	12	10	10	14	14	7	13	15	14	14	15	14	14
Ile	9	7	8	8	8	5	7	7	8	9	9	8	8	9	9
Leu	12	13	11	11	14	13	12	18	12	13	13	13	12	13	13
Tyr	4	5	6	7	7	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3
Phe	8	8	8	6	7	10	11	9	12	8	8	8	8	8	8
Arg	11	9	8	10	9	9	10	8	10	11	11	11	11	11	11
Pro	8	8	10	8	9	8	9	6	10	8	8	8	8	8	8
Lys	2	2	1	2	1	3	4	4	4	2	2	2	2	2	2
Try	3	3	2	2	3	1	1	2	1	3	3	3	3	3	3
Met	0	1	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0
总数 Total	158	158	158	156	158	151	160	161	158	156	159	156	159	158	157

C3: 黄瓜花叶病毒 3; C4: 黄瓜花叶病毒 4; Cc: 黄瓜绿斑駁花叶病毒 c; Cw: 黄瓜绿斑駁花叶病毒 w; Da: dahlemense 株; HR: Holms 车前株; ORSV: 齿兰环斑病毒; Vu: vulgare 株

C3: cucumber mosaic virus 3; C4: cucumber mosaic virus 4; Cc: cucumber green mottle mosaic - c; Cw: cucumber green mottle mosaic w; Da: Dahlemense strain; HR: Holmes ribgrass virus; ORSV: odontoglossum ringspot virus; Vu: vulgare strain

## 讨 论

本研究对来自广东梅州和南雄两大烟区和症状有所不同的有代表性的 6 个 TMV 分离物进行的鉴定结果表明:(1)它们在粒体形态特征上基本是相同的,都是长杆状,大小大致在 300~315×18 nm 之间;(2)在血清学关系上,用 SPA-ELISA 法和用一个分离物的血清就可表明它们具有很密切的同源关系,琼脂双扩散实验也得到相同结果;(3)在物理性质方面,它们的病毒粒体迁移率、CP 的亚基分子量、紫外吸收特征值和病毒钝化温度结果,均无显著差异;(4)在 CP 氨基酸组份方面,它们之间存在微小差异;(5)在寄主范围和鉴别寄主植物上,它们在不同科属的寄主上和在不同品种的烟苗上所反映的侵染性和症状基本相同,只是在千日红上有所差异。根据上述各方面的研究结果,我们初步认为采自广东不同烟区和症状有所不同的 6 个分离物,都同属于烟草 TMV 的普通株(暂称为广东烟草 TMV 普通株)。至于它们在田间所呈现的症状差异,可能是品种、生育期、温度及营养状况等差异而引致的。因而这些症状的差异,似乎不可能作为株系区分的依据。

从 TMV-CP 的氨基酸组成来看,广东烟草上的 TMV 普通株与 Vulgare 株较为接近,但存在某些差异,这些差异有待于 CP 氨基酸序列进一步确定。

此外,本试验6个分离物中有些在千日红和田间烟株上所出现的一些症状差异究竟说明什么问题?也有待进一步探讨。

### 参 考 文 献

- 1 Van Regenmortel M H V. Tobamoviruses. In: Kurstak E ed. Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981, 542~564
- 2 Nozu Y, Ohno T, Okada Y. Amino acid sequence of some common Japanese strains of tobacco mosaic virus. J Biochem, 1970, 68:39~52
- 3 Kwon S, Sako N. A new strain of rakkyo (*Allium chinense* G. Don). 日植病报, 1994, 60:36~44
- 4 Lonumel S A, Melain A H, Morris T J. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathology, 1982, 72:1018~1022
- 5 Fraenkel-Conrat H. Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid. Virology, 1957, 4:1~4
- 6 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 22:680~685
- 7 沈仁权,潘家秀. 色氨酸的测定,见:蔡武城,袁厚积主编. 生物物质常用化学分析法. 北京:科学出版社, 1982, 70~74
- 8 Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82:70~77
- 9 Fraenkel-Conrat H, Wagner K R. Comprehensive virology Vol. 1. Descriptive catalogue of virus. Lenum Press, 1974, 113

## Studies on Strains of TMV in Tobacco Production Areas in Guangdong Province

Fu Mingjia    Gao Qiaowan    Faan Hweichung

(Plant Protection Department, South-China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Six Tobacco-TMV isolates which cause different symptom expressions on tobacco in different tobacco production areas in Guangdong Province were selected from 138 samples and were studied. The symptom expression of the 6 Tobacco-TMV isolates on 6 differential host plants and 6 tobacco varieties were about the same, although some minor differences might exist. The morphology of the virus particles of the 6 isolates, their thermal inactivation points, electrophoretic mobility and ultraviolet light absorption were found to be about the same. By agar double-diffusion reaction and indirect ELISA, the 6 isolates were found to have very close serological relationship. The amino acid compositions of the coat proteins of the 6 isolates were found to be very similar each other and similar to the Vulgare strain, although minor differences existed in the amount of certain amino residues. According to the experimental results, it was concluded that the 6 isolates all belong to the common strain of TMV.

**Key words** TMV, Strain, Characterization