

我国发生的一种香石竹斑驳病毒株系研究

I 寄主范围、提纯及血清学特性*

于嘉林 刘 仪

(北京农业大学, 植保系, 北京)

提 要

北京、上海栽培香石竹上发生的一种香石竹斑驳病毒BS株系 (Carnation Mottle Virus-BS Strain), 人工接种可局部侵染鳶色藜, 墙生藜, 千日红及番杏, 有时可系统侵染昆诺阿藜。分别造成坏死斑或褪绿斑, 不侵染所试其它2科5种植物。单斑分离接种昆诺阿藜做为提纯材料, 经PEG(分子量6,000)沉淀, 差速离心及蔗糖密度梯度离心, 病毒提纯量约140毫克/公斤鲜组织。病毒颗粒呈等轴多面体, 直径为33毫微米。提纯物紫外扫描呈典型病毒核蛋白吸收曲线, A₂₆₀/A₂₈₀值为1.54, 核酸含量约20%。提纯病毒免疫家兔所得抗血清试管沉淀效价为1:4096, 琼脂糖双扩散效价可达1:1024。此株系血清学反应与英国香石竹斑驳病毒B-362株系呈部分同源性。

香石竹病毒病广泛发生于世界各地香石竹种植区, 国外对此研究较多, 已有明确报道的病毒包括香石竹斑驳 (Holling和Stone, 1970a)、香石竹潜隐 (Wetter, 1971)、香石竹环斑 (Holling和Stone, 1970b; Tremaine和Dodds, 1985)、香石竹蚀环 (Lawson和Hearon, 1977)、香石竹脉斑驳 (Hollings和Stone, 1971)及香石竹坏死斑点 (Inouye, 1974)六种病毒。这些病毒常造成香石竹植株生长衰弱, 淘汰周期缩短, 花朵变小、杂色、花苞开裂等危害, 而使其商品价值降低。对此国外已广泛采用无毒苗木繁育, 栽培措施来加以控制。由于我国以往大面积栽培香石竹较少及香石竹病毒多为混合侵染, 分离研究困难, 故过去研究较少。除少量非正式报告外, 迄今尚未见关于香石竹病毒的正式详细报道。本文报道了一种经分离纯化的香石竹斑驳病毒BS株系的寄主范围, 提纯及血清学特性的研究结果。

材 料 与 方 法

毒源: 采自北京、上海的香石竹植株, 用国外提供的香石竹斑驳、环斑、蚀环、潜隐、坏死斑点及脉斑驳等六种病毒的抗血清分别进行琼脂双扩散及免疫电镜检查, 结果为香石竹斑驳病毒与香石竹潜隐病毒或与香石竹环斑病毒混合侵染。接种昆诺阿藜并经

本文于1987年2月9日收到。

*本工作由上海园林所, 北京巨山园艺场提供毒源植物并大力协助, 由英国温室作物研究所 Brunt 博士提供香石竹病毒抗血清及同源抗原, 在此深表谢意。

两次单斑分离后再用上述相同方法检查, 证明所含病毒仅为石香竹斑驳病毒, 此材料定名为BS-I、BS-II, 作为寄主范围测定及提纯材料。

寄主植物及传播: 供试植物材料均于防虫温室内栽培, 环境室温为12—27℃, 冬季补充光照, 以香石竹实生苗作为无病接种材料。喷布300目金钢砂后, 汁液摩擦叶片接种。

纯化: 接种后5—6天的昆诺阿藜, 取地上5厘米以上部分, 去顶梢, 按2:1(v/w)加入含0.1%巯基乙醇的冷的0.05mol/L磷酸缓冲液(PB)(PH7.6)或0.1mol/L磷酸钾缓冲液(pH7.2), 匀浆(Waring Blender)2—3分钟。经双层纱布过滤后, 滤出液按8%(v/v)加入正丁醇, 4℃下搅拌1—2小时。10,000g离心30分钟, 上清液按8%和1%(w/v)分别加入PEG(分子量6,000)和氯化钠, 4℃下搅拌1小时后, 6,000g离心30分钟, 沉淀悬浮于1/20原体积的0.03mol/L PB(pH7.6)中, 再经5,000g离心10分钟。上清液经10—40%蔗糖密度梯度30,000r/m离心2小时(日立RPR 30-2转头), 或经10—40%氯化铯梯度33,000r/m离心1.5小时(日立RP55 T转头)后收集折光带, 超速离心浓缩, 沉淀悬浮于少量0.03mol/L PB中。提纯物在220—230nm间进行扫描(岛津UV-190), 得紫外吸收曲线。

血清学: 提纯病毒液加Freund's不完全佐剂免疫家兔, 三次肌肉注射及一次静脉注射, 每次间隔一周, 注射病毒量为1mg。最后一次注射后一周采血。所得抗血清经生理盐水二倍稀释, 用浓度为0.2mg/ml的提纯病毒液进行试管沉淀测定效价。0.15mol/L NaCl、0.2%NaN₃及0.75%琼脂糖配制凝胶板, 进行双扩散试验。经喷碳及亲水处理的铜网浸沾病叶挤出汁液, 然后滴加经稀释的病毒抗血清(1:10—1:100)。37℃下保温30分钟, 蒸馏水冲洗后, 2%PTA(PH6.8)染色, 晾干后进行免疫电镜观察(ISEM)。

电镜观察: 感病植株叶片挤出液或提纯病毒液经2%PTA染色, 电镜检查结果。感病昆诺阿藜浸出液经2%UA(pH6.5)染色, 分别以2195线/mm标准栅格(美国, Ladd公司产)及直径109nm的标准胶乳颗粒(Seragen产)做为内外标准物校正电镜误差, 测量病毒颗粒直径。

结果与讨论

分离所得毒株BS-I, BS-II自然条件下可侵染香石竹, 导致轻微叶片斑驳, 植株生长衰弱。人工接种可侵染3科5种植物, 均为局部侵染。在昆诺阿藜上, 夏季有时可造成系统侵染, 接种叶上部新生叶片出现褪绿斑及叶片下卷, 病株所得种子无毒。在千日红及番杏上用提纯病毒液接种较易成功。夏季较冬季症状表现更为明显, 且表现速度较快。结果见表1。(图1 a-c)。

病毒颗粒为等轴多面体, 直径为33nm(103个颗粒测量结果)(图3a)。蔗糖密度梯度离心所得提纯物紫外扫描呈典型核蛋白吸收曲线, 吸收高峰在260nm, 最低值在244nm, A₂₆₀/A₂₈₀为1.54。病毒颗粒中核酸比例约占20%, 产量约140mg/kg鲜组织。

表1 寄主范围及症状
Table 1 Host range and symptoms

寄主	症状
昆诺阿藜 (<i>Chenopodium quinoa</i>)	接种5-6天后产生局部褪绿斑, 扩展后连接成片, 造成叶片黄化枯死并伴有少量枯死斑, 夏季有时造成系统侵染。
莧色藜 (<i>C. amaranticolor</i>)	接种后8-9天出现局部褪绿斑及少量坏死斑。
墙生藜 (<i>G. murale</i>)	接种后9-10天出现局部环状褪绿斑, 外缘水浸状扩展连接成片, 造成叶片黄化枯死。
千日红 (<i>Gomphrena globosa</i>)	接种后10天出现局部棕褐色斑点。
克利夫兰烟 (<i>Nicotiana clevelandii</i>)	不侵染
白花曼陀罗 (<i>Datura metel</i>)	不侵染
矮牵牛 (<i>Petunia hybrida</i>)	不侵染
番杏 (<i>Tetragonia expansa</i>)	接种后7-8天叶片局部褪绿形成“绿岛”, 扩展造成叶片黄化早衰。
菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>) 品种: Topcrop	不侵染
豇豆 (<i>Vigna sinensis</i>) 品种: 红嘴燕	不侵染
香石竹 (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	新生叶片褪绿斑驳, 植株生长衰弱, 下部成熟叶片无症状表现。



图1 香石竹斑驳病毒寄主反应

- a 在昆诺阿藜上产生的褪绿斑
- b 在千日红上表现的局部褐色坏死斑点
- c 在莧色藜上形成局部褪绿及坏死斑

Fig 1 Host symptoms induced by carnation mottle virus BS strain.

- a Local chlorotic spots in *Chenopodium quinoa*
- b Local brown necrotic lesions in *Gomphrena globosa*
- c Local chlorotic and necrotic flecks in *C. amaranticolor*

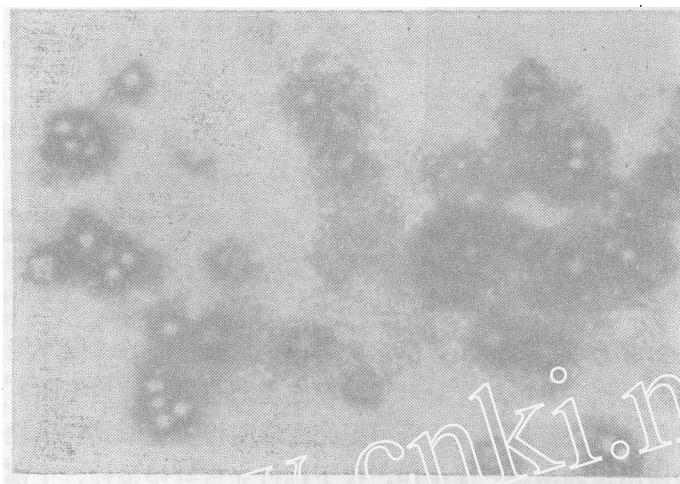


图2 用香石竹斑驳病毒抗血清处理进行
免疫电镜观察所见提纯病毒颗粒

Fig 2 Purified virus particles coated by antibodies
to carnation mottle in ISEM test.

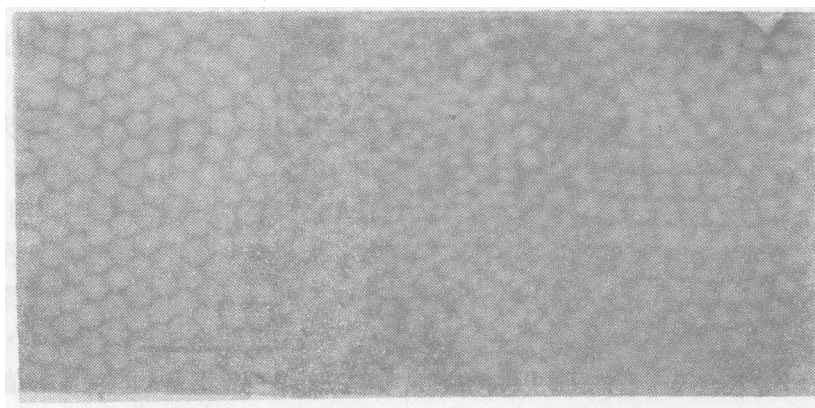


图3 纯化香石竹斑驳病毒颗粒。标尺(a, b, c相同): 120nm

- a 聚集的病毒颗粒
- b 聚集并相互重叠的病毒颗粒
- c 规则排列的形态亚基三轴对称及四轴对称病毒颗粒

Fig 3 Purified carnation mottle virus particles.

Bar (same for a, b, c): 120 nm

- a Normal virus particles.
- b Virus particles uniformly accumulated and overlapped each other
- c Virus particles ranged in regular pattern seen from
three- and four-fold axis.

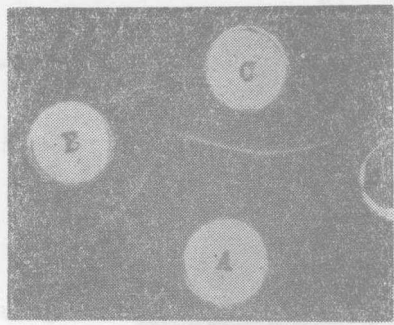


图4 琼脂糖双扩散试验结果
A 香石竹斑驳病毒抗血清(1:100)
B 香石竹斑驳病毒英国株系B-362
C 分离所得BS株系

Eig 4 Result of gel double diffusion test.
A antiserum to carnation mottle virus (1:100).
B B-362 strain from British.
C BS strain occurring in China.

免疫电镜检查提纯物可为香石竹斑驳病毒抗血清均一包被(图2),但不能为其它香石竹病毒抗血清所包被。提纯病毒颗粒有时可集聚形成规则的晶状结构(图3 b, c)并可见其形态亚基构成情况。经蔗糖梯度离心所得提纯病毒回接莧色藜具侵染性,但经氯化铯平衡梯度离心后所出现的两条折光带中,仅下部折光带具侵染性,上部较浅折光带接种莧色藜则不具侵染性,琼脂糖双扩散试验中与下部较强折光带收集物为完全同源性,在10% SDS-聚丙烯酰胺电泳中亦与下部较强折光带收集物表现相同,因而为病毒蛋白外壳。

所得抗血清试管沉淀效价为1:4096,琼脂糖凝胶双扩散,与提纯病毒液反应效价可达1:1024,用于田间香石竹植株带毒检测,效价约1:200—500。在用所得抗血清进行的琼脂糖双扩散试验中,分离物BS-I, BS-II均与英国香石竹斑驳病毒分离物B-362呈部分同源性(图4)。

纵观上述,本工作所得分离物为香石竹斑驳病毒,但它在寄主范围、症状及血清学特性方面均与国外所报道的同种病毒有差异(Hollings, 1970a; Tremaine, 1970)。据Kemp(1966)报道,香石竹斑驳病毒株系中PSR毒株和减弱型毒株与典型株系只有寄主症状差异而无血清学差异,但PR4株系与典型株系却有血清学差异,且在莧色藜上不能导致坏死斑。因而我们认为BS分离物是一种不同于现有报道的香石竹斑驳病毒的新株系。

提纯过程中由于病毒颗粒的聚集造成其沉降行为的变化而影响对 $S_w, 20$ 值的测定。本工作采用标准物作为内、外标记,测定所得香石竹斑驳病毒BS株系颗粒直径与国外同种病毒早期报道(Hollings and Stone, 1970a)有一定差异,估计可能是由于标准物的使用与否或种类不同、染料或染色方法不同而引起的观测误差所致。

该病毒在世界各地栽培的香石竹中广泛发生,极易机械传播,生产中带毒母株的繁殖为主要传播途径,其传播介体不详。但我们曾观察到,经PEG沉淀浓缩的田间病土浸出液接种莧色藜可能具有侵染性,不过,其具体存在及传播方式有待进一步研究。在北京、上海取样测定,香石竹斑驳病毒的检出率在90%以上,其中包括一些新引进品种及组织培养繁殖苗。随着我国香石竹栽培面积及国内交流的增加。这种情况应当引起注意。由于此病毒免疫原性较好,抗血清效价较高,因而利用琼脂双扩散或免疫电镜方法进行田间样品带毒情况检测,可获得较为满意的效果。

参考文献

- [1] Hollings, M. & Stone, O.M., 1970a, Carnation Mottle Virus in CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 7.
- [2] Hollings, M. & Stone, O.M., 1970b, Carnation Ringspot Virus in CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 21.
- [3] Hollings, M. & Stone, O.M., 1971, Carnation Vein Mottle Virus in CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 78.
- [4] Inouye, T., 1974, Carnation Necrotic Fleck Virus in CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 136.
- [5] Kemp, W.G., 1966, *Can. J. Bot.* 44 (10) :1261.
- [6] Lawson, R.H. & Hearon, S.S., 1977, Carnation Etched Ring Virus in CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 182.
- [7] Tremaine, J.H., 1970, *Virology* 42 (3) :611-620.
- [8] Tremaine, J.H. & Dodds, J.A., 1985, Carnation Ringspot Virus in CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 308.
- [9] Wetter, C., 1971, Carnation Latent Virus in CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 61.

Research on a Strain of Carnation Mottle Virus Occurring in China

I. Host Range, Purification and Serology

Yu Jia-lin and Liu Yi

(Plant Protection Department of Beijing Agricultural University, Beijing)

Carnation mottle virus BS strain, which was isolated from carnation plants grown in gardens in Beijing and Shanghai of China, infected *Chenopodium murale*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa* and *Tetragonia expansa* locally, *C. quinoa* systemically sometimes and induced necrotic spots or chlorotic lesions on these hosts respectively. But other five species plants of two families tested were not infected. After two cycles single lesion isolation, the virus yield purified from *C. quinoa* by PEG (MW 6,000) precipitation and sucrose gradient density centrifugation was about 140 mg/Kg fresh tissues. Diameter of the isometric particle is 33 nm. With UV absorption spectrum scanning, the value of A₂₆₀/A₂₈₀ is 1.54 showing a 20% nucleic acid content of the purified preparation. The titre of antiserum from immunized rabbit is 1:4096 in conventional tube precipitation test and 1:1024 in gel double diffusion test. This strain was distinguished serologically from that occurring in British.

Acknowledgement: We thank very much to Mr Zhang Jianru and Mr Suen Bailing for their helps, and to Dr Brunst for his kindly gifts of antisera and antigen.