

# 我国菊花褪绿斑驳类病毒鉴定

李孟津

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

杨希才 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从我国广州地区发现的带有褪绿斑驳症状的“广白”菊花病株中分离到一种小分子核酸, 经鉴定其性质与国外报道的菊花褪绿斑驳类病毒 (Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid, ChCMV) 的性质完全一致。病株用酚提取后的粗核酸和制备的纯核酸经正反双向或垂直双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明为具有单链环状的 RNA 分子, 其分子量与菊花矮化类病毒 (Chrysanthemum Stunt Viroid, CSV) 的相似。根据病株症状、寄主范围以及分段自我杂交等试验分析, 证明这种小分子核酸是类病毒——ChCMV, 而不是 CSV。在检测过程中, 我们改进了提取和鉴定类病毒的方法, 并建立了可以区分不同种类病毒的分段自我杂交技术。

**关键词** 菊花褪绿斑驳类病毒; 正反双向或垂直双向聚丙烯酰胺凝胶电泳; 分段自我杂交

Dimock 和 Geissinger 在 1969 年首次描述了引起菊花褪绿斑驳的一种病害<sup>[1]</sup>, 这种病害最早是在 1967 年发现的, 绝大部分的病害来源于美国南部佛罗里达的无性幼苗, 通过嫁接传播。从病株中未分离出致病的细菌和真菌, 也没找到病毒颗粒; 但发现病株样品用 RNase 处理后能使其感染性下降, 而用 DNase 处理不影响其感染性。用酚抽提后能提高其感染性, 并对氯仿和偏碱性条件有很强的抗性, 酚抽提后的样品经蔗糖密度梯度离心收集各核酸组分, 发现主要侵染性组分的沉降系数为 6—14S<sup>[2]</sup>。Horst 等人<sup>[3,4]</sup>在 1975 年提出菊花褪绿斑驳病是由一种类病毒——菊花褪绿斑驳类病毒 (Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid, 简称 ChCMV) 引起的病害。

继后, Henco 等<sup>[5]</sup>和 Niblett 等人<sup>[6]</sup>分别研究了 ChCMV 的热变性特征和 ChCMV 与其它类病毒交叉保护反应。

菊花起源于我国<sup>[7]</sup>, 我们调查了来自广州、北京、内蒙古和新疆等地区的菊花病害情况, 在此基础上对来自广州地区具有褪绿斑驳症状的“广白”菊花进行了较系统的生物学和生物化学性质鉴定。

本文介绍提取类病毒 ChCMV、正反双向或垂直双向聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染色及用 CSV 酶解片段作探针的分段自我杂交技术, 以及用 ChCMV 和 CSV 接种寄主植物的检测。并以类病毒 ChCMV (国外株)、CSV 和马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTV) 作参照物, 用来鉴定“广白”菊花中的 ChCMV。

## 材料和方 法

### (一) 材料

本文于 1985 年 11 月 2 日收到。

武汉大学刘年翠教授和中国科学院微生物研究所裴美云副研究员审阅本文, 并提出宝贵意见, 特此致谢。

1. 寄主植物: 健康菊花 (*Chrysanthemum*) 和爪哇三七 (*Cynura aurantiaca*), 通过电泳分析证明无类病毒, 在防虫温室中培养。

2. 类病毒毒源: ChCMV (国外株) 由丹麦引入; CSV 为中国“广白”或“广黄”分离株, 鉴定的中国株 ChCMV 来自广州“广白”菊花病株, 以上毒源分别在防虫温室中培养。PSTV 粗核酸样品和 CSV 纯核酸样品均由本实验室提供。

3. 试剂: 所用化学试剂均为分析纯。硼氢化钠、RNase 和 DNase I 为 Sigma 产品。T4 多核苷酸激酶为 BRL 产品。 $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP 为 Amersham 产品。

### (二) 病株症状的比较

挑选健康菊花, 感染 CSV 的菊花病株和带有褪绿斑驳症状的“广白”菊花病株, 用消毒过的刀片切割成大小一致, 分别扦插在装有消毒土的花盆中, 放在防虫温室中培养。室内温度保持在 20—30°C, 正常光照条件。一个月以后检查 3 种菊花表现出的症状。

### (三) 类病毒粗核酸的提取

1. ChCMV 的提取: 根据 Romaine 和 Horst 所叙述的方法<sup>[1]</sup>, 并作了改进。步骤如下: (1) 100g 新鲜菊花病叶在液氮中处理 10 分钟, 取出后压碎, 放在匀浆器中。加入 150ml 硼酸缓冲液 (0.2M 硼酸, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 用 NaOH 调至 pH 9.0), 1.5g SDS, 1.5ml 2-巯基乙醇, 匀浆 5 分钟, 然后加 200ml 水饱和酚 (含 0.1% 8-羟基喹啉) 和 200ml 氯仿-正戊醇 (25:1, V/V), 继续匀浆 5—10 分钟。匀浆物 8000 r/min 离心 20 分钟, 收集上清液。沉淀相加 50ml 上述缓冲液重复抽提 1 次, 离心后取上清液。(2) 合并上清液, 加等体积水饱和酚, 匀浆 10 分钟, 8000r/min 离心 20 分钟, 收集水相。(3) 加 1/4 体积 10M LiCl (终浓度为 2M), 混匀, 在冰中放置 2 小时以上。10000r/min 离心 20 分钟, 上清液装入透析袋中, 对无菌蒸馏水透析过夜, 至少更换 2 次水。(4) 加 1/19 体积 4M 乙酸钠和 2.5 体积 95% 冷乙醇, -20°C 放置过夜。10000r/min 离心 15 分钟, 沉淀物经真空抽干后得到粗核酸样品。

2. CSV 的提取: 按照 Palukaitis 和 Symons<sup>[2]</sup> 叙述的方法提取。

3. 健康菊花粗核酸的提取: 与 CSV 粗核酸

的提取方法相同。

### (四) 侵染性试验

在防虫温室中, 将爪哇三七和健康菊花的幼苗用消毒的刀片切去幼苗基部叶片以造成伤口, 然后用针刺法<sup>[3]</sup> 分别接种菊花病叶的汁液、ChCMV 粗核酸和 CSV 粗核酸。2 个月后观察接种植物的症状, 提取粗核酸并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

### (五) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

用 5% 聚丙烯酰胺 (其中含 0.17% 甲叉双丙烯酰胺) 平板凝胶电泳, TBE 缓冲系统 (89mM Tris, 89mM 硼酸, 2.5mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH8.3)。检测的核酸样品用少量指示剂 (含 10% 蔗糖, 0.02% 二甲苯蓝, 0.02% 溴酚蓝) 混合。预电泳 30 分钟, 电压约 100V, 即可加样进行电泳。

1. 单向电泳: 每核酸粗样品加样 2—4 $\mu$ g, 待溴酚蓝指示剂迁移至胶底时, 停止电泳。凝胶经银染色后, 分析类病毒核酸区带。

2. 正反双向电泳: 每核酸粗样品加样 15—20 $\mu$ g, 待二甲苯蓝指示剂迁移至胶底时, 更换新鲜 TBE 缓冲液, 保持缓冲液温度 55—65°C, 调换电泳的电流方向, 并使凝胶预保温 15 分钟, 继续电泳。当二甲苯蓝指示剂反向迁移至胶长的 2/3 时, 停止电泳, 凝胶经银染色后分析环状的类病毒核酸区带。

3. 垂直双向电泳: 每核酸粗样品加样 15—30 $\mu$ g, 待溴酚蓝指示剂迁移至胶底时, 取出凝胶, 用刀片切割出胶条, 按垂直方向将胶条平放在玻璃底部, 倒入含 8M 尿素的 5% 变性凝胶液, 第二向电泳条件与正反双向的第二向相同。

4. 银染色: 按照陈炜等人<sup>[4]</sup> 的方法进行。

### (六) 分子杂交

1. 化学合成的 DNA 探针的点杂交<sup>[5]</sup>。

2. 用类病毒片段作探针的分段自我杂交: 类病毒 CSV 纯核酸样品经核酸酶部分酶解后, 获得 CSV 的片段, 以此为探针分别与 CSV、ChCMV、PSTV 和健康菊花的粗核酸进行点杂交。(1) CSV 的部分酶解: 20 $\mu$ g CSV 溶解在 50 $\mu$ l 缓冲液 (600mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5) 中, 加入 0.25 $\mu$ g RNase A, 混合后在冰浴中反应 1 小时。加入 100 $\mu$ l 无菌水, 75 $\mu$ l 水饱和酚和 75 $\mu$ l 氯仿, 抽提 10 分钟, 10,000r/min 离

心 5 分钟。收集水相, 用乙醚处理 3 次(1ml/次), 加入 450 $\mu$ l 冷乙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 2 小时, 15000r/min 离心 15 分钟, 真空抽干。(2) 探针的标记<sup>[10]</sup>。(3) 分离探针: 标记后的样品经 6% 聚丙烯酰胺凝胶(含有 7M 尿素, TBE 缓冲液系统,  $20 \times 40 \times 0.05\text{cm}$ )电泳和放射自显影, 切割出带有  $^{32}\text{P}$  标记的核酸片段的胶条, 胶条分别放在 500 $\mu$ l 浸泡液(0.5M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , 1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0.1% SDS)中, 并加入 60 $\mu$ g *E. coli* tRNA, 室温浸泡过夜。吸出带有核酸的浸泡液, 加 3 体积冷乙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置过夜。15000r/min 离心 20 分钟, 将核酸真空抽干。(4) 杂交: 取 2 个片段的 CSV 作为探针, 分别与几种类病毒粗核酸进行自我点杂交, 杂交步骤与 1 相同。

## 结 果

### (一) 症状比较

在防虫温室中扦插的健康菊花, 感染 CSV 的菊花病株和感染 ChCMV 的“广白”菊花病株经生长 1 个月后分别表现出各自不同的症状。健康菊花生长正常, 叶片为深绿色; “广白”病菊的叶片呈现明显的褪绿斑驳(图版 I-1)。感染 CSV 的病菊有明显的矮化现象, 株高仅达到“广白”病菊的 1/2, 且叶片带有少量的“铁锈斑”(图版 I-3)。说明感染“广白”病菊的不可能是 CSV, “广白”病菊与感染 ChCMV (国外株)病菊的症状相似。

### (二) 宿主范围鉴定

用“广白”病菊的汁液和经酚抽提后的粗核酸分别接种 10 株健菊幼苗, 发现接种病菊汁液的有 2 株发病, 而接种粗核酸的有 8 株发病, 说明类病毒经酚处理后增强了其感染力。爪哇三七是诊断 CSV 最灵敏的鉴别寄主<sup>[11]</sup>, 观察 CSV 粗核酸和“广白”病菊粗核酸接种爪哇三七的结果(图版 I-4)发现, 接种 CSV 粗核酸的爪哇三七顶端叶片反卷和皱曲, 而接种“广白”病菊粗核酸的不表现病症, 说明其不感染爪哇

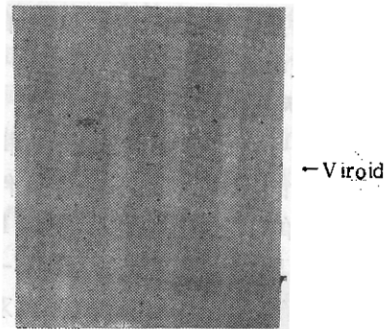


图 1 从菊花组织提取粗核酸的凝胶电泳图  
从左到右: 健菊(a); 接种 C-ChCMV; 健菊(b);  
C-ChCMV; ChCMV

Fig. 1 Gel electrophoresis diagram of crude nucleic acids isolated from *Chrysanthemum*  
From left to right: healthy (a); inoculated C-ChCMV; healthy (b); C-ChCMV; ChCMV

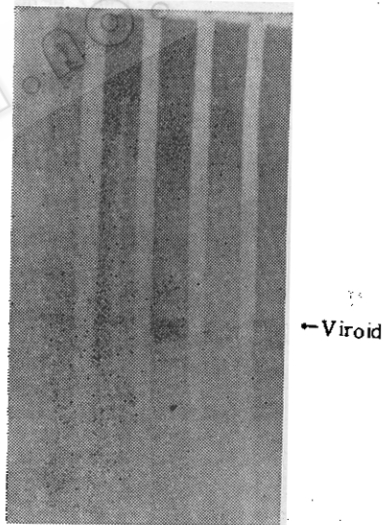


图 2 从菊花和爪哇三七提取粗核酸的凝胶电泳图

从左到右分别是类病毒和接种的寄主植物:  
C-ChCMV(菊花); CSV(菊花); CSV(爪哇三七); C-ChCMV(爪哇三七); ChCMV(菊花)

Fig. 2 Gel electrophoresis diagram of crude nucleic acid isolated from *Chrysanthemum* (Ch.) and *Gynura aurantiaca*(Gy.)\*

Inoculated viroids from left to right: C-ChCMV (Ch.); CSV(Ch.); CSV(Gy.); C-ChCMV (Gy.); ChCMV(Ch.)

\* Ch.: *Chrysanthemum*; Gy.: *Gynura aurantiaca*, 下同。

三七。这个结果在提取被接种物核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析中得到证实。

### (三) 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

类病毒是一种含有环状分子结构和线状分子结构的 RNA，在不变性条件下的凝胶电泳(单向,如图 1,图 2,图版 I-2)中形成一条明显的核酸区带,位于 7S—9S 之间;在变性条件下的凝胶电泳(正反双向或垂直双向,如图 3—6)中,可分离出单一环状分子的核酸区带,这是鉴定有无类病毒的可靠方法。图 1 中,“广白”病株(简称 C-ChCMV) 和 ChCMV 的类病毒带的迁移率相同,接种 C-ChCMV 的菊花幼苗样品中含有明显的类病毒带。图 2 中,CSV、C-ChCMV 和 ChCMV (国外株) 都能感染菊花。CSV 能感染爪哇三七,而接种 C-ChCMV 的爪哇三七样品中无类病毒带,这与接种寄主植物的症状表现结果相符。从

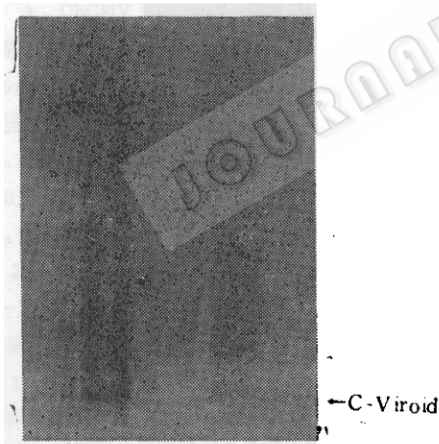


图 3 接种菊花和爪哇三七的粗核酸的正反双向凝胶电泳

从左到右: CSV(菊花); CSV(爪哇三七); C-ChCMV(爪哇三七); C-ChCMV(菊花); ChCMV(菊花)

Fig. 3 Positive and negative two-dimensional gel electrophoresis diagram of crude nucleic acids isolated from Ch. and Gy.

From left to right: CSV(Ch.); CSV(Gy.); C-ChCMV(Gy.); C-ChCMV(Ch.); ChCMV(Ch.)

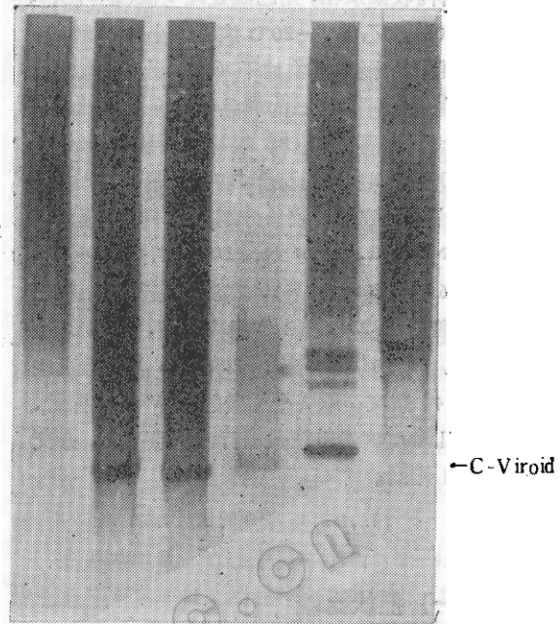


图 4 类病毒的正反双向凝胶电泳

从左到右: 健菊; CSV(粗); C-ChCMV(粗); C-ChCMV(纯); PSTV(粗); 健番茄

Fig. 4 Positive and negative two-dimensional gel electrophoresis diagram of viroids

From left to right: healthy Ch.; CSV(crude); C-ChCMV(crude); C-ChCMV(pure); PSTV(crude); healthy tomato

图版 I-2 的 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图中,发现 C-ChCMV、ChCMV (国外株)和 CSV 三者的分子量相似。

环状结构的类病毒分子在变性条件下的泳动速度要比相同分子量的线状分子核酸的泳动速度慢。用正反双向或垂直双向凝胶电泳(第二向均为变性条件)可以检测出环状的类病毒分子。正反双向凝胶电泳的优点是可以同时检测较多的核酸样品,凝胶中最下端的核酸带是环状类病毒。图 3 可清楚地看出用 C-ChCMV 接种爪哇三七后没有环状的类病毒带,与图 2 结果一致。用 CSV(粗)、C-ChCMV(粗,纯)、PSTV(粗)和健菊及健番茄粗核酸进行正反双向凝胶电泳(图 4),作为对照的寄主

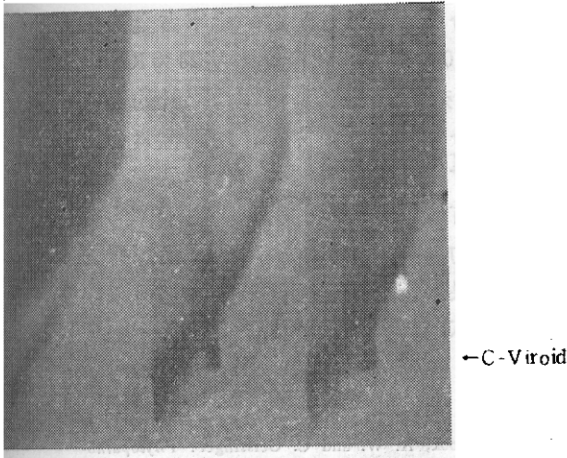


图5 健菊、C-ChCMV 和 CSV 粗核酸的垂直双向凝胶电泳

Fig. 5 Vertical two-dimensional gel electrophoresis diagram of healthy Ch. (left), C-ChCMV (middle) and CSV (right)

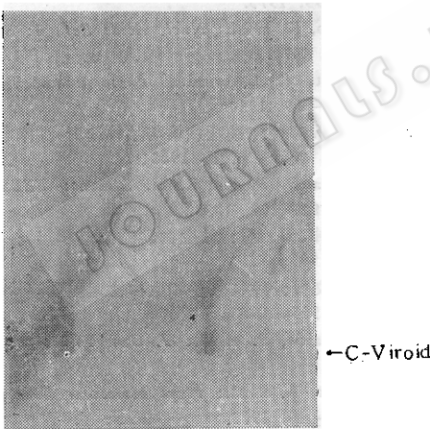


图6 C-ChCMV 粗核酸(左)和纯核酸(右)的垂直双向凝胶电泳

Fig. 6 Vertical two-dimensional gel electrophoresis diagram of crude (left) and pure (right) C-ChCMV

植物核酸中不存在环状的类病毒带，其它3种含类病毒样品都有明显的类病毒带。图5是健菊、C-ChCMV 和 CSV 粗核酸的垂直双向凝胶电泳。图6是 C-ChCMV 粗核酸和纯核酸的垂直双向凝胶电泳。寄主核酸在第二向变性条件(60℃, 含 8M 尿

素的凝胶)中按大小核酸不同的泳动速度形成较为明显的对角线，环状的类病毒分子则泳动在对角线的下方。图5、图6可以看出 C-ChCMV 和 CSV 的环状分子核酸带，在作为对照的健菊核酸样品中找不到此带。

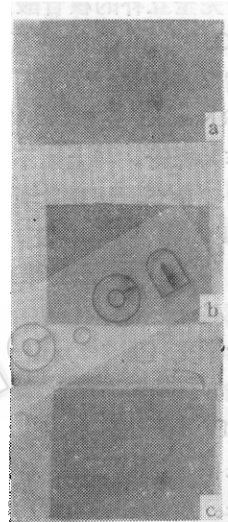


图7 类病毒与不同探针的点杂交

(a): 探针来自化学合成的小分子 DNA;  
(b, c): 探针来自 CSV 酶解片段

类病毒样品: C-ChCMV 和 ChCMV (国外株)  
(上) PSTV 和 CSV (下)

Fig. 7 Dot-spot hybridization of viroids with probes

(a): Probe is from synthetic small molecular DNA; (b, c): Probe is from CSV fragments. Viroids: C-ChCMV and ChCMV (upper); PSTV and CSV (below)

#### (四) 分子杂交

Palukaitis 等人<sup>[8]</sup>报道了用类病毒的 cDNA 进行分子杂交检测类病毒。我们在国内则发展了用化学合成的 DNA 探针杂交检测类病毒的方法<sup>[10]</sup>，同时也试验用类病毒片段与待测的类病毒样品进行分段自我杂交(即 RNA 与 RNA 杂交)的方法。

1. 化学合成的 DNA 探针 (d-CCCCGGGGATCCC) 是根据与已知类病

毒核苷酸序列(PSTV 和 CSV)保守区互补设计的。用该探针与 C-ChCMV、ChCMV (国外株)、PSTV 和 CSV 粗核酸样品进行点杂交。结果表明它们都能与该探针杂交(图 7-a)。ChCMV 的核苷酸序列至今未报道,这一结果说明 ChCMV 含有一小段与该探针完全互补的核苷酸序列,同时也是 C-ChCMV 和 ChCMV (国外株)为同一种类病毒的证据。

2. 用 RNase A 酶解 CSV 得到其中 2 个片段作为探针,与上述不同的类病毒进行分段自我杂交,结果发现其中 1 个探针可与 PSTV 和 CSV 杂交,不能与 C-ChCMV 和 ChCMV (国外株)杂交(图 7-b);另一个探针仅与 CSV 杂交,而不能与别的类病毒杂交(图 7-c)。分子杂交的结果表明:能与 C-ChCMV 杂交的探针就可与 ChCMV (国外株)杂交,这两种核酸的杂交结果相同,且区别于 PSTV 和 CSV 的杂交结果。

## 讨 论

迄今已正式报道了 12 种类病毒,在国内也发现了 7—8 种类病毒,其中像 PSTV, CSV, CEV 等 9 种类型的类病毒核苷酸序列已作了详细的研究。在国内已报道了菊花褪绿斑驳类病毒的生物学性质、核酸的分子量和与菊花矮化类病毒在寄主植物上的区别,证明这种类病毒不是 CSV,而是 ChCMV。但 ChCMV 的核苷酸序列还未报道,根据用类病毒的 cDNA 探针的杂交结果,可以断定 ChCMV 也具有共同的类病毒核苷酸保守区域。目前,在国内许多地区都能找到有 ChCMV 症状的病菊,用上述方法即可进行初步鉴定。

分段自我杂交技术是在 Rosner 的自我杂交方法<sup>[12]</sup>基础上进行改进而建立的。类病毒是具有高度碱基配对的单链闭环

形杆状分子,其碱基配对的比率占全部核苷酸的 70—80%。此杂交方法即为 RNA-RNA 的杂交,主要是将作为探针的类病毒经部分酶解成许多片段,用同位素标记的某一片段作为探针与类病毒样品进行杂交,具有较强专一性的特点。由于作为探针片段的选是随机的,不同片段探针的杂交结果可能不完全相同,因而它可以作为鉴定不同种类病毒的间接手段之一。

## 参 考 文 献

- [1] Dimock, A. W. and C. Geissinger: *Phytopathology*, 59: 1024, 1969.
- [2] Dimock, A. W. et al.: *Phytopathology*, 61: 415—419, 1971.
- [3] Horst, R. K. and C. P. Romaine: *New York's Food and Life Sciences Quarterly*, 8: 11—14, 1975.
- [4] Romaine, C. P. and R. K. Horst: *Virology*, 64: 86—95, 1975.
- [5] Henco, K. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 6: 3041—3059, 1979.
- [6] Niblett, C. L. et al.: *Phytopathology*, 70: 610—615, 1980.
- [7] 晏才毅编著: 菊花栽培与品种选育, 湖南科技出版社, 长沙, p. 1, 1983.
- [8] Palukaitis, P. and R. H. Symons: *FEBS Letters*, 92: 268, 1978.
- [9] 陈炜, 田波: 微生物学通报, 12(3): 132—135, 1985.
- [10] 于大文等: 生物化学和生物物理学报, 17(4): 520—525, 1985.
- [11] Palukaitis, P. et al.: *J. Gen. Virol.*, 46: 477, 1980.
- [12] Rosner, A. et al.: *Plant Molecular Biology*, 2: 015—018, 1983.

# IDENTIFICATION OF CHINESE CHRYSANTHEMUM CHLOROTIC MOTTLE VIROID (C-ChCMV)

Li Mengjin

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Yang Xicai Tien Po

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A small molecular nucleic acid, chrysanthemum chlorotic mottle viroid of China (C-ChCMV), has been isolated from naturally infected "Guangbai" *chrysanthemum* plants showing chlorotic mottle symptom in Guangzhou. Its properties are similar to reported ChCMV which was identified. The crude and pure nucleic acids extracted with phenol from infected plants were analysed on positive and negative or vertical two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and were showed that it is a single-stranded circular RNA. Its molecular weight is similar to chrysanthemum stunt viroid (CSV). The small molecular weight RNA was identified to be

ChCMV by diagnostic test of host, assay of systemic host an fragmental self-hybridization.

Besides, a set of methods of extraction and identification of viroid was improved to identify different viroids by using several separate parts of a certain viroid as probes. It is known as fragmental self-hybridization.

## Key words

Chrysanthemum chlorotic mottle viroid of China (C-ChCMV); Positive and negative or vertical two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; Fragmental self-hybridization

## 图 版 说 明

### Explanation of plate

1. 健康菊花接 C-ChCMV 与健康对照(左)的比较。  
Comparison of healthy(left) and C-ChCMV inoculated *Chrysanthemum*.
2. 从接种类病毒的菊花中提取核酸的凝胶电泳。  
从左到右：对照, CSV, CSV, C-ChCMV, C-ChCMV, ChCMV, ChCMV。  
Gel electrophoresis diagram of silver staining procedure of nucleic acids isolated from *Chrysanthemum*.  
From left to right: CK, CSV, CSV, C-ChCMV, C-ChCMV, ChCMV, ChCMV.
3. CSV (左)和 C-ChCMV (右)感染菊花后的症状比较。  
Comparison of CSV(left) and C-ChCMV(right) infected *Chrysanthemum*.
4. 爪哇三七对 C-ChCMV (左)和 CSV (右)的感染反应。  
The reaction of C-ChCMV(left) and CSV(right) infected *Gynura aurantiaca*.