

# 甘蓝型油菜芜菁花叶病毒分离物 TuMVH<sub>1</sub> 的生物学研究

陈集双 张耀洲 徐平 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所)

**提要** 采自杭州甘蓝型油菜上的芜菁花叶病毒分离物 TuMVH<sub>1</sub>, 经寄主反应测定, 不侵染茄科普通烟和心叶烟, 对多数供试甘蓝型油菜和十字花科蔬菜品种(品系)有强的致病力。枯斑指示植物检测和 ELISA 检测, 选择城青2号大白菜作为毒原繁殖寄主, 提纯病毒的得率为 6—7mg 病毒/100g 鲜病叶, 用提纯病毒制备的兔抗血清经环状沉淀反应测得其效价为 1/20 000, 免疫电镜观察, TuMVH<sub>1</sub> 与同源抗血清有强的阳性反应, 与另一个芜菁花叶病毒抗血清亦有阳性反应。提纯病毒经蛋白酶 K 处理, 酚:氯仿抽提后在琼脂糖凝胶电泳中测定其 RNA 分子量约为 9.4kb。在接种 TuMVH<sub>1</sub> 30 天的城青2号大白菜和甘蓝型油菜的植株细胞中观察到分散的线状病毒粒子和典型的风轮状内含体。TuMVH<sub>1</sub> 风轮状内含体的结构介于 Edwardson 等所描述的亚型和 IV 型之间。

**关键词** 芜菁花叶病毒; 血清学; RNA; 组织病变; 提纯

芜菁花叶病毒(TuMV)是侵染十字花科蔬菜和油菜的一类重要病原。该病毒在世界范围内有广泛的自然分布。除侵染十字花科外, TuMV 还在豆科、姜科、芸香科、毛茛科及鸢尾科上引起典型病害<sup>[1]</sup>。在我国, 大白菜孤丁病、萝卜花叶病、芜菁花叶病、榨菜缩叶病、豌豆花叶病、芝麻矮化病等都是以 TuMV 单独侵染或 TuMV 和其它病毒复合侵染所致<sup>[2-5]</sup>。

TuMV 属于马铃薯 Y 病毒组(*potyvirus*), 在自然界中可通过数十种蚜虫以非持久性方式传播, 易经汁液接种传播, 病毒粒子线形, 长约 720nm<sup>[6]</sup>。在 TuMV 感染的植物细胞中产生典型的风轮状内含体<sup>[6]</sup>。最近发表的 TuMV 基因组全序列资料表明: 该病毒正链 RNA 有 9831 个核苷酸只翻译产生一个分子量为 358KD 的多肽。该多肽经自身剪切和加工最终形成 8 个功能蛋白。TuMV 基因组结构与几个已经报道的 *Potyvirus* 基本相似<sup>[7]</sup>。TuMV 本身具有广泛的变异类群, 利用鉴别寄主来划分其株系的努力一直没有取得满意的结果。裘维蕃等<sup>[2]</sup>、范怀忠<sup>[3]</sup>、Providenti<sup>[8]</sup>、刘朝平等<sup>[9]</sup>均探索了各自的株系划分标准, TuMV 的变异类型复杂可能与其分布范围广有关。

油菜花叶病是长江流域冬油菜生产上的一个突出问题, 造成严重的产量损失<sup>[10]</sup>, 李德葆<sup>[11]</sup>、王拱辰<sup>[12]</sup>、李丽丽<sup>[13]</sup>等分别报道认为 TuMV 是该地区, 尤其是浙江省油菜花叶病的主要病原, 而油菜 TuMV 本身又存在明显的生物学变异类群。

以构建甘蓝型油菜抗芜菁花叶病毒基因工程植株为最终目标, 我们自 1991 年起再次对浙江省部分地区甘蓝型油菜上的病原病毒进行了分离鉴定, 并选用致病力较强的一个病毒分离物作为病源开展病毒与寄主相互关系及该病毒分离物基本生物学特性研究。

## 材料与方法

### (一) 毒源

芜菁花叶病毒分离物 TuMVH<sub>1</sub> 于 1991 年 2 月分离自浙江农业大学实验农场甘蓝型油菜第

• 浙江省委八五攻关课题。浙江农业大学生物所洪皓、沈碧萍、陈雄凤、李世君、盛方锐、许建平参加了部分工作。

株,毒原在昆诺藜上2次单斑纯化后,保存于城青二号白菜上。

## (二)寄主反应测定

按常规汁液摩擦接种方法进行<sup>[13]</sup>。

## (三)接种植物中 TuMV 相对浓度的测定

1. 枯斑指示植物检测 取接种毒源相同时间(常温下20—25天)的接种叶片和新生叶,经汁液摩擦接种昆诺藜9—10叶片,观察、计算平均枯斑数作为病毒的相对浓度。

2. ELISA 检测 采用间接 ELISA 方法<sup>[13]</sup>,等量待检病叶经磷酸缓冲液研磨后稀释2倍直接包被酶标板(40孔),以健康的叶片作为阴性对照,TuMV 抗血清(TuMV-AS,由浙江农科院病毒中心林瑞芬研究员提供)用生理盐水稀释40倍,然后用辣根过氧化物酶标记 A 蛋白—邻苯二胺方法检测,确定相对病毒浓度。

## (四)病毒提纯和病毒粒子形态观察

根据接种植物中 TuMV 相对浓度测定的结果选择毒源繁殖寄主,病毒提纯参照 Hisashi 大豆花叶病毒提纯方法<sup>[14]</sup>进行修改。取新鲜病叶(未表现明显症状)200克置—20℃冰冻20分钟,加入200ml pH7.4的0.5mol 磷酸缓冲液(含0.1%巯基乙醇、2% Triton X-100,0.01mol EDTA),匀浆1—2分钟,加入10%氯仿:正丁醇(1:1),匀浆2分钟,双层纱布过滤,置4℃下20分钟,4℃下8000g 离心20分钟取上清,加4%PEG6000,0.1mol NaCl,于4℃下沉淀3小时,8000g 离心20分钟,弃上清,沉淀再用0.02mol 磷酸缓冲液(pH7.4,含0.01mol EDTA,1% Triton X-100)充分悬浮后,8000g 离心10分钟取上清,4℃下78000g 离心100分钟,沉淀用0.02mol PB(pH7.0)充分悬浮,8000g 离心10分钟,取上清,再经5%和40%甘油梯度78000g 离心120分钟,病毒最终悬浮于5ml 左右双蒸水中。提纯病毒(或病株汁液)按常规方法经1%磷钨酸或1%醋酸铀负染后置电镜下观察病毒粒子形态。

## (五)抗血清制备和血清学反应测定

1. 抗血清制备 纯化病毒与 Freund's 不完全佐剂充分乳化后于家兔背部24—26点皮内注射,每只公兔注射1.0mg 病毒(约1.5ml 乳化抗原)作为初次免疫,4周后用同样方法引入约0.5mg 病毒,3周后用0.2mg 病毒(悬浮于0.4ml 生理盐水中,作为可溶性抗原进行耳静脉注射,10天后采血、收集抗血清。抗血清效价测定按常规小试管环状沉淀反应方法<sup>[3]</sup>。

2. 血清学反应测定 采用改良的 Derrick's 方法进行免疫修饰<sup>[13]</sup>。阴性对照用免疫前兔血清,阳性对照用已知 TuMV(粗提纯)。

## (六)病毒 RNA 的提取和分子量测定

提纯病毒在37℃下经50μg/ml 蛋白酶 K(美国 SIGMA 公司)水解30分钟,然后经酚:氯仿抽提,酒精沉淀,在含有 EB 的1%琼脂糖凝胶上电泳2—3小时<sup>[15]</sup>紫外灯下观察。RNA 标准分子量为0.24—9.49Kb(美国 BRL 公司)。

## (七)组织病变观察

甘蓝型油菜79—601和城青二号大白菜接种芜菁花叶病毒7—30天后,分别采取样品,然后用戊二醛(含多聚甲醛)—锇酸双固定,EPon 812(A:B=1:6)包埋。超薄切片用醋酸铀和柠檬酸铅双染色后,置电镜下检查组织病变情况<sup>[16]</sup>,以同龄健康叶片作为对照。

## 结果与分析

### (一)寄主反应与症状

田间自然感病的甘蓝型油菜(浙油601)表现为系统花叶和叶脉坏死,植株矮化。汁液摩擦

接种分离到的毒原能侵染甘蓝型油菜等十字花科植物,表现系统症状,并在昆诺藜上为局部枯斑。毒原经昆诺藜2次单斑纯化获得的病毒分离物 TuMVH<sub>1</sub>在9科28种植物上的反应和接种植株中相对病毒浓度如表1。

表1 TuMV H<sub>1</sub>在测试寄主上的反应

寄主植物			寄主反应	枯斑寄主检测 病毒浓度(20天)	ELISA 检测 病毒浓度(20天)
科名	种名	名			
藜科	昆诺藜	<i>Chenopodium quinoa</i>	SN		
	苋色藜	<i>C. amaranticolor</i>	SN		
茄科	曼陀罗	<i>Datura stramonium</i>	0		
	心叶烟	<i>Nicotiana glutinosa</i>	0		
	黄苗烟	<i>N. tabacum</i>	0	—	—
	三生烟	<i>N. tabacum</i>	0	—	
	黄花烟	<i>N. rustica</i>	0		
	葱烟	<i>N. debneyi</i>	0		
	克里美兰烟	<i>N. cleveandii</i>	SN		
	假酸浆	<i>Nicandra physalodes</i>	LN/(LD)	++	+++
	洋酸浆	<i>N. florida</i>	LN		
	番茄	<i>Lycopersicon esculentum</i>	0		
豆科	委实牛	<i>Petunia hybrida</i>	YS		
	豇豆	<i>Vigna sinensis</i>	0		
	菜豆	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0		
葫芦科	黄瓜	<i>Cucumis sativus</i>	0		
	豇豆	<i>Vicia faba</i>	0		
苋科	千日红	<i>Gomphrena globosa</i>	0		
	鸡冠花	<i>Celosia cristata</i>	LN		
玄参科	金鱼草	<i>Antirrhinum majus</i>	YS		
菊科	翠菊	<i>Callistephus chinensis</i>	0		
	瓜叶菊	<i>Senecio cruentus</i>	0		
唇形科	紫萼	<i>Tetragonia expansa</i>	LN		
十字花科	皱叶2号白菜	<i>Brassica pekinensis</i>	SYS, S, SM	++++	++++
	早熟5号白菜	<i>Brassica pekinensis</i>	S, M	+(+)	++
	小白菜	<i>B. chinensis</i>	YS, SN, C	+(+)	
	601油菜	<i>B. napus</i>	SM, SN, C	+++	+++
	79-505油菜	<i>B. napus</i>	YS, SM	++	
	78-251油菜	<i>B. napus</i>	C, M	+(+)	
	waters 油菜	<i>B. napus</i>	SM	++(+) (+)	+(+)
	白菜型油菜	<i>B. chinensis</i>	SM, C, SN	++++	
	油青菜	<i>B. chinensis</i>	SM, VC, SN, D	++	+++
	榨菜	<i>B. varacea</i>	SM, C	+++	
	花椰菜	<i>B. oleracea</i> Var. botrytis	VC, D	+(+)	
	浙大长萝卜	<i>Raphanus sativus</i>	SM, SN	++++	++++

注:LN:部斑;SN:系统坏死;0:不受染;LD:落叶;YS:局部黄斑;SYS:系统黄斑;SM:花叶;S-SM:轻花叶;

S-Mo:轻斑;C:皱缩;VC:明脉;St:矮化;D:发僵

"+"表示相对病毒浓度;"—"无

TuMVH<sub>1</sub>对大多数供试十字花科蔬菜和油菜品种(品系)均有较强的致病力,但在78-251油菜品种和早熟5号大白菜品种上只表现轻斑皱缩症状,用昆诺藜作为枯斑指示植物和ELISA检测接种植株中病毒相对浓度的结果显示,TuMVH<sub>1</sub>在这两个品种(品系)中含量较低,而在皱叶2号大白菜、浙大长萝卜和小白菜上的浓度为最高。TuMVH<sub>1</sub>不侵染茄科普通烟的数个品种

及心叶烟,似与一般 TuMV 株系不同。

## (二)病毒的提纯

选用发病程度中等,但病毒浓度较高的城青2号大白菜作为毒原繁殖寄主,常温下接种20天左右,取新鲜病叶提取病毒,得率为6—7mg 病毒/100g 鲜病叶。提纯病毒经磷钨酸负染,在电镜下可观察到完整、均一的病毒粒子并能分辨其外壳蛋白亚基结构(封三图1A)。经多次病毒提纯结果比较,表明这一方法重复性好。

## (三)抗血清制备和血清学反应

TuMV H<sub>1</sub>提纯病毒免疫家兔获得的抗血清经小试管环状沉淀反应测定,其效价为1/20,000。用免疫修饰(ISEM—Decoration)电镜观察测定其对同源病毒有强的修饰反应。另一已知 TuMV 抗血清(As-TuMV)亦能吸附 TuMV H<sub>1</sub>病毒粒子且对其进行修饰,但病毒吸附量和修饰强度不如同源抗血清(封三图B、C)。

## (四)TuMV H<sub>1</sub>的 RNA 分子量

TuMV H<sub>1</sub>总 RNA 的琼脂凝胶电泳分析结果表明,用酚/氯仿抽提的 TuMV H<sub>1</sub>为单一组分,其分子量约为9.4kb。这一结果说明以上抽提核酸的方法未导致 RNA 明显降解。

## (五)叶片病变组织的观察

TuMV H<sub>1</sub>接种后7天、10天、15天的城青2号白菜和601油菜,经汁液负染虽然能检查到大量线状病毒粒子,但在叶肉细胞超薄切片中难以观察到风轮状内含体。在接种30天后的植株叶肉细胞质中观察到分散的线状病毒粒子和风轮状内含体,TuMV 的风轮状内含体具有典型的片层状聚集结构(laminated aggregation),部分风轮状“臂”(plate)卷曲成卷筒状(tubular scroll-like)。TuMV H<sub>1</sub>的风轮状“臂”在8个以上、片层状聚集体比较短而且不弯曲,这是该病毒分离物风轮状内含体的突出特征(封三图2)。病毒粒子和风轮状内含体似不存在于同一细胞质区域。

## 讨 论

本文所报道的病毒分离物 TuMV H<sub>1</sub>与我们六十年代划分的Ⅰ型<sup>[1]</sup>、王拱辰的 TpMV 98<sup>[12]</sup>以及李丽丽的 CR<sub>2</sub>株系<sup>[4]</sup>相似,该分离物对十字花科寄主有强的致病力。

Edwardson 等曾将 Potyviruses 的风轮状内含体分为4个型,TuMV 大多数供试株系(分离物)皆为典型的Ⅲ型<sup>[6]</sup>,即在横切面上同时具有风轮状、卷筒状和片层状聚集的结构,TuMV 的风轮状臂比较小、片层状聚集结构比较长<sup>[1]</sup>。本文的结果显示,TuMV H<sub>1</sub>具有较多的风轮状臂、较短但不形成明显弯曲的片层状聚集结构。根据这些特点,TuMV H<sub>1</sub>的风轮状内含体似介于 Edwardson 等所划分的Ⅲ型和Ⅳ型之间。

TuMV 提纯的效果一直不够理想<sup>[1,7]</sup>。要获得大量完整的、纯化的线状病毒粒子,选择适当的繁殖寄主和根据病毒特点确定提纯程序显然是重要的。线状病毒在经过 PEG 沉淀和超速离心沉淀后的悬浮过程中损失很大,而在这些步骤中充分悬浮尤为重要<sup>[14]</sup>。本文所采用的 TuMV 提纯方法的多次重复结果表明,提纯病毒经电镜病毒粒子检查和核酸抽提和分子量测定,均获得稳定的结果,所制备的病毒抗血清有较高的效价,免疫电镜检查,对其同源病毒表现较高的特异性。为进一步进行 cDNA 文库的构建和对克隆基因的检测、基因表达产物的鉴定提供了条件。关于此分离物的基因克隆和植物表达载体的构建工作正在进行之中。

## 参考文献

- 1 Tomlinson J A. Turnip mosaic virus, CMI/AAB Description of plant Viruses, 1970(8)
- 2 袁维普, 梁训生. 京津大白菜弧丁病毒病原的类型及其分布. 植物病理学报, 1963, 6(2)
- 3 范怀忠. 广州及附近十字花科蔬菜花叶病毒的鉴定. 植物病理学报, 1957, 3(12)
- 4 李丽丽. 油菜花叶病毒株系鉴定. 中国油料, 1989
- 5 李书军等. 芝麻病毒病病原研究. 病毒学杂志, 1989, 3(3)
- 6 Edwardson J R et al. Potyvirus Cylindrical inclusion- Subdivision—IV. Phytopathology, 1984, 74(6)
- 7 Nicolas O and Lalibere J F. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic Virus RNA. Journal of General Virology, 1992, 73(9)
- 8 Provvidenti R. Evaluation of Chinese cabbage Cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. J Amer Soc Hort Sci, 1980, 105(4)
- 9 刘翔平等. 我国十省(市)十字花科蔬菜花叶病毒(TuMV)株系分化研究. 病毒学杂志, 1990, 4(1)
- 10 魏景超. 油菜花叶病. 北京: 科学出版社, 1958
- 11 李德葆. 浙江油菜花叶病毒类型初报. 植病保护学报, 1964, 3(2)
- 12 王拱辰. 浙江油菜花叶病毒类型的研究. 微生物学报, 1978, 18(4)
- 13 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法. 北京: 科学出版社, 1987
- 14 Hisashi Iwai. Purification of soybean mosaic virus. Ann Phytopath Soc Japan, 1985, 51(4)
- 15 Sambrook s et al. Molecular cloning a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab, 1989

# A STUDY ON THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF A TURNIP MOSAIC VIRUS ISOLATE(TuMV H<sub>1</sub>)FROM RAPE

Chen Jishuang, Zhang Yaozhou, Xu Ping, Li Debao

(Institute of Biotechnology, Zhejiang Agricultural University)

**Abstract** An isolate of turnip mosaic virus(TuMV H<sub>1</sub>)from natural infected rape(*B. napus*)was studied. This isolate didn't infect both *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa*, but showed high pathogenicity to most varieties of cruciferous crops tested. The virus concentration in the inoculated plants was detected by local lesion test and ELISA. A variety of *B. pekinensis*(CHEN QIN 2)was selected as the propagating host for purification. A modified purification schedule was developed which yielded 6—7mg virion/100g fresh leaves. A rabbit antiserum against TuMV H<sub>1</sub> was developed from purified virus particles by mixing with Freund's incomplete adjuvant, with the titer of 1/20,000(ring precipitation test). This antiserum had high specificity with TuMV H<sub>1</sub> by immuno-decoration in comparing with antiserum against another TuMV isolate. Total RNA of TuMV H<sub>1</sub> was successfully extracted from purification of this virus, the molecular weight was about 9.4kb when tested under agarose electrophoresis. Pinwheel inclusion bodies with plate number over eight and shagreened aggregates and scroll-like structurals were observed in infected cells of *B. napus* and *B. pekinensis*. The type of pinwheel inclusion bodies was considered between Subdivision III and Subdivision IV that described by Edwardson et al. Scattered virus particles were also observed in cytoplasm of infected cells.

**Key words** Turnip mosaic virus; Purification; Serology; RNA; Cytopathology