

菲律宾引种香蕉花叶病毒的鉴定*

徐平东¹ 李梅¹ 龚进兴¹ 柯冲²

(¹ 厦门华侨亚热带植物引种园国家植物引种隔离检疫基地, 厦门 361002;

²福建省农业科学院, 福州 350003)

摘要 根据病毒生物学特性、粒体形态和血清学性质, 明确在厦门地区种植的菲律宾引种香蕉 (*Musa sp.*) 表现花叶症状病株上分离的一个病毒分离物是属于黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV) 亚组 II。该分离物能通过摩擦接种侵染供试 11 科 52 种 (或品种) 植物中的 10 科 47 种 (或品种); 能够由棉蚜 (*Aphis gossypii*) 传播; 失毒温度为 50~55℃, 稀释终点为 10^{-3} ~ 10^{-4} , 体外存活期为 24~48h。提纯病毒粒体为球状, 直径约 28~30nm。用该分离物提纯病毒免疫家兔制备的抗血清, 经琼脂双扩散方法测定效价为 1:64。用法国提供的 CMV 单克隆抗体, 经双抗体夹心 ELISA (DAS-ELISA) 测定, 该分离物与 ToRS 血清组 (亚组 II) 的单克隆抗体具有强阳性反应。

关键词 香蕉; 花叶病; 黄瓜花叶病毒; 黄瓜花叶病毒亚组 II

Etiological Identification of Mosaic Disease in Banana Imported from the Philippines

Xu Pingdong¹, Li Mei¹, Gong Jingxin¹ and Ke Chung²

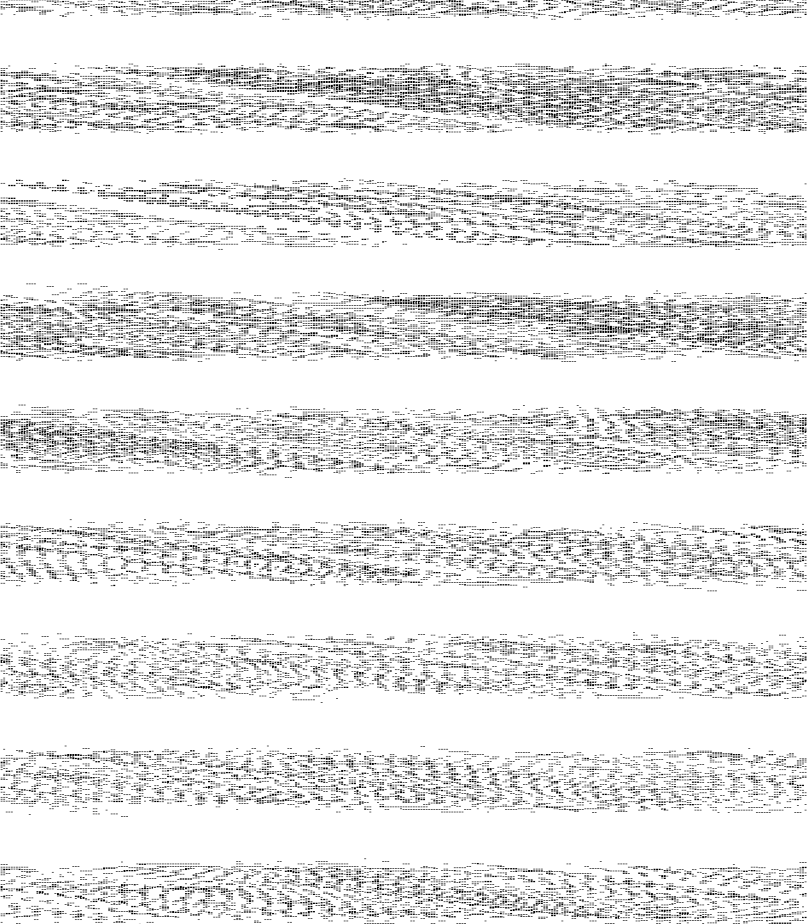
(¹ Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, National Plant Introduction Quarantine Base, Xiamen 361002; ² Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003)

Abstract One virus isolated from mosaic disease of banana introduced from the Philippines and grown in Xiamen area, was identified as an isolate of cucumber mosaic *cucumovirus* subgroup II, based on its biological properties, particle morphology and serology of the virus isolate. The virus isolate could infect 47 species (or varieties) of ten families from 63 species (or varieties) of 11 tested families and be also transmitted by *Aphis gossypii*. The thermal inactivation point for the virus isolate was 50–55℃; the dilution end point was $1:10^{-3}$ – 10^{-4} , and the longevity in vitro was 24–48h. The electron microscopic examination of the purified virus particle preparations showed isometric particles of about 28–30nm in diameter. The antiserum obtained had a homologous titre of 1:64 in gel diffusion tests. The virus isolate had strong positive reaction to monoclonal antibodies of CMV ToRS serogroup in double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.

Key Words Banana; Mosaic disease; Cucumber mosaic *cucumovirus* (CMV); CMV subgroup II

香蕉花叶亦称侵染性退绿 (infectious chlorosis) 或心腐病 (heart rot)。1929 年首次报道于澳大利亚的新南威尔士, 现已普遍在世界上大多数香蕉产区发生。在不同的环境条件下, 其病原为黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV) 的不同株系^[1]。在我国的大陆及台湾各香蕉产区亦有该病的报道^[2~7]。

1991 年秋至 1992 年春, 厦门华侨亚热带植物引种园种植的菲律宾引种香蕉严重发生花



拌 30min。悬液低速离心（16000g，15min），上清液经 20% 蔗糖垫离心（Hitachi P42A 转头，40000r/min，1.5 h）。沉淀加 2ml 5mM 硼酸缓冲液（含 0.5mM Na₂EDTA，pH 9.0）悬浮。悬液经 10%~40% 蔗糖梯度离心（Hitachi RPS40T 转头，25000r/min，2h），收集乳白色病毒带。超离心脱糖，沉淀用少量 0.01M PB(pH7.0) 悬浮，即为病毒提纯液。提纯病毒用 Beckman DU8 型紫外/可见光分光光度计在 220~320nm 波长范围内进行扫描，检测病毒的紫外吸收。沾取提纯病毒悬液的铜网经 2% 醋酸铀染色后，JEM-100 CX II 型透射电镜观察病毒粒体形态。

表 1 分离物 XB 的寄主范围及症状反应

| 供试植物 | 寄主反应 | | 供试植物 | 寄主反应 | |
|---|------|---------|---|------|--------|
| | 接种叶 | 上位叶 | | 接种叶 | 上位叶 |
| 苋色藜 (<i>Chenopodium amaranticolor</i>) | NLL | - | 洋酸浆 (<i>Physalis floridana</i>) | - | mM |
| 昆诺藜 (<i>C. quinoa</i>) | NLL | - | 矮牵牛 (<i>Petunia hybrida</i>) | - | Mo |
| 灰藜 (<i>C. album</i>) | NLL | - | 龙葵 (<i>Solanum nigrum</i>) | - | Mo |
| 墙藜 (<i>C. murale</i>) | NLL | - | 碗豆 (<i>Pisum sativum</i>) | | |
| 甜菜 (<i>Beta vulgaris</i>) | - | - | CV. Green - foast | NLL | - |
| 紫果西番莲 (<i>Passiflora edulis</i>) | - | M | 豇豆 (<i>Vigna unguiculate</i>) | | |
| 黄果西番莲 (<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>) | - | M | CV. Black eye | NLL | - |
| 杂交种西番莲 (<i>P. edulis</i> X <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>) | - | M | CV. 黑种二尺 | NLL | - |
| 龙珠果 (<i>P. foetida</i>) | - | M | CV. 长泰豇豆 | NLL | - |
| 毛西番莲 (<i>P. mollissima</i>) | - | M | 大豆 (<i>Glycine max</i>) | | |
| 转心莲 (<i>P. caerulea</i>) | - | M | CV. 诱变 33 | CLL | - |
| 心叶烟 (<i>Nicotiana glutinosa</i>) | CLL | Mo, Mal | 菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | | |
| 普通烟 (<i>N. tabacum</i>) | | | CV. Bountiful | - | - |
| CV. Havana 38 | - | mMo | 绿豆 (<i>Vigna radiata</i>) | | |
| CV. Samsun - NN | - | mMo | CV. M7A | NLL | - |
| CV. Turkish | - | mMo | 望江南 (<i>Cassia occidentalis</i>) | NLL | - |
| CV. White Burley | - | mMo | 黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>) | | |
| CV. Xanthi - NC | CLL | Mo | CV. 长青黄瓜 | CLL | Mo |
| CV. 黄苗榆 | - | mMo | CV. 二青黄瓜 | CLL | Mo |
| CV. 亮黄烟 | - | mMo | 西葫芦 (<i>Cucurbita pepo</i>) | CLL | + |
| 本氏烟 (<i>N. benthamiana</i>) | - | mMo | 笋瓜 (<i>Cucurbita maxima</i>) | | |
| 德氏烟 (<i>N. debneyi</i>) | - | + | CV. Butter cup | CLL | + |
| 克氏烟 (<i>N.levelandii</i>) | - | Mo | 丝瓜 (<i>Luffa cylindrica</i>) | CLL | RS, Mo |
| 黄花烟 (<i>N. rustica</i>) | CLL | Mo, Mal | 大白菜 (<i>Brassica campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i>) | | |
| 假酸浆 (<i>Nicandra physaloides</i>) | - | mMo | CV. 夏洋白菜 | - | - |
| 曼陀罗 (<i>Datura stramonium</i>) | - | Mo, Mal | 千日红 (<i>Gomphrena globosa</i>) | NLL | NLL |
| 番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>) | | | 莴苣 (<i>Lactuca sativa</i>) | - | M |
| CV. Momor | - | M, Mal | 百日菊 (<i>Zinnia elegans</i>) | - | M |
| CV. 苹果青番茄 | - | + | 番杏 (<i>Tetragonia expansa</i>) | CLL | - |
| CV. 直房丛生番茄 | - | + | 长春花 (<i>Catharanthus roseus</i>) | - | M |
| 大椒 (<i>C. annuum</i>) | - | Mo, Mal | 罗勒 (<i>Ocimum basilicum</i>) | - | M, Mal |

注：CLL = Chlorotic local lesions 局部退绿斑，M = Mosaic 花叶，Mal = Malformation 畸形，m = Mild 轻症，Mo = Chlorotic mottle 退绿斑驳，NLL = Necrotic local lesions 局部坏死斑，RS = Ringspot 环斑，+ = Symptomless infection 隐症侵染，- = No infection 不侵染

病毒用Eckon病毒。提纯
分光光度计紫外/可见光
吸收曲线呈典型的核蛋白
吸收曲线在240nm, 最高
该提纯病毒1.65。1
鲜叶组量约提纯0mg/kg
毒(1200磷酸盐染色的提纯同
型透病毒在电镜100CX II
约28察,30粒体球状3)直径

2.5 病毒的血清学性质

2.5.1 抗血清效价 用分离物 XB 提纯物免疫家兔制备的抗血清，经琼脂双扩散测定，效价为 1:64。

2.5.2 血清学关系 在琼脂双扩散试验中，分离物 XB 和 CMV-GB（广东香蕉分离物，由农业部植物检疫实验所张成良、张作芳研究员提供）与 XB 抗血清及 CMV-GB 抗血清（系作者制备的）均形成清晰的沉淀带。单、多克隆抗体夹心 ELISA（DAS-ELISA）测定结果表明，分离物 XB 与 CMV-ToRS 血清组（亚组 II）单克隆抗体具有强阳性反应（表 3）。

表 3 分离物 XB 的单、多克隆抗体夹心 ELISA(DAS-ELISA)测定结果(A450) *

| 抗原 | 单克隆抗体 | | | |
|------------|-------|------|------|------|
| | 2.1 | 34.2 | 21.4 | 42.3 |
| XB | 0.50 | 0.00 | 0.30 | 0.00 |
| Fny(亚组 I) | 1.21 | 0.78 | 0.04 | 0.01 |
| Lny(亚组 II) | 0.45 | 0.00 | 0.28 | 0.00 |
| CK1 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 |
| CK2 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

* 注：a. 以 As-XB (1:1000) 为第一抗体；b. Fny 为亚组 I（DTL 血清组）标准毒株，Lny 为亚组 II（ToRS 血清组）标准毒株（由农业部植物检疫实验所张成良、张作芳研究员提供）；c. CK1 为健康心叶烟，CK2 为 PBST-PVP

3 结论与讨论

根据病毒生物学特性、粒体形态、血清学性质，分离物 XB 被鉴定为 CMV 的一个分离物。

CMV 根据其生物学特性、血清学性质及基因组序列等区分为两个性质不同的亚组，即亚组 I（DTL 血清组）和亚组 II（ToRS 血清组）^[10]。CMV 亚组 I 主要发生于热带、亚热带地区，而亚组 II 则主要发生于温带地区^[11]。香蕉上 CMV 主要属亚组 I 分离物^[1]。李华平（1995）采用 ELISA、DOT-BLOT 及 RT-PCR 方法对广东香蕉花叶病进行了系统的调查，并对其中三个代表分离物的外壳蛋白基因进行序列分析，结果认为均属 CMV 亚组 I 株系^[12]。张锡炎等（1995）对海南香蕉分离的一个 CMV 分离物的外壳蛋白基因进行了序列分析，同属于亚组 I 株系^[13]。本试验的分离物 XB，在寄主范围及症状反应上与亚组 I 分离物存在比较大的差异（未列出资料）。用法国提供的单克隆抗体进行的测定结果表明分离物 XB 与 ToRS 血清组单抗具有强阳性反应，而与 DTL 血清组单抗无阳性反应。根据上述结果，把分离物 XB 归属于亚组 II 是合理的。香蕉花叶病在菲律宾普遍发生，其病原被鉴定为 CMV，但对其所属亚组未作分析^[2]。因此，分离物 XB 虽来自菲律宾引种香蕉，但尚难确定是随引种材料传入，抑或引种香蕉在厦门种植期间被感染所致？进一步对厦门地区的香蕉花叶病危害程度、病原种类及其防治进行深入的研究是很有必要的。

致 谢：农业部植物检疫实验所张成良、张作芳研究员赠送 CMV-Fny、Lny 及 CMV 广东香蕉分离物，法国国家科学研究中心 Van Regenmortel 博士赠送 CMV 单克隆抗体，特此致谢。

参考文献

- [1] Niblett, C. L.; et al. 1994. Infectious chlorosis, mosaic, and heart rot. pp. 18~19. In: Compendium of Tropical Fruit Diseases. R. C. Ploetz, et al., eds. APS Press, St. Paul, Minnesota
- [2] 高乔婉, 范怀忠. 1983. 引致香蕉花叶病的黄瓜花叶病毒株系. 华南农学院学报 4 (4): 43~48
- [3] 蔡云鹏等. 1986. 香蕉嵌纹病发生生态. 植保会刊 (台湾), 28 (4): 383~387
- [4] 欧阳洁. 1987. 香蕉花叶心腐病及其防治. 广西农业科学, 1987 (1): 41~42
- [5] 宋荣洁等. 1990. 香蕉黄瓜花叶病毒的鉴定. 上海农业学报, 6 (3): 82~84
- [6] 谢联辉等. 1991. 香蕉花叶病在福建的发生及其病原. 福建省植保、植病学会学术讨论会论文摘要汇编: 8
- [7] 刘志昕等. 1993. 海南香蕉花叶病病毒分离物的研究. 热带作物学报, 14 (1): 93~97
- [8] Lot, H.; et al. 1972. Contribution a l'etude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). II. Methode de purification rapide du virus. Ann. Phytopathol. 4: 25~38
- [9] Porta, C.; et al. 1989. Serotype specificity of monoclonal antibodies to cucumber mosaic virus. Arch. Virol. 104: 271~285
- [10] Palukaitis, P. et al. 1992. Cucumber mosaic virus. Adv. Virus Res. 41: 281~248
- [11] Hasse, A.; et al. 1989. Monoclonal antibodies for detection and serotyping of cucumber mosaic virus. J. Phytopathol. 127: 129~136
- [12] 李华平. 1995. 侵染香蕉的黄瓜花叶病毒株系特征及衣壳蛋白基因的遗传转化研究. 华南农业大学博士学位论文
- [13] 张锡炎等. 1995. 香蕉花叶病毒外壳蛋白基因的分离、测序和比较. 热带作物学报, 15 (增刊): 13~18
- [14] Reiking, O. A. 1951. Banana mosaic in Borneo and its relationship to abaca mosaic in the Philippines. Plant Dis. Repr. 35: 31~32