

## 新疆花椰菜花叶病毒的研究

王小凤 谢德贞 徐绍华 裴美云

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从血清学、内含体、病毒形态及理化性质等方面, 确证了自新疆十字花科蔬菜上分离到的 63-3 毒源(称为新疆分离物)是属于含 DNA 的花椰菜花叶病毒。

新疆分离物与已知为花椰菜花叶病毒的 Campbell 毒株的抗血清发生沉淀反应。对感染了新疆分离物的油菜叶片超薄切片进行电镜观察, 发现有多种内含体存在, 其中直径 15—18 微米的小颗粒呈晶格排列。此情况, 在花椰菜花叶病毒组 (Caulimovirus) 中尚未发现。新疆分离物纯化制剂的病毒颗粒为直径 50 毫微米的球状颗粒。病毒沉降系数  $s_{20,w}$  为 200—220S, 用二苯胺方法测定出病毒中 DNA 含量为 16—18%, 其侵染性能为 DNase 所破坏。这些特性都与国外报道的花椰菜花叶病毒的理化性质相一致。根据传毒媒介和在蔓陀萝上形成枯斑反应, 新疆分离物可能是类似于 New York 8153 这一类的一个毒株。

早在 1938 年 Tompkins<sup>[1]</sup> 就报道了花椰菜花叶病毒的寄主范围和传染特性, 但直至 1968 年 Shepherd 等<sup>[2]</sup> 研究此病毒核酸时才发现它是一个含 DNA 的植物病毒。谢浩等<sup>[3]</sup> 在调查新疆十字花科蔬菜病毒类型时, 根据病毒的生物学特性, 初步认为 63-3 毒源属于花椰菜花叶病毒。

由于花椰菜花叶病毒 DNA 有可能成为外源 DNA 带到植物细胞中的一个载体, 因此, 研究花椰菜花叶病毒的结构、复制和基因表达就更加有意义了。我们曾从病毒形态和血清学关系方面研究过我国主要十字花科植物上的病毒类型<sup>[4,5]</sup>, 但尚未从核酸类型的分析来证明花椰菜花叶病毒在我国的存在。

本文从血清学、内含体、病毒提纯及其理化性质的测定等方面, 确证 63-3 毒源是含 DNA 的花椰菜花叶病毒的一个毒株。

### · 材料和方法

#### (一) 材料

1. 新疆分离物(63-3毒源): 系新疆维吾尔自治区昌吉农垦局农业科学研究所谢浩同志分离和赠送。

2. Campbell 毒株: 系澳大利亚联邦科学工作研究组织 (CSIRO) M. Fischer 赠送。

#### (二) 方法

1. 抗原和抗血清的制备: 将 Campbell 毒株和新疆分离物分别接种在白菜 (*Brassica pekinensis*) 和芥菜 (*B. juncea*) 幼苗上, 5—6 周后采症状明显的病叶, 低温冷冻后, 每克叶片加 1.5 毫升含 0.05M 铜试剂  $[(C_2H_5)_4NCS_2 \cdot Na \cdot 3H_2O]$  的 pH7.8 的 0.5M 磷酸缓冲液, 用高速组织捣碎机匀浆, 四层纱布过滤, 去残渣, 在滤液中滴加正丁醇至终浓度为 8.5%。搅动半小时, 5,000 转/分离心 20 分钟, 上清液经 75,000  $\times g$  离心 1.5 小时, 将沉淀悬浮于 pH7.0 的 0.01M 磷酸缓冲液, 再经 105,000  $\times g$  离心 1 小时, 将病毒沉淀悬浮于上述缓冲液

本文于 1979 年 8 月 6 日收到。

63-3 毒源系新疆维吾尔自治区昌吉农垦局农业科学研究所谢浩同志分离和赠送; 中国科学院新疆分院生物土壤沙漠研究所丁志、沈艳芳同志参加部分工作; 中国科学院生物物理研究所协助电镜观察和超离心分析; 张秀华、丘艳同志协助制备抗血清, 特此致谢。

中。将此高低速交叉离心两次的部分提纯的病毒制剂作为抗原,免疫家兔(用时按 1:1 添加 Freund 不完全佐剂),共注射 3 次,所得两种毒株的抗血清效价在 1:1000 以上。为了减少非特异性蛋白的干扰,在进行血清沉淀反应时,新疆分离物繁殖在芜菁 (*Brassica rapa*) 上,并按上述方法制备部分提纯的病毒,作为沉淀反应时的抗原。

2. 超薄切片的制作: 将经人工感染新疆分离物的油菜 (*Brassica campestris* L.) 病叶,切成 0.5—1.0 毫米的小块,立即投入 3% 戊二醛和 1% 锇酸溶液中,分别固定 3.5 小时和 1.5 小时,经乙醇梯度和无水丙酮脱水,再置 1:3 和 3:1 的树脂丙酮中各 5 小时。然后在国产 618 和 Epon 812 的混合包埋剂中包埋,45℃ 聚合 48 小时,68°—75℃ 烘干 48 小时,在 LKB8800 型超薄切片机上进行超薄切片,经醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色后,在 Hu-11 型电镜下观察。以健叶同样处理作对照。

3. 蔗糖梯度离心: 为研究新疆分离物的理化性质,把部分提纯的病毒样品经蔗糖梯度离心,再进行分析超离心鉴定。

将 40%、30%、20% 和 10% (W/W) 的蔗糖溶液,依次按 9、7、6 和 6 毫升,加入到离心管中,置冰箱过夜,以形成均匀的梯度介质。加 2 毫升部分提纯的病毒液,在 VAC 601 离心机上 24,000 转/分离心 2 小时,用灯光照射梯度离心管,可以见到一乳白光带,用细滴管从梯度上部逐层向下小心吸取液体,1 毫升为一个分部,在紫外分光光度计上测定各分部的 260 毫微米波长的吸收值。

收集病毒带,用蒸馏水稀释数倍,超离心浓缩后,将病毒沉淀悬浮在 pH7.0 0.01M 磷酸缓冲液中,根据<sup>[6]</sup>  $E_{260}^{1\%} = 4.36$ ,把病毒浓度调整到 1 毫克/毫升左右。在 UCA-1A 分析超离心机上进行沉降分析。

4. 病毒 DNA 含量的测定: 采用 Richards<sup>[7]</sup> 改良的二苯胺法。

5. 病毒核酸的抽提: 采用蛋白酶-SDS 法<sup>[8]</sup>,从分析超离心纯的病毒制剂中抽提新疆分离物的 DNA。

## 结 果

### (一) 血清学鉴定

将花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 Campbell 毒株的抗血清用于鉴定新疆分离物的属型。由血清学鉴定结果 (表 1) 可以看出,新疆分离物与 Campbell 毒株抗血清的沉淀滴度达 1:64, 与其自身的抗血清的沉淀滴度则达 1:512, 说明这两个毒株有血清学的亲缘关系。这一点已被马德芳等<sup>[9]</sup> 用酶联免疫吸附剂测定的结果所证实。

### (二) 内含体的观察

由超薄切片观察到,在感染了新疆分离物的病叶细胞中有多种内含体形成。一种是分布在细胞质中,没有明显的膜层包被,呈不定形的电子致密区域,其中有形状均一的圆形颗粒,直径一般为 42—48 毫微米,中央似见空心结构。就其形态大小和在细胞中的分布状况,可以判断这种颗粒就是新疆分离物的病毒颗粒。在沿细胞壁周围的特定区域内,似有由细胞质膜畸形延伸、膨胀成的泡囊状物,其内分散着直径为 42 毫微米的颗粒,并有管道穿过细胞壁,好似胞间连丝与邻近细胞沟通 (图版 I-1, 2)。这些情况与 Conti 等<sup>[10]</sup> 研究花椰菜花叶病毒内含体的结果是相同的。另外,还可看到

表 1 新疆分离物抗原与已知的花椰菜花叶病毒抗血清的沉淀反应

抗血清种类	新疆分离物抗原稀释度								
	1:1	1:2	1:4	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Campbell 毒株	+++	++	+	+	+	+	-	-	-
新疆分离物	+++	++	+	+	+	+	+	+	±

注: CaMV-Campbell 毒株抗血清稀释 50 倍;新疆分离物抗血清稀释 25 倍;新疆分离物抗原浓度 260 毫微米光密度为 0.56。

直径只有 15—18 毫微米的较小颗粒,有的聚集成片,有的呈晶格排列(图版 I-3)。这种形式的内含体虽在许多植物病毒(例如:烟草花叶病毒组 *Tobamovirus*、雀麦花叶病毒组 *Bromovirus*、豇豆花叶病毒组 *Comovirus*、黄瓜花叶病毒组 *Cucumovirus*、伊拉病毒组 *Ilarvirus*、大麦黄矮病毒组 *Luteovirus*、线虫传多面体病毒组 *Nepovirus*、番茄束矮病毒组 *Tombusvirus* 和芜菁黄花叶病毒组 *Tymovirus*)<sup>[11]</sup> 中发现,但在花椰菜花叶病毒组中却尚未见报道<sup>[12]</sup>。这种比完整病毒小得多的颗粒,是寄主感病后的细胞学变化,还是病毒复制过程中的一个前体,有待于进一步研究。

### (三) 一些理化性质的测定

蔗糖梯度离心后,乳白光带所在的分

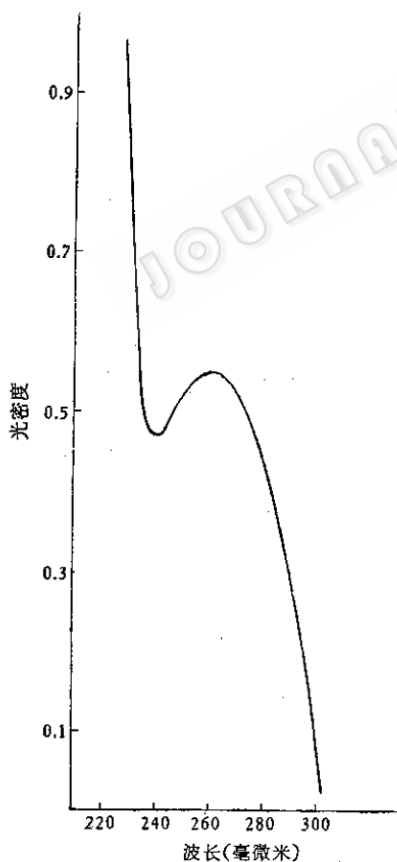


图1 新疆分离物提纯制剂的紫外吸收光谱

部,波长 260 毫微米的紫外吸收值最高,经电镜检查确定是病毒带。这一分部的紫外吸收光谱:260 毫微米/240 毫微米 = 1.17, 260 毫微米/280 毫微米 = 1.42<sup>[13]</sup>。图 1 为新疆分离物提纯制剂的紫外吸收光谱,超离心浓缩这部分病毒,经分析超离心检查只有一个峰(图 2)。

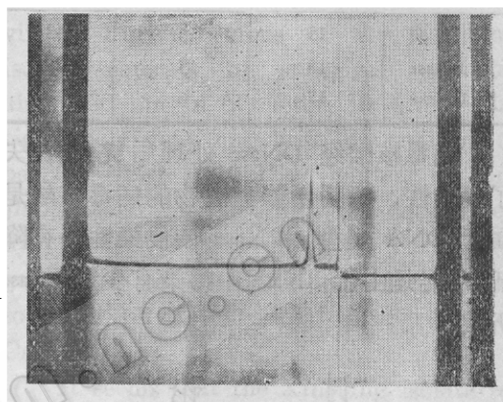


图2 新疆分离物提纯制剂的分析超离心峰  
(pH 7.0 0.01M 磷酸缓冲液, 18,000 转/分)

1. 病毒的沉降系数: 新疆分离物的沉降系数  $s_{20,w} = 200-220S$ , 在 Itoh 等<sup>[14]</sup> 和 Pirone 等<sup>[15]</sup> 报道的 206S 和 220S 范围之内。

2. 形态观察: 新疆分离物提纯制剂中的病毒颗粒为球形(图版 I-4), 直径 50 毫微米, 与国外报道的花椰菜花叶病毒的形态及大小完全一致。

3. 病毒 DNA 含量的测定: 对三批提纯的新疆分离物病毒制剂进行测定, 其 DNA 含量为 16—18%。这与 Hull 等<sup>[6]</sup> 用二苯胺和磷含量测定法所测得的花椰菜花叶病毒 DNA 含量的数值(15.9%与17.1%)相近。

4. 核酸酶对新疆分离物 DNA 侵染性的影响: 用 pH 7.5 的 0.05 M Tris-HCl、0.01M  $MgCl_2$  缓冲液将病毒 DNA 稀释到

5 微克/毫升, 然后加入 DNase 或牛胰 RNase A, 使酶的最终浓度为 10 微克/毫升, 在 37℃ 水浴中保温 1 小时。对照不加酶, 代以缓冲液, 使 DNA 浓度与处理样品相同。反应终了后立即接种芜菁健苗。试验结果见表 2。

表 2 核酸酶对新疆分离物病毒 DNA 侵染性的影响

处理	接种株数	发病株数	发病率(%)
对 照	15	5	33
加 RNase	18	5	28
加 DNase	17	0	0

病毒核酸经 DNase 处理后完全丧失了侵染性, 说明新疆分离物的病毒核酸是属于 DNA 类型。RNase 使侵染性略有降低, 可能是由于 RNase 中污染有少量 DNase 所致。

讨 论

上述试验结果证明, 新疆分离物是我国分离到的花椰菜花叶病毒。它与国外花椰菜花叶病毒的五个毒株<sup>[16]</sup>的一些性状比较见表 3。

表 3 新疆分离物与国外花椰菜花叶病毒毒株的性状比较

毒 株	蚜虫传毒	莖陀萝上枯斑反应	凝胶电泳 R <sub>f</sub> 值
新疆分离物	+	+	0.39
Campbell	-	+	
CM 1841	-	+	0.44
Cabbage B	+	-	
KK	+	+	0.34
New York 8153	+	+	

表 3 表明, 新疆分离物能由蚜虫传毒, 在莖陀萝上能形成枯斑, 因此, 它不同于 Campbell 和 CM1841 毒株, 可能是相当于 New York 8153 的一个毒株。

最近 Hull 等<sup>[17]</sup>利用限制性内切酶, 绘制了花椰菜花叶病毒几个毒株的病毒基因组的物理图谱, 并通过分子杂交研究了病

毒核酸的同源性。但是, 并没有从中找到这几个毒株在蚜虫传毒、寄主反应和病毒凝胶电泳迁移率等方面的内在联系。

Fujisawa 等<sup>[18]</sup>指出, 花椰菜花叶病毒难以提纯的原因之一, 在于病毒颗粒局限于内含体中。Hull<sup>[6]</sup>介绍采用 Triton X-100 和尿素降解内含体, 再超离心提纯病毒, 可获得较高和稳定的产率。我们试用此法提纯新疆分离物, 但未得到理想结果。这可能与病毒毒株或其他条件不同有关。用本文介绍的方法, 不论从感染的芥菜或芜菁上都可获得约 1 毫克病毒/公斤鲜叶的产率。

参 考 文 献

[1] Tompkins, C. M.: *J. Agric. Res.*, 58: 119—130, 1939.

[2] Shepherd, R. J. et al.: *Virology*, 36: 150—152, 1968.

[3] 谢浩等: 微生物学报, 19(1): 52—56, 1979.

[4] 裴美云、谌章群: 微生物学报, 13(1): 81—83, 1973.

[5] 裴美云: 植物病理学报, 9(2): 137—142, 1979.

[6] Hull, R. et al.: *J. Gen. Virology*, 31: 93—100, 1976.

[7] Richards, G. M.: *Analy. Biochem.*, 57: 369—376, 1974.

[8] Shepherd, R. J.: *Phytopath.*, 61: 188—193, 1971.

[9] 马德芳等: 微生物学报, 印刷中.

[10] Conti, G. G. et al.: *Virology*, 47: 694—700, 1977.

[11] Giovanni, P. et al.: *Advance in Virus Research*, 21: 175—254, 1977.

[12] Robb, S. M.: *Ann. Appl. Biol.*, 52: 145—147, 1963.

[13] Russell, G. J. et al.: *J. Gen. Virology*, 11: 129—138, 1971.

[14] Itoh, T. et al.: *Virology*, 39: 367—372, 1969.

[15] Pirone, T. P. & G. S. Pound: *Nature*, 186: 656—657, 1960.

[16] Lung, M. C. Y. & T. P. Pirone: *Phytopath.*, 63: 910—914, 1973.

[17] Hull, R. & S. H. Howell: *Virology*, 86: 482—493, 1978.

[18] Fujisawa, I. M. et al.: *Phytopath.*, 57: 1130—1132, 1967.

## STUDIES ON THE XINJIANG ISOLATE OF THE CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS

Wang Xiao-feng   Xie De-zhen   Xu Shao-hua   Pei Mei-yun

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

According to serology, inclusion bodies, morphology and some physicochemical properties of the virus, the isolate 63-3 (designated as Xinjiang isolate) from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) in Xinjiang of China belongs to cauliflower mosaic virus (CaMV) which contains DNA.

The serological relationship has been shown between the Xinjiang isolate and the known Campbell strain of CaMV. In the infected leaves, besides the characteristic types of inclusion bodies, there were also intracellular bodies composed of particles about 15-18 nm in diameter, which has not been reported in caulimo-

virus. Purified virus of the Xinjiang isolate consists of spherical particles about 50 nm in diameter, its sedimentation coefficient has been determined to be 200—220S. The DNA content of Xinjiang isolate is 16—18% as determined by diphenylamine method. Taken together, these characteristics are similar to the physicochemical properties of CaMV.

It seems that the Xinjiang isolate resembles closely the New York 8153 of CaMV in respect of transmission by aphid *Myzus persicae* and formation of local lesions on *Datura stramonium*.