维普资讯 http://www.cqvip.com

侵染菊花和风信子的番茄不孕病毒的鉴定*

舒秀珍 朱水芳 胡伟贞 陆家珏 沈淑琳 王树琴 陈燕芳

（农业部植物检疫实验所 北京109026）

提 要

1986年先后在北京的公园采到菊花病样4个，北京动植检所送检风信子球茎病样一个。这5个分离物经人工接种10科36种植物，多表现花叶、斑驳、畸形等症状，而番茄的果实小而无籽。以菊-6分离物制备的抗血清与其它4个分离物产生明显愈合的沉淀线，证明它们的抗原性完全相同，这5个分离物与从菜豆分离的番茄不孕病毒（TAV）的抗血清反应产生分枝状的明显沉淀线。

菊-6分离物的理化特性：TIP为55—60℃，DEP为10^{-2}—10^{-4}，LIV为2天。其病毒粒子的平均直径为27nm等轴多面体，O.D260/280=1.76，病毒衣壳旦白分子量约为26300。

根据上述以菊-6分离物为代表的5个分离物的特性与CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No.79.1971所描述的从菊花分离的TAV基本相同，鉴定它们属TAV，但与菜豆分离物不完全相同，属不同株系。

关键词：番茄不孕病毒 菊花 风信子 分离物 鉴定

番茄不孕病毒（Tomato Aspermy Virus简称TAV）的寄主范围广，人工接种可侵染24科100多种植物。在种植菊花的国家均有分布[1,2]。1982年我国首次从菜豆上分离到TAV[3,4]，但从菊花和风信子上分离该病毒尚未见有报道。我国菊花品种资源极为丰富，从南到北种植菊花很普遍。根据我们调查，菊花上的病毒症状多种多样，较为复杂，因此，从1986—1988年我们在北京、广州、成都、上海、南京、杭州、昆明等地采集约500多个病样进行检测，结果表明，TAV在菊花上的发生是极为普遍的，是为害菊花的主要病原病毒。受侵染的花朵小，经常表现碎锦（即出现杂色），质量低劣。

材料和方法

一、毒株

1986年7月和11月先后在北京北海公园花圃采集到褪绿花叶病样3个（菊-6，菊-38，菊-118Ⅱ①）。12月在紫竹院公园花圃采集到绿花花样1个（菊-绿朝云）。

同年北京动植检所送检风信子有变黑坏死斑的球茎，种于温室花盆内，长成的植株表现较为瘦弱并有极轻微条纹花叶症状。

以上五个分离物先后在昆诺阿藜上经单斑分离纯化后作为毒毒。

本文于1988年10月4日收到

*本研究系农业部"七五"重点科研项目的专题

维普资讯 http://www.cqvip.com

二、寄主反应试验 供试寄主包括茄科、豆科、藜科、葫芦科、苋科、旋花科、菊科、番杏科等10科36种植物。供试植物的生育期：葫芦科用2子叶期，豆科用2单叶期，其它科一般4—7叶期。

三、稳定性测定 用黄花烟(*Nicotiana rustica*)病叶充分显症后采下研磨过滤的病汁液作稳定性测定，测定寄主植物为苋色藜（*Chenopodium amaranticolor*）和假酸浆（*Nicandra physaloides*）。

四、病毒提纯方法 接种普通烟（*Nicotiana tabacum* "White Burley"）15—20天后采收的病叶，加2倍体积的0.2mol/L磷酸缓冲液（pH6.5），捣碎，加入5%正丁醇20%氯仿，振荡10分钟，离心除去沉淀，上清液用10%PEG（MW 6000）沉淀，再用0.01mol/L磷酸缓冲液悬浮（内含0.001mol/L EDTA），然后105000r/m超速离心1.5小时。沉淀用0.01mol/L磷酸缓冲液悬浮，经高速离心去杂质后即为粗提物，用以进行5—20%蔗糖梯度离心，得精提纯物。

五、电镜观察 提纯病毒制剂适当稀释后，滴少许于铺有Formvar膜的铜网上，片刻后吸去多余病毒汁液，用2%醋酸氧铀负染1分钟左右，吸干，置电镜下观察病毒粒体。

测病毒颗粒大小时用乳胶颗粒（直径109nm）作校对，在双解剖镜下测病毒50个颗粒和乳胶颗粒直径，然后算出直径大小。

六、蛋白分子量测定 样品溶于0.01mol/L pH 7.2—7.4磷酸缓冲液，含2%SDS，0.5%巯基乙醇，沸水水浴热处理5分钟，冰浴急冷，2000r/m离心10分钟，上清液用于加样。标准蛋白样品（上海生化所东风试剂厂生产），内含磷酸化酶B（94,000）牛血清白蛋白（67,000），肌动蛋白(43,000)碳酸酐酶(30,000)，烟草花叶病毒外壳蛋白(17,500)，用同样方法处理。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳：分离胶浓度12%，浓缩胶5%，交联度2.6%电胶和缓冲液中都含1%SDS。电泳2小时后用考马氏亮兰R-250染色，洗脱后照相。

七、血清学测定 用我所从菜豆分离提纯的TAV制备的抗血清及黄瓜花叶病毒的抗血清，用琼脂扩散法测定毒株的血清学亲缘关系。

结　果

一、寄主反应试验

上述五个分离物寄主范围广，汁液接种10科36种植物，表现斑驳花叶，畸形或扭曲或有耳突或疱突者有普通烟(*Nicotiana tabacum "White Burley"*，*"Xanthi-nc"*)、心叶烟（*N. glutinosa*）、德伯尼烟（*N. debneyi*）、毛叶烟（*N. sylvestris*）、黄花烟（*N. rustica*）、番茄（*Lycopersicum esculentum*）"早粉2号"，番茄结的果实小而无籽或仅有个别种子），大豆（*Glycine max* "猴子毛"），洋酸浆（*Physalis floridana*），矮牵牛（*Petunia hybrida*），翠菊(*Callistephus chinensis*)、龙葵（*Solanum nigrum*）、毛曼陀罗（*Datura metel*）、曼陀罗（*D. stramonium*）和天仙子（*Hyoscyamus niger*）。

表现系统坏死斑的有假酸浆（*Nicandra physaloides*）、天鹰椒（*Capsicum frutescens*）、千日红（*Gomphrena globosa*）。

表现局部枯斑的有长豇豆（*Vigna sesquipedalis* "黑种三尺"）、蚕豆（*Vicia faba* "成胡9号"）、绿豆（*Phaseolus aureus* "M7A"）、番杏（*Tetragonia ex-*

维普资讯 http://www.cqvip.com

pansa）、昆诺阿藜（*Chenopodium quinoa*）、苋色藜（*C. amaranticolor*）、墙生藜（*C. murale*）、百日菊（*Zinnia elegans*）。

表现局部褪绿斑的老枪谷（*Amaranthus caudatus*）、西风古（*A. retroflexus*）、黄瓜（*Cucumis sativus*）和金鱼草（*Antirrinum majus*）。

它们都不侵染菜豆（*Phaseolus vulgaris*）、"家雀豆"（"Pinto"，"Topcrop"，"Monroe"）、补骨脂（*Psoralea corylifolia*）和裂叶花葵（*Lavatera trimestris*）。

现将菊-6、菊-118Ⅱ①和风信子三毒株与番茄不孕病毒在主要鉴别寄主上作一症状比较（见表1）。

表1 菊-6，菊-118Ⅱ①，风信子毒株与番茄不孕病毒在鉴别寄主上的症状比较

Table 1 Comparison of symptom expressions among isolates Chry-6, Chry-118Ⅱ① and Hyacinth with Tomato Aspermy Virus on indicator plants

鉴别寄主 (Indicator plants)	症状(Symptom expressions)			
	菊-6菊-118Ⅱ① Chry-6 and Chry-118Ⅱ①	风信子毒株 (Hyacinth isolate)	TAV(Des. of Pl. V. No.79)	TAV(菜豆分离) (Bean isolate)
普通烟(*Nicotiana tabacum* "White Burley")	CRS-MO mal	CRS-MO mal	MO, mal	MO, mal
心叶烟(*N. glutinosa*)	CM-MO⁺ mal	MO⁺, mal	CM-MO⁺	MO⁺
黄瓜(*Cucumis sativus*)	Lc	O	Lc or O	O
番茄(*Lycopersicum esculentum* "早粉2号")	MO, mal Ffs	MO, mal	MO, mal Ffs	M⁻, Ffs
昆诺阿藜(*Chenopodium quinoa*		Lc-s		
苋色藜(*C. amaranticolor*)				
长豇豆(*Vigna sesquipedalis* "黑种三尺"		Ls		M-Mo
菜豆(*Phaseolus vulgaris*)		O		M-Mo
裂叶花葵 (*Lavatera trimestris*)		O		CM
补骨脂 (*Psoralea trimestris*)		O		Ls-M

注：CRS=褪绿环斑(Chlorotic Ringspot)，Mo=斑驳(Mottle)，mal=畸形(Mal-formation)，C=褪绿(Chlorosis)，M=花叶(Mosaic)，s=枯斑(necrotic spot)，Lc=局部褪绿斑(Local chlorotic spot)，Ls=局部枯斑(Local necrotic spot)，Ffs=果实无籽(Fruits with no seeds)，O=不侵染(No infection)，+=严重(heavy)，−=轻微(light)。

菊-6、菊-118Ⅱ①，菊-38、菊-绿朝云和风信子五个分离物在以上寄主上的症状反应与CMI/AAB Descriptions of plant Viruses No. 79. 1971对番茄不孕病毒描述的寄主症状反应基本相似，特别是引起番茄不孕，与从菜豆分离的TAV的大部分寄主反应相似，但在部分寄主上反应不同。在黑种三尺上表现局部坏死斑，对菜豆、裂叶花葵和补骨脂不侵染，而菜豆分离的TAV对这4种鉴定寄主均表现为系统侵染。以上五个分离物都不系统侵染黄瓜，在心叶烟上表现严重蕨叶，表明它们和CMV的症状反应亦有明显差别。

维普资讯 http://www.cqvip.com

二、稳定性测定

表 2 菊-6与番茄不孕病毒稳定性比较

Table 2 Comparison of physical stabilities between Chry-6 and Tomato Aspermy Virus

稳定性 stability	Chry-6 菊-6	TAV (Des. of Pl. V. No. 79)	TAV (从菜豆分离 bean isolates)
TIP	55-60℃	55-60℃	55-60℃
DEP	10^{-2}—10^{-4}	10^{-4}—10^{-5}	10^{-2}—10^{-5}
LIV	2天	2—5天	6—9天

从表2看出，菊-6的稳定性与CMI/AAB Descriptions of plant Viruses No.79.1971描述的TAV稳定性基本相似。

三、病毒粒体理化特性

1. 病毒粒体大小：菊-6提纯病毒制剂稀释后电镜观察。见有大量球形粒体，平均直径为27nm左右（见图1）。提纯病毒制剂紫外吸收光谱测定用菊-6病毒制品，适当稀

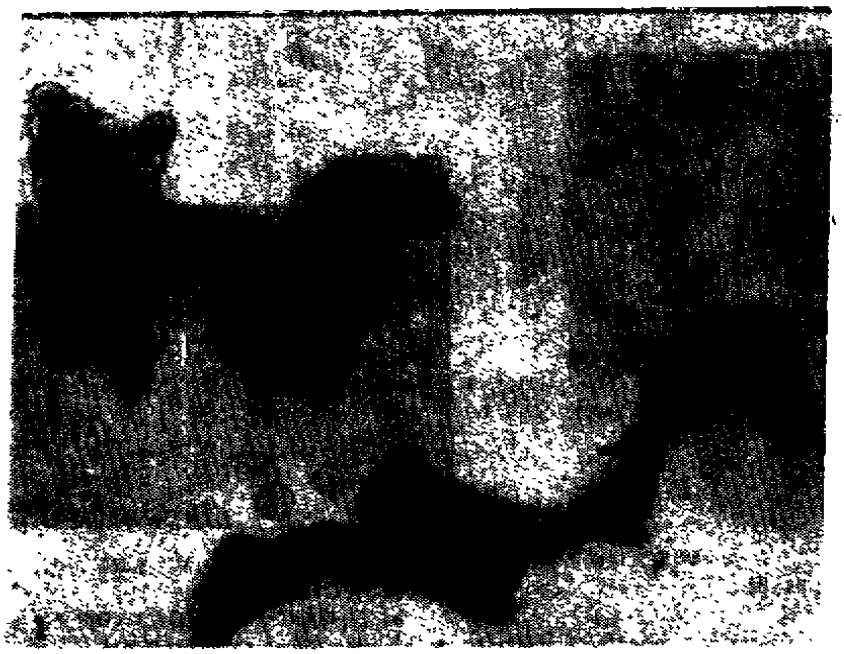

图1 菊-6病毒粒体图

Fig 1. Chry-6 virus particles

释后，经分光光度计紫外扫描，呈现出典型的核蛋白吸收曲线（见图2），其最高吸

维普资讯 http://www.cqvip.com

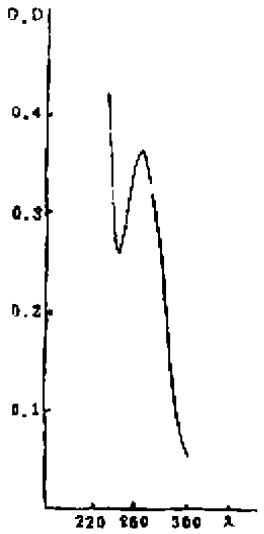

图2 菊－6病毒紫外吸收光谱图
Fig2. Ultraviolet absorbance curve of Chry-6 virus

收值在波长260nm，最低吸收值在波长242nm，A 260/280 为 1.76，与国外已报道的TAV A260/280为1.73—1.77相近。

2.蛋白分子量测定：电泳结果，标准蛋白出现清晰的5条沉淀带，菊-6外壳蛋白出现一条明显的沉淀带，其位置在碳酸酐酶与烟草花叶病毒外壳蛋白之间（见图3）。经过6次电泳重复，绘出蛋白质标准分子量曲线图，根据菊-6样品迁移率，在标准曲线上查出蛋白质分子量约为26300。

四、血清学反应

菊-6、菊-118Ⅱ①、菊-38等5个分离物的病汁液分别与我所从菜豆分离制备的番茄不孕病毒抗血清作琼脂扩散反应有明显的沉淀线，但不相连（见图4），说明血清学与番茄不孕病毒相关，但不完全相同。与黄瓜花叶病毒抗血清没有反应，表明无血清学关系。

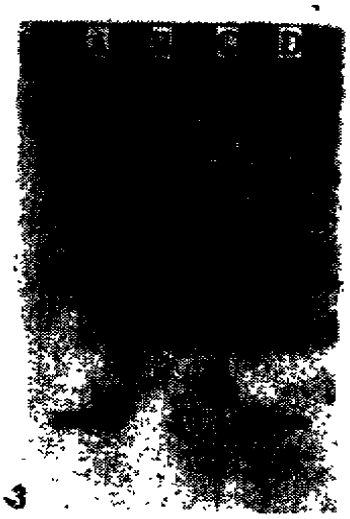

图3 菊-6 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳图
a. 标准蛋白质
b.c. 菊-6
d. 标准蛋白质＋菊-6
Fig 3. The map of Chry-6 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis(PAGE)
a. Standard Protein
b.c. Chry-6
d. Standard protein＋Chry-6

图4 菊-6，菊-38与TAV琼脂双扩散图
A. 菜豆TAV抗血清
a. 菊-6抗原 c. 菜豆TAV抗原
b. 菊-38抗原 d. 健康对照
Fig 4. Chry-6, Chry-38 and TAV agar double diffusion assay
A. Bean-TAV antiserum
a. Chry-6 antigen
b. Chry-38 antigen
c. Bean-TAV antigen
d. Health plant as a check

维普资讯 http://www.cqvip.com

菊-6制备的抗血清效价为1/256（免疫双扩散法），与菊-118Ⅱ①、菊-38、菊-绿朝云和风信子毒株有明显的沉淀线，且完全愈合，证明抗原性完全相同。

讨　论

从实验结果可以看出，分离物菊-6与从菜豆上分离的TAV的抗血清具明显的血清反应，而且其寄主症状反应（特别是引起番茄不孕）、稳定性、病毒粒体大小、理化特性等和TAV也很相似，因此，初步认为此分离为TAV。但它和从菜豆分离的TAV不完全相同，表现为血清反应沉淀线呈分枝状，寄主的症状反应也不完全相同，表明它和从菜豆上分离的TAV属不同的株系。

本实验首次测定了菊-6的衣壳蛋白的分子量为26300，与Cucumvirus病毒分子量为26000相接近，进一步确认此病毒属于Cucumvirus组的TAV。

菊-6的抗血清和菊-118Ⅱ①，菊-38，菊-绿朝云和风信子4个分离物具强烈的血清反应，沉淀线很吻合，寄主症状反应也一样，说明它们属同一株系。

参 考 文 献

〔1〕 M. Holling & Olwen M. Stone, 1971, CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No.78
〔2〕 M. Klinkowski, 1977, *Pflanzliche Virologie* 3: 62-64
〔3〕 王树琴等, 1983,《菜豆种传的番茄不孕病毒的研究》植物检疫研究报告，农业部植物检疫实验所印
〔4〕 马德芳等, 1983, 植物保护学报, 10(3): 215-217

Identification of Tomato Aspermy Virus Infecting Chrysanthemum and Hyacinth

Shu Xui-zhen et al

(*Plant Quarantine Institute, Ministry of Agriculture, Beijing* 100026)

Four diseased samples of chrysanthemum showing chlorotic mosaic or green flowers were collected from the Beihai Park and Zizhuyan Park in Beijing in July and December of 1986. Another one showing black necrotic spots on bulb of Hyacinth was from Beijing Animal and Plant Quarantine Service.

These five isolates were inoculated on 36 species of plants belonging to 10 families(e.g. Solanaceae, Leguminosae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Amaranthaceae and Compositae etc.). The infected plants showed either systemic mosaic, severe mottle or malformation. The diseased fruits of tomato became small, deformed and seedless. Cucumber and cowpea showed chlorotic local lesions. They did not infect *Phaseolus vulgaris*, *Psoralea corylifolia* and *Lavatera tremestris*.

维普资讯 http://www.cqvip.com

The stability of the virus was: TIP 55-60℃, DEP 10^{-3}-10^{-4}, LIV 2 days (room temperature).

The purified virus was shown as isometric polyhedron particles with a diameter of about 27 nm.

The virus has typical ultraviolet absorption spectrum of nucleic protein, O.D 260/280 = 1.76, its moleclar weight was 26300.

By agar double diffusion assay, the precipitation band between the antiserum of bean isolate (TAV) and each of the antigens of the 5 isolates from Chrysanthemum was branching, while the precipitation band between the antiserum of isolate Chry-6 and each of the antigens of the 5 isolates (including Chry-6) was confluent.

Based on these characteristics as well as on the results of biological identification, the five isolates coincided closely with the Tomato Aspermy Virus recorded on CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 79, 1971. So it is concluded that these five isolates were identical with Tomato Aspermy Virus, but were not of the same strain with the bean isolate.

Key words: Tomato Aspermy Virus Chrysanthemum hyacinth Isolates Identification