

内 容

(五) 双生病毒分子生物学

(六) 烟花叶病毒组病毒的研究

目 录

87. 刘玉乐, 田波, 植物双生病毒研究进展, 1998, 中国病毒学, 13(1): 6-16。
- √ 88. 蔡健和, 王小凤, 田波, 1993, 烟草曲叶双生病毒的研究 I. 广西分离物的生物学特性和血清学反应, 微生物学报 33(3):166-169。
89. 洪益国, 王小凤, 田波, 1993, 印度木薯花叶双生病毒外壳蛋白的研究, II. 计算机分析外壳蛋白的一些特性, 微生物学报, 33 (4):255-259。
90. 洪益国, 王小凤, 田波等, 1994, 印度木薯花叶病毒 DNA 在寄主植物中可能存在的形式, 中国病毒学, 9(1):43-47。
91. 洪益国, 蔡健和, 王小凤, 王文慧, 黄谊, 田波, 1994, 烟草曲叶双生病毒分子进化的初步研究, 科学通报, 39(2): 165-168。
- √ 92. 蔡健和, 王苏燕, 王小凤, 田波, 1995, 番茄曲叶病及其血清学和 PCR 测定, 微生物学报 35(5): 394-396。
93. 洪益国, 蔡健和, 王小凤, 田波, 1994, 中国南瓜曲叶病毒: 一个双生病毒新种, 中国科学(B 辑) 24(6): 608-613。
- √ 94. Hong Yiguo, Wang Xiaofeng, Tian Bo and Cai Jianhe, 1995, Chinese squash leaf curl virus: a new whitefly-transmitted geminivirus, Science in China, 38(2): 179-186.
95. 洪益国, 王小凤, 田波, 1993, 印度木薯花叶双生病毒外壳蛋白的研究, I. 外壳蛋白及其基因的一级结构, 微生物学报, 33(2): 98-103。
96. 刘玉乐, 蔡健和, 李冬玲, 秦碧霞, 田波, 1998, 中国番茄黄化曲叶病毒 — 双生病毒的一个新种, 中国科学, 28(2): 148-153。
- √ 97. Liu Yule, Cai Jianhe, Li Dongling, Qin Bixia, 1998, Chinese tomato

yellow leaf curl virus — a new species of geminivirus, *Science in China*, 41(4): 337-343.

98. 刘玉乐, 李冬玲, 王环宇, 田波, B. D. Harrison, 1998, 一种非洲番茄黄化曲叶病毒 DNA 的克隆, *自然科学进展*, 8(3): 297-304。
99. P. Tien, P.S.Tang, 1963, The Role of Host Respiration in TMV Multiolicalation, *Acta Virologica* 7: 368-373.
100. 田波等, 1962, 寄主呼吸代谢过程与烟草普通花叶病毒增殖的关系, *实验生物学报*, 7(4): 299-309。
101. 田波 汤佩松, 1963, 感染烟花叶病毒的叶组织中葡萄糖的氧化代谢, *植物学报* 11(1): 1-7。
102. 田波 彭学贤, 1965, 放线菌素 C 对 TMV 增殖的抑制作用, *微生物学报* 11(4): 520-525。
103. 张秀华 李国云 田波, 1980, 植物病毒弱毒疫苗及其应用 I. 番茄花叶病毒弱株系诱变和性质, *植物病理学报* 10(1): 49-54。
104. 田波 张秀华 梁锡闲 曹小芝 盛方镜 陆关成 侯世昌 陆家兴, 1980, 植物病毒弱毒疫苗及其应用 II. 烟花叶病毒番茄株弱株系 N₁₁ 对番茄的保护作用, *植物病理学报* 10(2): 109-112。
105. 覃秉益 张秀华 田波, 1987, 植物病毒弱毒疫苗及其应用 III. ToMV 疫苗 N-14 的安全性试验, *微生物学报* 27(1): 23-29。
106. 谭增亮 高主泰 张秀华 田波, 1982, 浸根接种 N-14 的效果, *植物病理学报* 12(2): 59-61。
107. 崔泳汉, 田波等, 1992, 延边地区烟草病毒种类及病毒病的防治, *微生物学报*, 32(1): 47-55。
108. 田波, 1962, 关于河南地黄上分离到的一个病毒, *微生物学报*, 8(4): 418-419。
109. 裴美云 田波 崔文华, 1964, YMV15 和烟花叶病毒间的干扰作用, *植物病理学报* 7(2): 159-164。
110. 康良仪, 田颖川, 田波, 1984, 用 DNA 杂交技术测定烟草花叶病毒与长叶车前花叶病毒的关系, *微生物学报*, 24(2): 134-138。

111. Palukaitis P., Randles J.W., Tian Y.T., Kang L.Y., and Tien P., 1981, Taxonomy of several tobamoviruses from China as determined by molecular hybridization analysis with complementary DNA. Intervirology 16:136-141.
112. Adrian Gibbs, Tien Po, Kang Liang-yi, Tian Ying-Chun, John Randles, 1982, Classification of Several Tobamoviruses Isolated in China on the Basis of the Amino Acid Composition of Their Virion Proteins, Intervirology, 160-163.
113. Kang L.Y., Yang X.C., and Tien P., 1982, Double-Stranded Viral RNA Content in Tobacco Leaves Infected with Virulent and Avirulent Isolates of TMV. Virology 118: 324-328.
114. 张成良, 田波等, 1985, 烟草花叶病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立, 病毒学报, 1(2): 153-156。
115. 王小凤 田波 马德芳, 1985, 番茄花叶病毒及其弱毒株 N-14 RNA 在兔网细胞裂解液中翻译产物的比较, 病毒学报 1(2): 187-189。
116. 马德芳 王小凤 裴美云 田波, 1986, 相关和不相关病毒 mRNA 在兔网织细胞裂解液中的竞争性翻译, 微生物学报 26(1): 35-41.
117. 张秀华 田波 甚章群 刘新垣, 1983, 干扰素的功能表达机制 VI.2'-5'三腺甘酸对烟草花叶病毒增殖的抑制作用, 生物化学与生物物理学报 6(15): 585-588。
118. 王小凤 李丰知 田波, 1990, 酵母校正 tRNA 的提取及其对番茄花叶病毒增殖的抑制作用, 微生物学报 30(2): 105-111。

植物双生病毒研究进展*

刘玉乐 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

Advance in Plant Geminivirus Research

Liu Yule Tien Po

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

关键词 双生病毒, 鉴定, 基因组, 复制, 进化

Key words Geminivirus, Characterization, Genome, Replication, Evolution

双生病毒(Geminivirus)是一组具有双生颗粒形态的单链环状DNA植物病毒^[1~3]。典型的双生病毒为 18×30 nm颗粒,基因组大小为2.5~3.0 knt。双生病毒研究已成为植物病毒学最活跃的领域之一。

1 双生病毒的性质

1.1 双生病毒组的成员划分

依据基因组结构和介体,双生病毒被划分为三个亚组^[4],见表1。

亚组I至少有10个成员,由侵染双子叶植物的烟草黄化矮缩病毒(TYDV)和侵染单子叶禾本科植物的双生病毒构成,玉米条纹病毒(MSV)是该亚组的代表病毒。在自然界中,该亚组的病毒均为叶蝉(leafhopper)以持久性方式传播,不能通过摩擦接种传毒。亚组I的双生病毒基因组为单组份,大小为2.6~2.8 knt,其复制蛋白的转录物含有内含子,其基因组结构见图1。

亚组II双生病毒基因组为单组份,大小为2.7~3.0 knt,基因组特征为外壳蛋白等病毒链上的ORF与亚组I的双生病毒相似,另互补链DNA上的ORF与亚组III的双生病毒相似,其基因组结构见图2。该亚组病毒的寄主均为双子叶植物。甜菜曲顶病毒(BCTV)是其代表病毒。除番茄假曲顶病毒(TPCTV)为树蝉(treehopper)传播外,该亚组病毒均为叶蝉传播。

亚组III为粉虱传播的双生病毒,该亚组至少有30个成员,菜豆金黄花叶病毒(BGMV)是该亚组的代表病毒。该亚组病毒仅侵染双子叶植物,对于每一个病毒,其寄主范围一般较狭窄。在自然界,亚组III的双生病毒通过粉虱以持久性方式传播。非洲木薯花叶病毒(ACMV)等在特定的寄主上也可以摩擦接种。大多亚组III双生病毒的基因组为双组份,大小为2.5~2.8 knt,两个组份中稍大的组份叫DNA A,稍小的组份叫DNA B,其基因组结构见图3;也有

收稿日期:1996-11-25,修回日期:1997-07-07

* 国家自然科学基金资助

几个亚组 3 双生病毒为单组份基因组^[3,4],其基因组结构见图 4。

表 1 植物双生病毒分类

Table 1 The classification of plant geminiviruses

亚组 I 双生病毒 ^[4]		亚组 II 双生病毒 ^[4] (续)	
Bromus striate mosaic virus	BrSMY	Malvaceous chlorosis virus	MCV
Chloris striate mosaic virus	CSMV	Melon leaf curl virus	MLCV
Digitaria streak virus	DSV	Macrotylma mosaic virus	MaMV
Digitaria striate mosaic virus	DiSMV	Mungbean yellow mosaic virus	MYMV
Maize streak virus	MSV	Okra leaf curl virus	OLCV
Miscanthus streak virus	MISV	Okra yellow vein mosaic virus	OYVMV
Panicum streak virus	PanSV	Pepper huasteco virus	PHV
Paspalum striate mosaic virus	PSMV	Pepper mild tigre virus	PepMTV
Sugarcane streak virus	SSV	Potato yellow mosaic virus	PYMV
Tobacco yellow dwarf virus	TYDV	Pseuderanthemum yellow vein virus	PYVV
Wheat dwarf virus	WDV	Pumpkin yellow vein mosaic virus	PYVMV
(#) Bajra streak virus	BaSV	Rhynchosia mosaic virus	RhMV
(#) Chickpea chlorotic dwarf virus	CpCDV	Serrano golden mosaic virus	SGMV
		Sida golden mosaic virus	SGMV
亚组 III 双生病毒 ^[4]		Squash leaf curl virus - E	SqLCV - E
Beet curly top virus	BCTV	Squash leaf curl virus - CHI	SqLCV - C
Tomato pseudo - curly top virus	TPCTV	Texas pepper virus	TPV
Horseendish curly top virus ^[5]	HrCTV	Tobacco leaf curl virus	TbLCV
(#) Tomato leafroll virus	TLRV	Tomato golden mosaic virus	TGMV
亚组 IV 双生病毒 ^[4]		Tomato leaf curl virus - Au	TLCV - Au
Ageratum yellow vein virus	AYVV	Tomato leaf curl virus - In	TLCV - In
Asystasia golden mosaic virus	AGMV	Tomato mottle virus	TMoV
Bean calico mosaic virus	BCaMV	Tomato yellow dwarf virus	TYDV
Bean abutilon mosaic virus	BAbMV	Tomato yellow leaf curl virus - Ch	TYLCV - Ch
Acalypha yellow mosaic virus	AYMV	Tomato yellow leaf curl virus - Is	TYLCV - Is
African cassava mosaic virus	ACMV	Tomato yellow leaf curl virus - Sen	TYLCV - Sen
Bean dwarf mosaic virus	BDMV	Tomato yellow leaf curl virus - Sr	TYLCV - Sr
Bean golden mosaic virus	BGMV	Tomato yellow leaf curl virus - Th	TYLCV - Th
Bhendi yellow vein mosaic virus	BYVMV	Tomato yellow leaf curl virus - Ye	TYLCV - Ye
Chino del tomate virus	CdTV	Tomato leaf crumple virus	TLCrV
Cotton leaf crumple virus	CLCrV	Tomato yellow mosaic virus	ToYMV
Cotton leaf curl virus	CLCuV	Watermelon chlorotic stunt virus	WmCSV
Croton yellow vein mosaic virus	CYVMV	Watermelon curly mottle virus	WmCMV
Dolichos yellow mosaic virus	DoYMV	(#) Cowpea golden mosaic virus	CpGMV
Eclipta yellow vein virus	EYVV	(#) Eggplant yellow mosaic virus	EYMV
Euphorbia mosaic virus	EuMV	(#) Eupatorium yellow vein virus	EpYVV
Honeysuckle yellow vein mosaic virus	HYVMV	(#) Lupin leaf curl virus	LLCV
Horsegram yellow mosaic virus	HgYMV	(#) Papaya leaf curl virus	PaLCV
Indian cassava mosaic virus	ICMV	(#) Sida yellow vein virus	SiYVV
Jatropha mosaic virus	JMV	(#) Solanum apical leaf curl virus	SALCV
Limbean golden mosaic virus	LGMV	(#) Soybean crinkle leaf curl virus	SCLV
		(#) Wissadula mosaic virus	WiMV

为可能成员

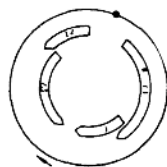


图 1 典型亚组 I 双生病毒的基因组结构
·TAATATTAC 序列, V2 为外壳蛋白基因
→病毒颗粒中用作合成互补链的 DNA 引物
Fig 1 Typical genomic organization of subgroup
I geminiviruses. Gene V2 encodes the coat protein.
The positions of TAATATTAC(·) and
the encapsidated, complementary sense
primer-like molecular(→) are shown.

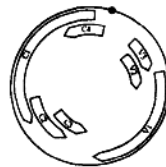


图 2 亚组 II 双生病毒(BCTV)的基因组结构
·TAATATTAC 序列, V1 为外壳蛋白基因
Fig 2 Genomic organization of BCTV
The positions of conserved sequence TAATATTAC(·)
are shown. Gene V1 encodes the coat protein.

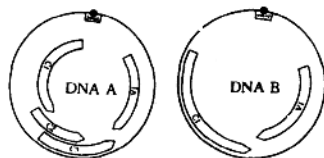


图 3 典型双组分亚组 III 双生病毒基因组结构
·TAATATTAC 序列, AV1 为外壳蛋白基因
阴影部分为共同区(common region)
Fig 3 Typical genomic organization of
bipartite subgroup III geminiviruses.
Gene V1 encodes the coat protein
The positions of TAATATTAC(·) and
the common region (shaded boxes) are shown.



图 4 单组分亚组 III 双生病毒基因组结构
·TAATATTAC 序列, V2 为外壳蛋白基因
Fig. 4 Genomic organization of monopartite
subgroup III geminiviruses. Gene V2 encodes
the coat protein. The positions of
TAATATTAC(·) are shown.

1.2 双生病毒的症状

双生病毒一般发生在热带和亚热带地区,其造成的损失依赖于侵染的时间、寄主的品种和病毒的株系。亚组 I 中侵染禾本科作物的双生病毒一般产生叶子条斑或矮缩症状。

BCTV 产生明脉,进而叶子卷曲、叶脉隆起、叶表面粗糙不平,因该病毒可侵染 44 科 300 多种植物,寄主广泛,造成的损失较大。

粉虱传双生病毒引起的症状可分为三类:(1)花叶型;(2)曲叶型;(3)黄化型。进一步可将黄化型分为黄花叶型和黄叶脉型。

1.3 双生病毒的介体传播

双生病毒在自然界中以昆虫为介体以持久方式传毒。饲毒所需时间、潜伏期、在介体中的存留和接种传毒所需时间依不同的病毒和介体而不同。病毒在介体中不增殖,虫卵不带毒。其传毒效率常依赖于饲毒时期和植物中的病毒浓度。双生病毒的传播首先涉及病毒粒子进入肠道、再进入昆虫的循环系统(体腔)、然后进入唾液腺,最终通过唾液腺进入植物。MSV的叶蝉传播专一性主要由肠道-体腔屏障决定^[3],粉虱传毒的专一性决定于体腔-唾液腺屏障^[6]。病毒-昆虫相互作用的特异性由昆虫和病毒两方面决定,在叶蝉方面,主要由一个与性连锁的显性基因控制,但第二个与性不连锁的基因可修饰主效基因对传毒能力的影响^[3];在病毒方面,似乎由病毒的外壳蛋白决定,用BCTV的外壳蛋白基因代替ACMV的外壳蛋白基因构建的嵌合病毒,能被BCTV的介体叶蝉传播,表明外壳蛋白与昆虫介体直接相关^[7]。

在实验室里,三个亚组的双生病毒均成功地用Agroinfection侵染植物,一些亚组Ⅲ的病毒DNA也已成功地用biolistics侵染植物^[4]。

1.4 双生病毒的检测和区分

目前主要用血清学方法、核酸杂交及PCR技术等进行双生病毒的检测和诊断。

粉虱传双生病毒(WTG)在血清学上全部相关,从一个成员制备的血清能检测同一亚组的其它成员^[8]。相同大陆不同WTG有相似的抗原表位分布,而来源于不同大陆的同一名称的病毒有不同的抗原表位分布,单克隆抗体能区分不同地理来源的WTG^[9],然而有时却难以区分相同大陆不同的WTG^[10]。

一般来说,来源于相同大陆的亚组1双生病毒血清学关系较近,而来源于不同大陆的亚组1双生病毒没有血清学关系或关系较远,用多抗和单抗已引起非洲条纹病的24个病毒分离物分成三个株系^[1]。

核酸分子杂交已用于双生病毒的检测和鉴定,WTG DNA A作探针能检测很多其它的WTG,而DNA B对每一种病毒都是特有的,能作为病毒或病毒株系特异的探针。

PCR方法已用于MSV、BGMV和TYLCV的检测和多样性的测定^[3]。WTG高度保守区的兼并PCR引物已用于扩增WTG的DNA A^[12]和DNA B,而在共同区的超变区的引物已用于区分BGMV分离物^[3]。PCR技术连同RFLP分析已用于测定双生病毒的混合侵染,目前PCR技术能在单个带粉虱中检测到双生病毒^[12]。

2 病毒基因组结构

2.1 基因组结构

单组份的亚组1双生病毒基因组编码四个开放阅读框(ORF),病毒链及其互补链各编码两个ORF,中间由两个非编码区隔开^[3]。其中C2 ORF没有起始密码ATG。C1和C2中间含有一个内含子,内含子剪接后可产生连续的编码区,用于翻译约41 kD的融合蛋白C1:C2^[4];病毒粒子中除有病毒链DNA外,还含有一5'端为核糖核苷酸约80 nt的互补链DNA片段,作为合成互补链的引物^[13,14]。

大多数亚组3的双生病毒有两个基因组份,称为A和B。DNA A和B组份大部分序列不同,但在非编码区中有约200 nt的序列几乎完全相同(同源性>95%),称为共同区(common region),共同区含有病毒复制、转录起始和包装所需的序列^[2]。所有的双生病毒共同区或基因间隔区均能形成发夹结构,且含有5'-TAATATTAC-3'。

在双组分的粉虱传双生病毒中, AV1 是外壳蛋白基因, 涉及病毒的介体传播和系统侵染^[15], 且对病毒 DNA 有保护作用。AC1 和 AC3 涉及病毒的复制, 但仅 AC1 是双组份双生病毒复制所必须的^[16], AC3 基因产物可增加病毒复制的效率; DNA B 编码两个基因 BV1 和 BC1, 这两个基因连同 AC2 涉及病毒在植物中的运动, AC2 的作用可能是间接的。在转基因 *N. benthamiana* 中, 南曲曲叶病毒(SqLCV)的 BC1 基因, 无论单独还是与 BV1 基因一同表达, 均可使植物产生典型的 SqLCV 症状^[17]。在 ACMV、TYLCV 和番茄曲叶病毒(TLCV)等部分双组分粉虱传双生病毒中, 在外壳蛋白基因前有一增加的 ORF, 与之类似的 ORF 也存在于单组份双生病毒中, 在 MSV 中该基因产物涉及病毒的系统侵染^[18]。

青麻花叶病毒(AbMV)的基因组结构与其它粉虱传双生病毒类似, 但其 AC2、AC3 有典型原核基因特征: 有 70S 核糖体结合位点^[19]。

BCTV 基因组编码 6 个基因, 病毒正链编码 2 个基因, 其互补链编码 4 个基因, 其基因组与亚组 3 双生病毒 DNA A 相似, 但外壳蛋白基因却与亚组 1 双生病毒的相似^[20]。

2.2 双生病毒基因组的转录

双生病毒基因组双向转录, 双生病毒的转录起始于共同区内或共同区的一侧(对于单组份病毒为基因间隔区), poly(A)终止信号位于共同区的对面。目前已知双向启动子在共同区或基因间隔区内。

MSV 和 DSV 转录两条 3'端相同的病毒链 RNA 转录物, 但其中一条链 5'端比另一条短 150 nt^[3], 而小麦矮缩病毒(WDV)仅转录一条病毒链 RNA^[3], 可能 V1 和 V2 的翻译是通过核糖体移码进行的。

双生病毒互补链上的 ORF 的翻译更加复杂, 已发现多条互补链转录物, 它们在 5'端或 3'端重叠, 或一条完全在另一条中间^[3]。亚组 1 的双生病毒互补链转录物有一典型特征: 在 C1 和 C2 ORF 重叠处有一内含子, 内含子剪接后产生的 RNA 翻译 C1 和 C2 融合蛋白, 约 41 kD, 在 DSV 和 WDV 侵染的植物中也检测到了未被剪接的 RNA 转录物, 可能用于 C1 蛋白的翻译。研究表明, ACMV AC1 基因启动子的活性比外壳蛋白、BV1 和 BC1 基因的启动子活性强^[3]。

对于双组份双生病毒, DNA A 和 B 转录至少 6 条 RNA, 以分别对应于 DNA A 编码的四个 ORF 和 DNA B 编码的 2 个 ORF。然而在 AbMV 和 TGMV 中未检测到 AC3 特异的转录物, 但在 AbMV 检测到了 AC2-AC3 转录物^[21], 在番茄金黄花叶病毒(TGMV)中检测到了 AC3 蛋白^[22], 提示 AC3 是从大转录物内的 ORF 翻译而来。

3 双生病毒的复制

3.1 复制位置

尽管发现虎尾草条纹花叶病毒(CSMV)和 MSV 在植物叶肉细胞中增殖, 但大多单组份双生病毒的增殖仅限于植物韧皮部, 相反双组份双生病毒在多种类型的细胞中增殖。双生病毒侵染植物后, 植物细胞核呈现一系列病理变化: 病毒粒子在细胞核中随机地聚集或呈不完全结晶的晶体状, 细胞核膨大并形成颗粒体或纤维状结构, 然后纤维状物质浓缩形成各种大小的环, 最后在核质中出现双生病毒颗粒, 细胞核中的纤维环是病毒复制或装配的场所^[3]。

3.2 复制循环

双生病毒是通过滚环复制的^[3], 复制分为三个阶段: (1)互补链的合成; (2)双链 DNA 的

产生;(3)从双链DNA中间体产生单链病毒链DNA。病毒互补链DNA合成完全依赖于寄主的酶进行。在MSV和WDV的病毒粒子中,已发现用于起始合成的互补链DNA引物^[13,14],在ACMV中,以病毒链DNA为模板,与其2581~221 nt区域互补的RNA片段为引物合成互补链DNA^[3],一直合成至RNA引物的5'端,去除RNA引物,互补链继续合成并进一步连接环化,然后病毒链以环状dsDNA为模板进行滚环复制。目前已知TGMV的复制起始点位于共同区的5'端,并且证明其发夹结构为复制所必需^[23]。SqLCV和TGMV AC1蛋白专一地结合共同区上游序列^[24,25],AC1蛋白在共同区有DNA切割和链转移的功能^[26]。

在单组份双生病毒中,C1和C2融合蛋白与双组份双生病毒AC1蛋白类似,为复制所必需。WDV C1和C2基因缺失,起始密码点突变或C1移码突变均导致WDV在小麦原生质体中不能复制^[3]。

为了从环状dsDNA模板合成新的单链病毒链DNA,需要在病毒链DNA上产生一缺口,缺口DNA3'端作为DNA合成的引物,置换病毒链,产生连环体(concatameric)DNA,复制循环完成后,裸露的病毒链DNA被特异地切割,然后重新连接形成环状单链DNA,目前已证实TYLCV AC1有上述这些功能,AC1在病毒正链保守序列TAATATT↓AC的箭头处切割产生一缺口,切割后,AC1仍结合在5'端,另外AC1还有连接功能,用于产生单位长度的病毒正链DNA^[27]。环状单链DNA一方面可能继续作为复制的模板,进入下一轮复制循环;另一方面可能被包装,用于形成病毒粒子,这一平衡过程可能受外壳蛋白调控,在侵染早期,外壳蛋白量少,环状单链DNA用于复制,而在侵染后期,用于包装形成病毒粒子。转基因研究表明,TGMV DNA A编码复制和包装所需的全部信息^[3],缺少DNA A时,DNA B不能复制;转基因植物仅表达TGMV AC1基因即可互补AC1缺损的DNA A或DNA B的复制^[3]。TGMV和其它双组份双生病毒AC1的氨基酸高度保守^[3],这种保守性也延伸入WDV和DSV等单组份双生病毒中。目前已知BGMV AC1中存在亲合NTP(NTP-binding)的结构域,它是复制所必需的^[28]。双生病毒复制蛋白可能参与DNA复制起点的解旋,且已发现在双生病毒复制蛋白和解旋酶(helicase)氨基酸水平上同源^[3]。复制过程中形成的dsDNA不仅能用作复制病毒链的模板,而且它也与寄主相互作用,形成超螺旋DNA以利于转录,且参与寄主症状的产生。

在SV40等动物DNA病毒中,病毒编码的肿瘤蛋白通过LXCXE结构域与视网膜细胞瘤蛋白(Rb)的结合,与病毒创造适宜病毒复制的寄主细胞环境有关。WDV的非结构蛋白C1和复制蛋白C1:C2中也存在LXCXE结构域,它能与Rb蛋白发生特异相互作用,推测植物中存在与Rb类似的蛋白,并且病毒复制和病毒链ORF的表达与C1和C1:C2与类Rb的相互作用有关^[29,30]。TGMV AC1蛋白定位于分化细胞的细胞核中,单独可诱导寄主DNA合成蛋白PCNA——一种在正常植物分化的细胞中检测不到的DNA聚合酶 δ 因子——的大量积累^[31],为研究植物DNA合成提供了新的机会。

4 双生病毒的运动

病毒运动有两种方式,一种是短距离运动,即细胞间运动;二是长距离运动,病毒编码的蛋白参与这些过程。在双组份双生病毒中,涉及病毒运动的基因有:DNA A上的CP和AC2, DNA B上的BV1和BC1,它们与病毒复制无关,AC2、BV1和BC1基因突变阻止病毒系统侵染,CP对病毒运动的影响仅在特定的寄主上才能显示出来。

TGMV和BGMV的研究表明,双组份双生病毒在植物中的运动分三种:(1)细胞间运动,

这一过程不需外壳蛋白的参与;(2)依赖于外壳蛋白的系统侵染,这在双生病毒的所有植物寄主中都起作用;(3)不依赖于外壳蛋白的系统侵染,这仅在特定的寄主中起作用^[15]。如完全缺失外壳蛋白基因的 ACMV 和 TGMV 在 *N. benthamiana* 上均可系统侵染,其中突变的 TGMV 引起的症状延迟和更加温和^[3]。

TGMV AC2 引入突变,dsDNA 合成正常,ssDNA 合成下降^[32]。AC2 蛋白是外壳蛋白的激活因子,突变则消除外壳蛋白表达^[33]。一些双生病毒 AC2 蛋白能激活其它病毒外壳蛋白启动子的活性^[34]。

DNA B 的产物参与了侵染过程。突变分析显示 ACMV BV1 促进细胞间运动,BC1 介导长距离运动^[35],TGMV BV1 似乎不涉及胞间运动^[36]。与 ACMV、TGMV 相反,AbMV DNA A 能独立系统侵染,但 DNA B 的存在可促进侵染并产生症状,突变的 DNA B 抑制上述过程,双生病毒运动可能至少涉及两种机制^[37]。SqLCV BV1 能与单链核酸结合,转基因研究发现,SqLCV BC1 和 BV1 单独表达时,BC1 定位于细胞表面而 BV1 定位于细胞核;共同表达时,BC1 使 BV1 也定位于细胞表面,其中 BV1 N 端负责核定位,C 端负责与 BC1 相互作用^[38,39]。表明 BC1 指导病毒基因组的运动方向。

SqLCV 的研究显示 BV1 和 BC1 均与寄主范围有关,但仅 BC1 与病毒的致病性有关^[40]。

对于单组份双生病毒,外壳蛋白对系统侵染是必需的,然而外壳蛋白突变却不影响 ssDNA 和 dsDNA 的复制^[3]。在玉米中,MSV 的 V1 ORF 的产物为 14 kD,而不是推断的 10.9 kD,它定位于细胞壁,参与病毒的细胞间运动,对病毒的系统侵染和症状产生也是必需的^[18]。

TLCV-AUS C4 ORF 与症状有关,与病毒复制和运动无关^[41],而 TYLCV C4 与病毒运动有关^[42],TGMV AC4 似乎无任何功能^[43]。

5 亚基因组及其它小分子 DNA

ACMV、BCTV、TGMV、TYLCV 及 WDV 等双生病毒侵染植物后,常产生比全长病毒基因组小的病毒特异的单链和双链 DNA,这些 DNA 分子常为全长病毒基因组缺失后形成的,即亚基因组形式。在双组份双生病毒中,小分子亚基因组 DNA 常来源于组份 B(DNA B)^[3]。在 BCTV Logan 株系中,有 0.8~1.8 kb 多种不同大小的亚基因组,它们的形成受寄主种类的影响^[44]。亚基因组 DNA 对于病毒不是必需的^[3]。

我们发现,CLCV-PK 与其它双生病毒不同,它侵染植物后产生的小分子有多种类型:第一种类型为病毒基因组缺失后产生,为亚基因组形式;第二种类型为病毒基因组缺失后又经重排产生;第三种类型病毒基因组缺失,可能重排也可能不重排,但有一些未知的 DNA 序列的插入。值得注意的是,CLCV-PK 侵染植物后产生的病毒特异性小分子 DNA 均来源于 A 组份,不同于其它双组份双生病毒,且这一过程受寄主影响,在烟草中产生的小分子大多为基因组一半大小,而在番茄中产生的小分子 DNA 有大有小(刘玉乐等,待发表)。

双生病毒侵染后产生的小分子 DNA 均缺失了一些病毒侵染所必需的一些基因,但保留了一些复制所必需的顺式作用元件^[3],我们已证实这些小分子 DNA 能被粉虱传播,因而小分子 DNA 也含有包装所需的信号(刘玉乐等,待发表)。

6 双生病毒用作基因表达载体

双生病毒基因组很小,且在植物细胞中的拷贝数极高,有可能用作植物表达载体。已发现在寄主 *N. benthamiana* 上,ACMV DNA A 外壳蛋白缺失株能系统侵染,且能产生典型的症

状^[2],而 TGMV 外壳蛋白缺失株仅能诱发极端温和的症状^[2]。用 CAT 基因、GUS 基因及 NPT-II 基因置换 ACMV 或 TGMV 的外壳蛋白基因,然后以这些嵌合病毒进行侵染或瞬时表达分析,报告基因高水平表达^[2,3]。

在单组份双生病毒中,外壳蛋白对系统侵染是必需的,但没有一个病毒链基因产物为复制所必需^[2,3]。用 CAT 基因替换 MSV 的外壳蛋白基因或连同 V1 基因一起替换,在接种叶中能检测到 CAT 活性,但构建物不能系统侵染^[2]。将抗除草剂基因 Bar 插入 MSV 的小的非编码区中,然后用农杆菌介导侵染玉米幼苗,嵌合病毒 DNA 在玉米叶中达到高拷贝,抗除草剂 Basta^[45]。

用 NPT-II 基因、GUS 和荧光素基因替换 WDV 的外壳蛋白基因的嵌合病毒能瞬时高效表达这些报告基因^[2,3]。

7 基因工程抗病性

目前已用多种途径获得抗双生病毒的转基因植物的报道^[46-51]:(1)用 TGMV 复制酶反义 RNA 基因获得了抗 TGMV 的烟草;(2)ACMV DNA B 和 BCTV Logan 株系的亚基因组双体的转基因植物,分别抗 ACMV 和 BCTV Logan 株系,症状更轻,且后者显示株系专一性;(3)转 TYLCV 以色列分离物 CP 基因的植物抗 TYLCV;(4)用双生病毒复制酶的正义 RNA 基因;(5)利用双生病毒外壳蛋白基因启动子与植株毒素形成的嵌合基因,获得了抗 ACMV 的转基因烟草。

8 双生病毒的进化

氨基酸序列、DNA 序列、血清交叉反应及 RFLP 的比较已用于双生病毒的进化研究。研究表明,双生病毒亚组 I 比亚组 III 的序列更具多样性,因而双生病毒的祖先可能是侵染单子叶的叶蝉传的单组份双生病毒(亚组 I),在随后的进化中基因组加倍增大,获得粉虱传毒和侵染双子叶植物的能力,进而产生典型的粉虱传的双组分双生病毒(亚组 III)。可能有下列因素参与双生病毒的进化:

(1)地理隔离:ACMV、TYLCV 等旧世界的双生病毒在进化树上形成了与新世界病毒不同的分支^[2];我们发现亚组 III 双生病毒外壳蛋白序列方面,美洲的病毒明显不同于其它大陆的病毒^[52]。

(2)生物因素^[2]:昆虫介体参与病毒的进化。全部亚组 III 双生病毒由一种粉虱传播而亚组 I 和 II 的病毒由多种介体传播,这可说明为什么亚组 III 双生病毒间进化距离较近,而亚组 I 和 II 双生病毒间进化距离较远;植物寄主也可能影响病毒的进化;双组分双生病毒共同区在 DNA A 和 B 中高度保守,说明 DNA A 和 B 是共进化的。

(3)病毒间重组:蚕豆矮缩花叶病毒(BDMV)DNA B 和 TMoV DNA A 的假重组子能侵染 *N. benthamiana*,经 3~5 次继代后,症状加重,发现在假重组子的后代中 BDMV DNA B 的共同区已被 TMoV 的共同区代替^[53]。我们证实巴基斯坦秋葵黄叶脉花叶病毒、秋葵曲叶病毒和棉花曲叶病毒有相同的外壳蛋白基因,但其它序列不同,这可能与病毒间重组有关(刘玉乐等,待发表)。我们发现目前在乌干达流行的木薯花叶病的病原由 ACMV 和东非洲木薯花叶病毒(EACMV)重组产生^[54]。病毒间重组不仅在病毒的长期进化、而且在中短期进化中起作用。

(4)病毒基因组与植物寄主基因组重组可能也参与了双生病毒的进化,在一些烟草中发现

多个重复的双生病毒相关 DNA 序列 (GRD), 每一 GRD 的序列与新世界双生病毒的复制起始和 AL1 基因相似, 相信是双生病毒 DNA 序列整合入烟草基因组的结果^[55]。我们发现 CLCV-PK 侵染烟草后产生很多比 CLCV-PK 基因组小的 DNA 分子, 这些分子是 CLCV-PK 基因组缺失、重排后产生的, 然而很多小分子含有一些未知序列, 它可能来源于烟草基因组 (刘玉乐等, 待发表)。

参 考 文 献

- 1 Lazarowitz SG. Geminiviruses: genome structure and gene function, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1992, 11(4), 327~349
- 2 Timmermans MC, Das OP, Messings J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45: 79~112
- 3 Dhar AK, Singh RP. Geminiviruses. Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Vol III: Viruses & viroids. Elsevier Science Ltd. 1995. 289~309
- 4 Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL *et al.* Geminiviridae. Virus taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of virus. New York: Springer-Verlag Wein, 1995. 158~165
- 5 Klute KA, Nadler SA, Stenger DC. Horseradish curly top virus is a distinct subgroup- II geminivirus species with Rep and C4 genes derived from a subgroup- III ancestor. *J Gen Virol*, 1996, 77: 1369~1378
- 6 Cohen SJ, Duffus JE, Liu HY. Acquisition, interference and retention of cucurbit leaf curl viruses in whiteflies. *Phytopathology*, 1989, 79: 109~113
- 7 Briddon RW, Pinner MS, Stanley J *et al.* Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, 1990, 177: 85~94
- 8 Harrison BD. Advances in geminivirus research. *Annu Rev Phytopathol*, 1985, 23: 55
- 9 Harrison BD, Muniyappa V, Swanson MM *et al.* Recognition and differentiation of seven white transmitted geminiviruses from India, and their relationship to african cassava mosaic and Thailand mung bean yellow mosaic viruses. *Ann Appl Biol*, 1991, 118: 299
- 10 刘玉乐, 蔡健和, 李冬玲等. 中国番茄黄化曲叶病毒——一个双生病毒新种. 中国科学, (印刷中)
- 11 Pinner MS, Markham PG, Markham RG *et al.* Characterization of maize streak virus: description of strains and symptoms. *Plant Pathol*, 1988, 37: 74
- 12 Deng D, Megrath PF, Robins DJ *et al.* Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by PCR with degenerate primers. *Ann Appl Biol*, 1994, 125(2): 327~336
- 13 Donson J, Morris-Krsinich BAM, Mullineux PM *et al.* A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is virion-associated. *EMBO J*, 1984, 3: 3069
- 14 Hayes RJ, MacDonald H, Coutts RHA *et al.* Priming of complementary DNA molecules tightly bound to virion DNA of wheat drawl virus. *J Gen Virol*, 1984, 69: 1345
- 15 Poona W, Gillette WK, Jeffrey JL *et al.* Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology*, 1996, 218: 264~268
- 16 Hanley-Bowdoin L, Elmer JS, Rogers SG. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1446
- 17 Pascal E, Goodlove PE, Wu LC *et al.* Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *Plant Cell*, 1993, 5: 795
- 18 Dickinson VJ, Halder J, Woolston CJ. The product of maize streak virus ORF V1 is associated with secondary plasmodesmata and is first detected with the onset of viral lesions. *Virology*, 1996, 220(1): 51~59
- 19 Frischmuth T, Zinnat G, Jeske H. The nucleotide sequence of abutilon mosaic virus reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. *Virology*, 1990, 178: 461

- 20 Stanley J, Markham PG, Callis RG *et al.* The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus, EMBO J. 1986, 5:1796
- 21 Frishmuth S, Frishmuth T, Jeske H. Transcript mapping of abutilon mosaic virus, a geminivirus. Virology, 1991, 185:596
- 22 Thommes PA, Buck KW. Synthesis of the tomato golden mosaic virus AL1, AL2, AL3 and AL4 protein *in vitro*. J Gen Virol, 1994, 75:1827
- 23 Orozco BM, Hanleybowdon L. A DNA-structure is required for geminivirus replication origin function. J Gen Virol, 1996, 70(1):148
- 24 Lazarowitz SG, Wu LC, Rogers SG *et al.* Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. Plant Cell, 1992, 4:799
- 25 Fontes EPB, Luckow VA, Hanley-Bowdoin LA. Geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. Plant Cell, 1992, 4:597
- 26 Laufs J, Schumacher S, Geisler N *et al.* Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. FEBS Letters, 1995, 377:258
- 27 Laufs J, Traut W, Heyraud F *et al.* *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:3879
- 28 Hanson SF, Hoegstraten RA, Ahlquist P *et al.* Mutational analysis of a putative NTP-binding domain in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. Virology, 1995, 211:1-9
- 29 Collin S, Fernandezlobato M, Gooding PS *et al.* The 2 nonstructural proteins from wheat dwarf virus involved in viral gene-expression and replication are retinoblastoma-binding proteins. Virology, 1996, 219(1):324
- 30 Xie Q, Suarezlopez P, Gutierrez C. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus—requirement for efficient viral DNA replication. Virology, 1995, 14:4073
- 31 Nagar S, Pedersen TJ, Carrick KM *et al.* A geminivirus induces expression of a host DNA-synthesis protein in terminally differentiated plant cells. Plant Cell, 1995, 7(6):705
- 32 Sung YK, Coutts RHA. Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. J Gen Virol, 1995, 76:2809
- 33 Sunter G, Bisaro DM. Transactivation in a geminivirus; AL2 gene products is needed for coat protein expression. Virology, 1991, 180:416
- 34 Sunter G, Stenger DC, Bisaro DM. Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. Virology, 1994, 203:203
- 35 Von Arnim A, Frishmuth T, Stanley J. Detection and possible functions of African cassava latent virus DNA B gene products. Virology, 1993, 192:264
- 36 Hayes RJ, Buck KW. Replication of tomato golden mosaic virus DNA B in transgenic plants expressing open reading frames (ORFs) of DNA; requirement of ORF AL2 for production of single-stranded DNA. Nucleic Acids Res, 1989, 17:10213
- 37 Evans D, Jeske H. DNA B facilitates, but is not essential for the spread of abutilon mosaic virus in agroinoculated *Nicotiana benthamiana*. Virology, 1993, 194:752
- 38 Sanderfoot AA, Lazarowitz SG. Cooperation in viral movement—the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. Plant Cell, 1995, 7(8):1185
- 39 Sanderfoot AA, Ingham DJ, Lazarowitz SG. A viral movement protein as a nuclear shuttle—the geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. Plant Physiology, 1995, 110(1):23
- 40 Ingham DJ, Pascal E, Lazarowitz SG. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. Virology, 1995, 207(1):191
- 41 Rigden JE, Krake LR, Rezaian MA *et al.* ORF C4 of tomato leaf curl geminivirus is a determinant of symptom severity. Virology, 1994, 204(2):847
- 42 Jupin I, de Kouchkovsky F, Jouanneau F *et al.* Movement of yellow leaf curl geminivirus; involvement of the protein encoded by ORF C4. Virology, 1994, 204:82

- 43 Pooma W, Petty ITD. Tomato golden mosaic virus open reading frame A14 is genetically distinct from its C4 analogue in monopartite geminiviruses. *J Gen Virol*, 1996, 77:1947
- 44 Stenger DC, Stevenson MC, Hormuzdi SG *et al*. A number of subgenomic DNAs are produced following agroinoculation of plant with beet curly top virus. *J Gen Virol*, 1992, 73:237
- 45 Shen WH, Hohn B. Vectors based on maize streak virus can replicate to high copy numbers in maize plants. *J Gen Virol*, 1995, 76:965
- 46 Day AG, Bejarano ER, Buck KW *et al*. Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:6721
- 47 Frischmuth T, Stanley J. African cassava mosaic virus DI DNA interferes with the replication of both genomic components. *Virology*, 1991, 183:539
- 48 Stenger DC. Strain-specific mobilization and amplification of a transgenic defective-interfering DNA of the geminivirus beet curly top virus. *Virology*, 1994, 203:397
- 49 Kunik T, Gafni Y, Navot N *et al*. Transgenic tomato plants expressing the V1 (capsid protein) and antisense CI (replication-related) genes of tomato yellow leaf curl virus are tolerant to the virus. *Biotechnology*, 1994, 12:500
- 50 Hong Y, Stanley J. Virus-resistance in *Nicotiana benthamiana* conferred by African cassava mosaic virus replication-associated protein transgene. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1996, 9(4):219
- 51 Hong Y, Saunders K, Hartley MR *et al*. Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of diathin in transgenic plants. *Virology*, 1996, 220:119
- 52 刘玉乐, 李冬玲, 田波等. 一种非洲番茄黄化曲叶病毒 DNA 的克隆. 自然科学进展, (印刷中)
- 53 Hou YM, Gilbertson RL. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *J Virol*, 1996, 70:5430
- 54 Zhou X, Liu YL, Calvert L *et al*. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with several cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology*, 1997, 78:2101~2111
- 55 Bejarano ER, Khasboggi S, Witty M *et al*. Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:759

烟草曲叶双生病毒的研究

I. 广西分离物的生物学特性和血清学反应

蔡健和¹ 王小凤² 黄福新¹ 林明生¹ 王文慧² 田波²

(¹广西农业科学院植物保护研究所, 南宁 530007)

(²中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

烟草曲叶病已在广西九个产烟县(市)发生危害,一般为零星发生,局部地区平均发病率高达50%以上,造成严重经济损失。试验结果表明,此病仅可通过嫁接和烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传染,而汁液摩擦、种子和中国菟丝子(*Cuscuta chinensis*)不传病。除普通烟(*Nicotiana tabacum*)外,还可侵染桔斑三生烟(*N. tabacum* var. *zanthi* N)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)和曼陀罗(*Datura stramonium*)等鉴别寄主,产生典型的曲叶症状。ELISA检测结果表明,病烟叶提取液与非洲木薯花叶病毒(ACMV)的两个单抗(SCR 18和SCR 23)呈阳性反应,而与另外两个单抗(ACMV SCR 11和ICMV(印度木薯花叶病毒)SCR 52)呈阴性反应,用ACMV单抗SCR 18免疫吸附法制片,在电镜下观察到球状成对或单个的病毒颗粒,单颗粒直径为18nm,成对颗粒大小为15—18×25—30nm。

关键词 烟草曲叶双生病毒;血清学关系

烟草曲叶病毒(Tobacco Leaf Curl Virus, TLCV)是重要的植物双生病毒之一,主要分布于热带和亚热带地区,温带地区亦有发生^[1]。过去我国曾有初步报道,但未进行较系统的研究^[2-4]。

近三年来,我们在广西进行烟草病害调查中,发现在南宁、武鸣、上林、田林、那坡、武宣、罗城、南丹和荔浦等9个县(市)也有该病的发生,一般为零星分布,但在个别县(乡)已严重影响到烟草生产的发展。如1990年上林县明亮六村的冬烟平均发病率为5%左右;1991年广西农业科学院试验地种植的春烟,到生长后期,全田烟株染病率接近100%。烟株早期染病,生长受阻,植株矮化,基本无经济价值;后期染病,顶部叶片皱缩卷曲,仅下部叶片可作烤烟,但质量已大为下降。可见,此病是我区乃至全国烟草生产的潜在威胁。作者对广西烟草曲叶病的传播途径,寄主范围及其与非洲木薯花叶病毒(ACMV)的血清学关系进行了研究。

材 料 和 方 法

1989—1991年,我们在对烟草曲叶病的发生、分布和危害情况调查中,采集典型曲叶症状的烟,移栽于防虫网室,作为研究材料。

(一) 传播途径

本文于1992年5月21日收到。

*广西农业科学院植物保护研究所周至宏和蒲天胜副研究员协助鉴定烟粉虱;广西各县生产办公室有关同志协助调查,特此致谢。

1. 嫁接:采用腹接法,以病株嫩叶或小侧芽作接穗嫁接在健康烟上,试验重复三次,共嫁接烟苗 30 株。

2. 烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 介体:供试的无毒烟粉虱先在病株上饲毒 6—24 小时,然后转移到健康烟苗 (3—4 片叶) 上传毒 24 小时,每株烟苗接种成虫 5—10 头,试验重复四次,共接种烟苗 24 株。

3. 其它:汁液摩擦、种子和菟丝子等传病试验均按常规方法进行。

(二) 寄主范围

供试植物有普通烟 (*Nicotiana tabacum*)、桔斑三生烟 (*N. tabacum* var. *xanthi* N)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 和曼陀罗 (*Datura stramonium*), 用烟粉虱或嫁接接种, 每种参试植物为 6 株, 试验重复三次。

(三) 血清学关系

1. ELISA:参照 Thomas 等 (1986)^[6] 的方法。

2. 免疫吸附电泳:火棉胶膜覆盖的铜网在稀释 3 倍的 ACMV 单抗 SCR 18 液滴上漂浮 1 小时 (25 °C 保温), 吸干, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 分钟, 吸干, 转移到病烟叶抽提液 (嫩叶加少量金刚砂研碎, 加 200 μl 0.01 mol/L Tris pH 8.0, 震荡, 12000 r/min 离心 10 分钟, 取上清液) 上漂浮 1 小时, 吸干, PBST 洗 3 次, 吸干, 用 1% 醋酸铀负染 30 秒, 电泳观察。

供试的 ACMV 和 I CMV 单抗和多抗由英国苏格兰作物研究所 B. D. Harrison 教授提供。

结 果

(一) 田间症状观察

发病初期, 顶部嫩叶微卷; 以后叶卷曲加重, 叶背面叶脉增生加厚, 对光看叶脉呈墨绿色; 生长后期叶背面产生许多耳状或叶状增生, 严重者叶柄、主柄、病株茎干及杈芽扭曲, 花萼及蒴果粗糙皱缩, 不能正常抽花。

(二) 传播途径

1. 嫁接:嫁接后 20 天左右, 烟株便陆续开始发病, 观察至 40 天, 接种的三批烟苗 (共 30 株) 有 18 株发病, 症状与原自然病株相同, 证明嫁接可以传病。

2. 烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 介体:接种后 20 天左右, 烟株开始发病, 观察至 40 天, 接种的 24 株烟苗共有 12 株发病, 证明烟粉虱是烟曲叶病的传播介体。

3. 其它:用汁液摩擦, 中国菟丝子 (*Cuscuta chinensis*) 及种子等方法进行了传毒试验, 结果表明烟曲叶病不能通过上述方法传播。

(三) 鉴别寄主症状

试验表明, 除普通烟 (*N. tabacum*) 外, 烟曲叶病毒还可以侵染桔斑三生烟 (*N. tabacum* var. *xanthi* N)、曼陀罗 (*Datura stramonium*) 和番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 等寄主植物, 产生卷叶、叶片皱缩, 叶背面有耳状增生, 矮化等典型烟曲叶病的症状 (图版 I-1—3)。