

## 菜豆黄色花叶病毒 (BYMV) —新疆苜蓿分离株的鉴定

张祥林 尹玉琦 李国英 崔星明

(石河子农学院植保教研室, 新疆石河子)

### 提 要

从新疆苜蓿黄斑花叶病株上分离到病毒分离物 M-4, 该分离物能引起多种豆科植物系统花叶, 并在藜科植物上产生局部褪绿斑, 易经汁液摩擦接种和蚜虫传毒, 不经菜豆种子传毒。病毒致死温度 60—65℃, 体外保毒期 4—5 天, 稀释限点  $10^{-3}$ — $10^{-4}$ 。病毒粒体线状, 长约 660—740nm, 宽 15nm; 在感病的寄主叶片细胞中, 电镜观察到风轮状、带状和环状内含体。免疫电镜法测定, 该分离物与菜豆黄色花叶病毒 (BYMV) 抗血清有血清反应。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和氨基酸自动分析仪分析分别测得该病毒的衣壳蛋白亚基分子量为 16,200 道尔顿, 氨基酸残基数 128 个。鉴定结果认为, 分离物 M-4 是 BYMV 的一个株系。

**关键词:** 菜豆黄色花叶病毒 苜蓿分离株

苜蓿是一种多年生豆科牧草及绿肥作物, 素有“牧草之王”和“维生素饲料”之称, 但它又是多种植物病毒越冬越夏寄主和病害发生的初侵染来源。新疆是农牧并举的省区, 苜蓿种植面积很大, 但近年来, 苜蓿病毒病的发生日趋严重, 不但给畜牧业生产而且给农作物、蔬菜生产带来重大损失。据文献报道<sup>[1][9]</sup>, 可侵染苜蓿的病毒有十多种, 如, 苜蓿花叶病毒 (AMV)、苜蓿潜隐病毒 (ALV)、菜豆黄色花叶病毒 (BYMV) 等等。我国仅对苜蓿花叶病毒研究较多, 对自然感染苜蓿的其它种类的病毒研究较少。

菜豆黄色花叶病毒 (BYMV) 是马铃薯 Y 病毒组的成员, 它在世界各地分布极广, 对豆科、百合科、菖蒲科的植物危害很大<sup>[8]</sup>。该病毒最早由 Pierce 记述<sup>[12]</sup>, 后来许多国家也研究报道过。我国濮祖芹<sup>[9]</sup>、董平<sup>[2]</sup>等分别报道了从菜豆和印度麻上分离到 BYMV, 但有关该病毒生化性质的研究国内未见报道。本文着重研究了 BYMV——新疆苜蓿分离株的生物学特性、血清学和病毒衣壳蛋白亚基组成及分子量。

### 材料与方 法

**病毒的分离及其寄主范围测定** 在新疆石河子、伊犁等地区采得苜蓿黄斑花叶病株标样 79 份, 将典型的病株按常规汁液摩擦法接种在昆诺阿藜上, 经单斑分离纯化并验证可侵染苜蓿, 将所得的分离物 M-4 保存在菜豆上, 按常规方法进行寄主范围和症状反应的测定, 共接种十科三

本文于 1988 年 12 月 14 日收到

十七种植物, 接种未显症者均回接昆诺阿藜, 以检测是否隐症带毒。

**蚜传试验** 在防虫网室内, 将人工饲养的无毒桃蚜 (*Myzus persicae*)、豆蚜 (*Aphis craccivora*)、棉黑蚜 (*Aphis atrata*) 和苜蓿无网长管蚜 (*Acyrtosiphon rondoi*) 饥饿 2 小时后, 分别移至感染分离物 M-4 的病株上, 饲毒 30 分钟, 再分别移到蚕豆健株上, 每一处理接 30 株, 每株接蚜 20 头, 传毒 10 小时, 最后杀死蚜虫, 观察记录发病情况。

**种传试验** 将健康菜豆种子播种并出苗后, 接种分离物 M-4 使其发病, 然后采收成熟的病株种子, 播种, 待出苗后观察发病情况, 以上步骤均在防虫温室内的消毒土壤中进行。

**体外抗性测定** 按常规方法测定分离物 M-4 的致死温度、稀释限点、体外保毒期。

**超薄切片观察** 采集不同时期接种分离物 M-4 后显症的蚕豆病叶, 参照徐绍华等<sup>[4]</sup>的方法将材料分别切成  $1 \times 6 \text{ mm}^2$  的细长条, 在 5% 戊二醛溶液中固定过夜  $\rightarrow 0.1 \text{ mol/L PB}$  清洗 3 次  $\rightarrow 2\%$  锇酸固定 60 分钟  $\rightarrow 0.1 \text{ mol/L PB}$  清洗 3 次  $\rightarrow$  常规酒精系列脱水  $\rightarrow$  环氧丙烷渗透 1 小时  $\rightarrow$  环氧丙烷与 Epon 812 以 1:1, 1:4 至纯包埋剂渗透包埋过夜  $\rightarrow 35^\circ\text{C}$ 、 $45^\circ\text{C}$  烤箱内各 24 小时聚合  $\rightarrow 60^\circ\text{C}$  烤箱内 12 小时固化  $\rightarrow$  修块, 用进口 Ultracut E 型超薄切片机切片, 经 1% 醋酸铀和 1% 柠檬酸铅双染色, 在日立 JEM-1200 EX 电镜下观察。

**血清学鉴定** 基本参照郑光宇等<sup>[5]</sup>的方法进行免疫电镜测定。供试的 BYMV 抗血清系日本北海道大学四方英四郎教授赠送。

**病毒的提纯及电镜观察** 参考 I. Uyede<sup>[13]</sup>的提纯方案, 并有所修改。冰冻的蚕豆病叶加 2 倍  $0.1 \text{ mol/L Tris-HCl}$  缓冲液 (含  $0.05 \text{ mol/L EDTA}$  和 1% 巯基乙醇,  $\text{pH} 7.0$ ), 匀浆, 过滤, 滤液中加 50% 四氯化碳, 振荡 30 分钟,  $3000 \text{ r/m}$  离心 15 分钟, 上清液加 4% PEG 和  $0.25 \text{ mol/L NaCl}$  搅拌 60 分钟,  $7000 \text{ r/m}$  离心 15 分钟, 沉淀悬浮于  $0.01 \text{ mol/L PB}$  中 (含  $0.5 \text{ mol/L}$  尿素),  $3000 \text{ r/m}$  离心 15 分钟, 上清液重复一次 PEG 沉降, 所得上清经蔗糖密度梯度离心 ( $24000 \text{ r/m}$ , 2 小时), 取出病毒带, 脱糖 ( $28000 \text{ r/m}$ , 3 小时)。沉淀悬浮于  $0.01 \text{ mol/L PB}$  中, 即为纯化病毒制剂。用铜网沾取少量提纯病毒悬浮液, 经 1% 醋酸铀负染后, 在电镜下观察病毒粒子形态。

**病毒衣壳蛋白亚基分子量测定及氨基酸组成分析** 参照张龙翔等<sup>[6]</sup>的方法进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 缓冲体系为 Tris-甘氨酸缓冲液, 在  $40 \text{ V}$ 、 $2 \text{ mA}$  下电泳 17 小时, 将测定结果进行统计分析计算病毒衣壳蛋白分子量。

参照 Bancraft<sup>[7]</sup>的方法, 用纯化病毒样品直接水解氨基酸残基分析病毒衣壳蛋白的氨基酸组成。取 300 微升纯化病毒制剂, 加  $6 \text{ N}$  盐酸 2 毫升, 于  $130^\circ\text{C}$  恒温箱中水解 2 小时, 真空抽干, 用  $0.02 \text{ N}$  盐酸溶解至 700 微升, 取 50 微升在日立 835-50 型高效氨基酸自动分析仪上分析。

## 结果与讨论

经人工接种测定, 分离物 M-4 可侵染豆科、藜科和苋科的 12 种植物, 结果见表 1 (图 1—3)。在测定的其他植物中, 如豇豆、黄豆、绿豆、羽扇豆、赤豆、决明、甜菜、千日红、萝卜、白菜、莴苣、黄瓜、西葫芦、罗勒、锦葵、苘麻、番茄、辣椒、茄子、蔓陀罗、矮牵牛、心叶烟、三生烟、珊西烟、白烟、黄苗榆、马铃薯等都不受分离物 M-4 的侵染。

分离物 M-4 可经桃蚜、豆蚜、棉黑蚜和苜蓿无网长管蚜以非持久性方式传毒。各种蚜虫的传毒率见表 2。

表 1 分离物M-4的寄主范围、症状反应和潜育期

Table 1 Host ranges, symptoms and incubation periods of isolate M-4

寄主 (Hosts)	症状 (Symptoms)	潜育期 Incubation periods (days)
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	系统斑驳花叶 System mottle mosaic	12
豌豆 <i>Pisum sativum</i> L.	系统脉间褪绿 S. chlorosis between veins	8
蚕豆 <i>Vicia faba</i> L.	同上 Ibid	8
白豆 <i>Phaseolus sativum</i>	系统褪绿斑 S. chlorosis spots	10
苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	系统黄斑花叶 S. yellow patch mosaic	25
草木樨 <i>Melilotus officinalis</i> L.	系统褐色枯斑 S. brown lesions	20
三叶草 <i>Trifolium pratense</i> L.	系统斑驳花叶 S. mottle mosaic	11
莧色藜 <i>Chenopodium amaranticolor</i>	局部褪绿斑 Local chlorotic spots	6
昆诺阿藜 <i>C. quinoa</i>	同上 Ibid	5
灰藜 <i>C. album</i>	同上 Ibid	6
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i> L.	同上 Ibid	5
尾穗苋 <i>Amaranthus caudatus</i> L.	系统脉间褪绿 S. chlorosis between veins	9

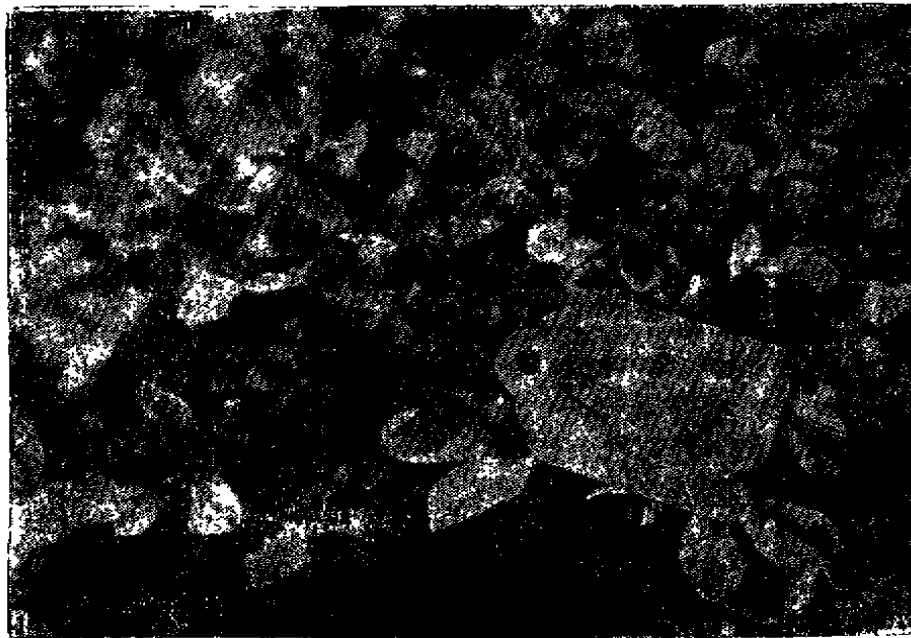


图 1 苜蓿黄斑花叶症状

Fig 1 Yellow patch mosaic on the alfalfa leaves

图 2. 蚕豆脉间褪绿和三叶草  
斑驳花叶症状Fig 2. Chlorosis between veins on  
broad bean and mottle  
mosaic on clover图 3. 菜豆疱疹花叶和昆诺阿藜褪  
绿斑Fig 3. Herpes mosaic on bean  
and chlorotic spots on  
C. quinoa

表 2. 不同种类蚜虫传播分离物 M-4 的能力

Table 2. The ability of various species aphid to transmit isolate M-4

蚜虫种类	接种 株数	发病 株数	传毒率 (%)	接毒至发病时间 (天)
桃 蚜 <i>Myzus persicae</i>	30	24	80	5~8
豆 蚜 <i>Aphis craccivora</i>	30	22	73.3	4~5
棉 蚜 <i>Aphis atrata</i>	30	19	63.3	4~6
苜蓿无网长管蚜 <i>Acyrtosiphon rondel</i>	30	14	46.7	5~8

分离物 M-4 不能通过菜豆种子传毒。

免疫电镜检查, 该病毒粒子四周包被着一层菜豆黄色花叶病毒抗血清中的抗体, 犹如给此病毒粒子表面加饰了一层外套。而未经免疫的病毒粒子则无此现象, 表明分离物 M-4 与菜豆黄色花叶病毒有血清学关系。

在蚕豆上测得该病毒的致死温度为 60—65°C, 稀释限点为  $10^{-3}$ — $10^{-4}$ , 体外保毒期为 4—5 天。电镜下观察感染该病毒的病组织超薄切片, 可以看到细胞质中有风轮状、带状和环状内含体。在寄主感病后的不同时期, 这三种形态内含体的数量有所变化, 在蚕豆接种后的前 10 天和 40 天后, 内含体数量较少, 第 20—30 天左右内含体数量较多。接种 30 天后的病叶细胞中可见一些包裹病毒粒子的细胞质束丝, 根据 Kitajima<sup>[11]</sup>报道, 这是染病细胞的一种保卫反应 (图 4—7)。

在提纯过程中使用 EDTA 和尿素, 较好地解决了病毒粒子的聚集和断裂, 经二次 PEG 沉淀和蔗糖密度梯度离心, 得到较高浓度的病毒产物, 其紫外吸收曲线最高吸收峰为 259.5nm, 最低吸收峰为 241.5nm,  $A_{260}/A_{280} = 1.15$  (图 10)。病毒核酸含量约为 5.15%, 质粒密度为 1.2005, 微分比容为 0.7689。在电镜下病毒粒子线状, 长 660—

740nm, 宽 15nm (图 8—9)。在 SDS-PAGE 电泳中, 分离物 M-4 表现为一个蛋白组分, 分子量约 16,200 道尔顿 (图 11—12)。氨基酸分析结果表明, 病毒蛋白亚基由



图 4. 健康蚕豆叶片超微结构 (74326×)

Fig 4. The ultrastructure of the healthy leaf of broad bean. (74326×)



图 5. 感染分离物 M-4 的蚕豆叶肉细胞内含体 (34687×)

A. 风轮状内含体 B. 带状内含体 C. 环状内含体

Fig 5. The inclusion bodies in the cytoplasm of broad bean infecting isolate M-4 (34687×)

A. Pinwheel B. bundle C. ring

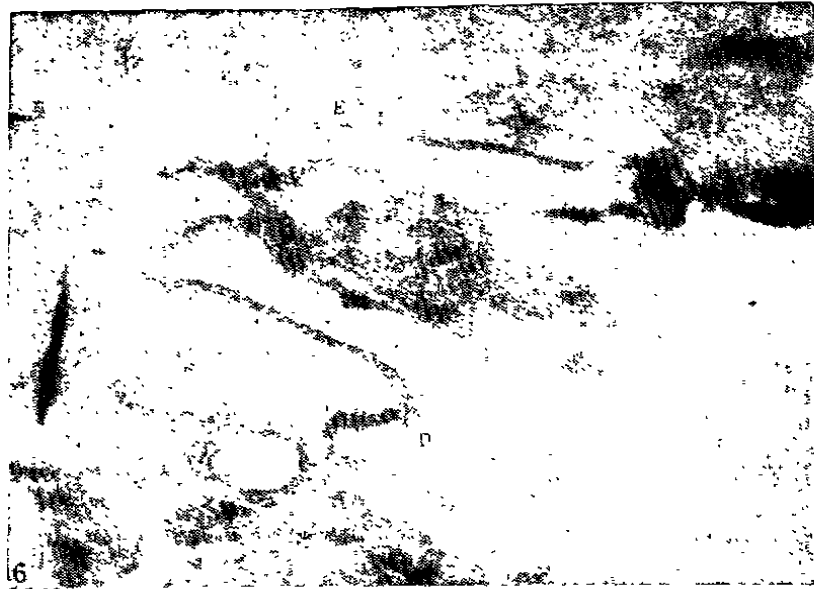


图 6. 感染分离物 M-4 的蚕豆叶内组织中的细胞质束丝 (E) 和病毒粒子 (D) (31250 $\times$ )

Fig 6 The cytoplasmic binding filament (E) and virus particle (D) in leaf tissues of broad bean infecting M-4. (31250 $\times$ )

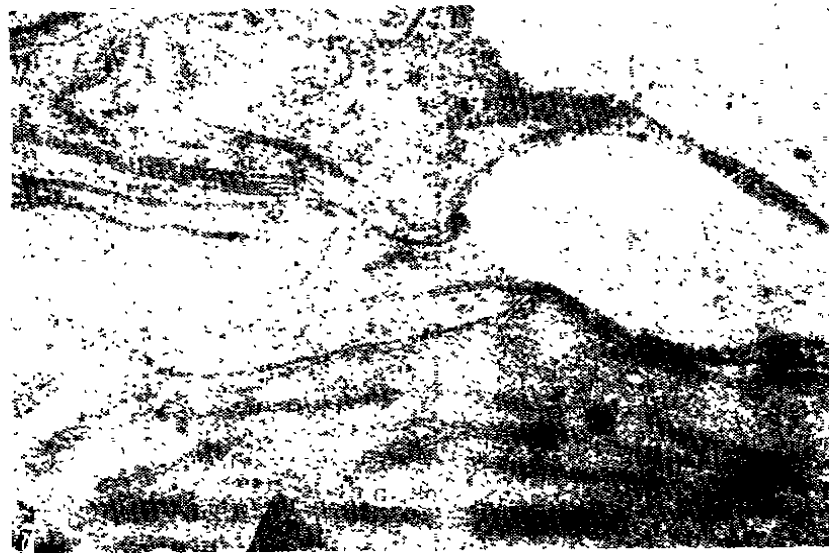


图 7. 感染 M-4 的蚕豆叶片细胞质中的束状内含体 (F) 和叶绿体 (G) (36770 $\times$ )

Fig 7. The bundle inclusion bodies (F) and chloroplast (G) in leaf cytoplasm of broad bean infecting M-4 (36770 $\times$ )



图 8. 从苜蓿病叶榨汁观察的分离物 M-4 病毒粒子 (130769 $\times$ )  
Fig 8. Isolate M-4 virus particles observed from infected alfalfa leaf (130769 $\times$ )

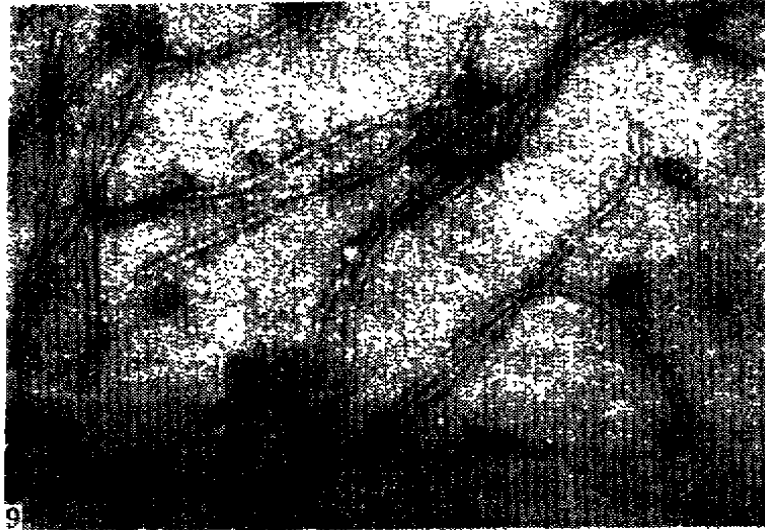


图 9 纯化分离物 M-4 病毒粒子 (78330 $\times$ )  
Fig 9 Purified isolate M-4 virus particles (78330 $\times$ )

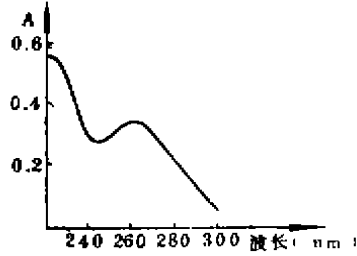


图 10 提纯分离物紫外吸收曲线  
Fig 10 UV absorption profile of purified isolate M-4

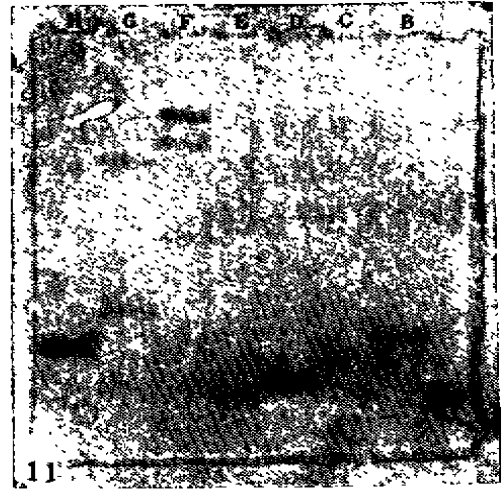


图 11 分离物 M-4 衣壳蛋白电泳图谱  
Fig 11 Electrophoretogram of coat protein of isolate M-4

- B: 分离物 M-4
- C: 核糖核酸酶 (MW=13700d)
- D: 细胞色素 c (MW=11700d)
- F: 牛血清 r 球蛋白 (MW=68000d)
- G: 蚕豆萎蔫病毒 (MW=45900; 20400d)
- H: 烟草花叶病毒 (MW=17500d)

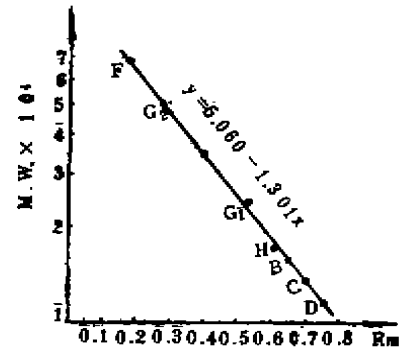


图 12 分离物 M-4 衣壳蛋白分子量的测定  
Fig 12 Determination of coat protein's molecular weight of isolate M-4

表 3 分离物 M-4 衣壳蛋白氨基酸组成测定结果  
Table 3 Determination of coat protein's amino acid composition of isolate M-4

Name of amino acid	Nmol	Ngram	Number	Name of amino acid	Nmol	Ngram	Number
Asp	8.325	1107.3	17	Ile	2.527	331.6	5
Thr	3.990	474.84	8	Leu	5.057	563.57	10
Ser	8.328	349.28	7	Tyr	2.123	384.82	4
Glu	8.251	1212.93	17	Phe	2.241	390.26	5
Gly	7.065	529.87	14	Lys	3.359	492.67	7
Ala	5.777	514.24	12	Arg	4.197	731.21	8
Cys	0.323	53.7	1	Pro	2.610	300.21	5
Val	3.614	423.56	7	Try	/	/	/
Met	0.500	89.65	1	Total			



17种约128个氨基酸组成,其中,色氨酸(Trp)在水解过程中易分解损失,故在氨基酸自动分析仪上未能检测出它的存在(表3)。

综上所述,分离物M-4为菜豆黄色花叶病毒。与国外已报道的BYMV株系相比,它的寄主范围及在菜豆、豌豆、蚕豆等一些鉴别寄主上的反应同Jones, R. T.<sup>(10)</sup>所报道的204-1株系相近,但还需就特异性抗血清及病毒基因组RNA同源性等方面作进一步研究才能定论其株系。

### 参 考 文 献

- [1] 季良等, 1981, 植物检疫研究报告 No. 7.
- [2] 董平等, 1985, 病毒学报 1: 366-369.
- [3] 濮祖芹, 1985, 豆科植物病毒论文集(1978-1985). 149.
- [4] 徐绍华, 1984, 植物病理学报 14: 87-89.
- [5] 郑光宇等, 1984, 植物病理学报 14: 47-51.
- [6] 张龙翔, 1982, 生化实验方法和技术 112-118.
- [7] Bancraft, G.B., 1968, Virology 64: 224
- [8] Bos, L., 1970, Bean Yellow Mosaic Virus in CMI/AAB, Description of Plant Viruses No. 40
- [9] Demski, J.W. et al, 1986, Plant Disease 70: 777-779
- [10] Jones, R.T. & Stephen Dieckman., 1977, Phytopathology 67: 831-838
- [11] Kitajima, E.W. & Lovisolo, O., 1972, J. Gen. Virol. 16: 265-277
- [12] Pierce, W.H., 1934, Phytopathology 24: 87-116
- [13] Uyeda, I., et al, 1975, Ann. Phytopath. Soc. Japan 41: 192-213

## Study on Bean Yellow Mosaic Virus Isolated from Alfalfa

Zhang Xiang-lin Yin Yu-qi Li Guo-yin Cuo Xin-min

(Laboratory of plant pathology, Shihezi Agricultural College, Shihezi, Xingjiang)

A virus isolate M-4 is obtained from alfalfa plant with yellow spot mosaic in Xingjiang. The M-4 isolate could cause systematic mosaic on many kinds of Leguminosae plants and give local chlorosis spots on Chenopodiaceae plants. The virus is easily to be transmitted by sap and aphid inoculation, but not by bean seeds. The thermal death point is 60-65°C, the dilution end point is  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  and the longevity in vitro is 4-5 days. The size of the filament particles is about  $660-740 \times 15$  nm in purified virus preparation. There are pinwheel, bundle and ring inclusion bodies in the cytoplasm of the infected host tissues seen with electron microscope. The capsid of the isolate migrates as a single component in SDS-polyacrylamide gel. Its electrophoresis molecular weight is about 16,200 dalton and consists of 128 amino acids residues. According to these properties and ISEM diagnosis results, the isolate is identified as a strain of Bean Yellow Mosaic Virus.

**Key words,** Bean Yellow Mosaic Virus Alfalfa's isolate