

# 黄瓜绿斑驳病毒人工诱变方法的研究

钟 敏, 赵 绪 生, 何 乙 坤, 王 亚 南, 曹 克 强

(河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001)

**摘 要:**以黄瓜绿斑驳病毒(Cucumber green mottle mosaic virus)野生株系为试材,采用高温处理、亚硝酸处理及复合处理对其进行人工诱变,比较3种诱变方法致弱效果。结果表明:3种方法均具有削弱病毒群体在莧色藜上枯斑扩展的能力,野生株系接种莧色藜后,直径小于1 mm 枯斑比率为1.99%,亚硝酸处理、高温处理、复合处理小枯斑比率分别为11.41%、12.87%、14.20%,复合处理致弱效果最好。该结果有助于快速有效的筛选CGMMV弱毒株,也将为弱毒疫苗的开发和致病相关基因功能的研究奠定基础。

**关键词:**黄瓜绿斑驳病毒;人工诱变;弱毒株

**中图分类号:**S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0108-04

黄瓜绿斑驳病毒(Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)是一种正单链RNA病毒,直杆状(300 nm×18 nm),属烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*),为典型的种传病毒<sup>[1-3]</sup>,严重威胁着西瓜生产,2006年12月农业部确定CGMMV为中国检疫性有害生物(农业部公告第788号)<sup>[4]</sup>。主要侵染葫芦科作物,使植株生长缓慢、矮化,结果延迟,严重的导致不育;叶片出现色斑、水疱及变形;有时果实外部没有症状或出现色斑,但内部果肉往往出现变色、纤维化及腐烂,使其食用价值完全丧失。在莧色藜(*Chenopodium amaranticolor*)或曼陀罗(*Datura stramonium*)上引起枯斑症状<sup>[5]</sup>。

目前病毒病尚无有效防治药剂,利用弱毒株的交互保护作用为病毒病防治较为理想的手段之一<sup>[6]</sup>,人工诱变为快速简便获得弱毒株的方法,主要包括物理处理(高温、紫外线、辐射)、化学处理(亚硝酸)、物理结合化学的复合处理等方法。迄今,已有多种人工诱变弱毒疫苗研制成功,如Holmes<sup>[7]</sup>通过热处理获得弱毒株TMV-M。日本Oshima<sup>[8]</sup>通过热处理获得TMV弱毒疫苗,并已在日本大规模推广应用,在番茄上获得增产15%~30%的

保护效果。张秀华等<sup>[9]</sup>用亚硝酸诱变获得2株TMV弱毒株,荷兰学者Rast<sup>[10]</sup>用亚硝酸诱变TMV番茄株系获得了弱毒株;邵碧英等<sup>[11]</sup>研究发现采用热空气和亚硝酸的复合处理可显著提高有效突变频率,且优于单种诱变处理,可增加获得弱毒株的几率。Nakazono-Nagaoka等<sup>[12]</sup>通过低温处理获得了对菜豆黄花叶病毒野生株具有交互保护作用的致弱株系M11,通过氨基酸序列比对及重组侵染性克隆分析发现,314位氨基酸对病毒致弱起主要作用。

该研究通过热处理、亚硝酸处理及复合处理对CGMMV野生株系进行人工诱变,对3种方法致弱效果进行比较,找到了适合CGMMV的人工诱变方法,以期为该病毒弱毒疫苗的开发及致病相关的基因功能的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试毒源:CGMMV野生株系由河北农业大学植物病害流行与综合防控研究室保存。

供试鉴别寄主:莧色藜(*Chenopodium amaranticolor*)由中国农业科学院植物保护研究所植物病毒研究室赠送。

### 1.2 试验方法

1.2.1 高温处理 参照谢联辉等<sup>[13]</sup>的方法,取CGMMV野生株系侵染的西瓜病叶,按10倍稀释(w/v)加1/15 mol/L(pH 7.2)磷酸缓冲液研磨,摩擦接种3叶期的黄瓜叶片,出现症状后取叶片放置于盛满水的三角瓶里,35℃处理15 d,经10倍稀释磷酸缓冲液研磨,摩擦接

**第一作者简介:**钟敏(1986-),女,陕西汉中,人,硕士研究生,研究方向为分子植物病理学。E-mail:849076353@qq.com.

**责任作者:**王亚南(1979-),女,河北三河人,博士,副教授,现主要从事植物病毒学等研究工作。E-mail:wyn3215347@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31201487);河北省自然科学基金资助项目(C2013204058);“河北省青年拔尖人才计划”资助项目。

**收稿日期:**2014-09-04

种枯斑寄主苋色藜,共接 5 片叶,观察症状。同时用 10 倍稀释磷酸缓冲液接种苋色藜作空白对照,未经处理病叶研磨后接种苋色藜作阳性对照。光照 18 h,黑暗 6 h, 25℃条件下培养。调查枯斑数量及枯斑大小情况。

1.2.2 亚硝酸处理 参考郑贵彬等<sup>[14]</sup>方法取 CGMMV 野生株系侵染的西瓜病叶低温冷冻 12 h,按 2 倍稀释(w/v)加1/15 mol/L(pH 7.2)磷酸缓冲液研磨,3 000×g 离心 20 min,取上清,使上清液成为 4 mol/L NaNO<sub>2</sub>: 1 mol/L醋酸缓冲液(pH 4.0)=2:1:1 比例。室温处理 30 min,用磷酸缓冲液稀释 50 倍摩擦接种苋色藜,共接 5 片叶。同时用稀释 100 倍的磷酸缓冲液接种苋色藜作空白对照。未经处理病叶研磨后接种苋色藜作阳性对照。调查枯斑数量及枯斑大小情况。

1.2.3 复合处理 高温处理再经化学处理 10 min<sup>[13]</sup>,共接 5 片叶。同时用 100 倍稀释磷酸缓冲液接种苋色藜作空白对照,未经处理病叶研磨后接种苋色藜作阳性对照,调查枯斑数量及枯斑大小情况。

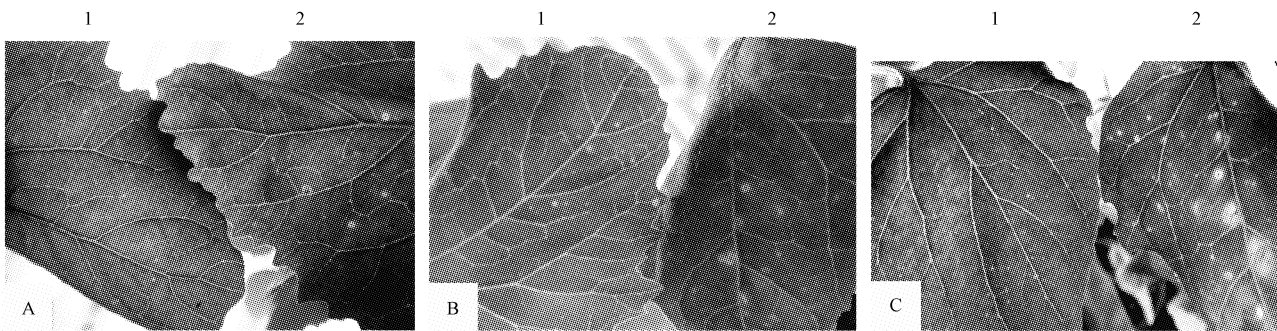
1.2.4 突变频率的计算 计数 3 个处理枯斑总数(N<sub>2</sub>)和小型枯斑数(N<sub>1</sub>),直径≤1 mm 的为小型枯斑。计算突变频率,突变频率(%)=N<sub>1</sub>/N<sub>2</sub>×100%。

1.2.5 RT-PCR 鉴定 RNA 提取、cDNA 合成、PCR 扩增、分子克隆采用 Liu 等<sup>[15]</sup>的方法进行,根据 GenBank 登录的 CGMMV 基因组序列,选择保守区域进行引物设计,鉴定特异性引物为:prCGCP-F:5'-C T T T G A C A A A G T T C C T A T T T C A G C G-3';prCGCP-R: 5'-T G A G C A A A C C G T T C G A T T T A-3'。扩增产物序列由上海生物工程有限公司测定。利用 Vector NTI 10.0 软件(Informax,Frederick,MD,USA)进行序列比对。

2 结果与分析

2.1 3 种方法人工诱变 CGMMV 野生株系致弱效果的比较

经 35℃高温处理、亚硝酸处理及复合处理后,将组织研磨进行摩擦接种,同时设未经任何处理的 CGMMV 野生株系为对照,3 d 左右,各处理苋色藜接种叶上均出现枯斑,但对照多数枯斑直径明显大于各处理枯斑直径(如图 1-A、B、C 所示),由表 1 可知,野生株系接种苋色藜后,直径小于 1 mm 枯斑比率为 1.99%,亚硝酸处理、高温处理、复合处理小枯斑比率分别为 11.41%、12.87%、14.20%,复合处理致弱效果最好。



注:A:1-35℃高温处理,2-未经处理对照;B:1-亚硝酸处理,2-未经处理对照;C:1-复合处理,2-未经处理对照。  
Note: A: 1-35℃ heat treatment, 2-Control; B: 1-Nitrous acid treatment, 2-Control; C: 1-Combination treatment, 2-Control.

图 1 3 种方法人工诱变 CGMMV 野生株系在苋色藜上的症状比较

Fig. 1 Symptom comparison of three artificial mutation methods for CGMMV wild strain on *Chenopodium amaranticolor*

表 1 3 种方法人工诱变 CGMMV 野生株系突变频率的比较

Table 1 Mutation frequency comparison of three artificial mutation methods for CGMMV wild strain

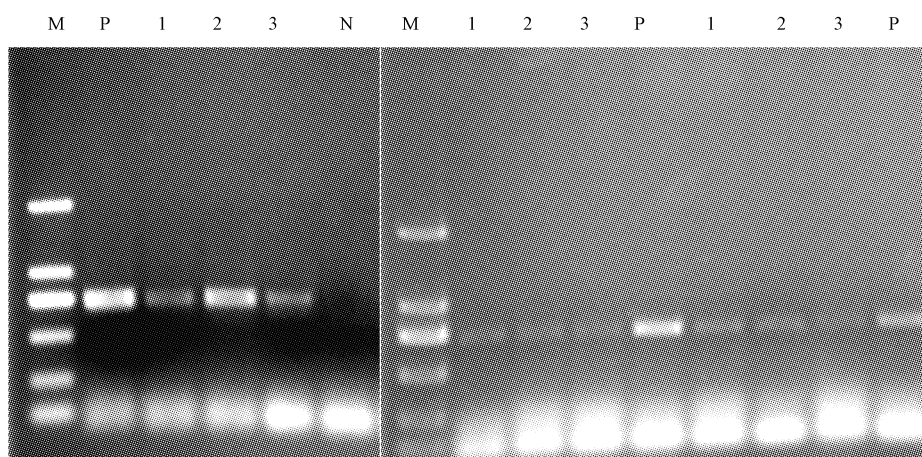
	亚硝酸处理(30 min) Nitrous acid treatment(30 min)	热处理(15 d) Heat treatment(15 d)	复合处理(10 min) Combination treatment(10 min)	CGMMV 野生株系 CGMMV wild strain	空白对照 CK
N <sub>1</sub>	35	43	49	6	0
N <sub>2</sub>	307	334	345	301	0
突变频率 Effect mutation frequency/%	11.41	12.87	14.20	1.99	—

2.2 人工诱变 CGMMV 野生株系产生枯斑的 RT-PCR 鉴定

从各处理随机选取 3 个枯斑,进行 RNA 提取、cDNA 合成及 PCR 扩增,从图 2 可以看出,各处理均出现了和

阳性对照完全相同的 722 bp 的特异性条带,阴性对照没有条带出现。经克隆测序及序列比对,证明该序列与野生株系 CGMMV-chb(GenBank 登录号为 KJ658958)序列相似性在 99%~100%之间(图 3)。





注:M;DL 2 000;P:未经任何处理 CGMMV 野生株系;1:高温处理;2:亚硝酸处理;3:复合处理;N:阴性对照。

Note:M;DL 2 000;P;CGMMV wild strain;1;Heat treatment;2;Nitrous acid treatment;3;Combination treatment;N;Negative control.

图2 人工诱变 CGMMV 野生株系产生枯斑的 RT-PCR 鉴定

Fig. 2 RT-PCR identification of the local lesion of CGMMV wild strain treated by artificial mutation methods

	(1)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140		
CGMMV-chb	(1)	TTCTTTGACAAGTTCCTATTTTCAGCGGCTGTAATGGCAAGAGATCCCGAGTTATAGGCTAGGTGCGAGTCTGTGGTGGTGGTAAAGCGGCTTCTAAACCTCCAAATCGGAGTTGGACTCTGCTCTCTGAAGAGTCCAGTTCTGT															
CGMMV1	(1)	TTCTTTGACAAGTTCCTATTTTCAGCGGCTGTAATGGCAAGAGATCCCGAGTTATAGGCTAGGTGCGAGTCTGTGGTGGTGGTAAAGCGGCTTCTAAACCTCCAAATCGGAGTTGGACTCTGCTCTCTGAAGAGTCCAGTTCTGT															
CGMMV2	(1)	TTCTTTGACAAGTTCCTATTTTCAGCGGCTGTAATGGCAAGAGATCCCGAGTTATAGGCTAGGTGCGAGTCTGTGGTGGTGGTAAAGCGGCTTCTAAACCTCCAAATCGGAGTTGGACTCTGCTCTCTGAAGAGTCCAGTTCTGT															
CGMMV3	(1)	TTCTTTGACAAGTTCCTATTTTCAGCGGCTGTAATGGCAAGAGATCCCGAGTTATAGGCTAGGTGCGAGTCTGTGGTGGTGGTAAAGCGGCTTCTAAACCTCCAAATCGGAGTTGGACTCTGCTCTCTGAAGAGTCCAGTTCTGT															
Consensus	(1)	TTCTTTGACAAGTTCCTATTTTCAGCGGCTGTAATGGCAAGAGATCCCGAGTTATAGGCTAGGTGCGAGTCTGTGGTGGTGGTAAAGCGGCTTCTAAACCTCCAAATCGGAGTTGGACTCTGCTCTCTGAAGAGTCCAGTTCTGT															
	(148)	148	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	
CGMMV-chb	(148)	GTTTCTTTTGAAGATGGCTTACAATCCGATCAGCACTAGCAAACTTATTCGGTTAGTGTCTTATGTTCCCGTCAGGACTTCTTAATTTTCTAGTTGCTTCAAGGTAACCGCTTCCAGACTCAAGCGGGAAGAGATTCTTTC															
CGMMV1	(148)	GTTTCTTTTGAAGATGGCTTACAATCCGATCAGCACTAGCAAACTTATTCGGTTAGTGTCTTATGTTCCCGTCAGGACTTCTTAATTTTCTAGTTGCTTCAAGGTAACCGCTTCCAGACTCAAGCGGGAAGAGATTCTTTC															
CGMMV2	(148)	GTTTCTTTTGAAGATGGCTTACAATCCGATCAGCACTAGCAAACTTATTCGGTTAGTGTCTTATGTTCCCGTCAGGACTTCTTAATTTTCTAGTTGCTTCAAGGTAACCGCTTCCAGACTCAAGCGGGAAGAGATTCTTTC															
CGMMV3	(148)	GTTTCTTTTGAAGATGGCTTACAATCCGATCAGCACTAGCAAACTTATTCGGTTAGTGTCTTATGTTCCCGTCAGGACTTCTTAATTTTCTAGTTGCTTCAAGGTAACCGCTTCCAGACTCAAGCGGGAAGAGATTCTTTC															
Consensus	(148)	GTTTCTTTTGAAGATGGCTTACAATCCGATCAGCACTAGCAAACTTATTCGGTTAGTGTCTTATGTTCCCGTCAGGACTTCTTAATTTTCTAGTTGCTTCAAGGTAACCGCTTCCAGACTCAAGCGGGAAGAGATTCTTTC															
	(293)	293	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420		
CGMMV-chb	(293)	TTCCGCGAGTCCCTGTCTGCGTTACCCCTGCTCTGCTGATAGATATTAATTTCTAGATTCCAGATGCGGGTTTTACGCTTCTCTCAAGCGTCTGTGTTGAGGCTATCTTCGTTTCGCTTCTAGCTCCACGGATA															
CGMMV1	(293)	TTCCGCGAGTCCCTGTCTGCGTTACCCCTGCTCTGCTGATAGATATTAATTTCTAGATTCCAGATGCGGGTTTTACGCTTCTCTCAAGCGTCTGTGTTGAGGCTATCTTCGTTTCGCTTCTAGCTCCACGGATA															
CGMMV2	(293)	TTCCGCGAGTCCCTGTCTGCGTTACCCCTGCTCTGCTGATAGATATTAATTTCTAGATTCCAGATGCGGGTTTTACGCTTCTCTCAAGCGTCTGTGTTGAGGCTATCTTCGTTTCGCTTCTAGCTCCACGGATA															
CGMMV3	(293)	TTCCGCGAGTCCCTGTCTGCGTTACCCCTGCTCTGCTGATAGATATTAATTTCTAGATTCCAGATGCGGGTTTTACGCTTCTCTCAAGCGTCTGTGTTGAGGCTATCTTCGTTTCGCTTCTAGCTCCACGGATA															
Consensus	(293)	TTCCGCGAGTCCCTGTCTGCGTTACCCCTGCTCTGCTGATAGATATTAATTTCTAGATTCCAGATGCGGGTTTTACGCTTCTCTCAAGCGTCTGTGTTGAGGCTATCTTCGTTTCGCTTCTAGCTCCACGGATA															
	(427)	427	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560		
CGMMV-chb	(427)	TACCGGTAATAGGTCATTGAGGTTGTAGATCCTAGCAATCTTACGACTGCTGAGTGCCTTAACGCTGTAAGCGTACTGATGACGGCTACAGCGGCTAGGGCTGAGATAGATAATTAATAGAGTCTAATTTCTAAG															
CGMMV1	(427)	TACCGGTAATAGGTCATTGAGGTTGTAGATCCTAGCAATCTTACGACTGCTGAGTGCCTTAACGCTGTAAGCGTACTGATGACGGCTACAGCGGCTAGGGCTGAGATAGATAATTAATAGAGTCTAATTTCTAAG															
CGMMV2	(427)	TACCGGTAATAGGTCATTGAGGTTGTAGATCCTAGCAATCTTACGACTGCTGAGTGCCTTAACGCTGTAAGCGTACTGATGACGGCTACAGCGGCTAGGGCTGAGATAGATAATTAATAGAGTCTAATTTCTAAG															
CGMMV3	(427)	TACCGGTAATAGGTCATTGAGGTTGTAGATCCTAGCAATCTTACGACTGCTGAGTGCCTTAACGCTGTAAGCGTACTGATGACGGCTACAGCGGCTAGGGCTGAGATAGATAATTAATAGAGTCTAATTTCTAAG															
Consensus	(427)	TACCGGTAATAGGTCATTGAGGTTGTAGATCCTAGCAATCTTACGACTGCTGAGTGCCTTAACGCTGTAAGCGTACTGATGACGGCTACAGCGGCTAGGGCTGAGATAGATAATTAATAGAGTCTAATTTCTAAG															
	(567)	567	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	724
CGMMV-chb	(567)	GTTTGTATGTTACGATAGGCTTCATTGAGCGCGGTTTTCGTTAGTCTGTGACAGGCTACACCTCGAAGCTTAGTTTCAGGGCTTCTGATGGTGTGACACCAAGTGATAGTCTTCCCGTTCACCTAAATGAAAGGTTTGTCTCA															
CGMMV1	(567)	GTTTGTATGTTACGATAGGCTTCATTGAGCGCGGTTTTCGTTAGTCTGTGACAGGCTACACCTCGAAGCTTAGTTTCAGGGCTTCTGATGGTGTGACACCAAGTGATAGTCTTCCCGTTCACCTAAATGAAAGGTTTGTCTCA															
CGMMV2	(567)	GTTTGTATGTTACGATAGGCTTCATTGAGCGCGGTTTTCGTTAGTCTGTGACAGGCTACACCTCGAAGCTTAGTTTCAGGGCTTCTGATGGTGTGACACCAAGTGATAGTCTTCCCGTTCACCTAAATGAAAGGTTTGTCTCA															
CGMMV3	(567)	GTTTGTATGTTACGATAGGCTTCATTGAGCGCGGTTTTCGTTAGTCTGTGACAGGCTACACCTCGAAGCTTAGTTTCAGGGCTTCTGATGGTGTGACACCAAGTGATAGTCTTCCCGTTCACCTAAATGAAAGGTTTGTCTCA															
Consensus	(567)	GTTTGTATGTTACGATAGGCTTCATTGAGCGCGGTTTTCGTTAGTCTGTGACAGGCTACACCTCGAAGCTTAGTTTCAGGGCTTCTGATGGTGTGACACCAAGTGATAGTCTTCCCGTTCACCTAAATGAAAGGTTTGTCTCA															

注:CGMMV1:高温处理;CGMMV2:亚硝酸处理;CGMMV3:复合处理。

Note;CGMMV1;Heat treatment;CGMMV2;Nitrous acid treatment;CGMMV3;Combination treatment.

图3 诱变 CGMMV 与 CGMMV-chb 序列相似性比较

Fig. 3 The similarity of sequence between attenuated CGMMV isolate and CGMMV-chb

### 3 讨论

CGMMV 强毒株与弱毒株在苋色藜上出现大小差别明显的枯斑、大型枯斑和小型枯斑,故以小型枯斑作

为突变的标志,并参考裴维蕃<sup>[16]</sup>的方法,将 1 mm 直径作为小枯斑的界定值。未经诱变处理的 N1/N2 值为 1.99%,而 35℃ 高温处理、亚硝酸处理及复合处理的 N1/N2 值都有提高,说明 3 种诱变方法都可以提高突变

频率,复合处理表现最为显著,这与谢联辉等<sup>[13]</sup>的研究结果一致。但该突变是否有效突变,即是否削弱了病毒在大田寄主上的症状,还需进一步验证。

突变分析技术已成为研究生物现象的一种重要工具,但随着诱变技术的深入研究,诱变也显现出一些不足之处,如诱变的方向不够确定、诱变的幅度和频率还不够高、诱变的效果不理想,有待于进一步完善。诱变弱毒株除了为筛选弱毒疫苗、有效防治病害奠定基础外,还可通过致弱突变株利用分子生物学方法找出与致病性相关的基因,为遗传变异规律及致病机理的揭示提供重要材料来源,从而为农业生产提供科学、准确的指导。

### 参考文献

- [1] Kim O K, Mizutani T, Natsuaki K T, et al. First report and the genetic variability of Cucumber green mottle mosaic virus occurring on bottle gourd in Myanmar[J]. Journal of Phytopathology, 2010, 158(7-8): 572-575.
- [2] Antignus Y, Wang Y, Pearlsman M, et al. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting tobamovirus [J]. Phytopathology, 2001, 91(6): 565-571.
- [3] Tarasashvili L. Study on the spread and harmfulness of cucumber ordinary mosaic virus in Georgia and on the resistance of varieties to the disease [J]. Trudy Nauchno Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii Gruz SSR, 1976, 28: 31-34.
- [4] 陈红运, 赵文军, 程毅. 辽中地区西瓜花叶病原的分子鉴定[J]. 植物病理学报, 2006, 36(4): 306-309.
- [5] Holmes F O. A masked strain of Tobacco mosaic virus[J]. Phytopathology, 1934, 24(8): 845-873.
- [6] Nishiguchi M, Kobayashi K. Attenuated plant viruses; preventing virus diseases and understanding the molecular mechanism[J]. Journal of General Plant Pathology, 2011, 77(4): 221-229.
- [7] Holmes F O. A masked strain of Tobacco mosaic virus[J]. Phytopathology, 1934, 24(8): 845-873.
- [8] Oshima N. Control of tomato mosaic disease by attenuated virus[J]. Jpn Agric Res Q, 1981, 14(4): 222-228.
- [9] 张秀华, 李国玄, 梁锡炯, 等. 植物病毒弱毒系及其应用I. 烟花叶病毒番茄株弱毒系的诱变和性质的研究[J]. 植物病理学报, 1980, 10(1): 49-54.
- [10] Rast A T B. M II-16, an artificial symptomless mutant of tobacco mosaic virus for seedling inoculation of tomato crops[J]. European Journal of Plant Pathology, 1972, 78(3): 110-112.
- [11] 邵碧英, 吴祖建, 林奇英, 等. 烟草花叶病毒弱毒株的筛选及其交互保护作用[J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(3): 297-303.
- [12] Nakazono-Nagaoka E, Takahashi T, Shimizu T. Cross-Protection against Bean yellow mosaic virus (BYMV) and Clover yellow vein virus by Attenuated BYMV Isolate M11[J]. Phytopathology, 2009, 99(3): 251-257.
- [13] 谢联辉, 林奇英, 谢莉妍. 福建烟草病毒种群及其发生频率的研究[J]. 中国烟草学报, 1994, 2(1): 25-32.
- [14] 郑贵彬, 符云华. TMV 弱毒 DN<sub>60-3</sub> 等的诱变及其对番茄病毒病的保护效果[J]. 陕西农业科学, 1986(6): 5-7.
- [15] Liu Y, Wang Y, Wang X, et al. Molecular characterization and distribution of cucumber green mottle mosaic virus in China[J]. Journal of Phytopathology, 2009, 157(7-8): 393-399.
- [16] 裘维蕃. 植物病毒学[M]. 北京: 北京科学出版社, 1985: 90.

## Study on the Artificial Mutagenesis Method for Cucumber Green Mottle Mosaic Virus

ZHONG Min, ZHAO Xu-sheng, HE Yi-kun, WANG Ya-nan, CAO Ke-qiang

(College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001)

**Abstract:** The wild isolate of cucumber green mottle mosaic virus was mutated by three artificial methods, including heat treatment, nitrous acid treatment and combination treatment, the attenuation effect of the three methods were compared. The results showed that all of the three treatments could attenuate virus to product smaller local lesion on *Chenopodium amaranticolor*. The attenuated rate of heat treatment, nitrous acid treatment and combination treatment were 11.41%, 12.87% and 14.20% respectively. *Chenopodium amaranticolor* inoculated by wild strain was used as positive control, the attenuated rate of which was 1.99%. It presumed that the attenuation effect of combination treatment was the best. The result was useful to obtain CGMMV attenuated strain rapidly and effectively and set a good base for developing attenuated vaccine and studying the function of pathogenic genes in the future.

**Keywords:** cucumber green mottle mosaic virus; artificial mutation; attenuated strain