

## 一种含单链 DNA 的小病毒——菜豆畸矮病毒

奚仲兴 徐绍华 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报告从北京郊区菜豆上分离到的一种小球状病毒。经鉴定是一种含单链 DNA (ss-DNA) 的病毒, 称做菜豆畸矮病毒 (Bean distortion dwarf virus, BDDV)。温室人工摩擦接种或白粉虱接种产生病株病状, 表现为叶片畸形而变小, 色深而质厚, 有时带有轻微的花叶; 严重时伴有褐色系统坏死, 植株矮化, 花果减少。寄主范围测定, 在人工汁接的 5 科 11 种植物中只系统侵染菜豆和豇豆; 由白粉虱接种的 6 科 15 种植物中除豆科外, 还侵染曼陀罗、辣椒、烟草等茄科植物, 但不发生局部侵染。

提纯病毒颗粒的形态除部分为小球状呈散生外, 多数呈晶格状聚集体, 经 Latex 标准颗粒校正, 每种颗粒直径均为 9—11nm。从病叶组织超薄切片, 观察到聚集在细胞质液泡附近呈晶格排列的病毒颗粒和在核膜周围、细胞质内散生的小球状病毒颗粒以及密集在叶绿体周围的成串病毒颗粒, 大小为 9—10nm。提纯的病毒核酸能被 DNA 酶 I 和  $S_1$  酶降解, 而不被 RNA 酶 A 降解。提纯病毒回接在菜豆上具相当强的侵染性。

近年来, 在非洲、澳洲、美洲和欧亚地区的玉米、菜豆、烟草、番茄、麻和小麦等一些重要经济植物上陆续发现了十余种颗粒大小为  $18 \times 30\text{nm}$  的成双配对的双生病毒 (Geminiviruses)<sup>[1]</sup>。其中有 5 种已证实为含 ss-DNA 的病毒<sup>[1]</sup>。曾报道过自然侵染菜豆的双生病毒有菜豆金黄色花叶病毒 (BGMV)<sup>[2]</sup> 和菜豆夏枯病毒 (BSDV)<sup>[3-4]</sup>。前者的核酸为 ss-DNA, 后者还不清楚。我们在京郊海淀公社六郎庄大队菜豆上分离到一种大小仅为 9—11nm 的含 ss-DNA 的病毒, 称做菜豆畸矮病毒 (BDDV)。BDDV 在颗粒大小、构型、寄主范围上不同于 BGMV, 虽在构型上与苘麻花叶病毒 (Abutilon mosaic virus, AbMV) 有某些相似, 但个体比 AbMV 要小的多, 因此, BDDV 可能是异于已有的植物 ss-DNA 病毒的一种病毒。

本文报道我国菜豆畸矮病毒的寄主范围、传布途径、病毒形态、核酸性质和病组

织超薄切片观察的结果。

### 材料与 方法

(一) 病毒的寄主范围测定: 用病状明显的菜豆叶汁按常规汁接于 5 科 10 种植物 (见表 1) 上, 20 天后检查病情。

(二) 病毒的介体传布: 将病菜豆植株上的白粉虱 (*Trialeurodes vaporariorum*) 转移到菜豆等 6 科 16 种植物 (见表 1) 上, 2—3 周后检查病情。

(三) 病毒的提纯: 病毒接种后两周左右, 采集病叶并置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱过夜, 提取时经液氮冷冻, 破碎叶片, 按每克叶组织加 3ml 缓冲液的比例, 加入 0.1M 磷酸钠缓冲液, pH 7.8, 内含 10mM EDTA 和 0.1% 巯基乙酸。融化后, 再用组织捣碎机捣碎, 四层纱布过滤。滤液 12000rpm, 20' 离心, 取上清液并加入 8.5% 正丁醇, 振荡 20', 12000rpm, 20' 离心。上清液中加入 4% PEG (分子量 6000) 和 0.2M NaCl, 于  $4^\circ\text{C}$  搅拌 3 小时 (或

本文于 1982 年 6 月 28 日收到。

本工作承周家炽、裴维藩两位教授指导和审阅本文; 又承本所技术室协助进行超离心和电子显微镜观察, 一并在此致谢。

冰箱过夜), 12000rpm, 20' 离心, 将沉淀悬浮在 0.01M 磷酸钠缓冲液中, 并加 1% Triton X-100, 搅匀后, 12000rpm, 20', 离心。上清液 33000rpm, 3 小时, 离心, 经连续两次差速离心得到病毒粗制品。再经 10—40% 蔗糖梯度, 27000rpm, 3 小时, 离心, 获得纯化的病毒制品。

(四) 病毒核酸的提取: 采用修改的 Goodman<sup>[6]</sup> SDS 裂解法。病毒经 SDS 裂解后, 用饱和酚萃取 2 次, 取水相, 用乙醚除水相中的酚 2 次, 然后用 2.5 倍体积无水酒精沉淀过夜, 沉淀悬浮在少量无菌水中, 经 3M KAc 沉淀 1 次, 取上清液并对无菌水透析过夜, 再用 2.5 倍体积无水酒精沉淀一次, 即为纯化的核酸。

(五) 病毒核酸的核酸酶降解: 采用稍加

修改的 Francki<sup>[7]</sup> 核酸酶降解法。S<sub>1</sub> 酶浓度 14μg/ml, 病毒核酸 5μg/ml, 反应液为 21mM NaAc, 210mM NaCl, 0.7mM ZnSO<sub>4</sub>, 4% 甘油, pH4.6, 反应时间于 45℃, 30'。RNA 酶 A 和 DNA 酶 I 的反应液均为 5mM Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.3, 病毒核酸为 5μg/ml, RNA 酶 A 浓度为 8μg/ml (使用前 100℃ 煮 10'), DNA 酶 I 浓度为 10μg/ml, 反应时间于室温各 1 小时。

(六) 电镜观察

1. 提纯制品: 或用 2% PTA, pH4.6, 或先 2% 戊二醛固定 20—30', 然后用 2% PTA, pH7.0 负染, 晾干后, H-500 型电镜观察。

2. 病组织超薄切片: 用病状明显的菜豆叶经 3% 戊二醛和 2% 锇酸双固定, 酒精系列脱水

表 1 菜豆矮缩病毒的寄主范围和病状  
Table 1 Host range of BDDV and its symptoms

测定寄主 Tested hosts	病 状 反 应 Symptoms	
	汁 接 Sap inocu.	虫 传 Vector trans.
藜 科 (Chenopodiaceae)		
苋 色 藜 ( <i>Chenopodium amaranticolor</i> )	—	0
奎 宁 藜 ( <i>Chenopodium quinoa</i> )	0	0
苋 科 (Amaranthaceae)		
千 日 红 ( <i>Gomphrena glabosa</i> )	0	0
豆 科 (Leguminosae)		
菜 豆 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	LD, D, SM	LD, D, SM
豇 豆 ( <i>Vigna sinensis</i> )	LD, SM	LD, SM
大 豆 ( <i>Glycine max</i> )	0	0
豌 豆 ( <i>Pisum sativum</i> )	0	0
茄 科 (Solanaceae)		
曼 陀 罗 ( <i>Datura stramonium</i> )	0	LD
普 通 烟 ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	0	±LC
心 叶 烟 ( <i>Nicotiana glauca</i> )	0	±LC
克里夫兰烟 ( <i>Nicotiana clevelandii</i> )	0	±LC
辣 椒 ( <i>Capsicum annuum</i> )	—	SM
番 茄 ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	0	0
茄 子 ( <i>Solanum melongena</i> )	—	0
葫 芦 科 (Cucurbitaceae)		
黄 瓜 ( <i>Cucumis sativus</i> )	0	0
菊 科 (Compositaceae)		
莴 苣 ( <i>Lactuca sativa</i> )	—	0

SM = 系统花叶; LD = 叶片畸形; D = 矮缩; LC = 叶卷; 0 = 无病状; ± = 有时无病状; — = 未接种。

国产 618 树脂包埋。LKB-8800 III 型超薄切片机切片。醋酸双氧铀、柠檬酸铅双染色, H-500 型电镜观察。

3. 病毒核酸的细胞色素 C 分子展层: 按 Francki<sup>[7]</sup> 方法制备不同核酸酶处理和未处理病

毒核酸的细胞色素 C 分子展层样品, 然后 H-500 型电镜观察。

(七) 病毒提纯制品的回接试验: 将提纯病毒 ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 按常规摩擦接种菜豆, 2—3 周后观察病情。

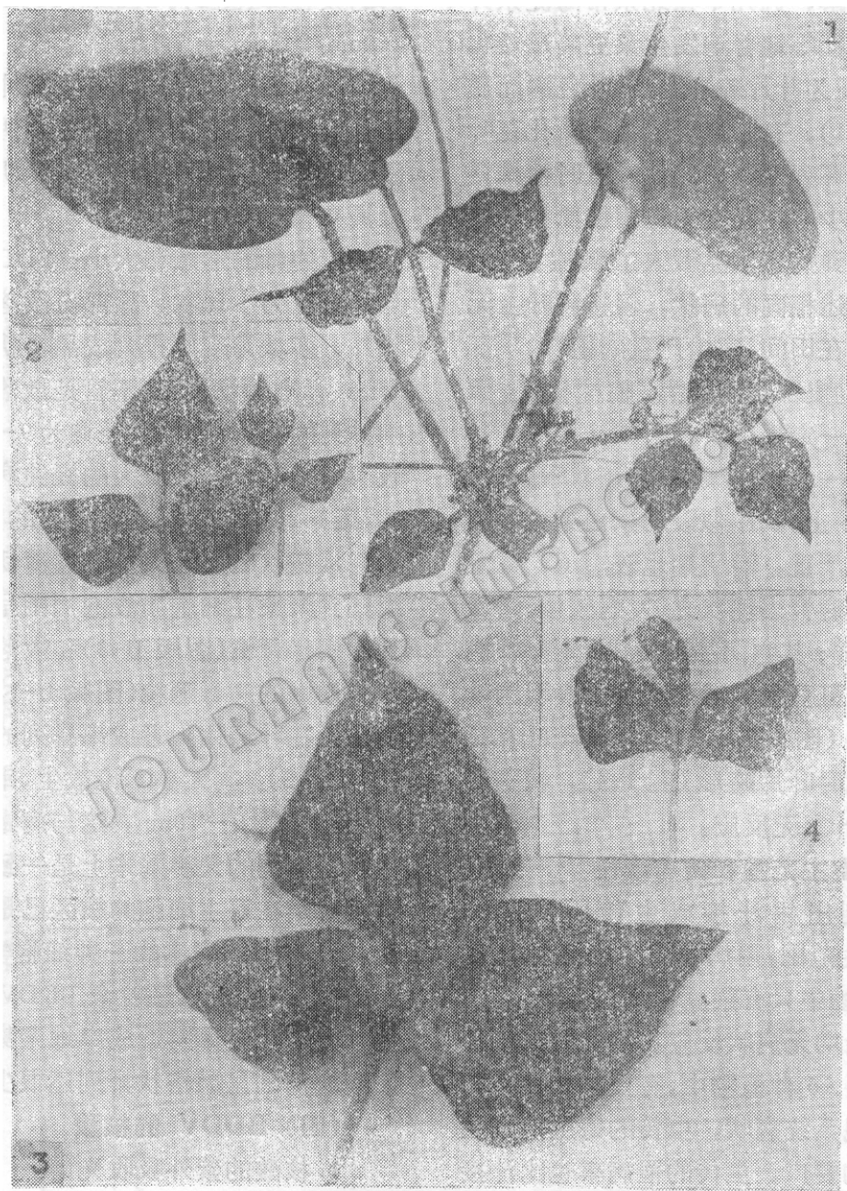


图 1 BDDV 感病的菜豆和豇豆上的病状。

1. 菜豆上的叶片畸形。 2. 菜豆病(右)健(左)叶的比较。
3. 豇豆上叶脉褪绿和黄化的病状。 4. 豇豆上的叶片畸形。

Fig. 1 Symptoms of infected bean and cowpea plant by BDDV.

1. Leaves distortion on the bean plant.
2. Comparison of infected (right) and healthy (left) leaves of bean plant.
3. Symptoms of vein chlorosis and yellowing on the cowpea.
4. Leaves distortion on the cowpea plant.

## 结果与讨论

### (一) 病株的病状

初步了解,近几年在北京市海淀东升和四季青公社等地普遍发生菜豆畸形矮化病。病状表现为叶片畸形变小,叶色深而质地厚(图 1-1),有时出现轻微的黄化花叶或褐色系统坏死(图 1-2),严重时植株矮化,花果减少。在温室无论用粉虱接种或病叶汁或提纯病毒制品做人工摩擦接种,都产生与上述相同的病状,但接种叶上无病状反应。在田间,病情严重的植株,下部叶片变黄,韧皮部组织变黑,植株枯死,致使生产遭受一定损失。在人工汁接的 4 种菜豆品种——北京白架豆、锦州双季、青岛架豆和 Pinto 上,其中似以北京白架豆幼苗感病后病情严重,潜伏期也较短(2 周左右);Pinto 病情表现次之,发病较慢,潜伏期需 3—4 周;其它两品种发病更慢,罹病率也较低。豇豆幼苗感病后通常表现为叶脉褪绿变黄(图 1-3),时有轻微花叶和褪绿点;严重时叶片畸形(图 1-4),植株矮化,但接种叶上无反应。

### (二) 寄主范围和传布途径

表 1 列出用汁接或虫传所测定的 BDDV 寄主范围,用病叶的汁液接种的 5 科 11 种植物中只有菜豆和豇豆表现系统病状,其余均无病状反应。用白粉虱接种测试的 6 科 16 种植物中,有豆科和茄科 7 种植物出现系统病状,虫传的寄主范围显然比汁传的要广,虫传的罹病率也比汁接的高。

BDDV 能侵染豆科和茄科植物,与只侵染豆科植物的 BGMV 在寄主范围上存在明显的差异<sup>[2]</sup>,虽然与 BSDV 在寄主范围上有些相似,但它们的传布介体不同,BSDV 是叶蝉传毒的<sup>[3]</sup>。

### (三) 提纯制品或超薄切片中的 BDDV

1. 病毒的紫外吸收光谱: BDDV 乳浊状提纯制品的紫外吸收光谱呈典型的核蛋白的吸收峰(图 2),  $260\text{nm}/280\text{nm} = 1.36$ ,  $260\text{nm}/242\text{nm} = 1.13$ 。

2. 病毒的回接试验: 将提纯的两批病毒分别按常规摩擦接种菜豆。两批接种的发病植株分别为 4/6, 9/9, 说明提纯的病毒具有相当的侵染性。

3. 病毒的形态和大小: BDDV 提纯制品的颗粒为小球状,除部份散落地呈游离状外,多数为规则排列成晶格状构型。经 Latex 标准颗粒校正,不管是散落的或是规则排列的,每种颗粒直径均为 9—11 nm(图版 I-1—2),并在放大的提纯病毒的照片(图版 I-2)中可看到病毒外壳的亚基结构。

从病状明显的菜豆叶超薄切片,屡次观察到聚集在细胞质液泡周围呈晶格状排列的病毒颗粒(图版 II-3)和散落在核膜周围胞质内的病毒颗粒(图版 II-1、2、4、5)以及密集在叶绿体附近成串排列的病毒颗粒(图版 I-3),其大小不论散生、串生或晶格排列的都是 9—10 nm,这与病毒提纯制品中所观察到的大小基本上是一致的。病毒颗粒聚集在寄主细胞的核区已是所报道的含 ss-DNA 的病毒的一种细胞学特征,但含 ss-DNA 的病毒颗粒像 BDDV 这样在寄主细胞的叶绿体附近成串地聚集,或在胞质液泡周围呈晶格状排列还很少有报道。

### (四) BDDV 的核酸

1. 核酸的紫外吸收光谱: 从纯化的病毒提取的核酸的紫外吸收光谱呈典型的核酸吸收峰(图 2)。  $260\text{nm}/280\text{nm} = 1.89$ ,  $260\text{nm}/230\text{nm} = 2.33$ 。 2. 核酸分子的细胞色素 C 展层: 提纯的病毒核酸经  $S_1$  酶、DNA 酶 I 和 RNA 酶 A 分别处理后,用细胞色素 C 分子展层法制备样品,在电镜下

表 2 我国菜豆萎蔫病毒与国外的 6 种 ss-DNA 病毒性状比较

Table 2 Comparison of BDDV with 6 members of geminiviruses

病毒名称 Names of viruses	形态 Morphology	大小 Size (nm)	病毒核酸 ss-DNA	传布介体 Vector	寄主范围 Host range	超薄切片 Ultrathin section
菜豆萎蔫病毒 (BDDV)	小球状, 呈晶格排列或散生 small spherical particles of virus in crystalline array or scattered	9-11	+	粉虱 Whitefly	菜豆, 豇豆, 曼陀罗, 辣椒, 烟等 Bean, cowpea, datura, pepper and tobacco etc.	病毒颗粒聚集在胞质液泡附近, 呈晶格状或散生在核膜周围或叶绿体附近成串排列 Crystalline array of virus particles near vacuoles, or scattered particles around the nuclear membrane or "chains of pearls" composing of virus particles just outside chloroplasts
菜豆金黄色花叶病毒 <sup>[1]</sup> (BGMY)	双联颗粒 Geminate particles	18×30	+	粉虱 Whitefly	菜豆和豇豆 Bean, and cowpea	病毒颗粒以晶格状聚集在核区 Viral particles aggregated in nucleus in crystalline array
菜豆夏枯病毒 <sup>[1,4]</sup> (BSDV)	双联颗粒 Geminate particles	20×35	-	叶蝉 Leafhopper	菜豆, 曼陀罗, 烟, 番茄等 Bean, datura, tobacco, tomato etc.	-
尚麻花叶病毒 <sup>[1,5]</sup> (ABMV)	双联, 散生, 念珠状 Particles of geminate or scattered or pearls	18×30 (双生, Geminate)	+	粉虱 Whitefly	尚麻, 锦葵, 花葵等 Malvaceae plants (abutilon, malva, etc.)	-
虎尾草条点花叶病毒 <sup>[1,7-8]</sup> (CSMV)	双联颗粒 Geminate particles	18×30	+	叶蝉 Leafhopper	虎尾草等禾本科植物 Chloris etc.	病毒颗粒聚集在核区 Viral particles aggregated in nucleus
木薯潜隐病毒 <sup>[10-11]</sup> (CLV)	双联颗粒 Geminate particles	18×30	+	-	木薯等 Cassava, etc.	-
玉米条纹病毒 <sup>[10,12]</sup> (MSV)	双联颗粒 Geminate particles	18×30	+	叶蝉 Leafhopper	玉米等 Maize, etc.	-

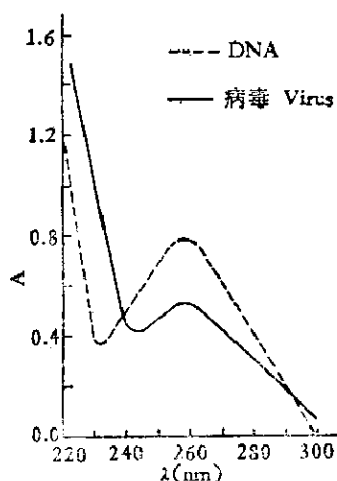


图2 BDDV(—)及其核酸(---)的紫外吸收曲线

Fig. 2 UV absorbance curve of the purified bean distortion dwarf virus (—) and its nucleic acid (---)

观察到： $S_1$ 酶和DNA酶I处理的病毒核酸只有一些断裂的短的线性片段(图版I-5、7)，几乎找不到环状分子。RNA酶A处理的核酸与未处理的一样，具较多的完整的环状分子(图版I-4、6)。

上述结果表明BDDV的核酸能被 $S_1$ 酶和DNA酶I降解，而不被RNA酶A降解，进而说明BDDV的核酸是一种ss-DNA。

根据上述实验结果，我们认为造成京郊菜豆畸矮病的病原是一种由白粉虱或机械传的含ss-DNA的小球状病毒，其直径为9—11nm。至今世界各地报道的含ss-DNA的几种植物病毒都属双联病毒组，综观其中六种双联病毒的一些特征并与我国的含ss-DNA的BDDV比较(表2)，不难看出，除AbMV外都是双联颗粒，有些在寄主体内双联颗粒并在一起成双轨型排列；AbMV颗粒多数呈念珠状串生或散生偶有双联，而我们的BDDV则是散生、串生呈单轨型排列，甚至聚集呈晶格排列，至今未见体内有双轨排列或提纯后的双联颗粒。从颗粒大小上比较，除AbMV外，所

有双联病毒都由单个的直径为16—18nm的颗粒组成18—20×30—35nm大小的双联颗粒；AbMV串生的念珠状颗粒为6—7nm，散生的则是16—18nm，双联的为16—18×30nm，可见AbMV是一种多型颗粒的病毒。我国的BDDV虽在颗粒构型为串生这一点上与之较为近似，但BDDV的颗粒不论散生，串生或晶格排列都是9—11nm，因此从颗粒大小和构型排列上看，BDDV既不同于绝大部份的双联病毒也不同于AbMV。将BDDV与已报道的两个双联病毒BGMV和BSDV比较，除大小、构型排列不同外，BDDV与BGMV虽然同为粉虱传但寄主范围不同；BDDV与BSDV虽寄主范围有些相近，但后者为叶蝉传。

据此，我们认为BDDV很可能是一种与现在已报道的双联病毒不同的病毒，是迄今比病毒中最小的病毒双联病毒还要小的一种含ss-DNA的病毒。但也并不排除BDDV就是属于双联病毒一类的可能性，因为在我们的几批提纯样品中，有一次看到几粒相互靠近的类似双联的颗粒，还需进一步观察；另外也不排除BDDV是BGMV的一个株系的可能，需进一步做血清学上的诊断。

有关BDDV的外壳蛋白质、基因组的分析以及分子生物学方面的工作也在进行中。

## 参考文献

- [1] Goodman, R. M.: *J. Gen. Virol.*, 54: 9—21, 1981.
- [2] Goodman, R. M.: *Descriptions of Plant Viruses*, CMI/AAB: No. 192, 1978.  
Goodman, R. M.: *CMI/AAB: Descriptions of Plant Viruses* (ed. by Gibbs, A. J. et al.), Wm Culross and Son Ltd, Scotland, 1978, No. 112.
- [3] Thomas, J. E. et al.: *A. P. P.*, 8(3): 36—

- 37, 1979.
- [4] Thomas, J. E. et al.: *Phytopathol.*, 70(3): 214—217, 1980.
- [5] Jeske, H. et al.: *Phytopathologische Zeitschrift.*, 97: 43—55, 1980.
- [6] Goodman, R. M.: *Nature*, 266: 54—55, 1977.
- [7] Francki, R. I. E. et al.: *Virology*, 101: 233—241, 1980.
- [8] Francki, R. I. E. et al.: *Annals of Applied Biology*, 91: 51—59, 1979.
- [9] Costa, A. S.: *Annual Review of Phytopathology*, 16: 429—446, 1976.
- [10] Harrison, B. D. et al.: *Nature*, 270: 760—762, 1977.
- [11] Bock, K. R. et al.: *Annals of Applied Biology*, 90: 361—367, 1978.
- [12] Bock, K. R.: *CMI/AAB: Descriptions of Plant Viruses* (ed. by Gibbs, A. J. et al.), Wm Culross and Son Ltd. Scotland, 1974, No. 133.

## A SMALL ssDNA-CONTAINING VIRUS — BEAN DISTORTION DWARF VIRUS

Xi Zhongxing Xu Shaohua Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A small ssDNA-containing virus, bean distortion dwarf virus (BDDV), has been isolated with sap inoculation from naturally infected bean plants showing leaves distortion, systemic brown necrosis and the whole plant stunt. Only bean and cowpea are susceptible with sap inoculation while the host range is broadened to solanaceous plants such as *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Datura stramonium* and pepper if it is transferred with whitefly. After two weeks incubation, on infected bean plant virus induces small and distorting leaves, darker and thicker than normal, sometimes a mild mosaic, or brown systemic necrosis on severely infected plants, in any event, the whole plant stops growing.

The purified virus preparation is infectious and shows a typical nucleoprotein UV absorbance curve;  $A_{260/280} = 1.36$ ;  $A_{263/242} = 1.13$ . Negatively stained viral particles are small spherical, most of them

aggregate in crystalline array. After calibrate the magnification with the Latex beads, the particles are 9—11 nm in diameter. In ultra-thin sections crystalline array of virus particles near the vacuoles, scattered particles around the nuclear membrane and “chain of pearls” composing of virus particles just outside chloroplasts were observed. In any case, the particles show 9—11 nm in diameter. Virion nucleic acid can be digested by DNase I or SI but not by RNase A, which has been proved with electron microscopy of the spread nucleic acid with cytochrome C.

We conclude that BDDV is different from BGMV in size, host range and aggregate conformation. But the possibility that it belongs to geminivirus or that it might be a strain of BGMV can not be ruled out. Anyway, it seems that BDDV is, so far, the smallest ssDNA-containing virus.