维普资讯 http://www.cqvip.com

2011(15)

85-92

第7卷第1期
1992年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.7 No.1
Mar.1992

小苍兰褪绿条纹花叶病毒的分离鉴定

陈伟丽 赵欣阳 于善谦

（复旦大学微生物系病毒室，上海200433）

S432.41

提　要

从表现褪绿条纹花叶症状的小苍兰（*Freesia hybrida*）上分离得到一种棒状病毒，能感染茄科、藜科、苋科、玄参科和葫芦科的部分植物。病毒粒子长500—575nm，直径13nm。外壳蛋白由一种分子量17500dalton的蛋白亚基组成。纯化的病毒制剂具有典型的核蛋白紫外吸收，A260/A280为1.39。稀释终点10^{-7}，致死温度约为95℃，在4℃下体外保毒期大于6个月。桃蚜不能传毒。病毒与PVX有血清学关系。实验表明，该病毒属于马铃薯X病毒群，不同于已报道的感染小苍兰的其它病毒。本文还讨论了小苍兰褪绿条纹花叶病毒的控制和检测问题。

关键词：小苍兰褪绿条纹花叶病毒　病毒特性　小苍兰；褪绿条纹花叶病毒

小苍兰（*Freesia hybrida*），又名香雪兰，鸢尾科小苍兰属植物，花色种类丰富，颜色鲜艳，我国各地均有栽培，是重要的鲜切花和观赏植物，因而颇受人们的喜爱。但是，病毒的感染造成了花色杂，花朵数量骤减，植物生长不良，病毒病严重时，甚至造成种球的退化，以致失去再利用的价值，这是限制小苍兰大规模生产的因素

表1. 感染小苍兰的几种病毒及部分特征

Table 1. Viruses which infect *Freesia hybrida* and some of their characters

病毒的种类（Viruses）	病毒形态（Morphology）	传播途径（Transmission）
菜豆黄花叶病毒（BYMV）	线状，长度大于700nm	蚜传，汁液传
小苍兰条斑病毒（FSV）	线状，850nm长	蚜传
小苍兰花叶病毒（FMV）	线状，643～646nm×15nm 或830～850nm×13nm	汁液传，蚜传
黄瓜花叶病毒（CMV）	球状，直径30nm	汁液传，蚜传
番茄黑环病毒（ToBRV）	球状，直径30nm	种传，线虫传，汁液传
蚕豆萎蔫病毒（BBWV）	球状，直径25nm	汁液传，蚜传
大丁香潜隐病毒（GLV）	弹状，60～70×150～300nm	汁液不传，其它不详
甜菜黄化病毒群的一个成员（尚未鉴定到种）	线状，800～850nm长	汁液不传

本文于1990年12月4日收到，1991年6月4日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

之一。[1,2]。

自1954年以来，国外在小苍兰上陆续发现了菜豆黄花叶病毒等八种病毒的感染（表1）[3-11]。国内小苍兰病毒的研究刚刚起步，目前仅有关于黄瓜花叶病毒和一种尚未鉴定的线状病毒感染小苍兰的粗略报道[12,13]。本文报道了以带病小苍兰上分离得到的一种棒状病毒，并对它进行了全面鉴定。

材料与方法

一、毒源 由上海林业站提供的有褪绿条纹和花叶病症的小苍兰，经蚕豆上三次单斑分离，得到纯化的病毒作为毒源，保存在三生烟上。

二、寄主范围测定[14] 取接种10～20天有系统花叶症状的三生烟叶片，加少量磷酸缓冲液（0.02mol/L，pH7.2），研碎，取汁液摩擦接种26种植物，在防虫温室培养7～20天后观察发病情况。未发病的植株以同法回接枯斑寄主蚕豆，培养7～20天，若蚕豆产生枯斑，则上述未发病植株能被该病毒感染，反之则不能被感染。

三、病毒的分离纯化 以接种10～20天的三生烟叶片为材料，采取修改的Freitag方法[15]，用0.1mol/L pH7.2的磷酸缓冲液（内含0.1%巯基乙醇）提取，8%正丁醇净化，6%聚乙二醇（M.W.6000）及3%氯化钠沉淀，4℃过夜，8000r/m离心15分钟收集沉淀，用0.05mol/L pH7.2的磷酸缓冲液洗脱4次，离心收集上清液，进一步采用35000r/m和8000r/m进行差速离心，得到纯化的病毒制剂。用分光光度计测定紫外吸收。

四、电镜观察 用负染法观察纯化病毒制剂及叶片粗汁液中病毒颗粒的形态，测量其大小。

五、病毒粒子稳定性测定 以三生烟为测试寄主，病毒感染的三生烟的病汁液用0.02mol/L pH7.2的磷酸缓冲液稀释后接种，按文献[16]的方法测定。

六、蚜虫传毒试验 将无毒桃蚜（*Myzus persicae*）饥饿半小时后，转移到病株上，饲毒半小时后移到三生烟健苗上，每株5～10只，共接10株，传毒1小时后杀死蚜虫，将接种后的三生烟置于防虫温室观察发病情况。

七、病毒外壳蛋白亚基分子量的测定 采用不连续的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（12.5%的分离胶，3.75%的浓缩胶）法[17]，考马斯亮蓝染色。

八、多克隆抗体制备及血清学测定 纯化病毒制剂与不完全佐剂按1：1充分乳化后对18克以上雄性BALB/C小鼠进行二次腹腔注射，每次注射病毒量300～500μg，间隔二周，第二次注射后一周用50μl 2.5mg/ml的病毒液进行一次尾静脉注射，同时腹腔内注射SP 2/0细胞约10^5～10^6个，二周后开始收集腹水，离心后制备的上清中含大量多克隆抗体。用酶免疫吸附实验[18]检测该病毒与马铃薯X病毒（PVX）、马铃薯Y病毒（PVY）的血清学关系。

结 果

一、寄主症状及寄主范围 自然发病及接种后的小苍兰一般二周后出现花叶症状，随后叶片上出现褪绿条纹，发病严重时造成叶片的枯萎死亡。对其它25种植物的感染结果如表2所示。该病毒能系统感染茄科植物中的几种烟草，而在曼陀罗上产生局部枯斑。豆科和玄参科部分植物感染该病毒后产生枯斑，而葫芦科的金瓜，黄瓜感染该病毒后则出现系统花叶症状。病毒对藜科的苋色藜、灰藜的感染一般表现为局部症状，但感

维普资讯 http://www.cqvip.com

染严重灰藜有时也会继发系统花叶症状（图1）。

表 2. 小苍兰褪绿条纹花叶病毒的寄主范围测定结果

Table 2. The host range of Freesia chlorotic stripe mosaic virus

供试植物 Plant tested	症状 Symptoms	供试植物 Plant tested	症状 Symptoms
鸢尾科（Iridaceae）		豆科（Leguminose）	
小苍兰（*Freesia hybrida*）	SM	大豆（*Glycina max*）	O
茄　科（Solanceae）		菜豆（*Phaseolus vulgaris*）	O
马铃薯（*Solanum tuberosum*）	O	赤豆（*P.angularis*）	O
心叶烟（*Nicotiana gletinosa*）	SM	蚕豆（*Vicia faba*）	LN
三生烟（*N.tabacum* cv.*samsum*）	SM	豇豆（*Vigna sinensis*）	LN
蕃　茄（*Lycopersicom esculentum*）	O	青豆（*G.max* cv.green）	O
克利夫兰烟（*N.clevelundii*）	SM	十字花科（Cruciferae）	
曼陀罗（*Datura stramonium*）	LN	青菜（*Brassica chinensis*）	O
矮牵牛（*Petunia hybrida*）	O	葫芦科（Cucurbitaceae）	
藜　科（Chenopodiacese）		金瓜(*Cucubita moschola* cv.*Jingua*)	SM
苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)	LN	丝瓜（*Luffa cylindrica*）	O
灰　藜（*C.glaucum*）	LN(SM)	黄瓜（*Cucumis sativus*）	SM
墙生藜（*C.murale*）	O	西瓜（*Citrullus lanatus*）	O
石竹科（Caryophyllaceae）		冬瓜（*Benincasa hispida*）	O
须苞石竹（*Dianthus barbatus*）	O	玄参科（Scrophulariaceae）	
苋科（Amaranthaceae）		金鱼草（*Antirrhiuh mejus*）	LN
千日红（*Gomphrena globosa*）	O		

注：SM：系统花叶症状；

LN：局部枯斑症状；

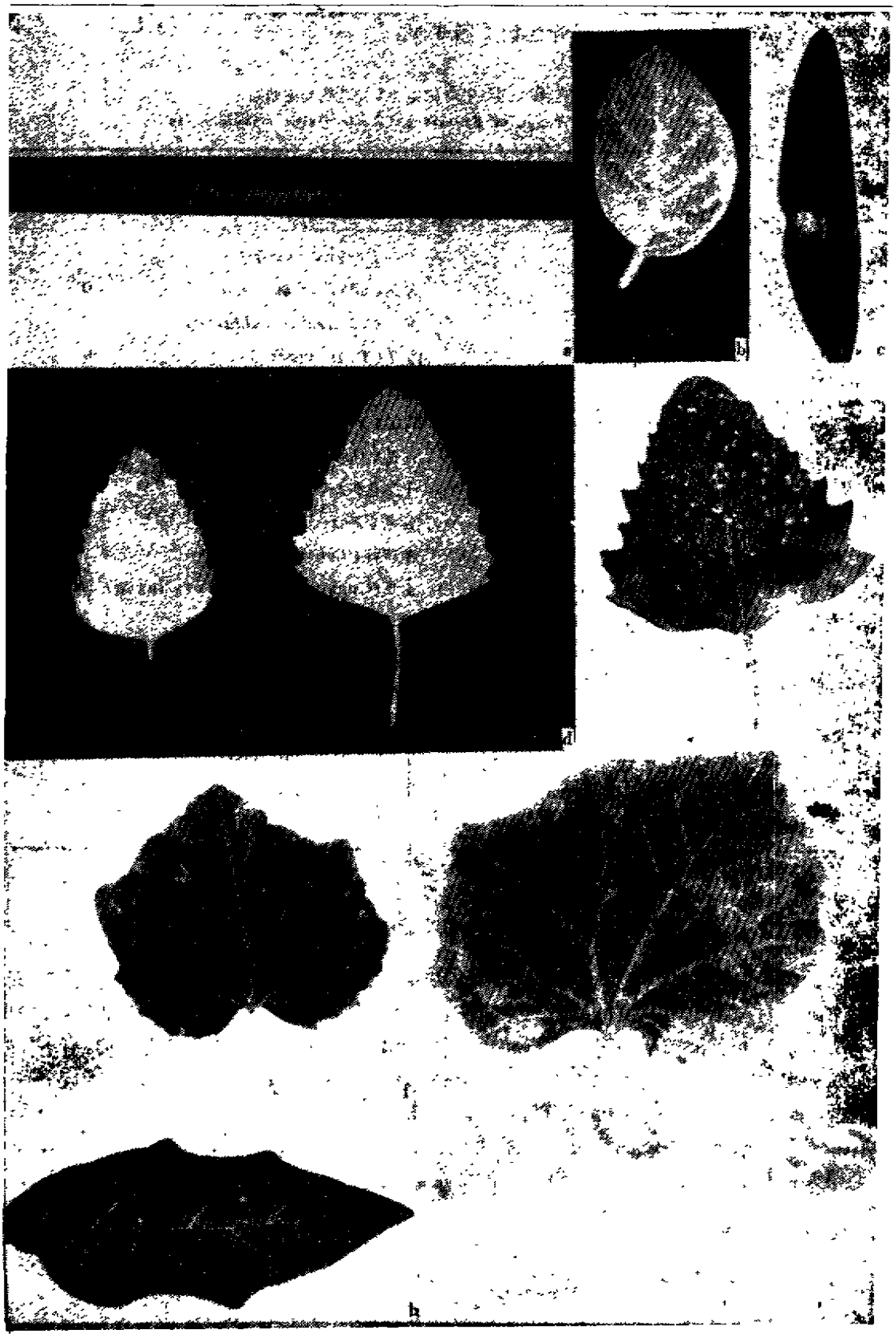
LN(SM)：一般为局部枯斑症状，发病严重时，有时会继发系统花叶症状。

二、病毒粒子形态　电镜下粗汁液中的病毒粒子有一定弯曲度。纯化液中则为直棒状(图2)。对病毒粒子长度的统计结果表明，60%以上病毒粒子的长度在500～575nm之间，以550nm长的粒子最多，病毒粒子直径为13nm，有些粒子可见空心结构。

三、病毒的紫外吸收特性　纯化病毒的紫外吸收曲线如图3所示，最大吸收值在260nm，最小吸收值在245nm，A260/A280＝1.39，呈典型的病毒紫外吸收曲线。

四、病毒粒子的稳定性　病毒的稀释终点为10^{-7}，致死温度约为95℃，4℃下体外保毒期大于6个月。数据表明，该病毒的稳定性较强。

维普资讯 http://www.cqvip.com



维普资讯 http://www.cqvip.com

图1．FCSHV感染后部分寄主叶部症状

a．小苍兰；　b．三生烟；　c．金鱼草；
d．灰藜；　e．苋色藜；　f．金瓜；
g．黄瓜；　h．曼陀罗；　i．蚕豆．

Fig 1. Symptoms on the leaves of some hosts infected by FCSMV.

a. *Freesia hybrida*; b. *Nicotiana tabacum* cv.*samsum*;
c.*Antirrhium mejus*; d.*Chenopodium glaucum*;
e.*C.amaranticolor*; f.*Cucubita moschola* cv.*Jingua*;
g.*Cucumis sativus*; h.*Datura stramonium*;
i.*Vicia faba*.

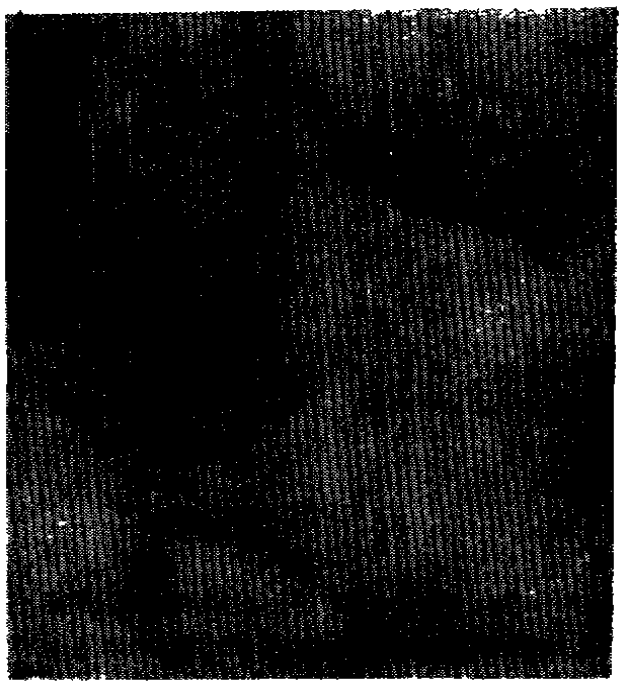


图2．病毒粒子形态，标尺长500nm

Fig 2. Virus particles.Bar represents 500nm

五、蚜虫传毒　由桃蚜接种的10株三生烟均无感染症状出现，该病毒不能经桃蚜传毒。

六、病毒外壳蛋白亚基的分子量　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果呈现一条带，分子量17500dalton（图4）。

七、血清学关系　用BALB/C小鼠制备的多克隆抗体ELISA效价为$1:10^4$。该抗体与PVX、PVY的反应结果表明，该病毒与PVX有血清学关系，而与PVY无血清学关系（表3）。

表3．小苍兰褪绿条纹花叶病毒与PVX及PVY的血清学关系

Table 3. The serological relationship between FCSM, PVX and PVY

病　毒 Viruses	FCSMV	PVX	PVY	负对照（Negative control）
O.D405nm	0.174	0.053	0.000	0.000

维普资讯 http://www.cqvip.com

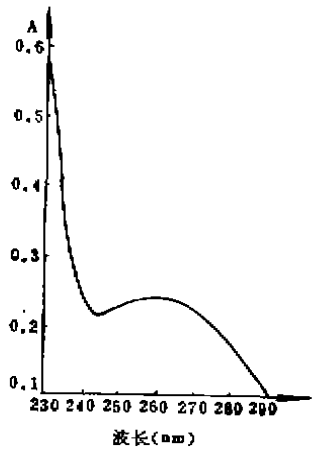


图3. 纯化病毒的紫外吸收曲线

Fig 3. UV-absorption curve of the purified virus

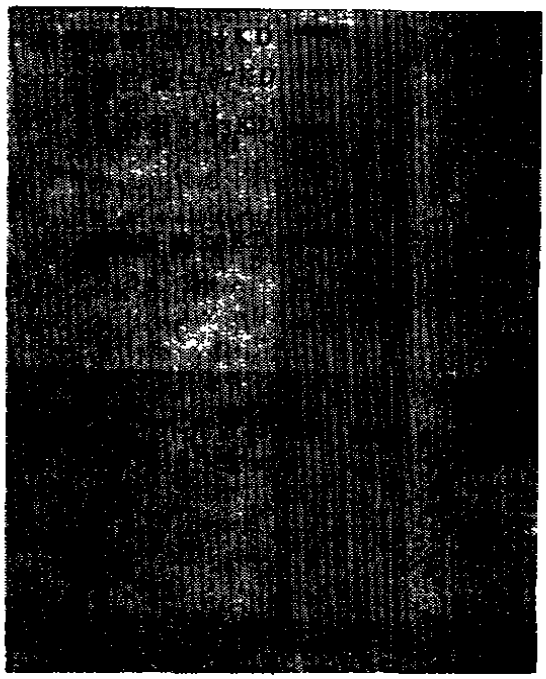


图4. 病毒外壳蛋白电泳图谱

Fig 4. SDS-PAGE of the coat protein of FCSMV

讨 论

从上海林业站提供的小苍兰病株上分离得到的棒状病毒回接小苍兰后，小苍兰产生褪绿条纹和花叶症状，严重时导致叶片枯萎死亡。病毒还能感染茄科、藜科、豆科、玄参科和葫芦科的部分植物，导致这些植物产生局部或系统症状。经电镜观察统计，60%以上病毒粒子长500～575nm，并以550nm的粒子为最多，与马铃薯X病毒群粒子大小相同[19,20]。该病毒稳定性高：稀释终点10^{-7}；致死温度约为95℃；在4℃下体外保毒期达6个月以上。该病毒也不能经桃蚜传播，这些特征与马铃薯X病毒群的典型特征相似。血清学试验表明，该病毒与马铃薯X病毒有血清学关系，而与马铃薯Y病毒无血清学关系。病毒外壳蛋白由一种亚基构成，分子量17500dalton，与烟草花叶病毒的外壳蛋白亚基相似。但它们的粒子长度、直径，对心叶烟的感染情况都相差甚远。上述证据表明，感染小苍兰的这种病毒属于马铃薯X病毒群，但由于该病毒又具有不同于已报道的马铃薯X病毒群中其它成员的特征，如目前尚未见马铃薯X病毒群成员感染小苍兰或从小苍兰上分离到马铃薯X病毒群中病毒的详细报道，因此该病毒可能是马铃薯X病毒群中的一个新成员，现定名小苍兰褪绿条纹花叶病毒（Freesia chlorotic stripe mosaic virus, FCSMV）。在感染小苍兰的几种病毒中（表1），CMV、BBWV和ToBRV为球状病毒；GLV为弹状病毒；其它四种线状病毒的长度，蚜虫和汁液传毒情况都明显不同于大小为500～575nm×13nm，蚜虫不传毒而汁液传毒的FCSMV。目前

维普资讯 http://www.cqvip.com

国内尚未见关于FCSMV的报道。至于该病毒在上海地区栽培小苍兰上的分布情况以及对小苍兰影响的严重程度都有待进一步查明。

如何控制小苍兰褪绿条纹花叶病毒在栽培小苍兰上的传播，是生产实际中引人关注的问题。该病毒虽然不能通过桃蚜传播，但因其毒力较强，少量病毒就可以引起较严重的症状，并且该病毒的稳定性强，可以通过汁液传播，因此，人为的接触，植株间的相互摩擦，可使病毒由病株传播到健株上。因为在国内一般选用小苍兰的种球进行繁殖，所以病毒可能通过种球在小苍兰的上代与下代之间传播。因此，严格选用无毒种球或通过组织培养等方法培育无毒苗是控制病毒传播的重要手段。及时清除带病植株和杂草，尽可能提供较宽敞的栽种空间以避免植株间的摩擦，对各种操作工具进行严格的消毒，将可以有效地控制小苍兰褪绿条纹花叶病毒的传播。

参 考 文 献

〔1〕 张爱平等，1989，上海农学院学报 7(3)：209-214。

〔2〕 冯德培等，1982，简明生物学辞典 第991页，上海辞书出版社。

〔3〕 张健如，沈淑琳，1984，花卉病毒鉴定手册（内部发行）。

〔4〕 Vad Koot, et al., 1954, *Tijdschr.Plziekt.*60：157-192.

〔5〕 Brunt, A.A., 1967, A Rep.Glasshouse Crops Res.Inst.101.

〔6〕 Brunt, A.A., 1968, A Rep.Glasshouse Crops Res.Inst.104—105.

〔7〕 Brunt, A.A., 1969, A Rep.Glasshouse Crops Res.Inst.131—132.

〔8〕 Hakkaart, F.A., 1970, Jversl.Inst.Plziektenk.Onderz.102—104.

〔9〕 Hakkaart, F.A., 1971, Jversl.Inst.Plziektenk.Onderz.102—104.

〔10〕 Foxe, M.J., et al., 1985, *Acta Horticulturae* 164：291—295.

〔11〕 Derks, A.F.L., 1985, *Acta Horticulturae* 164：281—288.

〔12〕 张爱平等，1989，中国植病学会华东区分会1989年年会及学术讨论文摘要汇编，第82页。

〔13〕 周桂珍等，1989，中国植病学会六十周年纪念论文汇编，第120页。

〔14〕 田波，裘美云，1987，植物病毒研究方法（上），第153—257页，科学出版社。

〔15〕 Freitag, J.F.and Milne, K.S., 1970, *Phytopathol.*60：66.

〔16〕 Rose, A.F., 1964, Identifitatioa of Plant Viruses. pp68—92. in Corbett M.K. and Sisler, H.D., eds.Plant Virology.Univ.Florida Press.Gaineville. p.527.

〔17〕 Leammli, U.K., 1970, *Nature* 227：680.

〔18〕 Dietzen, R.G.and Sander, E., 1982, *Arch.Virol.*74：197—204.

〔19〕 Kurstak, E.eds., 1981, Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis. pp627—694. Elsevier, North-holland.

〔20〕 Mathews, R.E.F., eds., 1982, Classifiontion and Nomenclature of Viruses (Firth Report of ICTV). pp156-157. Basel, Munchen, Paris, London, New York, Sydney.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Isolation and Classification of Freesia Chlorotic Stripe Mosaic Virus

Chen Wei-li Zhao Xin-yang Yu Shan-qian

(*Microbiology Department of Fudan University, Shanghai* 200433)

A rod shaped virus isolated from *Freesia hybrida* showing mosaic and chlorotic stripes on the leaves could infect some species of Solanceae, Chenopodiaceae, Leguminose, Scrophulariaceae and Cucurbitacere. The virus with the normal length of 500—575nm and the diameter of 13nm had a single type of coat protein subunit with the molecular weight of 17500 dalton. The purified preparation of the virus had a typical UV-absorption of nucleoprotein. A260/A280 was 1.39. Its dilution end-point was 10^{-7}, thermal inactive point about 95℃ and longevity in vitro under 4℃ above 6 months. The virus could not transmitted by *Myzus persicae*. The virus was serologically related to PXV, different from other viruses infecting *Freesia hybrida* which had been reported. It was regarded as a member of Potexvirus. The virus was named Freesia chlorotic stripe mosaic virus. The control and detection of the virus were also discussed.

Key words: Freesia chlorotic stripe mosaic virus *Freasia hybrida* Properties of vrius