

烟草花叶病毒株系鉴定研究进展

付鸣佳 高乔婉 范怀忠

(华南农业大学植物病毒研究室, 广州 510642)

摘要 烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)具许多株系, 国内外近十几年来主要在生物学、血清学、生物化学和分子生物学等方面进行株系鉴定的研究。文章就上述研究进展作一简要综述, 并针对某些研究方面阐述了一些见解和评论。

关键词 烟草花叶病毒; 株系; 株系鉴定; 研究进展

中图分类号 S 432. 41

关于 TMV 株系的研究, 近十几年来, 大致做了下面几方面的工作。(1)鉴别新的株系;(2)株系间交互保护作用的研究;(3)对已知株系的生化和物理特性的比较研究;(4)修正原有株系归类的错误。

本文主要对 80 年代以来国内外株系鉴定的研究作一概述, 有关内容也涉及部分 80 年代以前的研究成果。

1 新发现株系及株系鉴定研究中的复杂性

关于 TMV 株系的划分, 牵涉问题较复杂, 在各研究者之间, 并无统一标准。张成良等(1986)指出, 都丸根据在烟草上的症状分为普通系、黄斑系、潜伏系、坏死系等 4 个株系; Felolman 根据 TMV 寄主范围的差异分成烟草、葫芦科、豆科、兰科、车前等 10 个系群; 我国番茄抗病育种协作组, 按基因型将危害我国番茄的 TMV 分为 0、1、1.2 和 2 等 4 个株系。Van Regenmortel(1981)在其综述文章中列出了普通株系、番茄株系、车前草株系、豆类株系、葫芦科株系、兰花株系、U₂ 株系等, 同时指出描述为 TMV 株系的一些特异成员。

近十几年来, 新鉴定的株系时有报道。Igwegbe(1983)从辣椒(*Capsicum annuum*)分离到一新株系 defoliation(TMV-DS)。Taraku 等(1984)在大豆上发现一个新的豆类株系。Tosic 等(1981)也在辣椒上发现一个 hot pepper necrotic 株系。Kwon 等(1994)报道日本 rakkyo 上分离到一个新株系, 定名为 rakkyo 株系 TMV-R。在国内陈棣华等(1986)报道了为害太子参的太子参花叶病毒 TaMV。

株系鉴定的研究, 是一项较为复杂的工作, 而且鉴定过程中个人的观点也不同, 结果可能就会有差异。TMV 的寄主范围很广, 在不同寄主上可能出现同一分离物但定出不同的名称。此外, TMV 分布范围也很广, 几乎世界各地都有报道, 由于地域关系, 各地出现的株系有很大差异。当然, 有的株系是世界性的, 如普通株, 而有的株系局限于部分地区发生。因此, 各地报道的情况就出现了差异。TMV 株系鉴定的复杂性也反映在病毒本身。目前的研究发现, TMV-U₅ 株系有卫星病毒的存在(Valverde et al, 1986), 国内已有关于这方面的综述文章(程宁辉, 1993), 这个结果表明杆状病毒也有卫星病毒存在。也有报道在感染 TMV 豇豆株系 TMV-B 的豇豆中含有

两种粒子,除 TMV 特征粒子外,还有一种短粒子,这两种粒子大小悬殊,但有同源血清反应,蛋白的胰酶多肽图谱也有相同之处(Whitfield et al, 1976; Higgins et al, 1976)。在感染有 TMV-U₅ 的叶绿体中也分离到一种 d 为 18 nm, l 为 100 nm 的粒子(Shalla et al, 1975),这都说明 TMV 株系研究较为复杂,涉及内容也有增加。

2 TMV 株系鉴定方法进展

TMV 株系鉴定方法,不同作者根据其实验室的条件,采用的方法各异。

2.1 依据寄主的症状和寄主范围

以生物学方法鉴定株系,是传统的方法,现在仍是行之有效的方法。不同病毒或同种病毒的不同株系,不同寄主品种或同一品种的不同生育期和不同环境条件决定了植物病害病状,对于 TMV 也不例外。目前已鉴定和命名的许多株系主要是根据不同寄主或同种寄主不同症状筛选而获得。在众多的寄主上,各株系的症状都表现出各自的特性,如 TMV 普通株引起毛叶烟(*Nicotiana glauca*)花叶,而 TMV 矮牵牛(*Petunia*)分离物 TMV-P 在毛叶烟上产生坏死斑。不过大部分 TMV 株系在心叶烟和苋色藜上都产生局部枯斑,这是一个比较稳定的症状。应用一组具特征性症状的植物,可作为鉴别寄主。郁操国等(1982)以长叶车前(*Plantago spp*)、心叶烟、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、青菜(*Brassica chinensis*)和曼陀罗(*Datura stramonium*)做鉴别寄主,其中长叶车前和青菜产生系统花叶,心叶烟和曼陀罗产生局部枯斑,菜豆上无侵染,与长叶车前花叶病毒产生症状相同,已从生物学角度证明 HRVsh 为长叶车前亚组一个株系。

根据寄主症状和寄主范围来鉴定株系,目前仍然是病毒株系研究的常用方法。当然,目前的研究已不象早期株系研究那样单一以生物性状为主,而是结合其他方法。

2.2 血清学方法

利用血清学关系进行株系间的分类和株系鉴定,是一个很有效的方法。张成良等(1986)以 TMV 番茄株制备了 10 个单克隆抗体,根据对抗原决定簇的分析,可将 14 株分离物初步划分成 6 组抗原型。杨翠荣等(1992)对我国北方 6 省(市)番茄上株系间进行血清学试验,指出 0、1、2、或 1.2 株系在琼脂双扩散中,这 4 个株系之间有一定血清学关系,但是仅与同一株系抗体产生的沉淀线相互吻合,表明这 4 个株系之间在血清学上又有差异。有人也从分子结构上分析了单克隆抗体与病毒株系间的关系,由 TMV-OM 制备的单克隆抗体,6 个抗原决定基中,2 个同 TMV-OM 抗体专化性相关,3 个同 TMV-OM 和 TMV-T 有共同抗体专业化,1 个同 TMV-T 抗体专化性相关(Dubs et al, 1990),由此也能说明利用血清学区分株系的客观存在。此外,Inone 等(1985)确定了 5 个 TMV 株系即 T、OM、CGM-MV(Cucumber Green Mottle Mosaic Virus)-W-C-Y 之间的血清学关系,发现 OM 同 T 和 W 的血清学关系比其他两株系近;T 与 W 血清学关系较远,C 和 Y 的血清学关系较近。由此可反映出株系之间的亲缘关系,株系间关系越是远缘,血清学关系相差也大,同一亚组中不同株系的血清学关系则比较接近。

在这里要指出的是,各种血清学方法的灵敏性是不同的。肖启明等(1993)比较了 4 种血清学方法检测 TMV 和 CMV,ELISA-斑点免疫法 Dot-ELISA 灵敏性最高,其次为 ELISA-异种动物抗体双夹心法(DSM-ELISA)和 ELISA-A 蛋白酶联法(SPA-ELISA),葡萄球菌凝集法(SA-test)灵敏性最低。

2.3 衣壳蛋白(CP)氨基酸序列和组成

1960 年, Anderer 等和 Tsugita 等最早阐明了 TMV (CP)全部氨基酸序列。随着许多 TMV 株系 CP 氨基酸序列的研究报道,发现各株系间存在差异,这与理论显然是相符的。Van Regenmortel(1981)在其综述中,将 Zaitlin 和 Israel、Oshima 和 Harrison、Kassanis 和 Varma、Hollings 等、Hollings 和 Hutlinger、Rentschler 以及 Alschuh 等报道的 6 个株系的氨基酸序列进行比较,发现 SHM V 株系约有 2/3 的残基与普通 TMV 不同。也可从所列氨基酸序列看出普通株与 HR 株、U₂ 株和 Dahlemense 株比较,则有 8~17 个氨基酸残基的差异。从报道的各株系 CP 氨基酸序列比较可知,越是远缘,其差异越大。通过氨基酸序列的分析,也可查出同一亚组中不同株之间的差异。Nozu 等(1970)将 TMV 的日本普通株 OM 同美国的普通株 U₁ 和西德的普通株(vulgare)比较,发现在第 192 个氨基酸残基位置上,OM 为缬氨酸,U₁ 和 vulgare 为异亮氨酸;在第 153 个氨基酸残基上 OM 为天冬氨酸,其他两个株系则为苏氨酸。

进行 CP 氨基酸序列分析,所用费用比较大,而且此方法并非绝对准确,实验中有可能出现差错(Dubs et al, 1990)。在国内,进行株系鉴定时采用此方法不多,而通过 CP 氨基酸组分分析比较,亦能达到对株系鉴定的目的,且效果好花费少。郁操国等(1982)在 CP 氨基酸组分分析后再结合其他方法,确认 HRVsh 属于 TMV 群长叶车前花叶病毒(HR)的一个新的分离物。陈棣华等(1986)在研究太子参花叶病毒 CP 氨基酸组分时,发现含有组氨酸和甲硫氨酸,结合生物学和物理、化学特性确认太子参花叶病毒是烟草花叶病毒群的一个毒株。总之,进行氨基酸组分分析必须同其他株系进行比较,甚至还要结合其他方法,才易判断和区分。

2.4 核酸杂交和核酸序列分析

TMV 中的 RNA 和其他生物的 RNA 一样,有共同的生化和分子生物学特性,株系间的 RNA 核苷酸组成和序列肯定有同源性和差异性。

核酸杂交可以鉴别株系间核酸的同源关系,以此确定株系的归属。Van De Walle 等(1976)以竞争性杂交实验测定普通株、Dahlemense 株和 U₂ 株 RNA 核苷酸序列的同源性,发现它们分属于十分不同的亚组;进行核酸杂交,可以制备 RNA 的互补 DNA (cDNA)作为探针,来进行同源性检测。有人以³²P 标记的 cDNA 同 RNA 杂交来检测几个 TMV 分离物之间的关系,发现分离物 a₂、a₄ 和 a₇ 几乎有 100%的同源关系,它们同 U₂ 几乎无同源关系,同 U₁ 有大约 60%~70%的同源关系;此外,b 分离物同 U₁ 有几乎 100%的序列同源,认为 b 为 U₁ 的一个变异株(Garcia-Arenal et al, 1984)。此外,以³H 标记 RNA 进行 RNA 和 RNA 之间的杂交也早已有人做过,他们指出,进行分子杂交并不能完全鉴别株系,还要结合其他物理、化学和生物学特性。当然,以核酸分子杂交方法对株系之间的关系进行研究,还是行之有效的,判断株系间基因组的同源性关系,可将 TMV 株系归入各亚组。一般而言,在一亚组中这种同源性关系是无差异的,而在两亚组间却很少有同源性关系。

采用核苷酸序列分析鉴别株系,可以说是最准确的方法。该方法在许多植物病毒鉴定中都得到应用,但限于条件,应用并不很广泛。Goelet 等(1982)最早确定了 vulgare 株的核苷酸序列。也有人以此技术改正了曾错误鉴定的株系,Ikeda 等(1993)将原本归入番茄花叶病毒(Tomato Mosaic Virus)的一个能在含 N 基因烟中系统侵染的 TMV 分离物 ob,经过核苷酸序列分析比较,将其看做一个新的 TMV 株系。通过核苷酸序列分析,可发现株系间微小的差异。

2.5 不同株系在具不同抗性基因品种上的症状表现

全国番茄抗病育种协作组(1988)采用 Pelam 提出基因对基因的相关性概念作为番茄一

株系划分的方法对我国番茄上株系进行鉴定,指出我国主要分布的是O株系,部分地区有1、2和1.2株系。杨翠荣等(1992)对北方6省(市)侵染番茄的TMV株系进行鉴定,发现我国北方主要流行的TMV以O和1株系为主。此外,曹如玉等(1988)首次报道了我国有2^a株系。目前,所采用的番茄鉴别品种为GCR系统。

3 讨论

株系较多,进行TMV的分类和株系鉴定采用的方法也各不相同。目前来看,氨基酸序列分析和核酸序列分析易鉴别出亲缘关系较近的一些株系,特别是核酸序列分析,可将株系间微小的差异都区分开来,是株系鉴定中最好的方法。但从经济上考虑,许多实验室都难以接受这两个方法。核酸杂交也是TMV株系鉴定中常用的方法。也有上述不尽人意的地方,还必须结合其他方法,才较为准确。氨基酸组分的分析是一种较简单易行而又经济的方法,目前许多单位都有这种自动分析仪。生物学方法仍是株系鉴定中的主要方法,大部分TMV株系鉴定都首先基于生物学方法。血清学方法是一个快速、准确和灵敏的方法,但逊于分子杂交方法。

在TMV株系鉴定工作中存在问题也不少。首先,株系鉴定是由许多工作者在不同实验条件下完成的,其实验结果和作者的观点肯定有差异,不易比较。其次,各株系的命名也较混乱,甚至出现了同一株系有两个以上的名称,这也给鉴定工作带来困难。这些问题有待于寻求更新的方法解决。

参 考 文 献

- 全国番茄抗病育种协作组,郑贵彬,徐鹤林,等. 1988 我国为害番茄的病毒种群与烟草花叶病毒(TMV)株系分化的初步鉴定. 病毒学杂志, 1: 64~69
- 肖启明,刘学端,黄声仪. 1993年. 四种血清学方法检测烟草TMV、CMV的比较. 中国病毒学报, 8(1): 102~105
- 张成良,张作芳,阙晓枫,等. 1986. 应用单克隆抗体对烟草花叶病毒抗原决定簇及其抗原型的分析研究. 病毒学杂志, 1(2): 32~36
- 陈棣华,陈绳亮,孙继山,等. 1986. 太子参花叶病毒的生化特性研究. 病毒学杂志, 1(1): 44~49
- 杨翠荣,田如燕,姜春晓,等. 1992. 中国北方六省(市)侵染番茄的烟草花叶病毒株系鉴定. 植物保护, (4): 18~19
- 郁操国,王鸣歧,孙玉昆. 1982 烟草花叶病毒群长叶车前花叶病毒(HRV_{sh})的研究 2 纯化及性质. 病毒学集刊, 1: 129~135
- 涂正金,于善谦. 1988 长叶车前花叶病毒上海分离株单克隆抗体的制备及免疫学特性II. 单克隆抗体免疫反应方法及在株系鉴别上应用. 病毒学杂志, 4: 376~381
- 曹如玉,赵万英,郑燕棠,等. 1988 侵染具Tm-2^a抗性基因番茄品种的烟草花叶病毒新株系测定. 华北农学报, 3(1): 120~121
- 程宁辉. 1993 烟草花叶病毒卫星病毒(STMV)研究和用于生防的评价. 中国烟草, (4): 15~18
- Dubs M C, Van Regenmortel M H V. 1990. Odontoglossum ringspotvirus coat protein sequence and antigenic comparisons with other tobamoviruses. Archives of Virology, 115: 239~249
- García-Arenal R, Palukaitis P, Zaitlin M. 1984. Strains and mutants of tobacco mosaic virus are both found in virus derived from single-lesion-passaged inoculum. Virology, 132: 131~137
- Goelt P, Lomonosoff G P, Butler P J G, et al. 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. Proc Natl Acad Sci, 79(19): 5818~5822
- Higgins T J V, Goodwin P B, Whitfield P R. 1976. Occurrence of short particle in beans infected with the

- copea strain of TMV. II. Evidence that short particle contain the cistron for coatprotein. *Virology*, 71: 486~497
- Igwegbe E C K. 1983. Some properties of a tobacco mosaic virus strain isolated from pepper (*Capsicum annum*) in Nigeria. *Plant Disease*, 63(3): 317~320
- Ikedo R, Watanabe E, Watanabe Y, et al. 1993. Nucleotide sequence of tobamovirus ob which can spread systemically in N genetobacco. *Journal of General Virology*, 74(9): 1939~1944
- Inoue M, Furuya Y, Matsumoto T. 1985. Serological relationship among the virus strains of tobamovirus group using passive hemagglutination and reversepassive hemagglutination. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, 36: 151~154
- Kwon S, Sako N. 1994. A new strain of tobacco mosaic virus infecting rakkyo (*Allium chinense* G Don). *日植病报*, 60: 36~44
- Nozu Y, Ohno T, Okada Y. 1970. Amino acid sequence of some common Japanese strains of tobacco mosaic virus. *J Biochem*, 68: 39~52
- Sela I, Reichman M, Weissbach A. 1984. Comparison of dot molecular hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay for detection tobacco mosaic virus in plant tissue and protoplasts. *Phytopathology*, 74: 385~389
- Shalla T A, Petersen L J, Giunchedi L. 1975. Partial characterization of virus-like particle in chloroplasts of plants infected with the U₅ strain of TMV. *Virology*, 66: 94~105
- Taraku N, Tolin S A. 1984. A new legume strain of tobacco mosaic virus from soybean in Yugoslavia (abstr.). *Phytopathology*, 74(6): 759
- Tosic M, Videnov V. 1981. Contribution to the study of some isolates of tobacco mosaic virus from pepper. *Zastita Bilja*, 32(3): 285~292
- Valverde R A, Dodds J A. 1986. Evidence for a satellite RNA associated naturally with the U₅ strain and experimentally with the U₁ strain of tobacco mosaic virus. *J Gen Virol*, 67: 1875~1884
- Van De Walle M J, Segel A. 1976. A study of nucleotide sequence homolog between strains of tobacco mosaic virus. *Virology*, 73: 413~418
- Van Regenmortel M H V. 1981. Tobamovirus. In: Kurstak E ed. *Handbook of plant virus infection comparative diagnosis*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 542~564
- Whitfield P R, Higgins T J V. 1976. Occurrence of short particle in beans infected with the copea strain of TMV. I. Purification and characterization of short particles. *Virology*, 71: 471~485

AN ADVANCES IN IDENTIFICATION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS STRAINS

Fu Mingjia Gao Qiaowan Fan Huaizhong

(Lab. of Plant Virology, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Tobacco mosaic virus (TMV) has a large number of strains. The studies on identification of TMV strains were carried out in biology, serology, biochemistry and molecular biology for more than 10 years in the world. It gave a brief review of the research advances on the subjects mentioned above and proposed some perspectives and evaluation in the paper.

Key words Tobacco mosaic virus (TMV); strain; identification of strains