

苜蓿花叶病毒(AMV)白三叶草

分离物-Wc的研究

魏宁生 李 敏

(西北农业大学植物保护系, 杨陵)

提 要

在西北农大校园内的白三叶草上分离到Wc分离物。该分离物经汁液摩擦接种菜豆和豇豆只产生局部坏死斑，在烟草上为系统侵染。致死温度为55℃，体外保毒期为12—24小时，稀释限点为 10^{-2} — 10^{-3} 。琼脂双扩散试验表明Wc分离物与AMV抗血清有明显的沉淀反应。部分提纯制品在电镜下有5种形态：宽度一致(18—20nm)，长度分别为58、52、41和31nm，第5种粒子近球形。病毒粒子经3%凝胶电泳，染色扫描后有4个峰。超速离心分析有4个主峰，其沉降系数分别为 $S_{20,w}=98s$ (B组份)，82s(M组份)，72s(T_b组份)，和65s(T_a组份)。鉴定结果表明Wc是AMV的一个分离物。降解病毒所得总核酸(未变性)经聚丙烯酰胺凝胶电泳测定了4种核酸的分子量如下： $RNA_1=1.3\times10^6$ ， $RNA_2=1.0\times10^6$ ， $RNA_3=0.8\times10^6$ ， $RNA_4=0.3\times10^6$ 。

苜蓿花叶病毒(Alfalfa mosaic virus—AMV)是一种世界性分布的病毒。其寄主范围广泛，可侵染51科的430多种植物^[12]，其中不少是重要的经济作物。

1933年W.J.Zaumeyer和B.L.Wade^[20]报道了白三叶草(*Trifolium repens L.*)花叶病，汁液摩擦接种菜豆(*Phaseolus vulgaris L.*)表现为局部坏死斑和系统斑驳两种症状。其后E.M.Johnson^[13]也发现了该病害，接种菜豆只产生枯斑。K.W.Kreitlow等^[15]报道了黄化斑块(Yellow Patch)株系，在菜豆和豇豆(*Vigna sinensis(L.) savi*)上均产生局部坏死斑反应。1939年俞大绂先生在《中国植物病毒名录》^[18]中报道南京有白三叶草花叶病但未做具体鉴定。1982年蔡发兴等^[2,3]，在北京报道了苜蓿花叶病毒并做了进一步的研究。张鹤龄等^[4]也在内蒙报道了马铃薯杂斑病是AMV杂斑株系。1985年7月作者在西北农大校园种植的白三叶草上发现了AMV的一个分离物，简称Wc分离物，并做了分离纯化、生物学和血清学鉴定，提纯和理化研究以及RNAs分子量测定等工作。本文是这些工作的总结及分析讨论。

本稿1986年8月4日收到

材料与方法

1. 病毒的分离及其寄主范围和症状反应的测定 将采到的典型病株按常规汁液摩擦接种在豇豆上进行单斑分离，纯化毒源，然后测定其寄主范围和症状反应。纯化毒源保存于心叶烟 (*Nicotiana glutinosa* L.) 上。

2. 血清学鉴定 采用琼脂双扩散法。

3. 病毒的提纯及活性测定 基本参照蔡发兴等^[2]的方法但略有修改。

4. 电镜观察 参照蔡发兴等^[2]的方法，负染后在 JEM-100CX II 电镜下观察，测量了210个病毒粒子的大小并计算其平均数值及各种粒子的比例。

5. 病毒的聚丙烯酰胺凝胶电泳 参照 Bol 等^[8]的方法进行 3% 聚丙烯酰胺电泳。每管加样 50—100 μl (含病毒 50 μg 左右)，每管 5 mA 电流，电泳 16 小时并保持上下槽缓冲液 pH 稳定。凝胶采用常规蛋白质染色方法，显带后用 CS-930 双波长薄层扫描仪用可见光扫描。

6. 病毒的分析超速离心 将提纯病毒溶解于 0.02 mol/L pH=7.0 PBS 缓冲液中，(浓度为 8 mg/ml)，在 MSE-75 型分析超速离心机上分别以 Schlieren 和 U/V 光路测定，转速为 45000 r/m，每隔 4—6 分钟扫描一次，经三次实验后计算 $S_{20,w}$ 值。

7. 病毒核酸分子量的测定 (1)核酸的提取：采用 SDS-两相酚法，病毒浓度为 18 mg/ml，所得总核酸在低温下保存备用。(2)核酸分子量的测定：参考魏宁生等^[5]的方法，利用 2.4% 聚丙烯酰胺圆盘电泳，在未变性条件下以雀麦花叶病毒 (BMV) E 株系总核酸为标记测定 AMV-RNAs 的分子量。每管加样量为 50—80 μl。加样后先以 2.5 mA/管电泳 5 分钟，再升至 5 mA/管电泳 90 分钟。凝胶在乙酸中固定后，用自来水脱色 2 小时再测量其迁移距离。

结 果

1. 病毒的抗性测定： 在菜豆上测得致死温度为 50—55℃，体外保毒期为 12—24 小时，稀释限点为 10^{-2} — 10^{-3} 。

2. 寄主范围和症状反应的测定： 分别测寄主的症状及潜育期，结果见表 1。其中在白三叶草、苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 和豇豆上的症状表现可见图 1、2 和 3。图 4 为提纯病毒的电镜照片 (放大倍数为 144000)。

Wc 分离物可以侵染 3 个科的 14 种植物，但不能侵染苋科的尾穗苋 (*Amaranthus caudatus* L.)，十字花科的白菜 (*Brassica pekinensis* Rupr.) 以及葫芦科的黄瓜 (*Cucumis sativus* L.)。Wc 与已知株系比较，在豇豆和菜豆上的反应与黄化斑块和 AMV 典型株系以及 H-10 分离物相似，但更接近于黄化斑块株系。

3. 血清学鉴定： 试验表明 AMV 抗血清与 Wc 分离物之间有明显的沉淀线出现，说明 Wc 分离物属于 AMV。

4. 病毒的提纯： 通过两次的提纯结果来看，病叶的病毒产量为 500—550 mg/kg。提纯病毒稀释后在紫外分光光度计上测定其吸收曲线 (见图 5)，最大吸收峰为 260 nm，最小吸收峰为 240 nm， $A_{260}/A_{280} = 1.75—1.76$ 。提纯病毒经稀释成不同浓度后接种豇豆，

表 1 Wc 分离物的寄主范围、症状反应及潜育期
Table 1 Host ranges, symptoms and incubation periods of isolate-Wc

寄主 (Hosts)	症状 (Symptoms)	潜育期(天) Incubation periods(day)
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	坏死斑 Necrotic spots	3—4
心叶烟 <i>Nicotiana glutinosa</i> L.	脉间退绿, 叶微皱 Chlorosis between veins, leaves crinkle	5—7
三生烟 <i>N.tabacum Xanthi-nc</i> L.	先脉明, 后脉间退绿 Vein, clearing, then chlorosis between veins	5—7
茄科 Solanaceae	白烟 <i>N.tabacum</i> CV. White Burley	同上 Ibid
	克氏烟 <i>N.clevelandii</i> L.	脉间退绿 Chlorosis between veins
	黄花烟 <i>N.rustica</i> L.	同上 Ibid
	辣椒 <i>Capsicum frutescens</i> L.	花叶 Mosaic
	曼陀罗 <i>Datura stramonium</i> L.	轻花叶, 后变得不明显 mild, mosaic, then latent
豆科 Leguminosae	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	接种叶片产生红褐色枯斑 Redbrown lesions on inoculated leaves
	豇豆 <i>Vigna sinensis(L.) savi.</i>	同上 Ibid
	豌豆 <i>Pisum sativum</i> L.	无症带毒 no symptom carrier
	蚕豆 <i>Vicia faba</i> L.	同上 Ibid
藜科 Chenopodiaceae	苋色藜 <i>Chenopodium amaranticolor</i>	退绿斑, 顶叶呈花叶皱缩 chlorotic spots crinkle and mosaic on top leaves
	昆诺藜 <i>C.quinoa</i>	皱缩花叶 Crinkle mosaic
苋科 Amaranthaceae	尾穗苋 <i>Amaranthus caudatus</i> L.	不侵染 no infection
葫芦科 Cucurbitaceae	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i> L.	同上 Ibid



图 1 三叶草黄斑花叶症状
Fig. 1 Yellow patch on the white clover leaf



图2 苜蓿花叶症状
Fig 2 Alfalfa mosaic

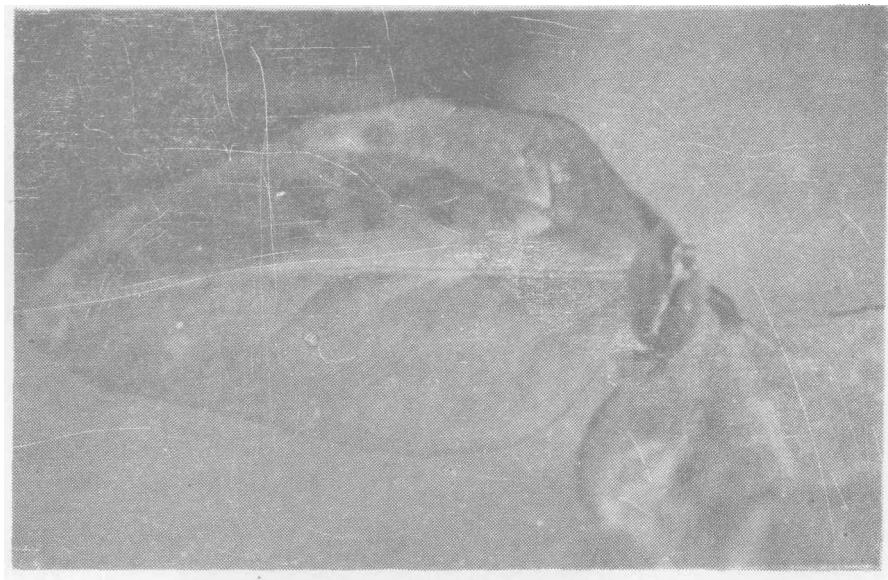


图3 豇豆接种叶产生的坏死斑
Fig 3 Necrotic spot on the inoculated leaf of cowpea

结果表明活性正常。

5. 病毒粒子的电镜观察：在电镜下可清楚地看到 Wc 分离物具有宽度一致（18—20nm），而长度不同（58、52、41、31 及 18—20nm）。各种粒子所占的比例按长度递减依次为8%、5%、15%、20%及30%。近球形粒子所占比例最大，而最长的粒子则较少。



图片 4 AMV-Wc 分离物病毒粒子 (144,000×)

Fig 4 Virion of AMV-Wc (144,000×)

6. 病毒的聚丙烯酰胺凝胶电泳: Wc 分离物经3%聚丙烯酰胺凝胶电泳、染色及扫描后有明显的4个峰, 扫描结果可见图6。

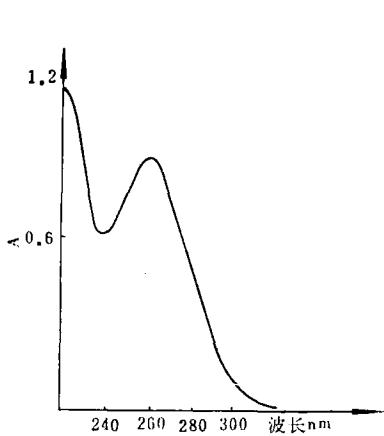


图5 提纯分离物的紫外吸收光谱

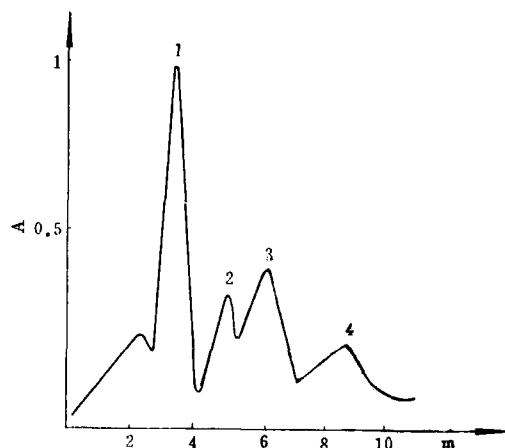
Fig 5 UV absorption profile of
purified isolate-Wc

图6 Wc分离物凝胶电泳后的紫外扫描图谱

Fig 6 UV-Scanning profile of isolate-Wc
after gel electrophoresis

7. 病毒的超速离心分析: Wc 分离物具有5个峰, 其中4个峰比较明显; 其沉降系数按递减分别为 $S_{20,w} = 98s$ 、 $82s$ 、 $72s$ 和 $65s$ 。第5个峰虽然可以从多次实验中比较出来, 但其沉降系数不能精确计算。这与电镜观察及电泳结果是基本一致的。

8. AMV-RNAs分子量的测定: (1) 核酸的提取: AMV 总核酸吸收曲线如图7, 最高和最低吸收峰分别为260nm和230nm, 是典型的核酸吸收曲线。

将降解病毒所得总核酸($430\mu\text{g/ml}$)稀释一倍，接种豇豆半叶，平均每个半叶的枯斑数为20.88个，这与 $20\mu\text{g/ml}$ 病毒在豇豆半叶上所形成的枯斑数(18个/半叶)相当。说明提取方法和操作正常。

(2)核酸分子量的测定：用2.4%聚丙烯酰胺凝胶电泳将AMV总核酸的各组份分开，以BMV-RNAs为标记测出AMV-RNAs的分子量如图8。

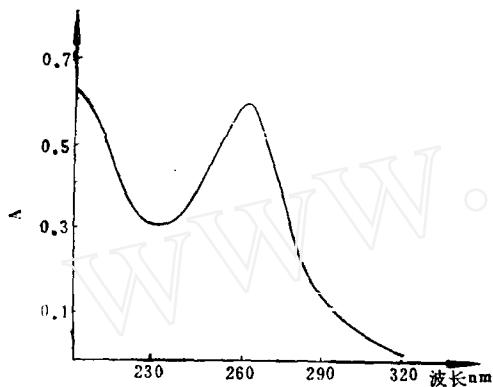


图7 分离物总核酸紫外吸收曲线

Fig 7 UV absorption profile of the total nucleic acids of We

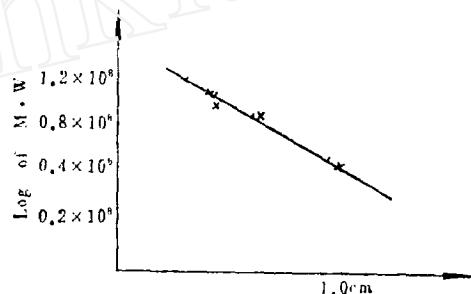


图8 We分离物分子量的确定

Fig 8 Determination of molecular weight of We RNAs. (The migration distance of BMV-RNA₄ is taken as 1)

雀麦花叶病毒RNAs的分子量分别为RNA₁= 1.09×10^6 , RNA₂= 0.99×10^6 , RNA₃= 0.75×10^6 , RNA₄= 0.28×10^6 。以BMV-RNA₄的迁移距离为1cm, 以相对迁移率为横轴, 分子量的对数为纵轴作图, 分别计算出AMV各RNAs的分子量。

图中“X”代表BMV-RNAs自上到下依次为RNA₁到RNA₄, “Z”代表AMV-RNAs, 依次为RNA₁-RNA₄。RNA₁= 1.3×10^6 , RNA₂= 1.0×10^6 , RNA₃= 0.8×10^6 , RNA₄= 0.3×10^6 。

讨 论

We分离物经生物学、血清学、电镜形态观察、病毒粒子电泳和超速离心分析以及对RNAs分子量的测定均充分证明了该分离物是AMV的一个株系。在豇豆、菜豆等一些鉴别寄主上的反应与国外Kreitlow和Price等^[15]报道的黄化斑块(Yellow patch)株系最为接近。但尚需对外壳蛋白氨基酸的组成、数目、序列和特异性抗血清以及不同株系基因组RNAs之间同源性关系比较等方面作进一步的研究后, 才能最后定论。作者所测得的各项数值基本与Hull^[11]及蔡发兴等^[2, 3]的报道一致。

We分离物经电泳染色后扫描形成的4个峰与分析超速离心后出现的4个峰, 参考Bol^[8]和蔡发兴^[2, 3]的图谱, 作者认为第一个峰是B组份-98s, 第二个峰是M组份-82s, 第三个峰是T_b组份-72s, 而第四个峰则是T_a组份-65s。

自1930年以来, 已发现了20多个AMV株系, 这些株系在鉴别寄主上的症状和寄主范围上皆具有一定的差别。有些人试图根据AMV在一到两种经过特殊选择的寄主上的

症状将这些株系划分成组，如 J.A.Milbrath 和 F.P.Mewhorter^[16] 将 23 种分离物根据它们在番茄上的症状分成 4 个组，根据在豇豆上的症状将 26 种分离物分成 2 个组^[17]。Bancroft 等^[6] 将 19 种分离物根据它们在菜豆和豇豆上产生枯斑还是系统侵染分成 4 个组。这些仅利用一到两种寄主症状的细微差别来区分象 AMV 这样易于发生遗传变异的多颗粒三分体基因组病毒正象 F.C.Bawden^[7] 所提出的那样意义不大。1975 年 Krall^[11] 通过对 11 个株系病毒外壳蛋白氨基酸含量的分析，弄清了各种氨基酸的数目，根据各株系氨基酸数目的差异等性状，利用数值分类法，将其中 9 个株系划分成 3 个组。这个结果后来还得到了血清学和内含体等方面研究的进一步证明。

目前关于 AMV-RNAs 分子量的测定已有不少报道，这些报道涉及到不同的测定方法。用凝胶电泳包括聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶，及变性与不变性处理所测得的分子量都比 1977 年 Heitink 等^[10] 利用沉降平衡法和从病毒粒子的重量、蛋白质的含量推算出的平均值偏高，本文报道的数据也是偏高。Heitink 等由此进一步推算出了各种 RNA 组份的核苷酸数目，RNA₁ 为 3250，RNA₂ 为 2250，RNA₃ 为 1950，而 RNA₄ 则是 800。这与 1980 年 Brederode^[8] 对 RNA₄ 的核苷酸序列的研究结果比较一致。Brederode 已将 AMV-RNA₄ 的核苷酸序列全部搞清，共含 881 个核苷酸，其分子量可确切的计算为 0.28×10^6 。由此可知，Heitink 等所测得的其它 RNAs 的分子量也是接近实际的。

参 考 文 献

- [1] 陈永萱, 1984, 南京农学院学报 No.3 : 54—57.
- [2] 蔡兴发等, 1982, 微生物学报, 22(3) : 223—240.
- [3] 蔡兴发等, 1982, 微生物学报, 22(4) : 300—305.
- [4] 张鹤龄等, 1983, 微生物学报, 23(3) : 238—243.
- [5] 魏守生等, 1984, 植物病理学报, 14(2) : 71—78.
- [6] Bancroft, J.B. et al., 1953, *Nature*, 181 : 720.
- [7] Bawden, F.C., 1964, *Plant Virus and Virus Diseases* : 40.
- [8] Bol, J.F. et al., 1971, *Virology* 46 : 73—85.
- [9] Brederode, F.Th. et al., 1980, *Nucleic Acids Research*, 8(10) : 2, 8(10) : 2213.
- [10] Heijtink, R.A. et al., 1977, *Biochem*, 16(21) : 4684.
- [11] Hull, R., 1969, *Advance in Virus Research*, 365.
- [12] Jaspars, E.M.J. et al., 1980, *Alfalfa Mosaic Virus CM/AAB Description of Plant Virus*, P.229.
- [13] Johnson, E.M., 1994, *Phytopathology*, 36, 142.
- [14] Krall, B., 1975, *Virology* 66 : 336.
- [15] Kreitlow, K.W. et al., 1949, *Phytopathology* 39 : 517.
- [16] Milbrath, J.A. et al., 1953, *Phytopathology* 43 : 479.
- [17] Milbrath, J.A. et al., 1954, *Phytopathology* 44 : 498.
- [18] Yu, T.F., 1939, *Phytopathology* 29 : 459.
- [19] Zaumeyer, W.J. et al., 1933, *Phytopathology* 24 : 562.
- [20] Zaumeyer, W.J. et al., 1935, *Jour. Agr. Res.(U.S)* 51 : 715.

STUDY ON ALFALFA MOSAIC VIRUS- WHITE CLOVER ISOLATE (Wc)

Wei Ning-sheng Li Yi

(Dept. of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling)

A virus isolate-Wc has been obtained from diseased white clover which grows in the campus of Northwestern Agricultural University. The Wc isolate only gives necrotic local lesions on bean and cowpea without systematic spread, but systematic on tobacco. The thermal death point is between 50—55°C. The life in vitro is 12—24 hours and the dilution end point is 10^{-2} — 10^{-3} . Under EM, partially purified virus preparation presents five components with uniform width (18—20nm) but different in length (58, 52, 41, 31 and 18—20nm respectively). Four major peaks have been detected on the 3% PAGE after staining with Xylene Brilliant Cyanin G and scanning by visible light, Schlieren and U/V pattern of Wc preparation in the analytical ultracentrifuge give four major peaks with $S_{20,w} = 98, 82, 72$ and $65s$. The whole results suggest that the four major components of Wc isolate are in correspondence with the four well known components B, M, Tb, Ta of AMV. The viral nucleic acids are extracted and purified, the biological activity of the viral nucleic acids are normal. The RNA's molecular weights are also determined by PAGE. The four kinds of viral nucleic acids are $RNA1 = 1.3 \times 10^6$, $RNA2 = 1.0 \times 10^6$, $RNA3 = 1.8 \times 10^6$ and $RNA4 = 0.3 \times 10^6$ dalton. These calculated results may be higher than the actual situation.