

侵染大丽花的黄瓜花叶病毒分离物的鉴定

明艳林

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

摘要:根据病毒生物学特性、粒子形态和血清学性质,初步鉴定在厦门地区种植的大丽花上表现花叶症状的病株上分离的1个病毒分离物属于黄瓜花叶病毒。在供试的11科39种(或品种)植物中,该分离物通过摩擦接种能侵染其中的9科35种(或品种);失活温度为50~55℃,稀释终点为 $10^{-3} \sim 10^{-4}$,体外存活期为24~28 h;病毒粒子球状,直径约28~30 nm。经间接ELISA测定,该分离物与烟草花叶病毒、南瓜花叶病毒、烟草环斑病毒、番茄不孕病毒、西番莲木质病毒的抗血清均无反应。与黄瓜花叶病毒抗血清具有强阳性反应,鉴定该病毒是黄瓜花叶病毒。

关键词:大丽花; 黄瓜花叶病毒; 鉴定

中图分类号: S 682.261; S 432.41

文献标识码: A

Identification of cucumber mosaic virus isolate from *Dahlia pinnata*

MING Yan-lin

(Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, National Plant Introduction Quarantine Base, Xiamen, Fujian 361002, China)

Abstract: One virus isolated from *Dahlia pinnata* Cav. grown in Xiamen area was identified as an isolate of *Cucumber mosaic cucumovirus* based on its biological characteristic, particle morphology and serology of the virus isolate. The virus isolate could infect 35 species (or varieties) of 9 families from 39 species (or varieties) of 11 tested families. The thermal inactivation point for the virus isolate was 50~55℃; the dilution end point was $10^{-3} \sim 10^{-4}$, and the longevity was 24~48 h. The electron microscopic examination showed the purified virus particle preparations were isometric particles of about 28~30nm in diameter. The virus isolate had strong positive reaction to monoclonal antibodies of CMV by enzyme-linked immunosorbent assay, and no reaction to monoclonal antibodies of TMV, SqMV, TRSV, TAV, PFWV.

Key words: *Dahlia pinnata* Cav.; Cucumber mosaic virus (CMV); Identification

大丽花(*Dahlia pinnata* Cav.),又称天竺牡丹,属菊科,大丽花属,多年生草本植物,具粗大纺锤状肉质块根,并能入药。大丽花可种植于花坛或庭前丛栽,矮生品种亦可盆栽用作室内装饰及会场布置。大丽花花叶病是大丽花中为害最为严重的一种病毒性病害,主要症状表现为花叶、叶子畸形、植株黄化矮小,我国广东、广西、内蒙古等省(自治区)及银川、南京、沈阳和上海等市均有发生^[1,2]。迄今,报道能引起大丽花花叶病的病原主要有大丽花花叶病毒(DMV)和黄瓜花叶病毒大丽菊株系(CMV-D₂)。除此之外,亦有烟草花叶病毒(TMV)和番茄斑萎病毒(TSWV)侵染大丽花形成花叶的报道^[3,4]。有时由于蚜虫、叶蝉、蓟马或螨类等昆虫的刺激,也会使大丽花产生花叶或畸形等症状,但这种症状与病毒症状

不同,它不能随大丽花块根传播到下一年。

近年来,厦门地区种植的大丽花严重发生花叶病,田间病株严重矮化,叶片上有明显的花叶症状,严重时叶片发育受阻,呈畸形,花朵小,色不鲜,产量质量都受到影响。本文报道该病毒分离物的分离鉴定结果。

1 材料与方法

1.1 毒源及其纯化 毒源从厦门华侨亚热带植物引种园种植的大丽花病株上分离得到。该病株严重矮化,叶片上有明显的花叶症状,部分病叶呈畸形。病毒经苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)3次单斑分离纯化后,繁殖在心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)上,置于隔离检疫温室内。

1.2 寄主范围测定 感病心叶烟叶片, 按 1/10~1/20 (W/V) 比例, 加入 0.025 mol·L⁻¹ PB (0.02 mol·L⁻¹ NaDIECA、pH 7.2) 研磨, 汁液摩擦接种 11 科 39 种 (或品种) 植物, 置于隔离检疫温室内 (温度为 20~26℃), 观察记载症状表现。每种供试植物接种 3~5 株, 重复 3 次, 每次观察 1 个月, 不表现症状的回接苋色藜, 验证是否属于隐症感染。

1.3 理化性质测定 按常规方法测定病毒钝化温度、稀释终点、体外成活期。毒源材料为心叶烟显症叶片, 测定寄主植物为苋色藜, 重复 3 次。

1.4 电镜观察 用接种两周的普通烟叶作为病毒的粗提纯材料, 采用 0.5 mol·L⁻¹ 柠檬酸缓冲液 (含 5 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA、0.5% 疏基乙醇、pH 6.5) 氯仿抽提, 用 PEG (MW6000) 沉淀与 20% 蔗糖垫离心 (Hitachi P42A rotor, 42 000 r·min⁻¹) 相结合提纯程序来制备病毒部分提纯液, 作为电镜观察材料。沾取病毒悬浮的铜网经 2% 醋酸铀染色后, JEM-100CX II 型透射电镜观察病毒粒体形态。

1.5 血清学性质测定 黄瓜花叶病毒 (CMV) 抗血清由本室徐平东博士制备, 烟草花叶病毒 (TMV) 抗血清由福建农林大学植物病毒研究所惠赠, 南瓜花叶病毒 (SqMV)、烟草环斑病毒 (TRSV)、番茄不孕病毒 (TAV)、西番莲木质病毒 (PFWV) 抗血清均由台湾中兴大学叶锡东教授惠赠。DAS-ELISA 测定参照 PORTA 等方法进行^[5]。抗血清均以 1:1 000 包板; 单克隆抗体稀释 1 000 倍; 辣根过氧化标记羊抗鼠为 Sigma 产品, 稀释 1 000 倍。DG-3022A 型酶联免疫检测仪 (波长 450 nm) 检测。

2 结果与分析

2.1 病毒的寄主范围 摩擦接种 11 科 39 种 (或品种) 植物, 分离物能侵染西番莲科、藜科、茄科、豆科、葫芦科、苋科、番杏科等 9 科的 35 种 (或品种) (表 1)。

2.2 病毒理化性质 分离物的病毒钝化温度为 50~55℃, 稀释终点为 10⁻³~10⁻⁴, 体外成活期为 24~48 h。

2.3 电镜下病毒粒体 提纯病毒在 JEM-100CX II 型透射电镜下观察, 粒体球状, 直径约 28~30 nm。

2.4 病毒的血清学性质 经 DAS-ELISA 测定, 该分离物与 TMV、SqMV、TRSV、TAV、PFWV 等 5 种病毒抗血清均无反应; 与 CMV 抗血清具有强阳性反应 (表 2)。

表 1 分离物的寄主范围及症状反应

Table 1 The host plants and systemic symptom

供试植物	局部症状	整株症状
苋色藜 (<i>Chenopodium amaranticolor</i>)	NLL	—
昆诺藜 (<i>C. quinoa</i>)	NLL	—
灰藜 (<i>C. album</i>)	NLL	—
墙藜 (<i>C. murade</i>)	NLL	—
甜菜 (<i>Dactylis glomerata</i>)	—	M
紫果西番莲 (<i>Passiflora edulis</i>)	—	TN
黄果西番莲 (<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>)	—	TN, Y, M, Mal
杂交种西番莲 (<i>P. edulis</i> × <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>)	—	TN, M, Mal
龙珠果 (<i>P. foetida</i>)	—	TN
毛西番莲 (<i>P. mollissima</i>)	—	TN
转心莲 (<i>P. caerulea</i>)	CLL	TN, M
心叶烟 (<i>Nicotiana glutinosa</i>)	CLL	TN, M
普通烟 (<i>N. tabacum</i>)		
CV. Havana 38	—	M
CV. Samsum-NN	—	M
CV. Turkish	—	M
CV. White Burley	—	M
CV. Xanthi-NC	—	M
CV. 黄苗榆	—	M
CV. 亮黄烟	—	M
本氏烟 (<i>N. benthamiana</i>)	—	TN, S, D
德氏烟 (<i>N. debneyi</i>)	CLL	M
克氏烟 (<i>N. clevelandii</i>)	—	M
黄花烟 (<i>N. rustica</i>)	CLL	M, D
假酸浆 (<i>Nicandra physaloids</i>)	CLL	M, Mal
曼陀罗 (<i>Datura stramonium</i>)	—	M
番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)		
CV. Momor	—	LNN, S
洋酸浆 (<i>Physalis floridana</i>)	—	M
矮牵牛 (<i>Petunia hybrida</i>)	—	M
龙葵 (<i>Solanum nigrum</i>)	—	M
豌豆 (<i>Pisum sativum</i>)		
CV. Gree-foast	NLL	—
豇豆 (<i>Vigna unguiculata</i>)		
CV. Black eye	NLL	—
CV. 黑种二尺	NLL	—
CV. 长泰豇豆	NLL	—
大豆 (<i>Glycine vulgaris</i>)		
CV. 诱变 33	CLL	—
菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)		
CV. Bountiful	—	—
绿豆 (<i>Vigna radiata</i>)	—	—
望江南 (<i>Cassia occidentalis</i>)	—	—
黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)		
CV. 长青黄瓜	CLL	M
CV. 二青黄瓜	CLL	M, D

(续表1)

供试植物	局部症状	整株症状
西葫芦(<i>Cucurbita pepo</i>)	CLL	M,S,D
瓠瓜(<i>Cucurbita maxima</i>)	—	M,S,D
丝瓜(<i>Luffa cylindrica</i>)	CLL	D
大白菜(<i>Brassica campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i>)		
CV. 夏洋白菜	—	—
千日红(<i>Gomphrena globosa</i>)	NLL	M,Mal
莴苣(<i>Lactuca sativa</i>)	—	M,Mal
百日菊(<i>Zinnia elegans</i>)	—	M
番杏(<i>Tetragonia expansa</i>)	CLL	—
长春花(<i>Catharanthus roseus</i>)	—	M
罗勒(<i>Ocimum basilicum</i>)	—	M,Mal,D
老枪谷(<i>Amaranthus caudatus</i>)	—	—
大椒(<i>Capsicum annuum</i>)	—	M,Mal

注: CLL 示局部褪绿斑, D 示全株死亡, LNN 示叶片变窄, M 示花叶, Mal 示畸形, NLL 示局部坏死斑, S 示矮化, TN 示顶枯(死顶), Y 示黄化, — 示不侵染。

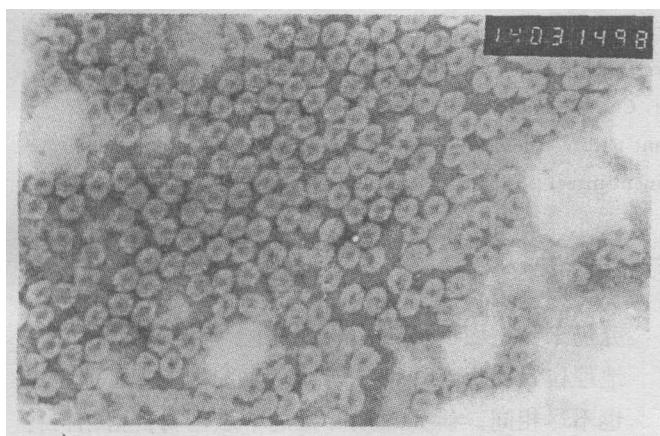
图1 电镜下病毒粒体 ($\times 14\,000$)Fig. 1 Virions of purified virus under electron microscope ($\times 14\,000$)表2 分离物 DAS-ELISA 测定结果(OD_{450})

Table 2 DAS-ELISA detection result of the virus isolate

抗原	CMV	TMV	SqMV	TRSV	TAV	PFWV
感染病毒的烟草叶片	0.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
感染病毒的黄瓜叶片	1.21	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01
健康烟草叶片	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
PBS 缓冲液	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00

注: ①抗原为感病各叶片按 1:10(W/V)研磨。②5 种病毒抗血清作一抗时均稀释 1 000 倍, 作二抗时稀释 1 000 倍; 抗原稀释 100 倍(稀释液为 PBS, 含 0.05% Tween-20、2% PVP、pH7.4)。

3 结论与讨论

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

大丽花病毒病主要有花叶型、矮缩型、环班型 3 种。迄今, 报道能引起大丽花花叶病的病原主要有 DMV 和 CMV-D₂。其中, DMV 可以通过汁液及嫁接传染, 叶蝉及多种蚜虫也能传毒。一般情况下, DMV 难以用汁液在大丽花上接种成功, 该病毒粒体为球状, 正 20 面体, 直径为 50 nm, 致死温度 75 ~ 80°C, 体外保毒期为室温下 4 d。DMV 在自然种植情况下, 只为害大丽花; 通过人工接种 DMV 还能侵染其它如茄科、藜科和苋科等植物^[3,4]。CMV-D₂ 寄主范围较窄, 经人工测定的 34 种植物中, 其仅能侵染 4 科 15 种, 局部侵染苋色藜、昆诺藜、甜菜、蚕豆等, 系统侵染黄瓜、心叶烟、白烟和矮牵牛等。其钝化温度 70°C 以上, 稀释终点 10⁻¹ ~ 10⁻⁸, 体外存活期 2 d, 病毒粒体球形, 大小 27 nm^[4]。根据本试验结果, 该分离物在寄主范围内及理化性质上与 CMV-D₂ 及 DMV 分离物存在比较大的差异。用 CMV 多克隆抗体进行的测定结果表明, 该分离物与 CMV 具有强阳性反应, 而与 TMV、SqMV、TRSV、TAV 和 PFWV 等 5 种多抗无阳性反应。根据上述结果, 该分离物可能是不同于黄瓜花叶病毒大丽菊株系的一种新的 CMV 病毒分离物, 推测侵染大丽花的 CMV 分离物可能有亚组 I 和亚组 II 之分。

参考文献:

- [1] 张健如, 沈淑琳. 花卉植物病毒及病毒病 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 110—112.
- [2] 孔宝华, 蔡红, 陈海如, 等. 花卉病毒病及防治 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 136—138.
- [3] Passal P, Pirone C. Diseases and Pests of Ornamental Plants [M]. 1987, 261—262.
- [4] 吕佩珂, 段半锁, 苏慧兰. 中国花卉原色图鉴 (上册) [M]. 北京: 蓝天出版社, 2001. 462—463.
- [5] Porta C, Devergne J C, Cardin L, et al. Serotype specificity of monoclonal antibodies to Cucumber mosaic virus [J]. Arch. Virol, 1989, 104: 271—285.