科 学 通 报
第39卷 第2期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1994年1月

烟草曲叶双生病毒分子进化的初步研究

洪益国 蔡健和① 王小凤 王文慧 黄 谊 田 波
(中国科学院微生物研究所,北京 100080;①广西农业科学院植物保护研究所,南宁 530007)

关键词 烟草曲叶双生病毒、外壳蛋白基因、分子进化

烟草曲叶病是烟草的主要病害之一,流行于热带和亚热带地区,其病原是烟草曲叶双生病毒(Tobacco leaf curl virus, TbLCV). TbLCV 由烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播,能侵染属于茄科(Solanaceae)和番木瓜科(Caricaceae)的许多植物. 在我国蔡健和等曾报道 TbLCV 的寄主范围、传毒媒介和与非洲木薯花叶双生病毒的血清学关系[1].

本文首次报道 TbLCV 外壳蛋白基因的核苷酸序列,在外壳蛋白氨基酸水平上比较与其它双生病毒的分子进化关系,为进一步研究其分子生物学特性奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 病毒材料

以广西南宁地区烟曲叶病毒为材料[1],采取温室中经烟粉虱(*Bemisia tabaci*)接种的烟草病叶(*Nicotiana tabacum*),在−20℃下保存备用.

1.2 总核酸的提取

参照洪益国的方法[1)].

1.3 病毒特异片段的 PCR

PCR 反应液参照洪益国配方[1)],采用简并引物 P_1(5′TAATATTACC(T/G)G(A/T)(G/T)G(A/G/C)CC(C/G)C3′)和 P_2(5′GTTGAT(C/T)ATGTATTGT(A/C)(T/C)(G/C/A)ATGTA3′),PCR 程序如下:94℃ 2min,52℃ 1.5min,72℃ 2min,循环 1 次,94℃ 30s,55℃ 1min,72℃ 1.5min,循环 30 次,最后 72℃反应 5min. 病毒特异的 PCR 产物经 1.0%低融点琼脂糖凝胶电泳分离纯化,用于分子克隆.

1.4 DNA 克隆和序列分析

纯化的 PCR 产物经 TaqI,MboI,AluI 和 RsaI 酶解,分别连接到 puc19 ACCI,BamHI 和 SmaI 位点,转化 JM105 感受态细胞,碱法制备重组质粒,dsDNA 序列测定均参照文献[2]方法. UWGCG 计算机软件处理分析所有序列数据. 与 TbLCV 比较的双生病毒包括:苘麻花叶病毒(AbMV)、菜豆矮缩花叶病毒(BDMV)、美国南瓜曲叶病毒(SqLCV-E)、番茄金黄花叶病毒(TGMV)、菜豆金黄花叶病毒(BGMV)、绿豆黄花叶病毒(MYMV)、以色列番茄黄曲叶病毒(TYLCV-I)、意大利番茄黄曲叶病毒(TYLCV-S)、非州木薯花叶病毒(ACMV-K)、印度木薯花叶病毒(ICMV)、马唐条点病毒(DSV)、玉米线条病毒(MSV)、虎尾草条纹花叶病毒

1993-03-29 收稿,1993-08-10 收修改稿.

1) 洪益国,博士论文,中国科学院微生物研究所,北京,1990.

(CSMV)、烟草黄矮病毒(TobYDV)、小麦矮缩病毒(WDV)、甜菜曲顶病毒(BCTV)[3-11]中国南瓜曲叶病毒(SqLCV-C)和泰国番茄黄曲叶病毒(TYLCV-T).

2 结果与讨论

2.1 PCR和DNA克隆

用简并引物合成出病毒特异的PCR产物,其大小1.2—1.3kb,由于P_1位于双生病毒外壳蛋白基因上游共同区域的保守序列,P_2位于外壳蛋白基因3′末端的53Nt处的保守序列,因而1.2—1.3kb的PCR产物包含全长外壳蛋白基因. TaqI,MboI,AluI和RSaI酶切纯化的PCR产物,用于随机克隆.

2.2 外壳蛋白及其基因的一级结构

图1示外壳蛋白基因核苷酸序列和导出的外壳蛋白氨基酸序列. 外壳蛋白基因全长777Nt(包括两个TAA终止密码子),编码257个氨基酸.

```
ATGTCGAAGCGACCCGCCGATATTGTCATCTCTACGCCGAGCTCGAAGGTACGTCGCCGGCTGAATTTCGACAGCCCGTATGCGAGCCGT  90
M  S  K  R  P  A  D  I  V  I  S  T  P  S  S  K  V  R  R  R  L  N  F  D  S  P  Y  A  S  R   30

GCAGCTGCCCCCTACTGTCCTCGTCACAAGCAAGAGGAAGTCTTGGGCAAGCAGGCCAATGTACAGGAAGCCCAGAATGTACAGAATGTAC 180
A  A  A  P  T  V  L  V  T  S  K  R  K  S  W  A  S  R  P  M  Y  R  K  P  R  M  Y  R  M  Y   60

AGAAGCCCTGATGTGCCCAGGGGATGTGAAGGCCCATGTAAGGTACAGTCATTCGAAAAGAGACATGATGTTAGTCATACTGGTACTGGG 270
R  S  P  D  V  P  R  G  C  E  G  P  C  K  V  Q  S  F  E  K  R  H  D  V  S  H  T  G  T  G   90

CTTTGTGTTTCTGATGTTACTAGAGGTACTGGGCTTACTCATCGTACTGGTAAGAGATTTTGCATTAAATCCGTTTATATATTGGGTAAG 360
L  C  V  S  D  V  T  R  G  T  G  L  T  H  R  T  G  K  R  F  C  I  K  S  V  Y  I  L  G  K  120

ATATGGATGGACCGAAATATCAAGACCAAGAACCATACGAACACCGTATTGTTCTGGCTTGTTAGAGATAGAAGGCCCGTCACTACTCCG 450
I  W  M  D  R  N  I  K  T  K  N  H  T  N  T  V  L  F  W  L  V  R  D  R  R  P  V  T  T  P  150

TATGGTTTTGCTGAAGCATTTAACATGTATGATAATGAGCCGTCTACTGCTACTATTAAGAATGATCTTCGAGACAGATTACAAGTTTTG 540
Y  G  F  A  E  A  F  N  M  Y  D  N  E  P  S  T  A  T  I  K  N  D  L  R  D  R  L  Q  V  L  180

CATAAGTTTGGAGTTACCGTTACTGGGGGACAGTATGCGTCTAAAGAACAGGCTATGGTGAAGAAATTCTGGAAGATCAACAATCATGTC 630
H  K  F  G  V  T  V  T  G  G  Q  Y  A  S  K  E  Q  A  M  V  K  K  F  W  K  I  N  N  H  V  210

ACTTACAATCATCAAGAGAAGGCTGCTTATGAGAATCACACTGAAAATGCTTTAATTTTGTATATGGCATGTACTCATGCTTCTAATCCC 720
T  Y  N  H  Q  E  K  A  A  Y  E  N  H  T  E  N  A  L  I  L  Y  M  A  C  T  H  A  S  N  P  240

GTGTATGCTACTTTGAAAATCAGAATCTATTTTTATGATTCTGTTAACAATTAATAA                                  777
V  Y  A  T  L  K  I  R  I  Y  F  Y  D  S  V  N  N  *  *                                   259
```

图1 TbLCV外壳蛋白基因及其氨基酸序列

2.3 TbLCV的分子进化

用UWGCG中Pileup程序分析比较TbLCV与其它18种双生病毒外壳蛋白氨基酸序列的变异,构成分子进化树(图2). TbLCV不同于这18种双生病毒,但与泰国番茄黄曲叶病毒(TYLCV-T)、中国南瓜曲叶病毒(SqLCV-C)和印度木薯花叶病毒(ICMV)亲缘关系较近,其氨基酸序列的同源性分别为73,77和78%.

我们采用随机克隆策略,通过不同酶切片段重组克隆中病毒核酸序列的重叠,测TbLCV外壳蛋白基因的全长核苷酸序列. TbLCV与SqLCV-C在外壳蛋白基因核苷酸水平上的同

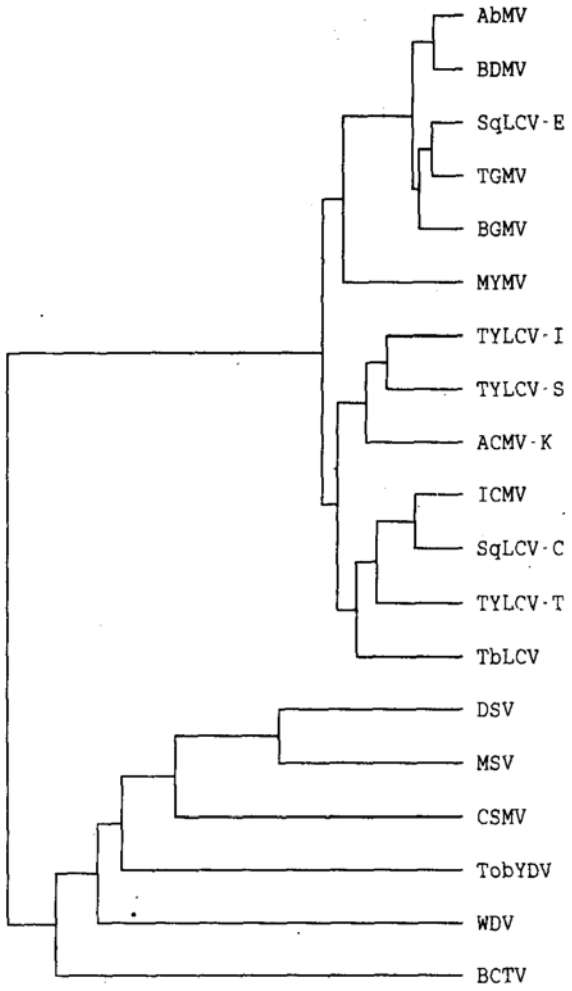


图 2　双生病毒的分子进化树

源性为 72%，在氨基酸水平上的同源性是 77%. 这是在中国发现的两个不同的双生病毒. 基于外壳蛋白变异的比较，不同的双生病毒具有两条进化路线(图 2)，其一是叶蝉传播的双生病毒，其相互间亲缘关系较远；其二是烟粉虱传播的双生病毒，其相互间有较高的同源性. 在烟粉虱传播的双生病毒中，TbLCV 与三种亚洲发现的双生病毒(ICMV，SqLCV，TYLCV-T)分子进化关系较为密切，而与另一种亚洲双生病毒 MYMV 只有 68%同源性(图 3)，后者处于分子进化树中新老世界的交界处(图 2). 这些情况表明地理区域可能是双生病毒进化中的重要因素.

我们已用 PCR 合成出 TbLCV 的全长 DNA A，并已得到克隆. 分析工作在进行中.

```
ICMV     MSKRPADIIISTPGSKVRRRLNFDSPYSSRAAVPTVRVT.KRQSWTNRPINRKPRWYRMYRSPDVPKGCEGPCKVQSFESRHDVVHIGKV  89
SqLCV-C  MSKRPADIIISTPASKVRRRLNFDSPYVSRAVVPIARVT.KGKAWTNRPMNRKPKMYRMYRSPDVPRGCEGPCKVQSFESRHDVSHIGKV  89
TYLCV-T  MSKRPADILISTPVSKVRRRLNFDSPYNSRAAVPTVRVT.KGQVWKNRPAYRKPRIYMMYRSPDVPKGCEGPCKVQSPDAKNDIGHMGKV  89
TbLCV    MSKRPADIVISTPSSKVRRRLNFDSPYASRAAAPTVLVTSKRKSWASRPMYRKPRMYRMYRSPDVPRGCEGPCKVQSPEKRHDVSHTGTG  90
MYMV     MPKRNYDHRLLYPDVECAEEADLRHPLSLPATAGSVPASAKRRRWTNRPMWRKPRYYRLYRSPDVPRGCEGPCKVQSFEAKHDISHVGKV  90

ICMV     MCISDVTRGIGLTHRVGKRFCVKSIYILGKIWMDENIKTKNHTNSVMFFLVRDRRPVDKPQDFGEVFNMFDNEPSTATVKNMHRDRYQVL 179
SqLCV-C  MCISDVTRGSGLTHRVGKRFCVKSVYVLGKIWMDGNIKTKNHTNSVIFFLVRDRRPTGTPQDFGEVFNMFDNEPSTATVKNMHRDRYQVL 179
TYLCV-T  ICLYDVTRGIGLTHRVGKRFCVKSLYFVGKIWMDENIKVKNHTNTVLFWIVRDRGPTGTPYDFQQVFNVYDNEPSTATVKNDQRDRFQVI 179
TbLCV    LCVSDVTRGTGLTHRTGKRFCIKSVYILGKIWMDRNIKTKNHTNTVLFWLVRDRRPVTTPYGFAEAFNMYDNEPSTATIKNDLRDRLQVL 180
MYMV     ICVTDVTRGNGITHRVGKRFCVKSIWVTGKIWMDENIKTKNHTNTVMFKLVRDRRPPGTPQDFGQVFNMYDNEPSTATVKNDLRDRYQVV 180

ICMV     RKWHATVTGGQYASKEQALVRRFFRVNNYVVYNQQEAGKYENHTENALMLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSVSN              256
SqLCV-C  RKWHATVTGGAYASREQALVRKFVRVNNYVVYNQQEAGKYENHTENALMLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSVTN              256
TYLCV-T  RRFQATVIGGQYAAKEQAIIRKFYRVNNYVVYNHQEAGKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKVRSYFYDSVTN              256
TbLCV    HKFGVTVTGGQYASKEQAMVKKFWKINNHVTYNHQEKAAYENHTENALILYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSVNN              257
MYMV     RKFQATVTGGQYASKEQAIVSKFYRVNNYVVYNHQEAAKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYFYDSISN              257
```

图 3 TbLCV 与四种亚洲双生病毒外壳蛋白氨基酸序列的直接比较

参 考 文 献

[1] 蔡健和、王小凤、黄福新等，微生物学报，1993，**33**：166—169.

[2] Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labor-atory Press, 1989.

[3] Lazarowitz, S. G., Lazdins, I. B., *Virology*, 1991, **180**: 58-69.

[4] Howarth, A. J., Caton, J., Bossert, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**: 3572—3576.

[5] Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M. *et al.*, *Virology*, 1991, **185**: 151—161.

[6] Kyheyr-Pour, A., Bendahmane, M., Matzeit, V. *et al.*, *Nucl. Acid, Res.*, 1991, **19**: 6763—6769.

[7] Stanley, J., *Nature*, 1983, **305**: 643-645.

[8] 洪益国、王小凤、田波，微生物学报，1993，**33**：98-103.

[9] Donson, J., Accoto, G. P., Boulton, M. I. *et al.*, *Virology*, 1987, **161**: 160—169.

[10] Morris, B. A. M., Richardson, K. A., Haley, A. *et al.*, *Virology*, 1992, **187**: 633—642.

[11] Stanley, J., Markham, P. G., Callis, R. J. *et al.*, *EMBO J.*, 1986, **5**: 1761—1767.