

## 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原时首先发现类病毒(Viroid)后<sup>[1]</sup>, 在这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、 $\alpha$ -鹅膏蕈碱、皂土、草酸盐等无机盐、吡啶橙等染料、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<sup>[2-6]</sup>, 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结果。

本文于1989年5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巨同志的大力协助, 特致谢意。

## 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (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<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>四组。A为不施药的感染对照组, B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>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<sup>[7]</sup>。将1:1灭菌金刚砂(800目)和硅藻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
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.94	$\text{H}_3\text{BO}_3$	28
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.52	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	34
$\text{KNO}_3$	0.66	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.12	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{EDTA} + \text{FeSO}_4$	0.07	$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.0
(EDTA : $\text{FeSO}_4$ 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<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>三组分别加有50ppm GA、300ppm NaI、1mg/L 5-FU。

### 三、叶片核酸的抽提

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<sup>[8]</sup>和Semancik<sup>[9]</sup>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100 $\mu$ l无菌ddH<sub>2</sub>O,充分溶解,5000 r/m离心15分钟。取20 $\mu$ l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<sup>[10]</sup>。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<sup>[11]</sup>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100 $\mu$ l无菌ddH<sub>2</sub>O中后测得O.D<sub>260</sub>,按公式:

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

从而得知浓度。将之适当稀释成0.25ng/ $\mu$ l、0.50ng/ $\mu$ l、0.75ng/ $\mu$ l、1ng/ $\mu$ l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。

#### 六、F<sub>20</sub>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核苷酸5'-dAGGTTCCCGGGATCCCT-3'(F<sub>20</sub>)。用[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP标记5'末端(0.2~0.5  $\times 10^5$  cpm/ml)。杂交方法按Owens等方法<sup>[12-14]</sup>。

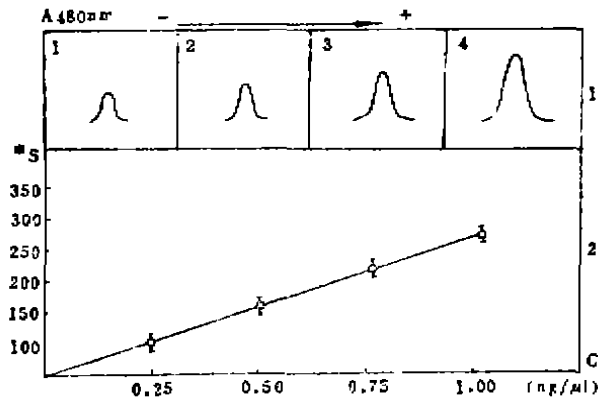


图1 1.四种浓度的E.coli 5s RNA经5% PAGE-银染色后480nm处的扫描图谱  
2.依RNA浓度和峰面积的线性关系绘制的标准曲线

\*S:扫描面积 每单位扫描面积=0.3cm<sup>2</sup>  
标准曲线为三次重复实验结果的数据平均值, S误差范围 $\pm 10$

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=0.3cm<sup>2</sup>. There are three repeat experiments in which S error area equal  $\pm 10$ , the datum of S in figure is the average one of three data.

## 结 果

## 一、几种浓度的GA、NaI、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 NaI 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 NaI 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, NaI, 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.										相对感染指数*** (积加之和) R.I.I. (Sum)	
		感染后天数											
		Days		after inoculation									
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
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	31
NaI, (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

\* 每种药物浓度共三次重复

\*\* 感染后30天内表现病症植株数

\*\*\* 30天内表现病症的植株病征天数之和

\*\*\*\* 喷洒0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液(pH8.0)代替药物

二、几种浓度的GA、NaI、5-Fu分别  
对CEV在爪哇三七中复制的影响

分别施用 50ppm GA、300ppm NaI、  
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 NaI 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  $S_{误差}=\pm 10$ ，以上结果均为三次重复实  
验的平均数据（后图同）。

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 NaI 后的杂交点  
弱于对照，这和图 2 (3)、(2) 的结果相符（见图 3 (2)）。

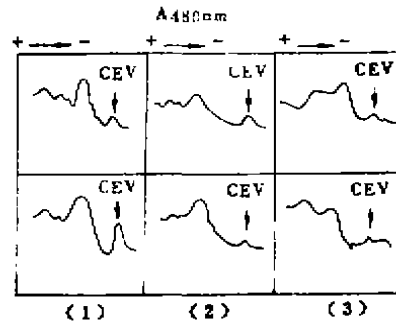


图2 施用 50ppm GA (1)、300ppm NaI (2)、  
1mg/L 5-FU (3) 于 CEV 感染的爪哇三七，经抽提  
和 5% PAGE-银染色后 480nm 处的扫描图谱

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 NaI (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

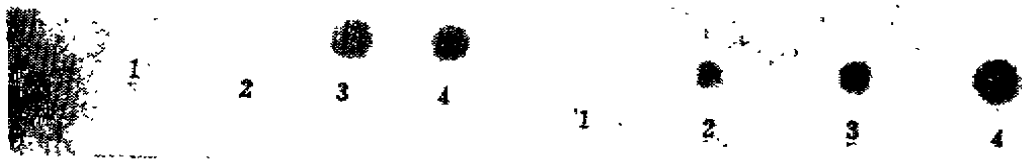


图3 用  $F_{20}$  探针作点杂交检测药物对 CEV 感染的影响

- (1) 1, 5S RNA 2, 健康爪哇三七  
3, CEV 感染后施用 50ppm GA 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 300ppm NaI  
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 NaI  
4, infected control

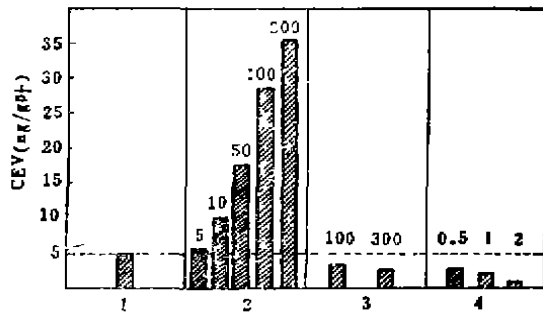


图 4 不同浓度的三种药物对感染的爪哇三七叶片中CEV浓度的影响

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)

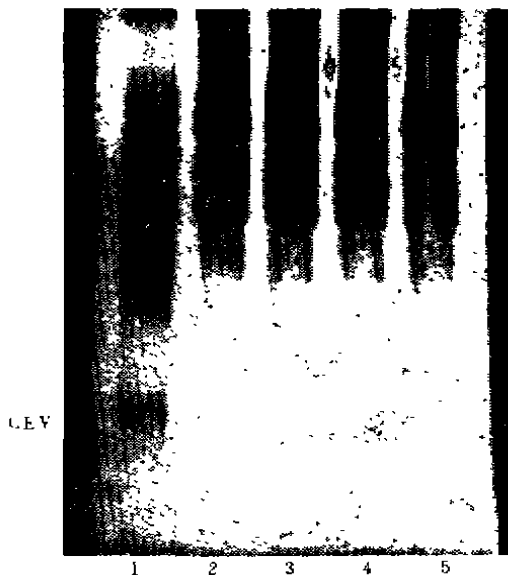


图 5 四株柑桔苗叶片核酸提取液5% PAGE-银染图谱  
1.用作标准对照的CEV感染的爪哇三七  
2,3,4,5.无性繁殖的柑桔苗

Fig. 5 5% PAGE-silver stained pattern of nucleic acids extracted from  
1.CEV-infected *G.aurantiaca* leaves used as standard control  
2, 3, 4, 5.Cloned citrus seedling leaves

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)、36.6 (500ppm); 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

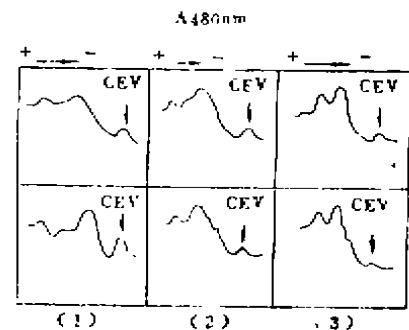


图 6 施用50ppm GA (1)、300ppm Nal. (2)、1mg/L 5-FU (3) 于CEV感染的无性繁殖柑桔苗, 经总提取液5% PAGE-银染色后480nm处的扫描图谱  
注: 上图力对照组 下图力施药组

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, control group; lower figure, applied drug group.

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 Nal、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 Nal.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 Nal.和1 mg/L 5-FU作用后CEV浓度都降低,分别为2.8及1.3。

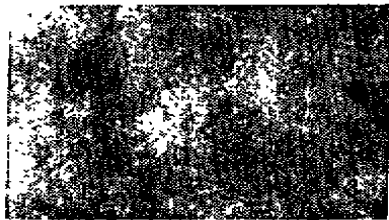


图7 用 $F_{21}$ 探针作点杂交检测GA对CEV感染的影响

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50ppm GA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

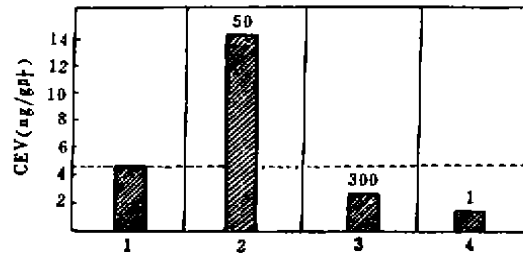


图8 三种药物对感染的无性繁殖柑桔苗叶片中CEV浓度的影响

1. 对照; 2. GA 50ppm; 3. Nal. 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 Nal.
- 4, 1mg/L 5-FU

## 讨 论

### 一、GA对CEV复制的影响

Rodríguez等人<sup>[16]</sup>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

特征就是涉及体内激素水平的紊乱<sup>[16-18]</sup>, 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<sup>[19]</sup>。

## 二、NaI<sub>2</sub>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<sup>[8]</sup>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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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., Sängler, 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: 406.
- [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] Rodríguez, J.L. et al., 1978, *Physiol.Plant Pathol.*, 13: 355.
- [16] Flores, R., Rodríguez, 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.



## 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 exogenous gibberellin (GA, 5ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 200ppm), naphthalen (Nal., 100ppm, 300ppm), 5-fluorouracil (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, accompanied 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