中 国 科 学 (B 辑)
第 24 卷 第 6 期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1994 年 6 月

中国南瓜曲叶病毒：一个双生病毒新种

洪益国 蔡健和[①] 王小凤 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)

摘 要

本文报道了中国南瓜曲叶病毒(SqLCV-C)外壳蛋白(CP)基因PCR、克隆和序列分析，在分子水平上证实中国南瓜曲叶病毒与美国南瓜曲叶病毒(SqLCV-E)不同，是一种新的粉虱传播的双生病毒，并与印度木薯花叶病毒(ICMV)有较近的亲缘关系.

关键词 外壳蛋白、中国南瓜曲叶病毒、双生病毒

双生病毒组(Geminivirus)是含单链环状DNA的植物病毒，其基因组大小为2.6—3.0kb，含一种外壳蛋白[1]，根据寄主范围、传播介体及基因组的特性，可分为3个亚组：I. 侵染单子叶植物，叶蝉传播，单基因组；II. 侵染双子叶植物，烟粉虱传播，双基因组. III. 侵染双子叶植物，叶蝉传播，单基因组[2]. 最近报道粉虱传播侵染双子叶植物的蕃茄黄曲叶病毒(TYLCV-S)仅含一个DNA分子[3]；而叶蝉传播，单一基因组的烟草黄矮病毒(TobYDV)能侵染单子叶和双子叶植物[4]，这些新病毒的发现，表明双生病毒复杂的进化关系.

南瓜曲叶病毒曾报道于美国(SqLCV-E)，属亚组II的双生病毒，寄主范围较广[5, 6]，其两个基因组DNA A和DNA B分别由2635 Nt和2604 Nt组成，两者之间有226 Nt的共同区域序列，其外壳蛋白29.2kd由DNA A编码[7]. 本文报道了中国南瓜曲叶病毒(SqLCV-C)外壳蛋白基因序列，通过比较证实，SqLCV-C不仅与亚组I, III中的双生病毒明显不同，而且与包括SqLCV-E在内的亚组II双生病毒各异，是亚组II双生病毒的一个新种.

1 材料与方法

1.1 病毒繁殖

病毒材料来源于南宁大田中表现曲叶症状的南瓜植株. 在温室中经烟粉虱(*Bemisia tabaci*)接种，健康南瓜幼苗感染后产生典型曲叶症状，采取病叶，−20°C保存备用.

1.2 总DNA提取

50mg南瓜病叶，匀浆前，加250 μl 抽提液缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 5mmol/L EDTA, 0.1% BSA, 1.25mol/L NaCl, 0.1% β-巯基乙醇)和25μl 10% SDS，置65°C保温

1993-04-08 收稿，1993-08-10 收修改稿.

5min, 以等体积苯酚/氯仿 (v/v=4:1)、氯仿各抽提一次，加入 2 倍体积无水乙醇沉淀核酸，总 DNA 溶解于 200μl 水中.

1.3 CP 基因 PCR 和克隆

人工合成引物 Pn(27mer): 5′ CGGGATCCCATATG TCGAAGCGACCA 3′和 PC (30 mer): 5′ CGGAATTCCTCGAGCATG TATTGTACAATG 3′, 用于 CP 基因 PCR. 100μl 反应液中含 1—2μg 总 DNA, 75pmol Pn 和 Pc, 100mmol/L dNTPs, 2.5mmol/L $MgCl_2$, 50mmol/L KCl, 1mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 2.5 单位 Taq DNA 聚合酶，PCR 反应如下: 94°C 30s, 55°C 1min, 72°以 1.5min, 循环 30 次，最后 72°C 延长反应 5min. 1.0% 低融点琼脂糖凝胶电泳，分离纯化 PCR 产物，连接到载体 pUC19 BamHI/EcoRI 位点，转化 JM101 感受态细胞[8].

1.4 DNA 序列测定

碱法制备重组质粒或亚克隆 DNA[9], 经 0.4mol/L NaOH 变性，模板 ssDNA 与通用引物或反向引物退火 (37°C 10min)，双脱氧法测定序列[10]. UWGCG 计算机软件分析处理序列数据[11]. 用于比较分析的双生病毒还包括: 玉米线条病毒 (MSV)[12], 小麦矮缩病毒 (WDV)[13], 美国南瓜曲叶病毒 (SqLCV-E)[2], 蕃茄黄花叶病毒 (TGMV)[14], 菜豆黄花叶病毒 (BGMV)[15], 非洲木薯花叶病毒 (ACMV-K)[16], 印度木薯花叶病毒 (ICMV)[17], 甜菜曲顶病毒 (BCTV)[18], 蕃茄黄曲叶病毒 (TYLCV)[3] 和烟草黄矮病毒 (TobYDV)[4].

2 结　果

2.1 病毒症状、传播介体和血清学反应

在南宁市郊区大田中发现南瓜曲叶病害，其症状为叶片内向卷曲，叶背部叶脉突起 (图 1 (a)). 试验表明，南瓜曲叶病可经烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 传播 (图 1(b)). ELISA 证实，南瓜曲叶病株叶片汁液与非洲木薯花叶双生病毒 (ACMV-K) 单抗呈阳性反应. 从而证明，中国南瓜曲叶病的病原是双生病毒.

2.2 病毒 CP 基因的合成和克隆

利用烟粉虱传播的双生病毒特异的引物进行 PCR, 扩增出了 SqLCV-CP 基因，其大小约



(a)　　(b)

图 1　SqLCV-C 感染的南瓜症状

(a) 大田中南瓜曲叶症状，(b) SqLCV-C 经烟粉虱接种健康南瓜幼苗，产生典型的曲叶症状

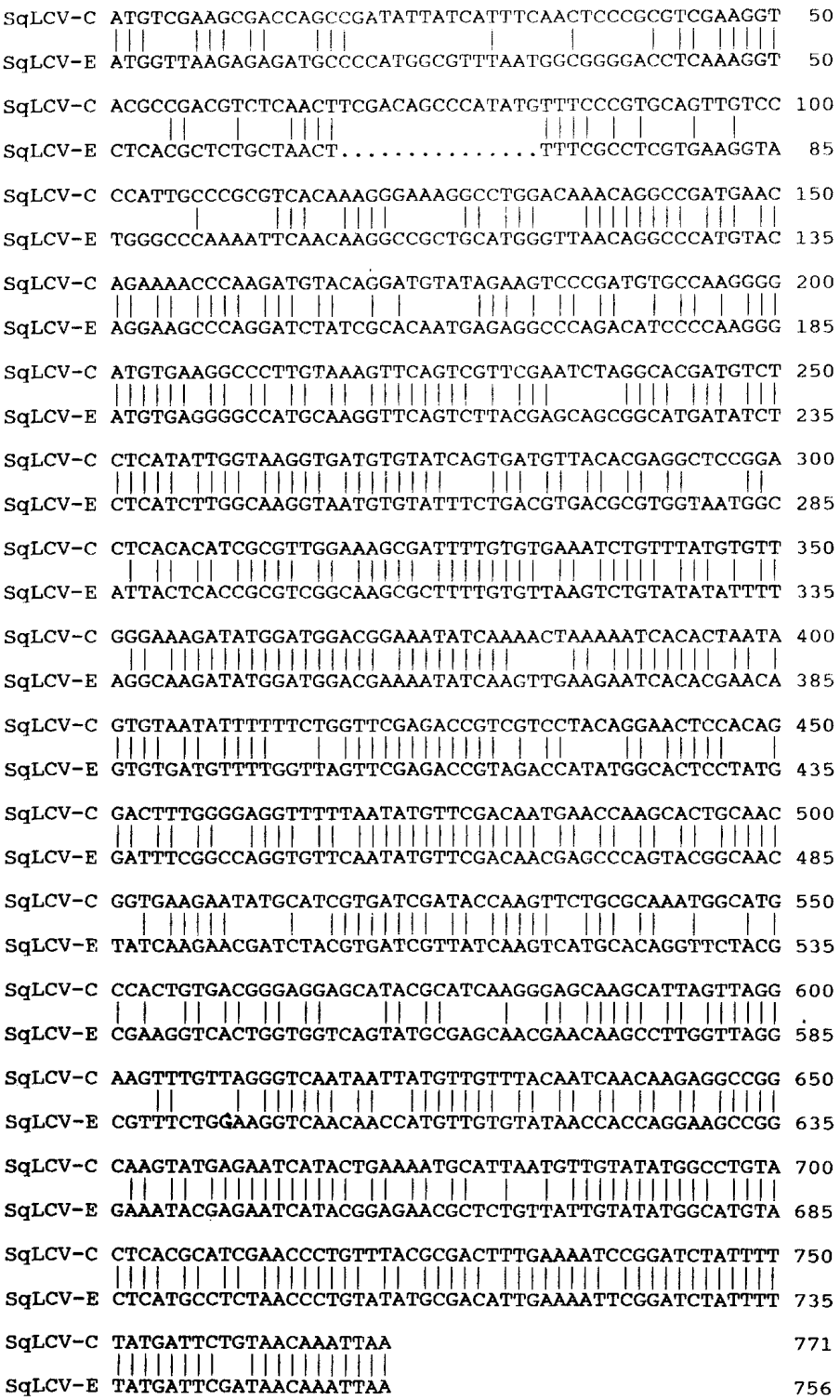


图 2 SqLCV-C CP 基因核苷酸序列及与 SqLCV-E 的比较

0.8kb, 而在健南瓜对照样品中，没有病毒特异的产物. PCR 引物 Pn 位于 CP 基因的 5′末端，在起始密码子 ATG 前加有 BamHI 酶切位点；Pc 位于 CP 基因 3′末端，在终止密码子 TAA 后 53Nt 处，亦加有 EcoRI 位点，Pn 和 Pc 所在的区域，在迄今已经序列分析的烟粉虱传播的双生病毒 DNA 中都比较保守，这在理论上保证了此对引物适用于大多数亚组 II 双生病毒 CP 基因的合成. PCR 产物的克隆和分析图略.

2.3 病毒 CP 及其基因的一级结构

图 2 和图 3 分别示 SqLCV-C CP 基因的核苷酸序列和由此导出的 CP 氨基酸序列及分别与美国 SqLCV-E 的比较. SqLCV-C CP 基因由 771 Nt 组成，T, C, G, A 的百分含量分别为 26.2, 20.2, 24.1 和 29.5, 而 SqLCV-E CP 基因由 756Nt 组成，T, C, G, A 的百分含量分别为 25.7, 21.3, 25.4 和 27.6, SqLCV-C CP 基因的 G+C 含量略低于 SqLCVE; 在 SqLCVE CP 基因的 5′末端缺失 15 Nt(相对 SqLCV-C 的 68—83 Nt), 两者在核苷酸水平上的相似性仅为 67%; SqLCV-C 和 SqLCV-E 的 CP 分别由 256 和 251 个氨基酸残基组成，N-末端大约 66 个氨基酸序列变异较大，而 C-末端的 52 个氨基酸中仅有 4 个氨基酸变化，氨基酸全序列的统一性为 74%. 不论是在 CP 基因的核苷酸水平还是在氨基酸水平，都表明 SqLCV-C 和 SqLCV-E 是两个不同的双生病毒种.

```
SqLCV-C MSKRPADIIISTPASKVRRRLNFDSPYVSRAVVPIARVTKGKAWTNRPMN  50
SqLCV-E MVKRDAPWRLMAGTSKVSRSANF.....SPREGMGPKFNKAAAWVNRPMY  45

SqLCV-C RKPKMYRMYRSPDVPRGCEGPCKVQSFESRHDVSHIGKVMCISDVTRGSG 100
SqLCV-E RKPRIYRTMRGPDIPKGCEGPCKVQSYEQRHDISHLGKVMCISDVTRGNG  95

SqLCV-C LTHRVGKRFCVKSVYVLGKIWMDGNIKTKNHTNSVIFFLVRDRRPTGTPQ 150
SqLCV-E ITHRVGKRFCVKSVYILGKIWMDENIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPYGTPM 145

SqLCV-C DFGEVFNMFDNEPSTATVKNMHRDRYQVLRKWHATVTGGAYASREQALVR 200
SqLCV-E DFGQVFNMFDNEPSTATIKNDLRDRYQVMHRFYAKVTGGQYASNEQALVR 195

SqLCV-C KFVRVNNYVVYNQQEAGKYENHTENALMLYMACTHASNPVYATLKIRIYF 250
SqLCV-E RFWKVNNHVVYNHQEAGKYENHTENALLLYMACTHASNPVYATLKIRIYF 245

SqLCV-C YDSVTN*                                           257
SqLCV-E YDSITN*                                           252
```

图 3　SqLCV- C CP 氨基酸序列及与 SqLCV-E 的比较

2.4 SqLCV-C 与其它双生病毒的比较

分析了 SqLCV-C 和其它 10 种分属不同亚组双生病毒 CP 的氨基酸组成(表 1)和氨基酸序列的同源性(表 2). 外壳蛋白氨基酸组成是区分病毒的一个依据，双生病毒 CP 一般由 240—260 个氨基酸组成，20 种氨基酸在不同的病毒中都有程度不同的差异，与其它病毒相比，SqLCV-C 中的甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、酪氨酸(W)和谷氨酸(Q)的含量相对较低，而缬氨酸(V)的含量相对较高，且各种氨基酸的含量与 ICMV 更为接近. 在分子水平上区分病毒的另一个重要依据是 CP 氨基酸序列的同源性比较. 在双生病毒分类中一般认为 CP 氨基酸序列同源性大于 95% 时，划分为同种病毒的不同株系，而小于 80% 则被认为是不同的病毒种.

表 1 不同双生病毒外壳蛋白的氨基酸组成

亚组	I		II						III	新世界	
病毒	MSV	WDV	新世界 SqLCV-E	TGMV	BGMV	老世界 ACMV-K	SqLCV-C	ICMV	BCTV	TYLCV-S	TobYDV
氨基酸											
D	12	15	11	12	11	13	11	12	13	12	7
E	4	5	9	8	7	8	8	9	5	7	8
H	6	4	9	8	9	10	8	8	3	7	3
K	17	22	18	17	17	18	18	18	24	18	17
R	17	18	22	23	18	26	25	26	18	25	18
N	10	15	18	18	20	17	16	16	22	11	14
Q	9	8	7	7	7	8	6	8	8	10	11
S	18	13	13	15	18	11	17	18	15	15	20
T	25	21	13	12	11	16	17	15	25	18	19
C	4	5	5	5	5	6	5	5	2	6	5
G	24	21	16	15	17	15	14	12	18	14	26
W	7	9	5	5	4	2	3	4	6	2	7
Y	9	11	14	13	15	15	13	13	16	15	14
F	8	10	10	9	8	11	10	11	7	10	12
M	5	6	12	9	11	7	10	9	16	12	6
A	19	18	15	13	12	12	15	12	8	11	13
I	11	11	12	11	12	17	11	13	13	15	5
L	13	12	11	13	8	16	9	9	12	12	14
V	14	26	19	21	21	16	27	25	13	22	21
P	12	10	12	13	10	14	13	13	10	14	14
总数	244	260	251	241	241	258	256	256	254	256	255

表 2 不同双生病毒外壳蛋白的氨基酸序列的同源性(%)

亚组	I		II						III	新世界	
病毒	MSV	WDV	新世界 SqLCV-E	TGMV	BGMV	老世界 ACMV-K	SqLCV-C	ICMV	BCTV	TYLCV-S	TobYDV
MSV	100										
WDV	35	100									
SqLCV-E	15	18	100								
TGMV	19	20	93	100							
BGMV	17	20	91	90	100						
ACMV-K	23	18	71	70	70	100					
SqLCV-C	18	18	74	75	75	77	100				
ICMV	17	19	74	77	74	78	90	100			
BCTV	25	24	23	24	22	25	23	24	100		
TYLCV-S	20	19	69	71	70	76	72	75	22	100	
TobYDV	36	37	16	17	19	22	20	18	18	17	100

表 2 结果表明 SqLCV-C 与亚组 I, III 的双生病毒和 TobYDV 明显不同，其 CP 氨基酸序列同源性为 17—23%; 在亚组 II 中 SqLCV-C 与地处“新世界”的 TGMV, BGMV 和 SqLCV-E 的 CP 氨基酸序列同源性为 75%, 75% 和 74%, 是不同种的双生病毒，与地处“老世界”的 ACMV-K

和 ICMV 的 CP 氨基酸序列同源性分别为 77% 和 90%. 与 TyLCV-S 的同源性为 72%. 尽管 SqLCV-C 和 ICMV 具有较高的同源性，但仍在确定为 10 种不同双生病毒 CP 氨基酸序列同源性变异的范围(15%—93%)内(表 2)，而且 ICMV 和 SqLCV-C 的寄主范围不同，所引起的症状各异，因此它们仍是不同种的双生病毒. 我们建议称 SqLCV-C 为中国南瓜曲叶病毒.

3 讨　论

本研究根据生物学特性(寄主反应和传播媒介)和血清学关系，进一步用分子生物学方法研究植物病毒，不但可以迅速地鉴定出病毒种类，而且可在分子水平上发现与相似病毒的进化关系. 由于病毒基因组核苷酸水平的变异，并不一定反应到蛋白质结构和功能的变化，因而氨基酸水平的比较分析，更能本质地表明病毒之间的相互关系.

在双生病毒中，常用外壳蛋白和复制功能相关蛋白的氨基酸序列同源性来研究各病毒之间的进化关系. Howarth 等[2] 通过计算 16 种双生病毒复制功能相关蛋白和 15 种外壳蛋白的同源性，构成双生病毒的种类发生树，两种蛋白的种类发生树基本相似，都具有两个大分枝，其一是侵染单子叶植物的双生病毒(亚组 I)；其二是侵染双子叶植物的双生病毒(亚组 II). 两个种类发生树上主要的差异表现在甜菜曲顶病毒(BCTV)(亚组 III)的位置上，在外壳蛋白的种系发生树上，BCTV 归到亚组 I，而在复制功能相关蛋白的种系发生树上，BCTV 归到亚组 II. 这表明病毒寄主的特异性主要影响复制相关蛋白的进化，而外壳蛋白则适应昆虫介体的变异. 中国处在"老世界"之中，SqLCV-C 与各种病毒的分子进化关系仍支持上述观点.

SqLCV-C 和 TbLCV-C(中国烟曲叶病毒)[19] 在分子水平上的研究，不仅对双生病毒分子进化提供了更充足的证据，也为进一步深入研究其基因组结构、表达和功能的研究打下了基础.

参　考　文　献

[1] Harrison, B. D., *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1985, **23**: 55—82.
[2] Howarth, A. J. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 1989, **70**: 2717—2727.
[3] Kheyr-Pour, A. *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1991, **19**: 6763—6769.
[4] Morris, B. A. M. *et al.*, *Virology*, 1992, **187**: 633—642.
[5] Flock, R. A., *Plant Disease*, 1981, **65**: 75—76.
[6] Cohen, S. *et al.*, *Phytopathology*, 1983, **73**: 1669—1673.
[7] Lazarowitz, S. G. *et al.*, *Virology*, 1991, **180**: 58—69.
[8] Glover, D. M., *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vol. 1, IRL Press, 1985.
[9] Sambrook, J. *et al*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
[10] Sanger, F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 1977, **74**: 5463—5467.
[11] Devereux, J. *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1984, **12**: 385—395.
[12] Mullineaux, P. M. *et al.*, *EMBO J.*, 1984, **3**: 3063—3068.
[13] MacDowel, S. W. *et al.*, *EMBO J.*, 1985, **4**: 2173—2180.
[14] Hamilton, W. D. O. *et al.*, *EMBO J.*, 1984, **3**: 2197—2205.
[15] Howarth, A. J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, **82**: 3572—3576.
[16] Stanley, J. *et al.*, *Nature*, 1983, **305**: 643—645.
[17] 洪益国等，微生物学报，1993, **33**: 98—103.
[18] Stanley, J. *et al.*, *EMBO J.*, 1986, **6**: 1761—1767.
[19] 洪益国等，科学通报，1994, **39**(2): 165—168.