

烟草病毒研究现状与展望*

马国胜何博如

(苏州农业职业技术学院园艺与园林系 苏州 215008) (中国烟草总公司郑州烟草研究院 郑州 450000)

摘 要 简述了烟草病毒主要种类、最新分类地位、鉴定与检测技术、抗病毒基因工程等方面研究进展,并展望了烟草病毒病检测技术、抗病毒制剂研制与开发以及烟草抗病毒基因工程技术等方面研究发展趋势。指出应加强用于烟草病毒诊断与检测的试剂盒研究及开发。
关键词 烟草病毒 分类 检测 基因工程

Current status and recent advances on the tobacco viruses .MA Guo-Sheng(Department of Horticulture and Gardening, Suzhou Polytechnical Institute of Agriculture, Suzhou 215008, China) ,HE Bo-Ru(Zhengzhou Tobacco Research Institute of Chinese Total Tobacco Company, Zhengzhou 450000 ,China) , *CJEA*, 2006, 14(2) :150 ~ 153
Abstract Recent research advances on the main kinds, latest taxonomy, determination and probe technique, and genetic engineering of anti-virus, etc ., of tobacco viruses are briefly stated .The related fields of further studies on determining and probing techniques , development of anti-virus medicaments, and genetic modified tobacco, *et al*, are prospected . Research and development of reagent box to determine and probe tobacco viruses are recommended, too .
Key words Tobacco virus, Taxonomy, Probe, Genetic engineering
(Received Dec .23 ,2004; revised Jan .29 ,2005)

1 烟草病毒的发现与主要种类及其分类

烟草病毒是引起烟草病毒病的植物病毒总称,可危害多种植物,是烟草普遍发生且危害严重的侵染性病原,也是世界范围内重要病害之一。近年来由于气候、耕作制度和农业产业结构的调整,烟草病毒病对植物的危害日益严重。烟草病毒病最早于 1857 年由 Swieten 以烟草反常现象为特征所记载^[20];1886 年 Mayer 首次将烟草发生的这种反常病害命名为烟草花叶病“ Mosaic ”,并证明病株汁液具有传染性^[1,2,20];1898 年 Beijerinck 再次证实烟草花叶病病原的传染性,并证实它具有滤过性,首次使用“ 传染性活液 (Contagium vivumfluidum) ”即“ 病毒 (Virus) ”一词本意称谓烟草花叶病病原^[1,2];1939 年德国科学家 Kausche 等利用最新电子显微镜第一次观察到烟草花叶病毒的长形病毒粒子,拉开了植物病毒学研究的序幕^[1,2]。人们还相继发现了其他种类烟草病毒^[3],1888 年美国首次报道了甜菜曲顶病毒;1906 年 Lownsberry 报道并描述了烟草出现的斑萎症状,1930 年由 Samuel 鉴定了番茄上的病原,并定名番茄斑萎病毒;1912 年荷兰 Peters, Schwarta 报道了烟草曲叶病毒病,并于 1931 年确定病原;1916 年 Doolittle 发现了黄瓜花叶病毒;1917 年 Fromme 首次报道了烟草环斑病毒;1928 年 Valleau, Johnson 最早发现烟草蚀纹病毒,并于 1932 年报道了烟草线条病毒;1931 年 Smith 率先发现马铃薯 X 病毒和 Y 病毒,并于 1946 年首次记录了番茄黑环病毒;1935 年 Smith, Bald 定名了烟草坏死病毒;1943 年 Quanjer 首次报道了烟草脆裂病毒;1966 年我国台湾省首次发现烟草脉带花叶病毒;1992 年我国谢联辉等首次报道了烟草番茄不孕病毒。
据报道^[1,2,4],目前世界烟草病毒种类有近 40 种,常见的约 20 余种,主要包括烟草花叶病毒 (Tobacco Mosaic Virus, TMV)、黄瓜花叶病毒 (Cucumber Mosaic Virus, CMV)、马铃薯 Y 病毒 (Potato Virus Y, PVY)、烟草蚀纹病毒 (Tobacco Etch Virus, TEV)、马铃薯 X 病毒 (Potato Virus X, PVX)、烟草褪绿斑驳病毒 (Tobacco Chlorosis Mottle Virus, TCMV)、苜蓿花叶病毒 (Alfalfa Mosaic Virus, AMV)、烟草斑驳病毒 (Tobacco Mottle Virus, TMtV)、烟草脉斑驳病毒 (Tobacco Vein Mottle Virus, TVMtV)、烟草曲叶病毒 (Tobacco Leaf Curl Virus, TLCV)、烟草坏死病毒 (Tobacco Necrosis Virus, TNV)、烟草坏死矮缩病毒 (Tobacco Necrosis Dwarf

* 苏州农业职业技术学院重点项目(050104)、江苏省“青蓝工程”(2005-12)和江苏省高校自然科学研究计划项目(05KJD210197)资助
收稿日期:2004-12-23 改回日期:2005-01-29

Virus, TNDV)、烟草矮化病毒 (Tobacco Stumpy Virus, TStuV)、烟草环斑病毒 (Tobacco Ring Spot Virus, TRSV)、烟草宽环斑病毒 (Tobacco Broad Ring Spot Virus, TBRSV)、烟草脆裂病毒 (Tobacco Rattle Virus, TRV)、烟草线条病毒 (Tobacco Streak Virus, TSV)、烟草脉带花叶病毒 (Tobacco Vein-banding Mosaic Virus, TVBMV)、烟草脉扭病毒 (Tobacco Vein Distort Virus, TVDV)、番茄不孕病毒 (Tomato Aspermy Virus, ToAV)、番茄黑环病毒 (Tomato Black Ring Virus, ToBRV)、番茄斑萎病毒 (Tomato Spot Wilt Virus, TSWV)、甜菜曲顶病毒 (Beet Curly-top Virus, BCTV) 等 23 种。由于我国烟区跨度大, 南北方气候、耕作制度和农业生态条件均有较大差异, 因此烟草病毒种类复杂, 据调查^[4] 目前我国发生的烟草病毒种类主要有 17 种。

按最新生物五界分类系统, 病毒属单列一界即病毒界, 但界以下分类一直处于变化之中, 追溯病毒分类发展史可分为 4 个时期^[1], 即 1961 年前为第一时期不同领域科学家各自提出或建立一些分类系统, 病毒分类进展缓慢, 缺乏国际间的协作; 1962 ~ 1966 年为第二时期建立了国际病毒命名委员会 (International Committee on Nomenclature of Viruses, ICNV); 1966 ~ 1970 年为第三时期 Wildy 组织病毒分类的国际协作并发表了国际病毒命名委员会首次报告; 1971 ~ 1999 年为第四时期病毒分类工作得到巩固和发展。1973 年 5 月国际病毒命名委员会改名为国际病毒分类委员会 (ICTV), 并在 1995 年发表的国际病毒分类委员会第六次报告中取消了病毒分类中的组和亚组, 统一使用科、属、种分类系统^[21]。1999 年由 Pringle 执笔公布了国际病毒分类委员会第七次报告的病毒分类检索表^[22], 并设立 3 个目、64 个科、9 个亚科、233 个属、约 400 个种, 界以下则根据核酸类型分为 8 大类群, 即单链 DNA 病毒 (ssDNA)、双链 DNA 病毒 (dsDNA)、负链单链 RNA 病毒 (-ssRNA)、正链单链 RNA 病毒 (+ ssRNA)、双链 RNA 病毒 (dsRNA)、裸露 RNA 病毒、DNA 与 RNA 逆转录病毒和类病毒, 并将亚病毒因子单设 1 类, 这就使病毒分类单元成为界、类群、目、科、亚科、属、种。种系病毒最基本分类单元, 是指构成 1 个复制谱系、占有一特定生态环境、具有多个分类特征的病毒, 种以下分类和命名国际病毒分类委员会暂不规定。烟草常见病毒在这一最新分类系统中的分类地位见表 1。

表 1 主要烟草病毒在国际分类系统中的地位 (根据核酸类型编排) *
Tab.1 The international taxonomy status of the main tobacco viruses (based on the type of nucleic acid)

病害名称	病毒种名	属 名	科	类 群
Disease	Species	Genus	Family	Taxon
甜菜曲顶病毒病	Beet Curly-top Virus	甜菜曲顶病毒属 (<i>Curtovirus</i>)	双粒病毒科 (<i>Geminiviridae</i>)	ssDNA
烟草曲叶病毒病	Tobacco Leaf Curl Virus	菜豆金黄色花叶病毒属 (<i>Begomovirus</i>)	同 上	ssDNA
番茄斑萎病毒病	Tomato Spot Wilt Virus	番茄斑萎病毒属 (<i>Tospovirus</i>)	布尼安病毒科 (<i>Bunyaviridae</i>)	- ssRNA
烟草环斑病毒病	Tobacco Ring Spot Virus	线虫传多面体病毒属 (<i>Nepovirus</i>)	豇豆花叶病毒科 (<i>Comoviridae</i>)	+ ssRNA
马铃薯 Y 病毒病	Potato Virus Y	马铃薯 Y 病毒属 (<i>Potyvirus</i>)	马铃薯 Y 病毒科 (<i>Potyviridae</i>)	+ ssRNA
烟草蚀纹病毒病	Tobacco Etch Virus	同 上	同 上	+ ssRNA
烟草脉带花叶病	Tobacco Vein-banding Mosaic Virus	同 上	同 上	+ ssRNA
烟草坏死病毒病	Tobacco Necrosis Virus	-	番茄丛矮病毒科 (<i>Tombusviridae</i>)	+ ssRNA
烟草线条病毒病	Tobacco Streak Virus	等轴不稳环斑病毒属 (<i>Ilarvirus</i>)	同 上	+ ssRNA
黄瓜花叶病毒病	Cucumber Mosaic Virus	黄瓜花叶病毒属 (<i>Cucumovirus</i>)	雀麦花叶病毒科 (<i>Bromoviridae</i>)	+ ssRNA
番茄不孕病毒病	Tomato Aspery Virus	同 上	同 上	+ ssRNA
苜蓿花叶病毒病	Alfalfa Mosaic Virus	苜蓿花叶病毒属 (<i>Alfamovirus</i>)	同 上	+ ssRNA
烟草花叶病毒病	Tobacco Mosaic Virus	烟草花叶病毒属 (<i>Tobamovirus</i>)	-	+ ssRNA
烟草脆裂病毒病	Tobacco Rattle Virus	烟草脆裂病毒属 (<i>Tobravirus</i>)	-	+ ssRNA
马铃薯 X 病毒病	Potato Virus X	马铃薯 X 病毒属 (<i>Potexvirus</i>)	-	+ ssRNA

* 表内均无或未确定亚科, 也均未确定目; “-”表示尚未确定科或属。

2 烟草病毒鉴定和检测技术与烟草抗病毒基因工程

生物学方法是植物病毒研究工作的基本环节, 亦是准确诊断鉴定病毒的关键, 曾在植物病毒鉴定与检测工作中起着重要作用。其常规内容主要包括寄主范围测定、鉴别寄主反应、病毒汁液钝化温度、稀释限点、体外存活期等离体性状测定和传播途径测定等, 这些常规方法在许多文献中^[2,5,6] 均有详尽描述, 但较费时、费事。血清学方法即利用抗原和抗体间发生的专化反应来鉴定与检测病毒的方法, 包括抗血清制备和血清学反应两方面内容^[5], 血清学方法具有快速、灵敏、准确等优点, 可用于植物病毒检测和鉴定的血清学技术约 20 多种, 按其反应原理可分为沉淀反应、凝集反应和标记抗体反应 3 类, 其相应检测灵敏度分别为 0.05 ~ 1.0mg/ mL、1.0 ~ 10.0μg/ mL、1.0 ~ 10.0ng/ mL。灵敏度单位为 mg/ mL 的检测方法主要有试管沉淀法、毛细管沉淀法、玻片凝集法、微量沉淀法、试管扩散法、平板免疫双扩散、免疫电泳法、对流电泳法和比较对流电泳法等; 灵敏度单位为

$\mu\text{g/mL}$ 的检测方法主要有皂土凝集法、炭凝集法、乳胶凝集法、A 蛋白丙体凝集法、血球凝集法和荧光抗体技术等;灵敏度为 ng/mL 的检测方法主要有放射免疫法和酶联免疫技术等^[2,5], 其中酶联免疫技术是目前生产应用最便捷、使用范围最广泛的血清学技术。酶联免疫全称为酶联免疫吸附反应(ELISA), 是酶标记抗体球蛋白技术的应用、固相吸附和免疫酶技术的结合, 是把抗原抗体免疫学反应和酶的高效催化反应有机结合而发展起来的免疫学鉴定新技术^[2], 具有灵敏度高、特异性强和操作简便等优点, 适于大量田间样品的检测。自酶联免疫技术建立以来经不断改进和提高, 目前已形成直接 ELISA、间接 ELISA、双抗体夹心法、Fab 法、异种动物抗体夹心法、A 蛋白酶联法、点免疫结合技术(Dot-ELISA, DIBA)和组织印迹法等多种测试方法^[2,7]。电子显微镜技术是 20 世纪 40 年代以来建立的病毒鉴定和检测技术, 现已形成叶浸蘸法、负染法、超薄切片法和免疫电镜技术等多种电镜技术^[2], 其中免疫电镜技术(IEM)是将免疫学与借助于电子显微镜的超微结构形态学结合的一种新的病毒检测与鉴定技术, 具有快速、灵敏、特异性强和抗血清用量少等特点, 20 世纪 80 年代后免疫电镜技术在植物病毒检测与鉴定中得到较广泛应用, 目前免疫电镜技术已发展为经典法、直接法、琼脂法、捕捉法、修饰法和 A 蛋白免疫电镜吸附等不同方法, 其中以修饰法和 A 蛋白免疫电镜吸附法使用范围最广泛。修饰法操作步骤为: A 用病毒悬液包被复膜铜网, 几分钟; B 用 30 滴重蒸水洗涤、吸干; C 加 1 滴稀释的抗血清, 保湿 15min; D 同 B; E 1% 醋酸双氧铀(UA)负染后观察, 病毒粒子周围有抗体形成的深色晕圈则为阳性反应, 反之为阴性。A 蛋白免疫电镜吸附法操作方法为: 先将 A 蛋白吸附在铜网上然后加抗血清, 再加病毒抗体最后负染镜检, 该法观察到的病毒粒子比修饰法高 25 倍以上, 大大提高了该技术灵敏度, 扩大了免疫电镜技术适用范围^[2]。核酸分子杂交技术又称为探针检测技术, 是近年发展起来的一种新的病毒检测与鉴定方法, 对鉴定 DNA 或 RNA 病毒有高度特异性和敏感性^[5], 其具体方法是先制备单链互补脱氧核糖核酸(cDNA)探针, 然后用³²P 同位素标记 cDNA 探针, 将病株汁液点在醋酸纤维膜上, 80℃ 固定后加 cDNA 探针杂交, 最后通过放射自显影技术分析检测结果, 使用核酸分子杂交技术时只要有某种病毒的 cDNA 探针, 即可对大量病株汁液样本进行检测, 该技术不仅用于检测 DNA 或 RNA 病毒, 还可用于类病毒和卫星病毒的检测。

烟草抗病毒基因工程技术是 20 世纪 70 年代初发展起来的一门新兴学科, 自美国斯坦福大学 Berg P. 博士等成功建立重组 DNA 技术以来, 世界各国都十分重视发展该项技术, 并将其应用于相关研究领域^[8]。80 年代植物基因工程兴起, 并最早用于烟草植物基因工程研究, 1983 年^[23] 世界首例转基因植物(烟草)问世, 1986 年^[24] 首次报道通过将 TMV 外壳蛋白基因(CP)转入烟草, 并获得对 TMV 具有很高抗性的转基因抗病毒烟草。此后基因工程技术很快被应用到 CMV、TRV、AMV、PVY 等烟草病毒病的研究, 至 1998 年国际上已报道近 50 例转基因抗病毒烟草实验成功例子^[1], 如转 CP 的抗 TMV、CMV、PVX、PVY、TEV、TRV、TSV、AMV、TSWV 烟草; 转卫星 RNA 基因的抗 CMV、TRSV 烟草; 转反义 RNA 基因的抗 CMV、PVY、TEV 烟草; 转复制酶基因的抗 TMV、PVY 烟草等。我国自 20 世纪 80 年代始开展烟草抗病毒基因工程的研究, 并于 1992 年成为世界首位将转基因植物——转基因烟草商业化种植的国家^[9,10]。中国科学院微生物研究所于 1985 年提出把卫星 RNA 的 cDNA 转化到植物中, 并获得国内烟草——抗 CMV 烟草转基因工程植株, 于 1988 年在北京通过鉴定^[11], 同时还利用 CP 基因获得转基因单抗 CMV、双抗 CMV 和 TMV 的转基因工程“NC89”烟株^[12,13], 1991~1992 年大田试验研究表明转基因“NC89”品种对花叶病抗性且产量稳定, 烟叶均价和产值明显提高^[10]。目前, 我国烟草抗病毒基因工程的研究已见诸报道^[11~16], 如利用 TMV-CP 转育出抗 TMV 的香料烟品系; 通过 PVY 复制酶基因转导, 得到抗 PVY 的转基因烟草等。

3 讨论与展望

可侵染烟草的病毒种类繁多, 我国相继成功鉴定出烟草 17 个病毒种类。浙江大学于 2002 年经过生物学、血清学及病毒基因序列测定, 发现并命名了 2 种烟草病毒“云南烟草曲叶病毒”(Tobacco Leaf Curl Yunan Virus, TLCYV)和“烟草曲基病毒”(Tobacco Curly Shoot Virus, TCSV)^[17]。有研究^[17] 表明植物 DNA 病毒基因重组可产生新病毒, 而此 2 种病毒均为 DNA 病毒。随着血清学、电镜技术和生物技术的发展, 烟草病毒检测与鉴定技术日臻完善, 血清学技术已成为我国烟草病毒检测的主要手段, 据报道^[7] 应用较广泛的为双抗体夹心法(DAS-ELISA)、抗原直接包被法(DAC-ELISA)和点免疫结合法, 而双抗体夹心法具有较强的株系特异性, 且比抗原直接包被法灵敏, 而点免疫结合法简单快速、灵敏且经济。组织印迹法(Tissue blots-ELISA)无株系特异性, 比点免疫结合法更简单、快速, 适合田间大量制样带回实验室检测, 其缺点是必须使用新鲜样品, 且结果易受干扰^[7]。对比不同方法可知, 间接 ELISA、Dot-ELISA 必将成为最主要的血清学检测手段。cDNA 探针的制备是核酸分子杂交技术的关键, 杂交灵敏度则依赖于 cDNA 探针中³²P 标记核酸数

量,其比例越高、放射性越强,灵敏度则越高。但同位素标记存在放射性污染和安全问题且同位素不便长期保存,探针制备复杂,费用昂贵,检测时某些植物组分还会对检测结果形成干扰,因此核酸分子杂交技术有待于探针制备和同位素标记等环节加以改进。此外为满足实际生产中对烟草病毒病快速准确检测与鉴定的需要,开发相应的病毒诊断与检测试剂盒将使烟草病毒检测诊断更加简便、快捷。

烟草抗病毒基因工程的研究已建成 1 套较系统的方法程序并取得一定成就,但距转基因烟草大规模生产应用还差距很大,诸多问题尚待解决。外源目的基因的选择范围小、转化体系繁杂、基因表达活性及稳定性不高、抗性单一、抗病延迟和抗性不高、转基因烟草安全性问题以及对病毒具有系统获得抗性的转基因烟草的获得等^[18]都有待于进一步深入研究。今后该方面的研究应着力于进一步取得抗病毒基因工程烟草生产应用实质性进展——转基因烟草的安全性评价。1992 年我国主产烟区河南省种植抗花叶病“NC89”纯合系转基因烟草^[10],后停止生产,其中转基因植物安全性评价体系在世界范围内不健全是限制转基因烟草商业化种植的主要原因,自 1997 年后我国再无转基因烟草种植的报道^[9]。据报道^[9]自 1994 年美国第一个转基因植物产品批准上市至 1996 年全球转基因作物开始大规模种植以来,全球转基因作物种植面积呈逐年上升趋势,2001 年全球转基因作物种植面积已达 5260 万 hm²,16 个国家 550 万农户接受了转基因植物。既然转基因抗病毒烟草有较高抗病性和良好的农艺性状^[10],且转基因植物已为许多人所接受,其产品也已正式摆上各国商品货架,就连一直拒绝转基因植物的欧盟也于最近接受了转基因植物,我国是否可再次考虑在目前烟草病毒病危害猖獗而又无有效防治手段下推广种植兼具良好抗病毒和品质特性的转基因烟草,并根据蚜传病毒病危害日益严重现状,加强研究兼抗蚜虫和病毒的蚜毒双抗转基因烟草。有研究^[19]表明将对蚜虫传播 PVY 必需的 56kb 蛋白编码基因封闭,蚜虫就会丧失传播 PVY 的能力,提示若 56kb 蛋白编码基因与抗 PVY 基因结合,其获得的转基因烟草防病效果将更好;烟草转化植株必须具有目的基因表达活性,表现出相应抗性,避免基因沉默;针对多种烟草病毒病混合发生的事实,可同时导入多个不同类型的抗病基因,以获得同时抗 2 个以上烟草病毒的多抗转基因烟草。

参 考 文 献

1 谢天恩,胡志红.普通病毒学.北京:科学出版社,2002

2 梁训生,谢联辉.植物病毒学.北京:中国农业出版社,1994

3 朱贤朝,王彦亭,王智发.中国烟草病害.北京:中国农业出版社,2002

4 陈瑞泰,朱贤朝,王智发等.全国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告.中国烟草科学,1997,14(1):1~7

5 方中达.植病研究方法(第三版).北京:中国农业出版社,1998

6 许志刚.普通植物病理学(第二版).北京:中国农业出版社,2000

7 刘 勇,杨树军,李天飞.应用点免疫结合法和组织印迹法检测烟草组织中的 TMV 和 CMV.实验草科技,2000(12):42~44

8 马国胜等.分子生物技术及其在植物病原菌研究中的应用.有害植物综合治理策略与展望.北京:中国农业科技出版社,2001.57~62

9 闫新甫.转基因植物.北京:科学出版社,2003

10 程 功,李跃峰,李新德等.转基因 NC89 品种对花叶病的抗病性研究及主要性状分析.烟草科技,1993(5):44~45

11 韩晓东.用卫星互补 DNA 构建的抗 CMV 的基因工程烟草研制成功.烟草科技,1988(2):48

12 方荣祥.抗烟草和黄瓜花叶病毒的双价抗病毒工程烟草.科学通报,1990(35):1358~1359

13 方荣祥,田颖川,王贵玲等.双抗转基因烟草纯合系的选育及田间试验.中国科学 B 辑,1993,23(5):481~488

14 黄文川.论我国烟草抗病毒基因工程.安徽师范大学学报(自然科学版),1999(2):283~285

15 吴元华,郑云泽,贝纳新等.转复制酶基因烟草的获得及抗性分析.中国烟草科学,1997(3):23~26

16 王振东,刘玉乐,房纯德.马铃薯 Y 病毒复制酶基因植物表达载体构建及转基因烟草的培育.沈阳农业大学学报,1995,26(3):249~253

17 浙江大学学报编辑室.浙江大学周雪平教授等发现两种新植物病毒.浙江大学学报(农业与生命科学版),2001,27(2):212

18 钟德义,李友权.烟草抗病毒基因工程研究进展.烟草科技,2000(6):43~47

19 项 瑜,杨兰英,周雪荣等.表达马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因的转基因烟草抗病性研究.病毒学报,1995,11(2):158~162

20 Bawden F.C.植物病毒和病毒病害(第三版).北京:科学出版社,1958

21 Pringle C.R.The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the sixth ICTV report in 1995. Arch.Virol,1998,143(1):203~221

22 Pringle C.R.Virus taxonomy-1999, the universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Virus Taxonomy during 1998. Arch.Virol,1999,144(2):421~429

23 Zambrysk P.Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regulation capacity.Embo J.,1983,2:2143~2150

24 Powell Abel P,Nelson R.S,De B.,et al.Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene.Science,1986,232:738~743