

# 十字花科蔬菜上黄瓜花叶病毒分离物的比较研究

周雪平 刘 勇 薛朝阳 金巧玲 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所 杭州 310029)

**摘 要** 对从杭州市郊青菜、萝卜、花椰菜上分离的 6 个 CMV 分离物进行了生物学、血清学及双链 RNA 比较研究。生物学测定结果表明,不同分离物在所测定的 6 种十字花科蔬菜上的致病力有差异。6 种分离物颗粒形态、衣壳蛋白分子量和血清学方面无差异,且都属血清型 I。dsRNA 分析结果表明,6 个分离物的 dsRNA1, 2, 3 和 4 在 PAGE 中迁移率相似,但在 1.5kb ~ 0.4kb 之间有多条量相对较少的条带,这些条带在不同分离物之间差异较大。6 个分离物均含有卫星 RNA。

**关键词** 十字花科蔬菜, 黄瓜花叶病毒, dsRNA, 卫星 RNA

十字花科蔬菜是我国广泛栽培的一类蔬菜,一年四季都有种植,并在菜篮子中占有重要的地位。由于蔬菜田连年连作,且一年内反复种植,因而病毒病发生十分普遍,且日趋严重。据我们在杭州地区调查,有些田块发病率几乎 100%。我国自 60 年代起即对大白菜、青菜、萝卜、花椰菜、榨菜、芥菜及油菜病毒病进行过系统研究,并先后报道了芜菁花叶病毒(TuMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、花椰菜花叶病毒(CaMV)、烟草花叶病毒(TMV)和长叶车前草花叶病毒(RiMV)等病毒侵染,其中以 TuMV 为主要病毒,其次为 TMV 和 CMV<sup>[1~7]</sup>。

1989 年起,我们研究所对杭州市郊 10 种主要十字花科蔬菜和油菜上的病毒进行了分离鉴定,并证明这些作物上的主要病毒为 CMV、TuMV 及这两种病毒的复合侵染,特别是 CMV 占有相当的比例<sup>[8]</sup>。为此我们选择了采自萝卜、青菜、花椰菜的 6 个 CMV 分离物进行了比较研究,现将结果报道如下:

## 1 材料和方法

### 1.1 毒源

分离物 B-931 和 B-932 分离自青菜, R-931 和 R-932 分离自萝卜, C-931、C-932 分离自花菜。以上各分离物均为 1993 年秋季从杭州市郊区蔬菜田采集分离,并经苋色藜单斑分离后保存繁殖于心叶烟和青菜。

### 1.2 寄主反应测定

采用汁液摩擦接种。

### 1.3 病毒提纯及颗粒形态观察

各分离物接种三生烟,15 天后采收病叶,并按周雪平等<sup>[9]</sup>的方法提纯病毒,病毒提

纯液经 2% 醋酸铀 (pH5.0) 染色后, 置于 JEOL, JEM 1200EX 电镜下, 观察颗粒形态。

#### 1.4 血清学试验

采用琼脂双扩散法。CMV-Y 抗血清(属血清型 I)由日本宇都宫大学奥田诚一教授惠赠。

#### 1.5 病毒外壳蛋白亚基分子量测定

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 标准蛋白为 Promega 公司产品。分离胶浓度为 15%, 浓缩胶为 5%。

#### 1.6 感染组织中病毒双链 RNA 检测

各分离物接种三生烟, 一周后采收病叶 10g, 并按周雪平等<sup>[10]</sup>的方法进行提取, 提取后的 ds RNA 溶于 200 $\mu$ l H<sub>2</sub>O 中, 并取 10 $\mu$ l 进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

#### 1.7 CMV 卫星 RNA 的 Northern 印迹杂交

1.7.1 探针制备和标记: 含坏死型卫星 RNA 的全长 cDNA 克隆 pUCT 由程宁辉和方荣祥先生惠赠。将 pUCT 经 Hind III 和 Sma I 双酶切后电泳, 并用低熔点胶回收 0.4kb 的特异带, 然后用 Promega 公司的缺口平移反应试剂盒进行  $\alpha^{32}$ P-dCTP(北京亚辉生物医学工程公司产品)标记。

1.7.2 dsRNA 电泳: 取提取的 6 种分离物的 dsRNA 20 $\mu$ l 进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.7.3 转移: 采用 Pharmacia 核酸真空转移系统(VacuGene XL Vacuum System), 并按说明书进行操作。依次用脱嘌呤液、变性液、中和液和 20 $\times$ SSC 进行真空转移, 真空度稳定在 50mbar。转移所用尼龙膜为 Boehringer Mannheim 公司产品, 转移后的膜 80 $^{\circ}$ C 烘烤 2h。

1.7.4 预杂交及杂交: 按 Sambrook 等<sup>[11]</sup>的方法进行, 膜最后经漂洗后放射自显影。

#### 1.8 CMV 卫星 RNA 的斑点检测

取 1.6 中提取的 dsRNA 2 $\mu$ l, 经 95 $^{\circ}$ C 变性 5min 后直接点于尼龙膜, 晾干后 80 $^{\circ}$ C 烘烤 2h, 然后按 Sambrook<sup>[11]</sup>等的方法进行预杂交和杂交。膜经漂洗后进行放射自显影。

## 2 结果

### 2.1 寄主反应

人工摩擦接种 7 科 26 种植物, 6 个分离物的寄主范围见表 1。6 个分离物在十字花科的 6 种植物(杭州油冬儿、榨菜、小白菜、黄苗甘兰、萝卜和花椰菜)上的致病力有差异, B-931 不侵染其中 5 种作物, 而 C-931 和 C-932 能侵染所有测定的十字花科作物, 除萝卜上为隐症带毒外, 其它均表现明显的系统花叶症状。B-932、R-931 和 R-932 则分别能侵染其中的 3、4 和 5 种作物, 在有些作物上为隐症带毒, 可见虽然这几个分离物都分离自十字花科, 但它们在十字花科植物上的侵染力明显不同, 甚至同一作物上分离的不同分离物之间也有差异(B-931 和 B-932, R-931 和 R-932)。6 个分离物在豆科的菜豆和豇豆上产生的症状也有差异, 其中 B-931 不能侵染菜豆和豇豆,

表1 6个CMV分离物在寄主植物上的症状反应

Table 1 Symptoms induced in different plant species by six CMV isolates

植物 Plant		B-931	B-932	R-931	R-932	C-931	C-932
		症状 Symptom					
藜科 Chenopodiaceae	昆诺藜 <i>Chenopodium quinua</i>	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN
	莫色藜 <i>C. amaranticolor</i>	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN
豆科 Leguminosae	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> Pinto	-	-	-	-	-	-
	Monore	-	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN
	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN
	豇豆 <i>Vigna bryugiculata</i>	-	-	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN
	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN	- /LN
	大豆 <i>Glycine max</i>	-	-	-	-	-	-
十字花科	杭州油冬儿 <i>Brassica campestris</i>	-	-	-	-	M /O	M /O
	榨菜 <i>B. Juncea</i>	-	-	-	M /O	M /O	M /O
Cruciferae	小白菜 <i>B. pekinensis</i>	-	M /O	M /O	M /O	M /O	M /O
	黄苗甘兰 <i>B. caulorapa</i>	-	-	M /O	M /O	mM /O	M /O
	萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	O /O	mM /O	mM /O	M /O	O /O	O /O
	花椰菜 <i>B. oleracea</i>	-	O /O	O /O	mM /O	M /O	M /O
茄科	番茄 <i>Lycopersicum esculentum</i>	mM /O	M.Si.FN /O	M.Si.FN /O	M.Si.FN /O	M.FN /Cr	M.Si.FN /O
	普通烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	M /O	M /O	M /O	M /O	SM /O	SM /O
Solanaceae							

续表 1

植物 Plant	症状 Symptom				
	B-931	B-932	R-931	R-932	C-931
茄科					
Solanaceae					
无茎烟 <i>N. tabacum - sansum</i>	M / O	M / O	M / O	M / O	SM / O
黄苗榆 <i>N. tabacum - Huangmiao Yu</i>	M / O	M / O	M / O	M / O	M / O
心叶烟 <i>N. glauca</i>	SM / O	SM / O	SM, St / O	SM, St / O	SM, St / O
大干生 <i>Nicandra physalodes</i>	M, FN / O	M, FN / O	M, FN / O	M, FN / O	M, FN / O
曼陀罗 <i>Datura stramonium</i>	M / O	M / O	M / O	M / O	M / O
矮牵牛 <i>Petunia hybridum</i>	mM / O	M / O	mM / O	M / O	M / O
百日菊 <i>Zinnia elegans</i>	mM / O	M / O	M / O	M / O	M / O
菊科					
Compositae					
葫芦科					
丝瓜 <i>Luffa cylindrica</i>	M / YS	M / YS	M / YS	M / YS	M / YS
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	mM / O	mM / O	mM / O	mM / O	M / O
番杏科					
番杏 <i>Tetragonia expansa</i>	- / LN	- / LN	- / LN	- / LN	- / LN
Aizoaceae					

注: 系统叶症状 / 接种叶症状 Chs: 褪绿斑; Cr: 皱缩; FN: 厥叶; LN: 局部枯斑; M: 花叶; mM: 轻花叶; SM: 重花叶; st: 矮缩; -: 不侵染; O: 无症状。

Notes: Systemic symptoms / local symptoms: Chs: Chlorotic spot; Cr: Crinkle; FN: fernleaf; LN: Local necrosis; M: Mosaic; mM: Mild mosaic; SM: Severe mosaic; St: Stunt; -: No infection; O: Latent.

B-932 不能侵染豇豆。此外, 在茄科上的症状严重程度也有差异, B-931 症状较轻, 而 C-931 和 C-932 较重。6 个分离物在心叶烟上除表现系统花叶外, 叶片均表现出黄化、坏死症状, 而作者从豆科植物上分离的多个 CMV 在心叶烟上未曾发现过这类症状。

## 2.2 病毒颗粒形态及提纯病毒稳定性

提取的各病毒分离物经 200 ~ 300nm 波长的紫外扫描, 均呈典型的核蛋白吸收曲线, 提取的病毒得率相似。电镜观察显示病毒颗粒大小无明显差异, 直径约 28nm。提纯病毒接种昆诺藜均具有侵染性, 说明各分离物在提纯过程中都很稳定。

## 2.3 血清学试验

在琼脂糖双扩散试验中, 6 个分离物均能与 CMV-Y 株系抗血清形成专一的沉淀线, 且沉淀线相互融合(图 1), 说明 6 个 CMV 血清学关系相近, 且均属血清型 I。

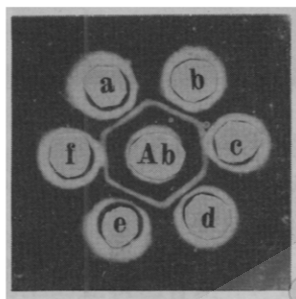


图 1 琼脂双扩散试验沉淀线

Fig. 1 Precipitate lines in agarose gel immunodiffusion tests

a: B-931; b: B-932; c: R-931; d: R-932;  
e: C-931; f: C-932  
Ab: CMV Y 血清 Antiserum of CMVY.

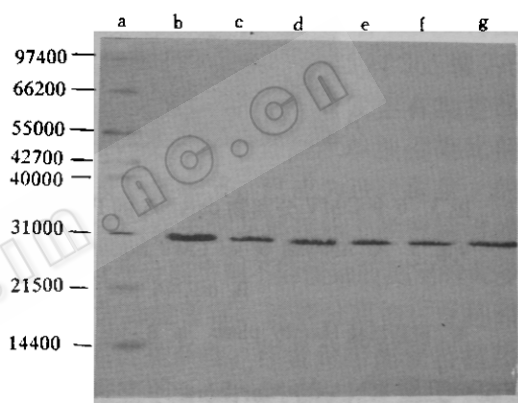


图 2 6 个分离物衣壳蛋白分子量测定

Fig. 2 Molecular weight of coat protein of six CMV isolates on SDS-polyacrylamide gels

a: 蛋白标准分子量 Protein makers; b: B-931; c: B-932; d: R-931; e: R-932; f: C-931; g: C-932.

## 2.4 病毒衣壳蛋白分子量测定

CMV 6 个分离物经多次 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定, 证明其衣壳蛋白亚基均只有一条多肽链组成, 其分子量相似, 约为 29000(图 2)。

## 2.5 dsRNA 分析

抽提受侵染组织中 dsRNA 经电泳分析, 发现 6 个 CMV 分离物均含有三条基因组 RNA, 一条亚基因组 RNA 及一条卫星 RNA。其中卫星 RNA 的量最多, 亚基因组 RNA 量最少(图 3A)。各分离物间卫星 RNA 的相对含量有差异, R-931 和 R-932 量最多, 而 B-931 相对较少。除上述 5 条带外, 在 1.5 ~ 0.4kb 之间尚有数条量较少的条带, 这些条带在不同分离物之间差异很大。还有一些较卫星 RNA 小的条带, 在不同分离物间也有差异, B-931, R-931 和 R-932 的量相对较多。

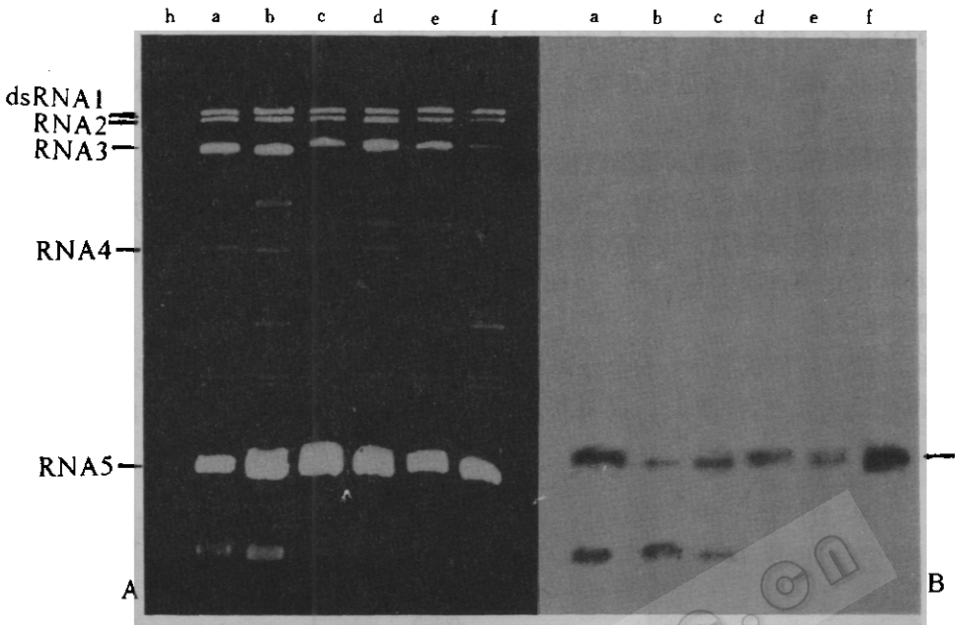


图 3 6个 CMV 分离物 dsRNA 的 PAGE 电泳分析(A) 和卫星 dsRNA 的 Northern 检测(B)

Fig. 3 A: Analysis of six CMV isolates dsRNA extracted from infected tobaccoplants on 5% PAGE;

B: dsRNA blot hybridization for detecting satellite RNA

h: 健康植株 Healthy plant; a: B-931; b: R-932; c: R-932; d: C-932; e: B-932; f: C-931.

## 2.6 卫星 RNA 的 Northern 印迹杂交及斑点检测

**2.6.1 Northern 印迹杂交:** 卫星 RNA 探针与转移到膜上的各分离物 dsRNA 进行杂交, 结果见图 3B。由图 3B 可知 6 个分离物中的卫星 RNA 带均能同已克隆的坏死卫星 RNA 杂交上, 进一步说明 6 个分离物确都含有卫星 RNA。从杂交信号看, 不同分离物之间的差异较大, 说明各分离卫星 RNA 与坏死卫星 RNA 之间同源性有差异。此外, 分离物 B-931, R-931 和 R-932 尚有一条约 0.2kb 的条带与卫星 RNA 有杂交信号。

**2.6.2 斑点杂交:** 为了对卫星 RNA 进行快速检测, 将提取 dsRNA 变性后直接点膜

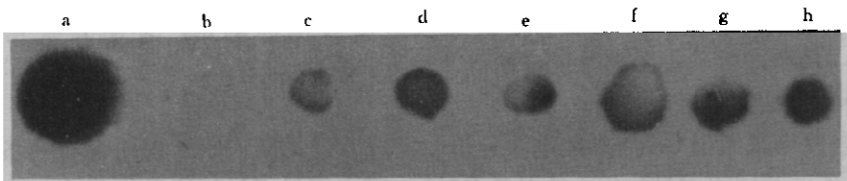


图 4 卫星 dsRNA 的斑点杂交

Fig. 4 Detection of satellite RNA by dsRNA dot-blot hybridization with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP labelled satellite RNA probe

a: pUCT 质粒 DNA; b: 健康植株抽提物 Healthy plant extracts; c: B-931; d: R-931; e: R-932; f: C-932; g: B-932; h: C-931

后与卫星 RNA 探针杂交, 结果表明 6 个分离物均有较强的杂交信号(图 4)。说明抽提 dsRNA 可直接点样, 以检测其是否存在卫星 RNA。

### 2.7 十字花科作物 CMV 田间发病率

1989 ~ 1994 年从杭州郊区的大白菜、小白菜、萝卜、青菜、芥菜、花椰菜、雪菜、榨菜、油菜等 9 种十字花科作物上随机采集表现病毒病病状的病样 126 份, 经生物学和血清学鉴定, 其中 76 份为 CMV 单独侵染(占 60.3%), 22 份为 CMV 与 TuMV 的复合侵染(占 17.5%), 可见杭州市郊十字花科作物上 CMV 发生相当普遍, 不同季节采样测定表明, 秋季和一月份前以 CMV 为主, 而后以 TuMV 或 TuMV 与 CMV 复合侵染为主。CMV 侵染后症状一般较 TuMV 稍轻, 但当与 TuMV 复合侵染后症状十分严重。

## 3 讨论

黄瓜花叶病毒(CMV)是黄瓜花叶病毒组中的典型成员, 病毒粒体包裹有 4 种 RNA, RNA1,2,3 为基因组 RNA, RNA4 为亚基因组 RNA。有些病毒分离物还含有 RNA5 即卫星 RNA。CMV 是世界性分布的病毒, 寄主范围极为广泛, 已知能侵染 85 科 365 属 775 种植物<sup>[13]</sup>。在我国 CMV 的为害也十分普遍, 而其在十字花科蔬菜上的发生有加重趋势, 作者对杭州地区的 9 种蔬菜的测定结果表明, CMV 发病率十分高, 单独侵染比例达 60.3%, 复合侵染比例也有 17.5%, 特别是在秋季及早冬季节, 已成为该科蔬菜上的主要病毒。对不同作物上的 6 个分离物的研究表明, 它们在十字花科作物上的致病力差异较大, 以侵染花椰菜上分离物的致病力为最强, 而有些分离物则不能侵染所测定的大多十字花科植物, 还有不少在所测定的十字花科作物上为隐症带毒。这些分离物在豆科和茄科作物上的症状也有差异。这充分说明了 CMV 株系的复杂性。作者曾根据豆科植物上的症状将侵染豆科植物的 CMV 划分为两个致病型<sup>[12]</sup>。根据 6 个分离物在十字花科其它寄主的症状较难划分为群或型。6 个分离物在心叶烟上的症状较为特殊, 均产生坏死, 黄化症状, 这些症状在我们以前对 CMV 研究中未曾发现过。血清学测定表明, 6 个分离物之间血清学无差异, 且均属血清型 I。

CMV 株系繁多, 目前基本方法还是通过寄主范围及症状测定。利用鉴别寄主测定时, 由于所使用的寄主及测定时环境条件及植物生长条件差异而无法相互比较。根据血清学及外壳蛋白图谱可将 CMV 划分为两个类群<sup>[14,15]</sup>, 但由于同一群内不同分离物生物学差异有的十分显著, 因而无法用其来反映株系的生物学差异。近年来, 不少学者使用病毒基因组的复制型双链 RNA(RF-dsRNAs) 进行病毒的分类诊断及病毒株系分化。如 Wang 等根据 6 个 CMV 分离物 dsRNA 电泳后的迁移情况, 可将其中 5 个有生物学差异的分离物区分开, 而生物学及血清学性状相似的两个分离物的 dsRNA 谱带无任何差异<sup>[16]</sup>。而 Pares 等对 26 个 CMV 分离物的 dsRNA 分析后将它们归为 7 个型<sup>[17]</sup>。由于 dsRNA 是病毒基因组复制产生的, 更能反映病毒分离物在生物学及基因组间的差异, 因而认为该方法对区分 CMV 有着重要作用。作者对 6 个分离物的 dsRNA 分析后发现, 6 个分离物间各基因组 RNA 及亚基因组 RNA 和卫星 RNA 的迁移率无差异, 但亚基因组 RNA 的量差异明显。不同分离物在 1.5 ~ 0.4kb 之间有许多量相对较少的条带, 这些条带之间的差异很大。由于健康植物中未发现这些条带, 因而这些肯定为

病毒专化产生的。根据病毒基因组 RNA 及亚基因组 RNA 迁移率,说明 6 个分离物尚十分相似,但 dsRNA 微带的差异较大,这些差异是否说明了这些分离物之间的生物学差异?这些微带又与病毒基因组中哪条 RNA 链有同源?这些问题有待今后研究。大多植物病毒(约 90%)的基因组为单链 RNA,病毒侵染植物后能产生大量复制型的 dsRNA,并在植物组织中积累起来,而提取 dsRNA 的方法简单,研究周期短,因而不失为研究病毒株系分化的有效方法。

dsRNA 分析 CMV 的另一优点是可直接检测出该 CMV 分离物是否含有卫星 RNA。根 dsRNA 分析,发现 6 个分离物均含有卫星 RNA,且在植物组织中积累量大。用 Northern 杂交进一步证明了其卫星 RNA 性质。Northern 杂交还发现有些分离物存在着一条约 0.2kb 的 dsRNA 条带,也能与卫星 RNA 杂交上。用卫星 RNA 探针可用提取的 dsRNA 直接检测其是否存在卫星 RNA。文献中未曾看到与卫星 RNA 有同源性的 0.2kb 的 dsRNA 带,从电泳图谱杂交结果看,不可能为卫星 RNA 的降解产物,尚不清楚这些条带是否存在着类似卫星 RNA 的调节辅助病毒病状的作用。

许多 CMV 存在着卫星 RNA,卫星 RNA 对 CMV 有着不同的调节作用,有的能减轻病状,有的能加重病状,有些则无调节作用。6 个分离物在心叶烟上的坏死及黄化症状可能是由于卫星 RNA 的作用。通过克隆卫星 RNA 基因、体外转录及生物测定等可以确定其作用。

## 参 考 文 献

- [1] 裘维蕃,王祈楷. 植物病理学报, 1957, 3(1):31 ~ 44.
- [2] 裘维蕃,吴新生,梁训生. 植物保护学报, 1962, 1(2):85 ~ 92.
- [3] 谢 浩,李树兰,李维琪,等. 微生物学报, 1979, 19(1):52 ~ 56.
- [4] 李德葆,周家炽. 植物保护学报, 1964, 3(2):155 ~ 156.
- [5] 李丽丽,黄早花,王圣玉. 中国油料, 1987, (4):52 ~ 55.
- [6] 朱培坤. 植物病理学报, 1984, 14(2):101 ~ 106.
- [7] 盛方镜,陆关成,李德葆. 浙江农业大学学报, 1983, 9(1):39 ~ 46.
- [8] 陈集双,吴琳福, Somahn S. 山东大学学报(自然科学版), 1994, 29(增刊):106.
- [9] 周雪平,徐志新,徐 静,等. 华南农业大学学报, 1995, 16(2):74 ~ 79.
- [10] 周雪平,李德葆. 生物技术, 1995, 5(1):1 ~ 4.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] 周雪平,濮祖芹,方中达. 中国病毒学, 1994, 9(3):232 ~ 238.
- [13] Kaper J M, Waterworth H E. Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Elsevier: North-Holland Biomedical Press, 1981. 257 ~ 332.
- [14] Porta C, Devergne J C, Cardin L *et al.* Arch Virol, 1989, 104:271 ~ 285.
- [15] Edwards M C, Gonsalves D. Phytopathology, 1983, 73:1117 ~ 1120.
- [16] Wang Wei Qin, Tomohide Natsuaki, Seiichi Okuda *et al.* Ann Phytopath Soc Japan, 1988, 54(4):536 ~ 539.
- [17] Pares R D, Gillings M R, Gunn L V. Intervirology, 1992, 34:23 ~ 29.



## COMPARATIVE STUDIES ON SIX CMV SOLATES FROM CRUCIFEROUS CROPS

Zhou Xueping Liu Yong Xue Zhaoyang Jin Qiaoling Li Debao

(Institute of Biotechnology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

**Abstract** Comparative studies were made among six CMV isolates collected from *Brassica chinensis*, *Raphanus sativus* and *Brassica oleracea*, which were named CMV B-931, B-932, R-931, R-932, C-931 and C-932, respectively. Biological tests showed the six isolates had different pathogenicity on six cruciferous crops. No difference was found in morphology of particles, molecular weight of coat protein and serology, and all the isolates belong to serotype I. Analysis of dsRNAs extracted from infected *Nicotiana tabacum* showed all the isolate had the same migration of each of the dsRNA1, 2, 3, 4. Many minor dsRNAs existed between 1.5kb and 0.5kb, and the profile of these dsRNAs were different between the isolates. All the isolates contain satellite RNA.

**Key words** Cruciferae vegetable crops, CMV, dsRNA, Comparison