第9卷 第4期 中国病毒学 Vol. 9 No. 4
1994年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1994

# 含卫星RNA的黄瓜花叶病毒弱株系的分离鉴定及在病毒病防治上的应用

周雪平[1] 濮祖芹[2] 方中达[2]

[1](浙江农业大学生物技术研究所，杭州 310029)
[2](南京农业大学植保系，南京 210014)





**提要** 从豌豆上分离获得黄瓜花叶病毒分离物CMVP1，摩擦接种9科29种植物，CMVP1在大多数植物上症状很轻或无任何症状，提纯的病毒颗粒为球形，直径约28nm，病毒衣壳蛋白亚基分子量约27.5kD，所含核酸有五个组份，即CMVP1含有卫星RNA。CMVP1接种三生烟后8—12天内呈轻花叶，此时组织中病毒含量最高，随后症状消失。去除卫星RNA能加重CMVP1在番茄上的症状，因而是卫星RNA减轻了CMVP1的病状。当CMVP1保护接种番茄后攻强毒，番茄发病率低，病情轻，保护率达90%以上，并有一定的刺激生长作用，还能提早开花4天，植株结果数增多，成熟果实的颜色、形态、品质和重量均正常。CMVP1对烟草亦具有很好的保护效果。保护接种的植株能明显减少强毒株侵染，可减少90%以上。

**关键词** 黄瓜花叶病毒，卫星RNA，交叉保护

黄瓜花叶病毒(CMV)株系繁多，寄主范围十分广泛，能侵染774种植物，且在多种经济作物上都可以造成严重危害。CMV病毒颗粒包裹有三种基因组RNA(RNA1—3)和亚基因组RNA4。1976年，Kaper等发现有些CMV病毒颗粒中还含有第5种RNA，即卫星RNA[1]，卫星RNA依赖于CMV才能复制，并干扰辅助病毒复制，影响寄主病状表现，因而被看作分子寄生物用于病毒病生防[2,3]。

近年来，我国番茄、辣椒、烟草等作物的病毒病十分严重，且大多由CMV引起，给这些作物造成了很大的损失，为解决生产上的这些问题，作者开展了CMV生防研究，并分离获得了含卫星RNA的分离物CMVP1，CMVP1在多种植物上病状极轻，利用CMVP1防治黄瓜花叶病毒的研究已进入田间小区试验，现将研究结果报道如下：

## 材料与方法

1 **毒原的分离、纯化与鉴定** 弱株系CMVP1分离自豌豆(*Pisum sativum*)，经苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)三次单斑分离纯化，并经CMV抗血清鉴定，纯化鉴定后的毒原繁殖保存于番茄(*Lycopersicon esculentum*)。强毒株CMVRB由作者分离鉴定。

2 **CMVP1在寄主植物上的反应** 按常规方法摩擦接种后观察症状反应，无症植株用苋色藜回接。

3 **病毒提纯及电镜观察** 参照裴美云等[4]的方法提纯病毒，提纯病毒悬浮于去离子水中。提纯病毒用2% pH5.0醋酸铀负染后置电镜下观察。

本文于1993年7月22日收到，9月2日修回

**4 病毒外壳蛋白亚基分子量测定** 采用SDS-聚丙稀酰胺凝胶电泳，标准蛋白为中科院上海生化所产品。

**5 病毒核酸组份分析** 提纯病毒用酚、氯仿提取核酸后进行琼脂糖水平平板电泳，胶浓度为1.2%，经0.1%甲苯胺蓝染色后无菌水脱色，用CS-930双波长薄层扫描仪扫描，波长为560nm。

**6 CMVP1在三生烟上的病状观察及组织中浓度测定** 三生烟接种CMVP1后的第4、8、12、16、20、25、30、40、50和60天用枯斑寄主苋色藜测定新生叶中病毒浓度，并观察症状。测定浓度时，用直径1cm的打孔器随机打取2片叶园片，加入100μl 0.01mol/L磷酸缓冲液，接种苋色藜。

**7 卫星RNA对CMVP1病状的影响** 提取的核酸经1.2%琼脂糖电泳后，去除卫星RNA，回收其它组份，接种番茄，同时以不去除卫星RNA的核酸抽取液接种作对照，观察症状。

**8 交叉保护试验** 用感染CMVP1的三生烟叶汁液摩擦接种番茄、三生烟、心叶烟和普通烟等作物，接种后间隔一定天数后摩擦接种CMVRB，同时以CMVP1和CMVRB单独接种及不接种植株作对照。

**9 CMVP1在番茄上的安全性测定** 将CMVP1与TMV混合接种番茄，观察植株生长，同时以CMVP1和TMV单独接种作对照。

**10 CMVP1保护接种对强毒株侵染性的影响** 将豌豆和蚕豆分为二组，一组接种CMVP1，另一组不接种，15天后同时接种CMVRB，记录接种叶上的枯斑数。

## 结 果

**1 CMVP1在寄主植物上的反应** 摩擦接种9科29种植物，CMVP1在大多数植物上症状很轻或不表现症状(表1)。产生枯斑和褪绿斑症状的植株，枯斑及褪绿斑数均较少。产生花叶症状的植株往往只在接种早期呈轻花叶，后期基本无症。CMVP1侵染番茄、三生烟等作物后几乎无症，叶片大小与健康植株相似，甚至稍大，而同期接种的强毒株CMVRB则产生严重症状(图1，图2)。

**2 病毒提纯及电镜观察** 提纯的病毒呈典型的核蛋白紫外吸收曲线，但病毒含量较低，只有同期接种的强毒株的1/4。提纯病毒颗粒为球形，直经约28nm(图3)。

**3 病毒衣壳蛋白亚基的分子量测定** 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定，病毒衣壳蛋白亚基只有一个组份，分子量约27.5kD(图4)。

**4 病毒核酸组份分析** 提纯的病毒抽提核酸后进行电泳，证明CMVP1的核酸含有五个组份(图5)，即CMVP1含有卫星RNA。

**5 CMVP1在三生烟上的病状变化及组织中浓度测定** CMVP1接种三生烟后8—16天内表现轻花叶，然后症状消失，第20天植株不显任何症状，植株生长正常(表2)。CMVP1在三生烟中的浓度，第四天开始增加，第12天达最高峰，第60天几乎测不到病毒，证明CMVP1在接种植物中的症状表现与感染组织中病毒浓度变化成正相关。

**6 卫星RNA对CMVP1病状的影响** 抽提的CMVP1核酸电泳后去除卫星RNA，其余组份接种番茄，番茄产生校重的花叶症状，叶片明显变小，而未去除卫星RNA的核酸接种番茄后几乎无症状(图6)，证明是卫星RNA减轻了CMVP1在寄主植物上的症状。

**7 CMVP1在番茄上的交叉保护试验** 用CMVP1保护接种的番茄(早魁苏茄)攻强毒，保护的植株发病率低，病情轻，保护率可达90%以上，且株高、株幅均大于健康植株，开花期可提前4天(表3)，说明CMVP1对强毒株具有很好的保护效果，并对植株有一定的刺激作用。保护接种的番茄结果数增多，果实颜色、形态、品质和重量与对照均无差异(图7)，果实可提前成熟数天。CMVP1在其它番茄品种上的保护效果与早魁苏茄相似，保护率一般都在90%以上。

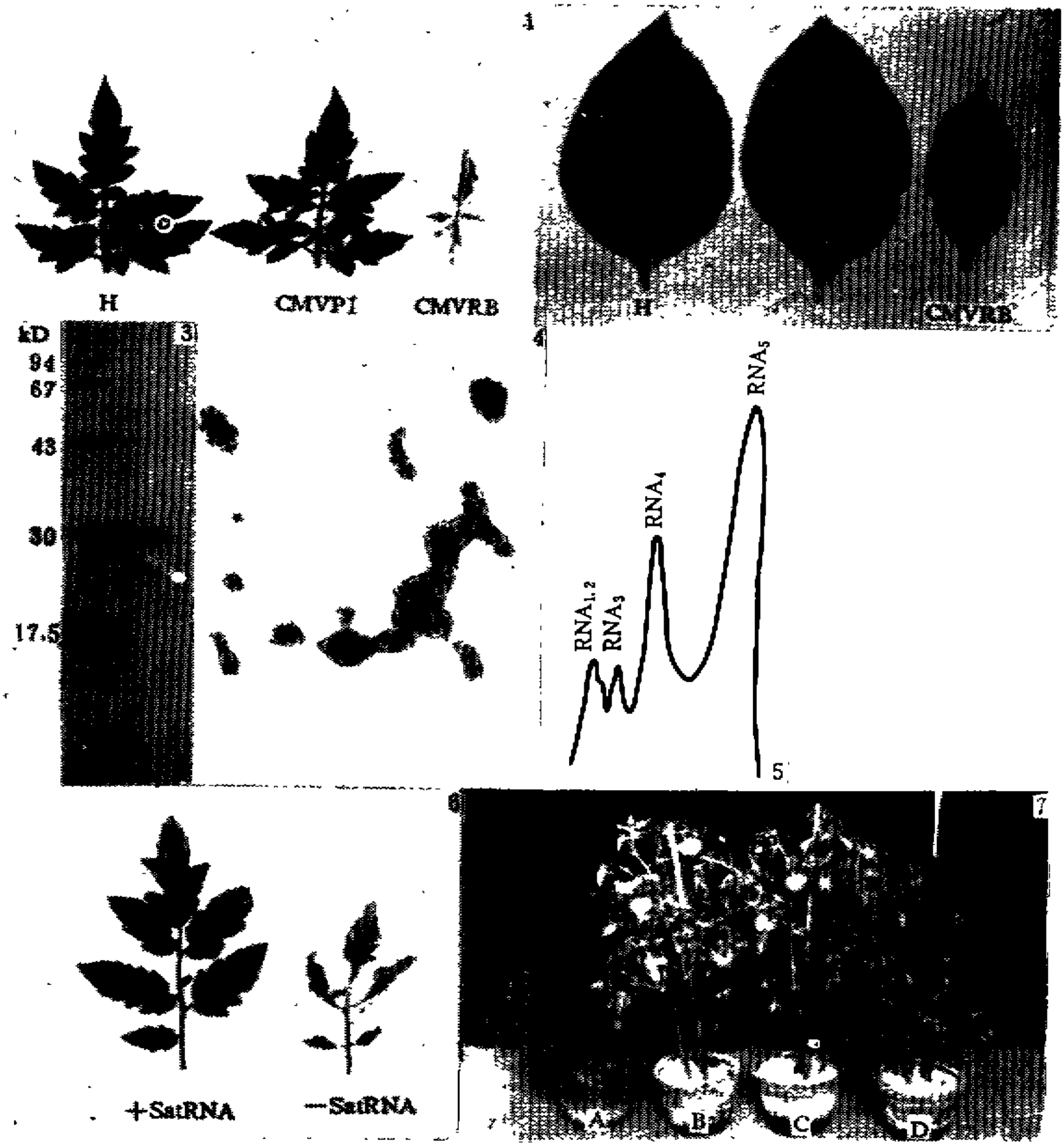


图1　CMVP1在番茄上的症状

Fig 1　Symptoms induced by CMVP1 in tomato

图2　CMVP1在三生烟上的症状

Fig2　Symptoms induced by CMVP1 in *N. tabacum*-Samsum

图3　提纯病毒粒体形态

Fig 3　Electron micrograph of purified virus particles

图4　CMVP1衣壳蛋白亚基的分子量测定

Fig 4　Molecular weight measurement of coat protein of CMVP1 on SDS-polyacrylamide gels,(A)Protein markers,(B)Coat protein of CMVP1

图5　CMVP1核酸组份的电泳扫描曲线

Fig 5　Pattern of the RNAs of CMVP1 on 1.2% agrose gel electrophoresis

图6　卫星RNA对CMVP1病状的影响

Fig 6　Changes in symptoms on tomato infected with CMVP1

图7　CMVP1在早魁苏茄上的保护效果

Fig 7 Protection test of CMVP1 on tomato CV. Zao Kui Su

(A) No protected and challenged,(B) Protected and no challenged,(C) Protected and ,challenged after 15 days, (D) Healthy

表 1 CMVP1 在寄主植物上的症状反应

Table 1 Symptoms in different plant species induced by CMVP1

| 植物 Species | 症状 Symptoms | 植物 Species | 症状 Symptoms |
|---|---|---|---|
| 豆科 Leguminosae | | 丝瓜 *Luffa cylindrica* | mM/YS |
| 蚕豆 *Vicia faba* | chl/Br | 苋科 Amaranthaceae | |
| 豇豆 *Vigna unguiculata* | mM/O | 千日红 *Gomphrena globosa* | O/O |
| 豌豆 *Pisum sativum* | O/O | 十字花科 Cruciferae | |
| 菜豆 *Phaseolus vulgaris* | mM/O | 青菜 *Brassica chinensis* | —/— |
| 赤豆 *Phaseolus angularis* | O/O | 番杏科 Aizoaceae | |
| 绿豆 *Phaseolus mungo* | —NL | 番杏 *Tetragonia expensa* | —/YS |
| 扁豆 *Dolichus lablab* | mM/O | 茄科 Solanaceae | |
| 大豆 *Glycine max* | —/— | 番茄 *Lycopersicum esculentu* | O/mCr |
| 藜科 Chenopodiaceae | | 辣椒 *Capsicum annuum* | mM/O |
| 昆诺藜 *C. quinoa* | —/NL | 普通烟 *Nicotiana tabacum* | mM/O |
| 苋色藜 *C. amaranticolor* | —/NL | 三生烟 *N. tabacum*-Samsum | O/O |
| 甜菜 *Beta vulgaris* | —/NL | 心叶烟 *N. glutinosa* | mM/O |
| 菠菜 *Spinacia oleracea* | O/O | 矮牵牛 *Petunia hybridum* | mM/O |
| 菊科 Compositae | | 大千生 *Nicandra physalodes* | mM/O |
| 百日菊 *Zinnia elegans* | —/— | 曼陀罗 *Datura stramonium* | —/— |
| 葫芦科 Curcurbitaces | | 伞形花科 Umbelliferae | |
| 黄瓜 *Cucumis sativus* | —/— | 青芹菜 *Apium graveolens* | O/O |

注：系统叶症状/接种叶症状；Br：褐色环斑；Chl：褪绿斑；NL：坏死斑；mCr：轻微皱缩；mM：轻花叶；YS：黄斑；—：不侵染；O：无症带毒

Note: systemic symptoms/local symptoms; Br: browning ringspot; Chl: chlorotic lesions; NL: necrotic lesions; mCr: mild crinkle; mM: mild mosaic; YS: yellow spots; —: no infection; O: symptomless.

表 2 三生烟接种 CMVP1 后的症状变化与组织中浓度测定

Table 2 Changes of symptoms and virus infectivity in *N. tabacum*-Samsum inoculated with CMVP1

| 接种后天数 Days after inoculation | 病状 Symptoms | 侵染性(枯斑数) Infectivity(lesions) |
|---|---|---|
| 4 | 0 | 10 |
| 8 | 轻微花叶 mM | 48 |
| 12 | 轻微花叶 mM | 103 |
| 16 | 轻微花叶 mM | 31 |
| 20 | 0 | 17 |
| 25 | 0 | 8 |
| 30 | 0 | 4 |
| 35 | 0 | 4 |
| 40 | 0 | 5 |
| 50 | 0 | 2 |
| 60 | 0 | 1 |

表 3　CMVP1 在早魁苏茄上的交叉保护试验

Table 3　Protection test of tomato CV. Zao Kui Su against virulent CMV strain by pre-inoculation with CMVP1

| 接种弱株系日期 Inoculation date with CMVP1 | 攻毒日期 Inoculation date with CMVRB | 间隔天数 Days of protection | 株高 (cm) Plant height | 株幅 (cm) Plant width | 发病率 (%) Percentage of diseased plants | 病情指数 (%) Disease index | 保护率 (%) Protective rate | 开花期 Date of flowering | 比对照提提前天数 Flowering phase shown early |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10/18 | 10/23 | 5 | 41.3 | 25.7 | 44.4 | 8.9 | 90.9 | 12/1 | 4 |
| 10/18 | 10/28 | 10 | 40.9 | 27.0 | 22.2 | 4.4 | 95.5 | 11/31 | 5 |
| 10/18 | 11/2 | 15 | 43.7 | 28.1 | 22.2 | 4.4 | 95.5 | 12/1 | 4 |
| 10/18 | 11/7 | 20 | 40.9 | 27.2 | 22.2 | 4.4 | 95.5 | 12/1 | 4 |
| 10/18 | 11/17 | 30 | 40.4 | 28.2 | 22.2 | 8.9 | 90.9 | 12/1 | 4 |
| 10/18 | — | — | 42.9 | 27.7 | 44.4 | 8.9 | 90.9 | 12/1 | 4 |
| — | 10/18 | — | 20.9 | 13.9 | 100 | 97.8 | — | 12/20 | — |
| — | — | — | 36.3 | 25.7 | — | — | — | 12.5 | — |

**8　CMVP1 在番茄上的安全性测定**　田间植株常常会发生复合侵染，为了确定 CMVP1 是否会加重其它病毒在番茄上的症状，我们将 CMVP1 与番茄上另一常见病毒 TMV 进行了混合接种，结果表明，TMV 与 CMVP1 混合接种后症状与 TMV 单独接种相同(表 4)，说明 CMVP1 不会加重 TMV 在番茄上的症状，而强株系与 CMV 混合接种后产生的症状明显较 TMV 单独接种重。

表 4　CMVP1 与 TMV 在番茄上的复合侵染试验

Table 4　Mixed infection of CMVP1 with TMV in tomato

| 处理 Treatment | 株高 Plant height | 株幅 Plant width | 发病率 Percentage of diseased plant | 病情指数 Disease index |
|---|---|---|---|---|
| TMV | 13.8 | 10.5 | 100 | 65 |
| CMVP1+TMV | 14.0 | 10.0 | 100 | 65 |
| CMVRB+TMV | 8.8 | 6.3 | 100 | 95 |
| CMVP1 | 19.5 | 15 | — | 10 |

**9　CMVP1 在烟草上的交叉保护试验**　CMVP1 保护接种三生烟、心叶烟和普通烟，然后用强株系攻毒，结果表明，CMVP1 在三种烟草上都具有较好的保护效果(表 5)，而在三生烟上的保护效果最佳，保护率达 95%以上。同番茄相似，CMVP1 对三生烟也具有一定的刺激作用。

**10　CMVP1 保护接种对 CMVRB 侵染性的影响**　保护接种 CMVP1 的豌豆和蚕豆，15 天后接种 CMVRB，由于 CMVP1 在豌豆和蚕豆上不产生枯斑症状，而 CMVRB 则产生局部枯斑症，因此接种叶产生的枯斑为 CMVRB 侵染所致。同未保护接种相比，保护接种的蚕豆和豌豆上产生的枯斑数仅为对照的 6.6%和 6.5%，说明 CMVP1 可明显减少 CMVRB 的侵染。

表5 CMVP1在三生烟、普通烟和心叶烟上的交叉保护试验

Table 5 Protection effect of CMVP1 in tobaccos

| 植物 Plant species | 弱毒株系接种日期 Inoculation date with CMVP1 | 强株系接种日期 Inoculation date with CMVRB | 株高 (cm) Plant height | 发病率 (%) Percentage of diseased plant | 病指 (%) Disease index | 保护率 (%) Protective rate |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 三生烟 *N. tabacum* -Samsum | 1/12 | 1/19 | 42.7 | 33.8 | 8.3 | 91.3 |
| | 1/12 | 1/22 | 43.3 | 16.7 | 4.2 | 95.6 |
| | 1/12 | — | 43.3 | 16.7 | 4.2 | — |
| | — | 1/22 | 20.3 | 100 | 95.8 | — |
| | — | — | 40.5 | — | — | — |
| 普通烟 *N. tabacum* | 1/12 | 1/19 | 30 | 50 | 2 | 68.8 |
| | 1/12 | 1/22 | 29 | 83.3 | 16.7 | 81.2 |
| | 1/12 | — | 30 | 50 | 16.7 | — |
| | — | 1/12 | 15.2 | 100 | 88.9 | — |
| | — | — | 30.7 | — | — | — |
| 心叶烟 *N. glutinosa* | 1/12 | 1/19 | 19.3 | 100 | 25 | 75 |
| | 1/12 | 1/22 | 18.9 | 100 | 25 | 75 |
| | 1/12 | — | 21 | 100 | 25 | — |
| | — | 1/12 | 6 | 100 | 100 | — |
| | — | — | 21.3 | — | — | — |

## 讨论

从豌豆上分离的CMVP1在大多寄主植物上症状很轻，核酸分析表明CMVP1含有卫星RNA。番茄、三生烟、普通烟、心叶烟保护接种CMVP1后可抵抗强毒株的侵染，在番茄和三生烟上的保护率达90%以上。番茄保护接种后5天至30天攻强毒，均获得了较高的的保护率，且还能刺激植物生长，提早开花及成熟，保护后的番茄植株的果实生长正常，结果数增多，这些结果表明CMVP1可用于CMV生防。目前CMVP1的生防应用已进入田间小区试验。田波等用卫星RNA组建获得了弱株系CMVS-51和CMVS-52，并将其用于田间青椒和烟草病毒病防治[2,5,6]。作者从田间豌豆上分离获得了含卫星RNA的CMVP1，并证明CMVP1可用于生防，这在国内是首次报道。

国内不少学者报道浸根接种CMVS-52具有较好的保护效果，作者的测定表明浸根和蚜传接种CMVP1，由于其接种效率差，而无法发挥保护作用。

对三生烟的研究表明，CMVP1的病状与组织中浓度成正相关。CMVP1在大多数植物上的病状很轻，作者认为是卫星RNA干扰所致，因为当去除卫星RNA后，CMVP1在番茄上可产生较重的症状。研究表明，CMVP1保护接种后攻强毒，虽然不能完全抑制强毒株的侵染，但明显减少了强毒株的侵染，强毒株在保护接种植株中含量只有未保护的6.5%，这就可以解释为什么CMVP1对强毒株具有很高的保护率。

卫星RNA保护作用可从两个方面解释，一是减轻辅助病毒的症状，二是保护植物免受或减少外来病毒的侵染[7-10]，其保护效果取决于攻强毒时被保护植物组织中卫星RNA与病毒基因组RNA的相对比例，组织中卫星RNA合成量高，保护效果好，含卫星RNA的生防制剂

CMVP1用于田间病毒病防治时只需苗期一次接种即可使植物终生获得保护效果。由于CMVP1在番茄和三生烟上具有一定的刺激生长作用,且接种越早刺激作用越明显,因此作者建议在四叶期接种弱毒疫苗。

CMV寄主范围广,且在多种植物上造成严重危害,目前尚没有有效办法进行防治,CMVP1的分离获得可望在今后用于番茄、辣椒和烟草等作物的病毒病防治,解决生产上亟待解决的问题,因而具有重要的应用价值。

## 参 考 文 献


1 Kaper J M, Waterworth H E. Cucumber mosaic virus associated RNA5; Causal agent for tomato necrosis. Science, 1977; 196(4288):429—431

2 邱并生,田波,丘艳,等.植物病毒卫星RNA及其在病毒病生物防治上的应用 I.用加入卫星RNA的方法组建成黄瓜花叶病毒的疫苗.微生物学报,1985;25(1):87—88

3 Gallitelli D, Vovlas C, Martelli G, et al. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus; Ⅱ. Field test under natural epidemic conditions in southern Italy. Plant Dis, 1991; 75(1):93—93

4 裴美云,邱并生,谢洁,等.哈密瓜花叶病毒病的研究 I.病原学.植物病理学报,1982;12(4):27—32

5 田文会,曹右光,孙茜,等.卫星RNA作为黄瓜花叶病毒的生防因子 Ⅱ.含有卫星RNA的黄瓜花叶病毒S51的某些生物学特性的研究.植物病理学报,1985;15(3):145—149

6 崔泳汉,何明花,韩珍淑,等.黄瓜花叶病毒卫星RNA生防制剂在烟草上的防病作用.病毒学杂志,1989,4(3):304—307

7 Kaper J M, Tousignant M E. Cucumber mosaic virus-associated RNA5 I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA5 with virions. Virology, 1977;80(1):186—195

8 康良仪,毋谷穗,徐水蝉,等.带卫星RNA黄瓜花叶病毒保护接种的植物中病毒积累与基因组RNA合成及病状表达.病毒学报,1988;4(1):45—52

9 杨希才,覃秉益,梁锡娴,等.卫星RNA作为黄瓜花叶病毒病生防因子的研究 Ⅱ.卫星RNA对黄瓜花叶病毒感染的烟叶组织中病毒双链RNA含量的影响.微生物学报,1986;26(2):120—126

10 Mossop D W, Francki R I B. Survival of a satellite RNA in vivo and its dependence on cucumber mosaic virus for replication. Virology, 1978; 86(2):562—566


# Isolation of a Mild Strain of CMV with Satellite RNA and Cross Protection against Virulent Strains


Zhou Xueping　Pu Zuqin　Fang Zhongda

[1](*Institute of Biotechnology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou* 310029)

[2](*Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210014)



A CMV isolate (CMVP1) containing satellite RNA was obtained from pea (*Pisum sativum*) in Jiangsu province in 1990. Twenty-nine plant species representing nine families were inoculated mechanically with CMVP1 and no symptoms or only mild symptoms were found. In *Nicotiana tabacum*-Samsum, CMVP1 caused slight mosaic 8—16 days after inoculation and the infectivity reached the highest level at this time then the symptoms disappeared and the infectivity decreased. When satellite RNA was eliminated by electrophoresis, CMVP1 caused severe symptoms in tomato, so mild symptoms of CMVP1 in plant species were controlled by satellite RNA. In greenhouse cross protection tests, tomato plants were first vaccinated with CMVP1 and challenge-inoculated with a virulent strain 5 to 30 days later, the disease incidence of vaccinated plant decreesed by 77.80% and the protective rate of the vaccination was higher than 90%. The average height and width of vaccinated plants were greater than those of healthy plants, so vaccination with CMVP1 had some favourable effects on tomato growth. Vaccinated plants flowered four days earlier and the fruit shape, color and weight were as normal as that of healthy plants. No synergistic effects were observed in mixed infection of CMVP1 and TMV, which is another common virus in tomato. High protective effects were also observed in tobaccos. Preinoculation of CMVP1 could decrease infectivity of virulent strain by more than 90%.

**Key words** Cucumber mosaic virus, Satellite RNA, Cross protection