维普资讯 http://www.cqvip.com

几种化学药物对柑桔裂皮病类病毒感染和复制的影响

胡康洪 周咏芝 丁达明

（中国科学院武汉病毒研究所，武汉 430071）

提 要

经柑桔裂皮病类病毒(Citrus exocortis viroid，简称CEV)感染后的指示植物爪哇三七(*Cynura aurantiaca*)，分别施用不同浓度的赤霉素（5ppm，10ppm，50ppm，100ppm，200ppm），萘（100ppm，300ppm）、5-氟尿嘧啶（0.5mg/L，1mg/L，2mg/L）溶液，其相对感染指数（Relative infectivity index）均有程度不同的改变。抽提叶片核酸，经5%双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)-银染色法结合凝胶扫描技术确定CEV浓度，辅以点杂交方法定性，观察到施用赤霉素组CEV浓度增高，施用萘组和5-氟尿嘧啶组CEV浓度均降低。用无性繁殖的柑桔苗作材料，CEV感染后分别施用50ppm赤霉素、300ppm萘、1mg/L 5-氟尿嘧啶溶液，用相同的分析方法，得到了与爪哇三七一致的结果。

讨论了这三种药物影响CEV复制的意义。

关键词：柑桔裂皮病类病毒 相对感染指数 聚丙烯酰胺凝胶电泳 点杂交

自1971年Diener在研究马铃薯纺锤体块茎病病原时首先发现类病毒（Viroid）后[1]，在迄今不到二十年的时间里已相继报道发现了15种类病毒。理论上，人们正对其起源与进化，致病与复制机理等课题进行探索性研究；实践上，围绕着病害防治这一亟需解决的实际问题正进行着不懈的努力，如弱毒株疫苗的建立，类病毒抑制剂的选择等。研究药物对类病毒在相应寄主中复制的影响，选择适当的类病毒刺激剂以利于类病毒制备从而开展基础研究，也可能用于弱毒苗生产；而可用作类病毒抑制剂的药物则有可能应用在类病毒病害防治方面。因此，选择适当的药物，探讨药物对类病毒感染和复制的影响有着重要的意义。

1975年以来，先后报道了放线菌素D、α-鹅膏草碱、皂土、草酸盐等无机盐、吖啶橙等染料、病毒唑（Ribavirin）等化学药物对柑桔裂皮病类病毒（CEV）、马铃薯纺锤体块茎病类病毒（PSTV）、黄瓜白果病类病毒（CPFV）、酒花矮化病类病毒（HSV）感染和复制的影响[2~6]，但这些研究均处于定性阶段。本文通过施用几种浓度的赤霉素（GA）、萘（Nal.）、5-氟尿嘧啶（5-FU）溶液，对侵染的寄主植物CEV进行定量，从而能够更精细地确定这三种药物对CEV复制的影响，这里报道的就是这些定量研究的的结果。

本文于1989年6月31日收到。

本实验得到华中农业大学柑桔所向旭同志，本所技术室杨伏生、黎智二位同志及亚病毒室其它同志的大力协助，特致谢意。

维普资讯 http://www.cqvip.com

材料和方法

一、植物材料和CEV毒源

爪哇三七（*Cynura aurantiaca*）：采自本所亚病毒室网室的同一批来源的爪哇三七，经沙土扦插法发根后，置入同一土质的花盆中于温室中培养。温室每天保持15～16小时光照，温度25℃～30℃，相对湿度40%～60%。

无性繁殖的柑桔苗（Cloned citrus seedlings）：由华中农业大学园艺系柑桔研究所惠赠。苗木品种为冰糖橙。所有苗木均为来源于同一母本的无性繁殖系，因而苗木的各项生理生化指标基本一致，株间个体差异可以忽略。

CEV毒源：湖南零陵地区园艺场的患病哈姆林橙叶片，加0.2mol/L Na_2HPO_4/NaH_2PO_4（pH7.8～8.0）缓冲液，研磨成匀浆，4000g离心10分钟，吸取上清即为感染液。

二、CEV的感染和药物的施用

1. 对爪哇三七的感染和施药实验

（1）编组：温室培养二月后的健康爪哇三七，分成A、B_1、B_2、B_3四组。A为不施药的感染对照组，B_1、B_2、B_3为感染CEV后分别施用GA、NaI、5-FU组。每组药物各有几种不同浓度，每种浓度用三株。所用药物浓度对植物不产生任何药害反应，随机编上株号，插上相应标签。

（2）感染实验：参照周咏芝等的方法[7]。将1：1灭菌金刚砂(800目)和硅皂土均匀撒在爪哇三七植株顶端幼叶叶面上，加感染液，接种量0.5ml/株，用无菌棉球沿主脉逆向擦拭叶片表面。

（3）施药实验：感染十天后，用小型喷雾器喷洒各种浓度的GA、NaI、5-FU溶液。喷洒量0.1ml/株次，共喷洒五次，每次间隔二天。

2. 对柑桔实生苗的感染和施药实验

（1）用水培法培养柑桔苗：即用Hongland营养液浸泡苗木根系使其生长。

表1 Hongland营养液配方

Tab 1 The ingredients of Hongland nutritional solution

浓度单位：g/L

大量元素(1000ml)		微量元素母液(1000ml)	
成份	浓度	成份	浓度
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0.94	H_3BO_3	28
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.52	$MnSO_4 \cdot H_2O$	34
KNO_3	0.66	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22
$NH_4H_2PO_4$	0.12	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.0
$EDTA+FeSO_4$	0.07	$(NH_4)_6MoO_4 \cdot 4H_2O$	1.0
($EDTA:FeSO_4$ 9:7)			

用0.1ml微量元素母液与1000ml大量元素混合，加1mol/L KOH调pH至5.7。

编组方法同爪哇三七，每组有三株苗木作重复。

（2）感染和施药实验：感染方法同爪哇三七，感染后换用新的Hongland营养液浸泡苗木，其中B_1、B_2、B_3三组分别加有50ppm GA、300ppm NaI、1mg/L 5-FU。

三、叶片核酸的抽提

维普资讯 http://www.cqvip.com

感染及施药五十天后（注：爪哇三七以最后一次施药之日起计算），每株称其茎尖新生幼叶1克，核酸抽提参照Morris[8]和Semancik[9]等的方法，加抽提液（0.3mol/L Tris，0.6mol/L NaCl，0.2mol/L Glycine）2～5倍，等体积(1：1)氯仿～苯酚，1%SDS研磨成匀浆，3000转/分离心30分钟，收集沉淀，真空干燥。

四、5%双向聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）～银染色及凝胶扫描

1克顶端幼叶组织的核酸抽提物粉末，加100μl无菌ddH_2O，充分溶解，5000 r/m离心15分钟。取20μl上清液加1/5倍体积的上样液：0.2%二甲苯蓝、0.2%溴酚蓝、10%蔗糖，混匀，离心。电泳按照*Schumacher*等的方法[10]。银染色后在UV-300型双光束/差式/双波长分光光度计上于波长480nm处进行凝胶扫描。

五、标准曲线的绘制

Fraser[11]在研究TMV-RNA性质时首先指出：叶片中的TMV-RNA可以通过扫描曲线中TMA-RNA的最大吸收峰面积定量。即：峰面积和该峰所示的RNA浓度成正比。本实验经5% PAGE后，因为胶条上CEV-RNA量太低（不超过50ng/g叶），不能直接进行凝胶扫描，需经银染色提高分辨率后再扫描，其最大吸收峰由260nm变迁至480nm。

取纯的E.coli 5S RNA少许干粉，溶于100μl无菌ddH_2O中后测得$O.D_{260}$，按公式：

$$\text{RNA含量}(ng/\mu l)=\frac{O.D_{260}}{0.024\times\text{比色杯厚度}}\times\text{稀释倍数}$$

从而得知浓度。将之适当稀释成0.25ng/μl、0.50ng/μl、0.75ng/μl、1ng/μl四个浓度，经5% PAGE-银染色后，凝胶在480nm处进行扫描，将峰面积进行积分，从而绘出峰面积～浓度关系的标准曲线。参见图1。

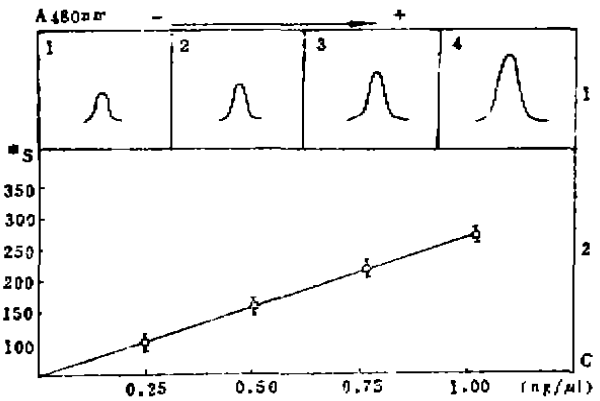

图1 1.四种浓度的E.coli 5s RNA经5% PAGE-银染色后480nm处的扫描图谱
2.依RNA浓度和峰面积的线性关系绘制的标准曲线
*s.扫描面积 每单位扫描面积=0.3cm²
标准曲线为三次重复实验结果的数据平均值，s误差范围±10

Fig 1 1. The corresponding absorption peaks profile at 480nm of four concentrations of E.coli 5sRNA by 5% PAGE-silver staining.
2. Standard curve showing the linearly proportional relation between the concentration of RNA and the area of the peak.
*S means scanning square, 1 unit=0.3cm². There are three repeat experiments in which S error area equal±10. the datum of S in figure is the average one of three data.

六、F_{20}与CEV-RNA的点杂交

DNA自动合成仪（380A型，Applied Biosystem公司，美国）合成与CEV，PSTV等中心保守区段互补的脱氧寡聚核苷酸5'-dAGGTTTCCCCGGGGATCCCT-3'（F_{20}），用[γ-^{32}p]ATP标记5'末端（0.2～0.5×10^5 cpm/ml。杂交方法按Owens等方法[12-14]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

结　果

一、几种浓度的GA、Nal、5-FU分别对CEV在爪哇三七中感染的影响

以相对感染指数（relative infectivity index，简作R.I.I.）和表现病症植株数（number of plants with symptoms，简称N.P.S.）二项指标分析三种药物对CEV感染的影响，结果如表2。

表2表明，和未施药的CEV感染对照组比较，施用GA组R.I.I.和N.P.S均有增加，说明GA刺激了CEV的感染，施用Nal.组N.P.S.不变，但R.I.I.有一定程度的下降；施用5-FU组R.I.I.和N.P.S也下降；说明Nal.和5-FU抑制了CEV的感染。

表2　不同浓度的赤霉素、萘、5-氟尿嘧啶对CEV感染的影响

Tab 2　The influence of different concentrations of GA, Nal. and 5-FU on CEV infection in *C.aurantiaca* plants

药物 Drug	浓度* Con.	表现病症植株数** N.P.S. 感染后天数 Days after inoculation 20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	相对感染指数*** (积加之和) R.I.I. (Sum)
GA (ppm)	5						1	1	1	1	1	1	6
	10			1	1	1	1	2	2	2	2	2	14
	50		1	1	1	2	3	3	3	3	3	3	23
	100		1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	25
	200	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	31
Nal. (ppm)	100				1	1	1	1	1	1	1	1	8
	300							1	1	1	1	1	5
5-FU (mg/L)	0.5				1	1	1	1	1	1	1	1	8
	1									1	1	1	3
	2												0
未施药对照**** Control			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10

* 每种药物浓度共三枝重复

** 感染后30天内表现病症植株数

*** 30天内表现病症的植株病症天数之和

**** 喷洒0.2mol/L Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 缓冲液(pH8.0)代替药物

维普资讯 http://www.cqvip.com

二、几种浓度的GA、Nal、5-Fu分别对CEV在爪哇三七中复制的影响

分别施用50ppm GA、300ppm Nal、1 mg/L 5-FU于CEV感染的爪哇三七，茎尖新生叶片经核酸抽提和5% PAGE-银染色后，480nm处的扫描图谱参见图2。图2表明：施用50ppm GA后，对应的CEV峰明显高于对照，扫描面积 $S_1=77$，$S_0=26$；施用300ppm Nal、和1mg/L 5-FU后对应的CEV峰低于对照，扫描面积分别为：$S_2=18$，$S_0=30$；$S_3=13$，$S_0=25$。经重复实验CEV峰对应的扫描面积误差范围 $S_{误差}=\pm10$，以上结果均为三次重复实验的平均数据（后图同）。

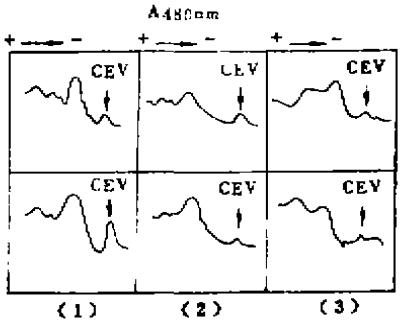

图2 施用50ppm GA（1）、300ppm Nal.(2)、1mg/L 5-FU（3）于CEV感染的爪哇三七、经抽提和5% PAGE-银染色后480nm处的扫描图谱

注：上图为对照组，下图为施药组

Fig. 2 Nucleic acids of leaves of CEV-infected *G. aurantiaca* plants to which applied 50 ppm GA(1); 300 ppm Nal.(2); 1 mg/L 5-FU(3) respectively were extracted and 5% PAGE-silver stained, corresponding absorption peaks profile at 480nm.

• upper figure, control group; lower figure, applied drug group

以与CEV的中心保守区域互补的F_{20}作探针，进行点杂交实验。结果表明：5S RNA和健康爪哇三七为阴性结果，在相同条件下，CEV感染后施用50ppm GA的爪哇三七杂交点强于未施药对照的杂交点，这和图2(1)的扫描结果一致（见图3(1)）。

点杂交结果还表明：在相同条件下，施用1 mg/L 5-FU和300ppm Nal.后的杂交点弱于对照，这和图2（3）、（2）的结果相符（见图3（2））。

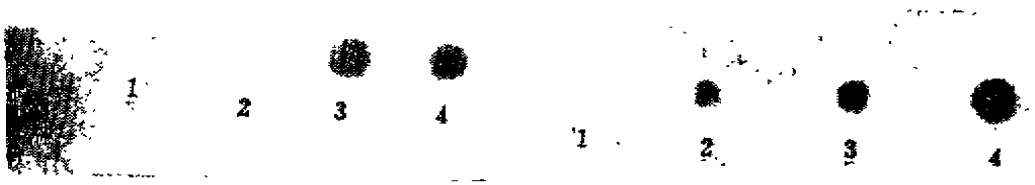

图3 用F_{20}探针的点杂交检测药物对CEV感染的影响

(1) 1.5S RNA 2.健康爪哇三七
3.CEV感染后施用50ppmGA的爪哇三七
4.未施药的CEV感染对照

(2) 1.健康爪哇三七 2.施用1mg/L 5-FU
3.施用300ppmNal.
4.未施药的CEV感染对照

Fig. 3 Detection result of dot-blotting hybridization using F_{20} probe shows that the effect of drugs on CEV replication in infected *G. aurantiaca*

A 1. 5S RNA 2. healthy 3. applied 50ppm GA 4. infected nonapplied drug control

B 1. healthy 2. applied 1mg/L 5-FU 3. applied 300ppm Nal. 4. infected control

维普资讯 http://www.cqvip.com

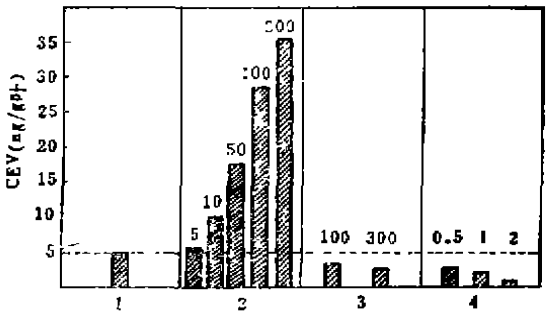

图 4 不同浓度的三种药物对感染的爪哇三七叶片中CEV浓度的影响

1.对照，2.GA（ppm），3 Nal.（ppm）4.5-FU（mg/L）

Fig 4 The influence of different concentrations of three drugs on CEV concentration in infected *G.aurantiaca* leaves

1. Control 2. GA(ppm) 3.Nal.(ppm) 4. 5-FU(mg/L)

将图2中CEV峰进行相对积分，得到相应面积，查图1标准曲线确定CEV浓度。依此方法，绘出不同浓度的药物与CEV浓度的关系图（见图4）。此图表明，GA刺激了CEV复制。在本实验选用的浓度范围内，施用GA浓度愈高，CEV浓度（ng/g叶）愈大。对照组为4.9，施GA组分别为6.2(5ppm)、10.1(10ppm)、17.5（50ppm）、28（100ppm）、36.6（200ppm）；Nal.和5-FU抑制了CEV复制，并且在本实验选用的浓度范围内，施用浓度愈高，CEV浓度（ng/g叶）愈小。Nal.为3.7（100ppm）、2.9(300ppm)；5-FU为3.0（0.5mg/L）、2.2(1mg/L)、1.3（2mg/L）。

三、50 ppm GA、300 ppm Nal.、1 mg/L 5-FU对CEV在无性繁殖的柑桔苗中复制的影响

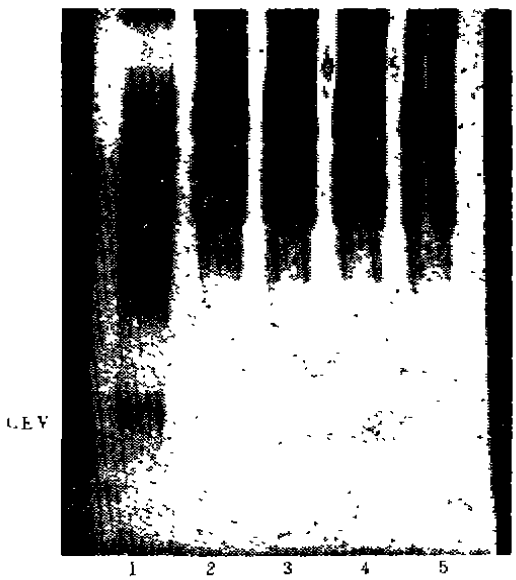

图 5 四株柑桔苗叶片核酸提物5% PAGE-银染图谱

1.用作标准对照的CEV感染的爪哇三七

2,3,4,5. 无性繁殖的柑桔苗

Fig. 5 5% PAGE-silver stained pattern of nucleic acids extracted from

1.CEV-infected *G.aurantiaca* 1 avis used as standard control

2, 3, 4, 5.Cloned citrus seedling leaves

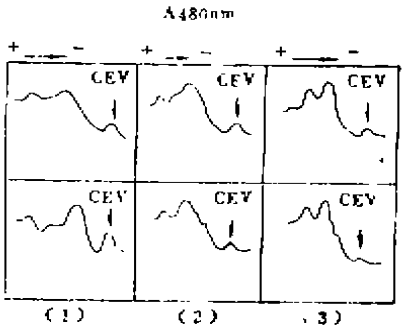

图 6 施用50ppm GA（1）、300ppm Nal.（2）、1mg/L 5-FU（3）于CEV感染的无性繁殖柑桔苗，经抽提的5% PAGE-银染色后480nm处的扫描图谱

注：上图为对照组 下图为施药组

Fig 6 Nucleic acids of leaves of CEV-infected cloned citrus seedlings to which applied 50 ppm GA(1), 300 ppm Nal. (2), 1mg/L 5-FU(3) respectively were extracted and 5% PAGE-silver stained, corresponding absorption peaks profile at 480nm.

* upper figure, controlgroup; lower figure, applied drug group.

维普资讯 http://www.cqvip.com

冰糖橙苗木无性繁殖系，经核酸抽提和5％ PAGE银染色后，检测表明不存在特有的CEV谱带，表明该繁殖系是健康苗系（见图5）。

CEV感染后分别施用50ppm GA、300ppm NaI、1 mg/L 5-FU，苗木茎尖新生叶片经核酸抽提和5％PAGE-银染色后，480nm处的扫描图谱见图6。图6和图2类似，也表明50ppm GA刺激了CEV复制，扫描面积$S_1=54$，$S_0=24$；300ppm NaI。和1 mg/L 5-FU则对CEV复制有一定抑制作用，$S_2=17$，$S_0=31$；$S_3=9$，$S_0=22$。

图7点杂交结果表明，未经CEV感染的柑桔苗为阴性结果，说明是健康苗系，与图6相符。在相同条件下，CEV感染后施用50ppm GA的柑桔苗杂交点强于对照，这和图6（1）的扫描结果一致。

用绘制图4的方法，绘出特定浓度的三种药物对CEV浓度影响的关系图，见图8。结果表明：50ppm GA作用后CEV浓度（ng/g叶）增加了二倍，从对照的4.8增加到14.2；而300ppm NaI。和1 mg/L 5-FU作用后CEV浓度都降低，分别为2.8及1.3。

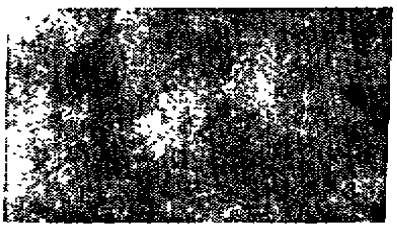

图7 用F_{21}探针作点杂交检测GA对CEV感染的影响
1.未经CEV感染的柑桔苗
2.未施药的CEV感染柑桔苗对照
3.CEV感染后施用50ppmGA的柑桔苗
Fig 7 Detection results of dot-blotting hybridization using F_{21} probe show that the effect of GA on CEV replication in cloned citrus seedlings
1.healthy 2.infected control 3.applied 50ppm GA

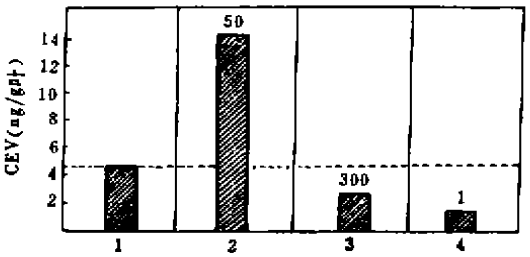

图8 三种药物对感染的无性繁殖柑桔苗叶片中CEV浓度的影响
1.对照；2.GA 50ppm；3.NaI。300ppm；4、5-FU 1mg/L
Fig 8 The influence of three drugs on CEV concentration in infected cloned citrus seedling leaves
1. control 2、50ppm GA 3、300ppm NaI。4、1mg/L 5-FU

讨　论

一、GA对CEV复制的影响

Rodriguez等人[15]曾以爪哇三七为材料，发现CEV感染后GA导致相对感染指数增加。但其实验有二点缺陷：（1）没有明确指明所施用GA的浓度；（2）没有用生物化学、分子生物学手段对感染叶片的CEV进行精确定量，因而难以分析GA对CEV复制的影响。本实验弥补了这些缺陷，结果表明CEV复制受GA的刺激且浓度随着所施GA浓度的递增而增高，其原因是否由于GA诱导了植物茎尖细胞的旺盛分裂，导致了CEV在总量上高于对照组？这尚有待对茎尖组织细胞作显微结构分析来证明，因为类病毒病的最重要

维普资讯 http://www.cqvip.com

特征就是涉及体内激素水平的紊乱[16-18]，所以深入研究植物激素-类病毒相互关系，有可能成为最终阐明类病毒复制和致病机理的突破口[19]。

二、NaI_4和5-FU对CEV复制的影响

从国内外现在的研究水平看，尚未找到一种对CEV感染产生专一性抑制作用的有效药物。由于没有弄清类病毒致病和复制的机理，人们只能随机选用各种化学药物（如核苷酸衍生物、氨基酸、抗生素、无机及有机盐等）进行尝试。因此药物筛选工作具有一定的盲目性。Toshimichi[5]曾选用对烟草花叶病毒（TMV）有一定抑制效果的草酸盐类和染料，考察其对酒花矮化病类病毒（HSV）侵染的效应，发现有轻微的抑制效果。但一般认为类病毒从本质上不同于植物病毒，因此抑制剂的选择有其独特性，而不能照搬一般植物病毒抑制剂。

本实验结果显示，所用浓度的NaI_4和5-FU均对CEV复制产生一定的抑制作用。5-FU是熟知的RNA合成抑制剂，对CEV的抑制很可能是非特异性的；NaI_4的抑制作用有待更深一步的研究，但非特异性抑制的可能性较大。如果选用各种浓度的NaI_4或5-FU进行作用，寻找到对CEV抑制作用最大而对宿主药害影响最小的临界浓度值，则有可能应用到生产实践中去。另外，本实验所建立的方法，可用于其它CEV抑制药物的筛选。

参 考 文 献

〔1〕 Diener, T.O., 1971, *Virology* 45：411.
〔2〕 Diener, T.O., Smith, D.R., 1975, *Virology*, 63：421.
〔3〕 Mülbach, H.P., Sänger, H.L., 1979, *Nature* 278：185.
〔4〕 Lin, J.J., Semancik, J.S., 1985, *Virus Research* 3：213.
〔5〕 Toshimichi, Y. et al., 1985, 日植病报, 51：405.
〔6〕 Belles, J.M., Hansen, A.J., 1986, *Physiol.Mol.Plant Pathol.*, 28：61.
〔7〕 周咏芝等, 1987, 病毒学报, 3：277.
〔8〕 Morris, T.J., Wright, N.S., 1975, *Am.Potato J.*, 52：57.
〔9〕 Semancik, J.S. et al., 1975, *Virology*, 63：160.
〔10〕 Schumacher, J.et al., 1983, *Analytical Biochem.*, 135：288.
〔11〕 Fraser, R.S., 1971, *Virology*, 45：804.
〔12〕 Owens, R.A.et al., 1978, *Virology* 89：388.
〔13〕 张奇亚等, 1986, 病毒学杂志, 1(4)：93.
〔14〕 周咏芝等, 1988, 生物化学与生物物理学报, 20：179.
〔15〕 Rodriguez, J.L. et al., 1978, *Physiol.Plant Pathol.*, 13：355
〔16〕 Flores, R., Rodriguez, J.L., 1981, *Phytopathology*, 71：964.
〔17〕 Yaguchi, S., Takahashi, T., 1985, *Pflanzenkr.pflanzenschtz*, 92：263.
〔18〕 Diener, T.O., 1981, *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 32：313.
〔19〕 胡康洪等, 1987, 中科院武汉分院首届青年生物学工作者学术讨论会论文摘要汇编, p.25—26.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Effect of Some Chemicals on Infectivity and Replication of Citrus Exocortis Viroid

Hu Kang-hong Zhou Yong-zhi Ding Da-ming

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Gynura aurantiaca plants infected by citrus exocortis viroid (i.e. CEV) were applied in different concentrations of exogennous gibberellin (GA, 5ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 200ppm), naphthalene (Nal., 100ppm, 300ppm), 5-flurouracil (5-FU, 0.5mg/L, 1mg/L, 2mg/L) solutions respectively. It was found that the relative infectivity indexes of plants had to some extent been changed. Nucleic acids of young leaves were extracted and subjected to 5% bidirectional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) followed by silver staining. CEV concentration was determined by using the gel scanning technique, companied with dot-blot hybridization. It was observed that CEV concentration had increased in applied GA group but decreased in applied Nal. group and in applied 5-FU group. Similarly, cloned citrus seedlings were applied by 50ppm GA, 300 ppm Nal., 1mg/L 5-FU respectively after CEV inoculation. The result is the same.

The significance about the effect of the three kinds of drug on CEV replication was discussed.

Key words: Citrus exocortis viroid(CEV) Relative infectivity index Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) Dot-blot hybridization