维普资讯 http://www.cqvip.com

第15卷4期 中国病毒学 Vol.15 No.4
2000年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 2000

405-408 (17)

中国烟草曲叶病毒广西株的初步研究

S435.72

张颖[1] 殷勤燕[1] 刘玉乐[1] 陈刚[1] 蔡健和[2] 田波[1]

S432.41

[1](中国科学院微生物研究所,北京 100080)
[2](广西农业科学院植物保护研究所,南宁 530007)

关键词:中国烟草曲叶病毒;广西株;中国番茄黄化曲叶病毒;双生病毒共同区;双生病毒全基因组DNA

中图分类号:S435.72 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2000)04-0405-04

双生病毒(Geminivirus)是一种具有孪生颗粒形态的单链环状DNA植物病毒[1]。根据基因组结构特征及传播介体,双生病毒可分为三个亚组[1]:亚组Ⅰ双生病毒全部为叶蝉传播的单组份基因组病毒,基因组大小在2.6~2.8 kb之间,其代表病毒是玉米条纹病毒(MSV);亚组Ⅱ双生病毒是单组份基因组病毒,基因组大小在2.7~3.0 kb之间;亚组Ⅲ双生病毒全部为粉虱(*Bemisiatabaci*)传播,基因组大小为2.5~2.8 kb,除番茄曲叶病毒TLCV-AUS[2]等几个病毒为单组份基因组外,大多数亚组Ⅲ双生病病毒均为双组份基因组,稍大的组份叫DNA A,一般编码四个基因,稍小的组份叫DNA B,编码二个基因。烟草曲叶病毒(TbLCV)和番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)都属于双生病毒亚组Ⅲ[3,4]。

本文报道的中国烟草曲叶病毒广西株与以前报导的烟草曲叶病毒症状有所不同,侵染烟草后导致叶片卷曲,但没有叶脉增生和耳状突起症状,是引起我国广西和云南地区烟草病害的主要病毒之一。本文初步从分子水平上证明了中国烟草曲叶病毒广西株与中国番茄黄化曲叶病毒为同一病毒,而不是以前报导的烟草曲叶病毒;并根据双生病毒共同区序列设计合成了背对背引物,从染病植株总DNA中扩增出了2.7 kb的该双生病毒全基因组DNA。

1 材料和方法

1.1 病毒材料

广西南宁地区有典型叶片卷曲症状的烟草叶片及正常无病叶片。

1.2 植物总DNA的制备

按文献[5]方法进行。

1.3 共同区(CR)和部分AV1蛋白基因序列的PCR扩增和克隆

PCR引物为:P1:5′ CGGGTACCATGGTCTCTAGCACGAATAACTG3′,P2:5′ CGTCTAGACTGGTCAATCGGTGTCTG3′;反应条件如下:94 ℃变性3 min,94 ℃/30 s,54 ℃/30 s,72 ℃/1 min,循环35次;72 ℃延伸10 min。分离纯化400 bp PCR病毒特异片段后,克隆入pUC19的*Kpn*1和*Xba*1位点之间。

收稿日期:1999-07-19,修回日期:1999-12-02
作者简介:张颖(1966年-),河北人,博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 DNA 序列测定

按 Pharmacia 公司 T7 Sequencing kit 指南进行。

1.5 双生病毒全基因组的 PCR 扩增

根据测出的双生病毒基因组共同区序列合成了背对背引物：

Z1：5′GGTCTTATTTATATGTGGACAC3′，Z2：5′CCAGACACCATTTGCATAGC3′；用于从植物总 DNA 中 PCR 扩增双生病毒的全基因组序列。反应条件为：94 ℃变性 3 min；94 ℃/1 min，54 ℃/1 min，72 ℃/3 min，循环 35 次；最后，72 ℃延伸 15 min。

2 结果和讨论

2.1 PCR 及 DNA 克隆

用白粉虱传双生病毒特异的 PCR 引物扩增中国烟草曲叶病毒广西株总 DNA，得到一个 400 bp 的病毒 DNA 特异片段，健康的烟草叶片无反应，见图 1。PCR 引物 P1 位于 AV1 蛋白 N 端第 52 个氨基酸的 DNA 序列处，引物 P2 位于共同区序列的另一端。该两个引物处的序列在至今已 DNA 测序的亚组Ⅲ双生病毒中都保守，这在理论上保证了此对引物适用于大多数亚组Ⅲ的双生病毒。更重要的是该 PCR 片段包括全部共同区序列和 AV1 蛋白 N 端 52 个氨基酸的 DNA 序列，基本可代表整个病毒基因组的特征[6]。序列分析表明(图 2)，这段序列与已经报导过的中国番茄黄化曲叶病毒[3]序列相同，而与烟草曲叶病毒[4]不同。初步从分子水平上证明该烟草曲叶病由中国番茄黄化曲叶病毒引起，而不是由烟草曲叶病毒引起。

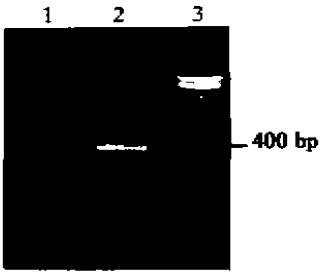

图 1 共同区和 AV1 蛋白 N 端 52 个氨基酸序列 PCR 产物

Fig.1 PCR products of the commom region and part of AV1

1. Control of health tobacco; 2. PCR products of TbLCV-Guangxi; 3. λ DNA/*Eco*RI + *Hin*dⅢ;

```
  1   ** CT  *** GGT *** CAA *** TCG *** GTG *** TCT * CTC AAA CTT GGC TAT GCA AAT GGT GTC TGG

 48   GGT CTT ATT TAT ATG TGG ACA CCA AAT GGC ATT ATC GTA ATT CCC AAA

 96   AGA AAT TCA AAA TTC AAA AGC GGC CAT CCG TAT AAT ATT ACC TGT TGG

144   CCG CGC GAT TTT TTT TAA AGT GGT CCC CCC CAT GTG CGC GTT TGT CCA

192   ATA GAA TGC GCT CCT CAA AGC TTA TTT ATT AAA TGG TCC CTT ATA AAA

240   CGT AGC TCC CAA GTA TAT ACG TCA AAC ATG TGG GAT CCA TTG CTT AAT
  1                                     Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn

288   GAG TTT CCT GAA ACC GTG CAC GGT TTT AGG TGC ATG TTA GCA ATT AAG
  8   Glu Phe Pro Glu Thr Val His Gly Phe Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys

336   TAT TTG CAG TTA GTC GAA AAT ACA TAC TCC CCC GAT ATA TTA GGT TAC
 24   Tyr Leu Gln Leu Val Glu Asn Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Leu Gly Tyr

                                   *** *** *** *** *** **
384   GAT TTA ATT CGT GAT TTA ATT TCA GTT ATT CGT GCT AGA GA----------
 40   Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val Ile Arg Ala Arg--------------
```

图 2 中国烟草曲叶病毒广西株的 CR DNA 序列和 AV1 部分 DNA 及氨基酸序列(* 表示 PCR 引物)

Fig.2 DNA sequence of the CR and part DNA and aa sequence of AV1 of TbLCV-Guangxi(* indicates PCR primers)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 双生病毒全基因组的 PCR 扩增

为了对引起这种烟草曲叶病的中国番茄黄化曲叶病毒做进一步研究，需克隆病毒的全基因组。由于不同种双生病毒共同区序列不同；同种双生病毒共同区序列相同。而双组份双生病毒的 DNA A 与 DNA B 组份的共同区序列高度同源。我们设计合成了背对背的 Z1 和 Z2 引物。Z1 和 Z2 均位于共同区序列中，保证了扩增出来的全基因组的完整性，即若为单组份病毒，则 PCR 产物中只有 DNA A 组份；若为双组份病毒，则 PCR 产物中应为 DNA A 和 DNA B 的混合物。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，结果如图 3，在染病植株总 DNA 中扩增出了 2.7 kb 的病毒全基因组特异片段；在健康植株总 DNA 中无反应。纯化 2.7 kb 的 DNA 片段，我们得到了中国番茄黄化曲叶病毒的全基因组，为对这种新病毒的研究打下了基础。

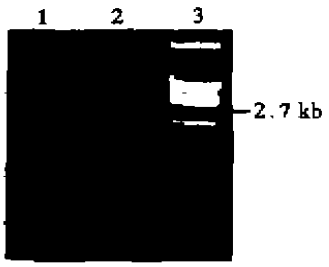

图 3　中国烟草曲叶病毒广西株全基因组的 PCR 产物

Fig.3　PCR products of the full genome of TbLCV-Guangxi

1. Control of health tobacco; 2. PCR products of TbLCV-Guangxi; 3. λ DNA/*Eco*R I + *Hin*dⅢ;

本研究通过对双生病毒共同区序列的比较首次初步从分子水平上证明了中国烟草曲叶病毒广西株与中国番茄黄化曲叶病毒为同一种病毒。并根据共同区序列 PCR 扩增出该病毒全基因组，对该病毒全基因组及各个功能区的研究正在进行中。

参 考 文 献

[1] Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, *et al*. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus[A]. New York: Spring-Verlag Wein, 1995. 158-165

[2] Dry IB, Rigden JE, Krake LR, *et al*. Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus[J]. J Gen Virol, 1993, 74: 147-151

[3] 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[J]. 中国科学, 1998, 28(2): 148-153

[4] 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[J]. 科学通报, 1994, 39(2): 165-168

[5] 刘玉乐. 双生病毒的分子生物学[D]. [学位论文]. 北京：中国科学院微生物所, 1997

[6] Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons[J]. J Gen Virol, 1995, 76(2): 249-263

维普资讯 http://www.cqvip.com

Preliminary Study on Chinese Tobacco Leaf Curl Gemnivirus-Guangxi Species

ZHANG Ying[1], YIN Qin-yan[1], LIU Yu-le[1], CHEN Gang[1], CAI Jian-he[2], TIAN Bo[1]

[1](*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*)

[2](*Institute of plant protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning* 530007, *China*)

Abstract: Using DNA of Chinese Tobacco Leaf Curl Virus-Guangxi (TbLCV-Guangxi) as the template, a 0.4 kb virus-specific fragment induding the total common region of the virus and DNA sequence of 52 aa of N-terminal of AV1 was obtained by PCR with primers specific to whitefly-transmittal gemniviruses, cloned and sequenced. This fragment can basically represent the characteristics of the virus full length genome. The sequence of this fragment is the same as that of chinese tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-Chi), which indicates that TbLCV-Guangxi and TYLCV-Chi are the same gemniviruses. According to the sequence of the common region of the 0.4 kb fragment, the virus full length genome DNA was amplified from the infected tobacco plant by PCR with primers back to back.

Key words: TbLCV-Guangxi; TYLV-Chi; Common region of geminiruses; Full length genome of geminiviruses