

197-206

3173(16)

第7卷第2期
1992年6月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol. 7 No. 2
Jun. 1992

浙江大蒜病毒的毒源鉴定

陆 关 成

(浙江农业大学植保系, 杭州 310029)

洪 健[✓] 徐 正

(浙江农业大学中心实验室, 杭州 310029)

5432.41

胡 仕 孟

(浙江慈溪县农业局植保站, 慈溪 315300)

提 要

浙江余姚白蒜等5个品种均有病毒病, 发病率100%, 呈现黄条褪绿、花叶和畸形扭曲。人工接种蚕豆 (*Vicia faba*) 产生局部褐斑, 墙生藜 (*Chenopodium murale*) 上呈现褪绿点斑或隐症, 豇豆 (*Vigna sinensis*) 上为坏死点斑或花叶。电镜检测病毒粒子为线形, 长度为300—2250×11—12nm, 其中550—650nm占29.6%、700—800nm占28%; 超薄切片发现大量风轮状、环状、束状和涡轮状胞质内含体, 未见片层状聚集体, 叶绿体被破坏。致死温度在55℃以上。免疫电镜测试和洋葱黄矮病毒(OYDV)有血清学相关性, 根据以上特征证明浙江大蒜病毒病是由两种病毒复合感染引起的, 一种是大蒜黄条病毒(GYSV), 属马铃薯Y病毒群(Potyvirus); 另一种是大蒜隐潜病毒(GLV), 属于石竹隐潜病毒群(Carlaviruses)。

关键词: 大蒜病毒鉴定 大蒜黄条病毒 大蒜隐潜病毒 复合感染

大蒜病毒, 毒源;

大蒜 (*Allium sativum* L.) 病毒病是世界性病害, 我国各省产地都普遍感染。作者收集15个国家和地区的研究文献, 50 来年的研究所得的结论 均描述不一, 因此病毒的命名归属至今混淆的局面尚未解决。本研究在大蒜 病状类型、病毒粒子形状大小、传染方式和与洋葱黄矮病毒血清反应关系中和前人相似, 但浙江大蒜病毒的寄主范围很窄, 病状反应、发病情况、病毒稳定性和病毒粒子长度分布峰值等均有差异, 我们把病毒粒子长度在750nm左右、超薄切片中所见风轮状胞质内含体、能侵染墙生藜和豇豆的称为GYSV, 把病毒粒子长度在600nm左右能侵染蚕豆的称GLV。

本文于1991年3月29日收到, 12月2日修回

材 料 和 方 法

一、田间发病调查

引种或产地田间调查有慈溪县的余姚白蒜、江苏太仓蒜、山东仓山蒜、上海嘉定蒜和河南中牟蒜。调查时间每年4月生长旺期，每品种/次随机隔行抽查10行以上，每行查10—50株。严重程度分5级标准（分级标准从略），记录病状类型、计算发病率和病情指数。

病状不明显的隐症株曾先后采集6批次共80株，供电镜检查。

二、传染方式、田间自然分布和寄主范围

虫传和汁传试验均按常规。

田间调查着重检查蚜虫有无；检查大蒜和洋葱（或）韭菜相邻或同丘种植的田块，是否有交互感染。

人工接种7科31种植物，接后置防虫温室内持续观察两个月以上，记录病状。

三、病毒粒子和病理超微结构检查

铜网沾取不同品种和不同病状类型的大蒜叶、根、茎、花茎和蒜瓣的汁液或提纯物，用2%磷钨酸（pH6.8）负染后镜检，测量余姚白蒜病叶汁液中300个病毒粒子的长度，绘制长度分布图。

细胞病变检查取不同病状类型的叶、根等组织切成1—2mm小块，经Karnovsky 2.5%戊二醛—2%多聚甲醛混合固定液和2%四氧化锇双重固定。常规脱水，Epon 812树脂包埋，用Reichert-Jung Ultracut E型超薄切片机切片，醋酸铀和柠檬酸铅复合染色。

四、免疫电镜测血清反应

铜网沾取大蒜病毒粗提纯物（和病汁液）用0.066 mol/L pH7.0 PB滴洗后，漂在一滴1:10稀释的OYDV兔抗血清上，经30 min—1 hr，再用PB和双蒸水分别滴洗后用2%磷钨酸负染色。制备好样品均在Hitachi H-600型JEOL JEM-1200 EX型电镜下观察（OYDV抗血清为上海复旦大学生物系病毒室赠给）

五、耐温限点测定

本试验用热处理法，先把蒜瓣剥去外皮，每处理用20瓣，纱布包扎后在35℃、40℃、45℃、50℃、55℃的恒温下各处理10 min，20 min和40 min，误差不超过0.5℃；对照用冷水浸10 min，处理后播花盆内置防虫温室观察，并作电镜检查。

六、大蒜病毒的提纯

大蒜病毒的提纯方法参考A Pena-Iglesias和Pilan Ayuso（1982）的程序^[1]，采用如下三种流程（见下页）。

用上述最后悬浮的粗提物分别稀释21倍、42倍后在日本岛津UV-210A型紫外分光光度计上测紫外吸收峰。

病叶300g液氮冰冻、粉碎

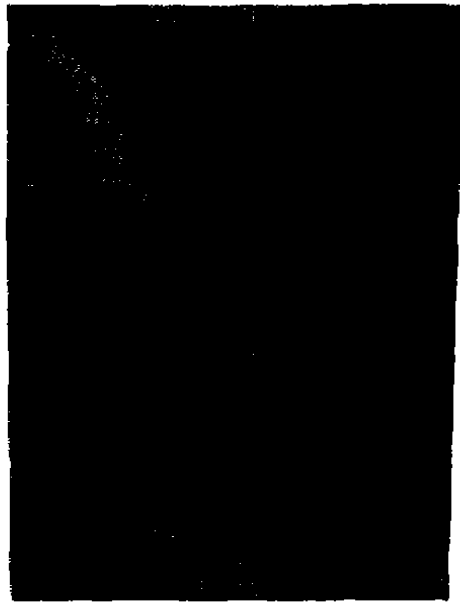
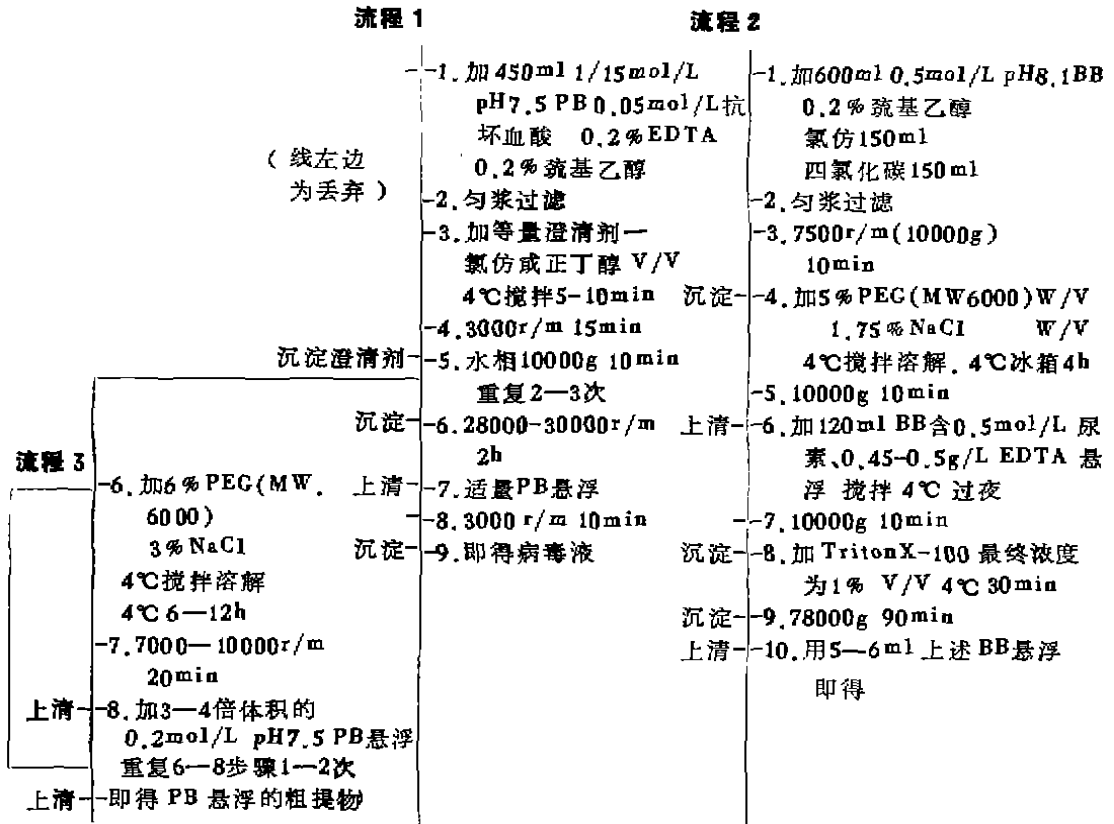


图 1. 大蒜叶上的黄条病状
Fig 1. Yellow streak symptoms on Garlic leaves

结 果

一、大蒜病毒病发病情况

田间调查各产区都有病毒病，病状有花叶、黄条、扭曲捻卷，见图 1、2。上海嘉定蒜和江苏太仓蒜较耐病，但病状不明显的植株用电镜检查也都有病毒粒子，只是数量较少。就 1987 年 5 月 22 日调查 5 户同一丘地上的浙江余姚白蒜和太仓白蒜的发病率分别为 88.1% 和 38.6%，病情指数为 41.2% 和 33%，说明不同品种的严重程度是有差异的。

二、传染方式和田间分布

大蒜播后一出土就可显现病状和高的发病率，说明我国的大蒜病毒病是以种蒜带毒为主。病毒可以汁传和蚜虫

传。但多年调查很难找到大蒜上的蚜虫，只在秋后套种于棉田中央的少量蒜苗上见过一次，所以蚜虫在传病上已无意义。值得提出慈溪是大蒜和洋葱的产地，在同丘或相邻的洋葱或韭菜上从未见有病毒病，说明它们之间不存在相互感染的问题。



图2. 大蒜苗样呈畸形扭曲

Fig 2. Distortion or deformation on Garlic seedling

三、大蒜病毒的鉴定

1. 指示植物和寄主范围

本研究接种 31 种植物只有 3 种有病状反应，墙生藜上现褪绿点斑或隐症，豇豆上坏死点斑和花叶、蚕豆上呈现局部褐斑，见图 3、表 1。迄今国内外报道葱属植物病毒



图3. 大蒜病毒在蚕豆、豇豆和墙生藜上的病状

Fig 3. Symptoms of Garlic viruses on *Vicia faba*, *Vigna sinensis* and *Chenopodium murale*

的成员多种，但它们总的寄主也只有十来种，说明其寄主范围很窄。本试验 5 次重复没有发现洋葱、韭菜、千日红、苋色藜、昆诺阿藜和番杏被感染。

2. 病毒粒子

用各品种的大蒜叶、茎、根和鳞茎瓣的汁液都能观察到和提纯制品一样的线状病毒粒子。直径约 11—12nm，长度范围宽达 300—2250nm，见图 4。统计余姚白蒜 300 个病

表 1. 余姚白蒜病毒的寄主范围及其病状和五种葱属病毒病性状比较
Table 1. The host range, symptoms of the Yu Yao white garlic viral disease and comparison of the properties of five kinds of Allium species viral diseases

指示植物	Indicator plants	病状类型 Symptom types (葱属病毒* Allium species viruses)					
		余姚白蒜 Yu Yao White Garlic	GYSV	GLV	GMV	LYSV	OYDV
百合科 Liliaceae							
大蒜	<i>Allium sativum</i>	YS, M	YS, M	Lat.	S	O	O
洋葱	<i>A. cepa</i>	O	O	±	O	O	S
韭菜	<i>A. fuberosum</i>	O	O	±	O	S	O
豆科 Leguminosae							
豇豆	<i>Vigna sinensis</i>	CS-BN	O	O	O	O	O
蚕豆	<i>Vicia fabe</i>	LL, BS	O	LL	O	O	O
菜豆	<i>Phaseolus vulgaris</i>	O	O	O	O	O	LL
豌豆	<i>Pisum sativum</i>	O	O	O	O	O	LL
苋科 Amaranaceae							
千日红	<i>Gomphrena globosa</i>	O	O	O	LL	LL	O
藜科 Chenopodiaceae							
昆诺阿藜	<i>Chenopodium quinoa</i>	O	O	LL	Lat.	GLL	O
苋色藜	<i>Che. amaranticolor</i>	O	O	LL	Lat.	LL	O
墙生藜	<i>Che. murabe</i>	CS→Noc	LL	O	O	LL	O
番杏科 Aizoaceae							
番杏	<i>Tetragonia expansa</i>	O	O	LN, LC	O	O	O
病毒粒子长度 (mm)	Virus particles length(nm)	550—650 703—800	700—800	625—700	750	680—700	700—750
内含体	Inclusion	PW, scroll	PW, scroll	Aggr. lam	PW, scroll, lam		
血清学特异性	Serological specificity	OYDV	OYDV LYSV		OYDV OYDV GYSV	LYSV GYSV	
汁液感染力持久性	温度钝化点(°C) TIP(°C)	>55	60—65	55—60	55—70		60—65
Persistence of infectivity in expressed sap	稀释终点 DEP		10 ⁻⁴ - ⁻⁵	10 ⁻⁴ - ⁻⁵	10 ⁻² - ⁻³		10 ⁻³ - ⁻⁴
	体外存活期 LIV		2—3	2—4	2		2—3

CS (Chlorosis spot)	褪绿斑	M (Mosaic)	花叶	PW (Pinwheel)	风轮状
BS (Brown spot)	褐斑	Noc (Not clear)	不明显	Scroll	涡轮状
LC (Local chlorosis)	局部褪斑	O (Symptomless)	无病状	Aggr. (aggregates)	集聚
LL (Local Lesion)	局部斑	BN (Brown necrosis)	褐色坏死	Lam. (Laminat)	层迭
Lat. (Latent)	隐潜	YS (Yellow streap)	黄条	± (Indeterminste)	不一致
LN (Local Necrosis)	局部坏死	S (Systemic)	系统性的		

*见参考文献1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12.

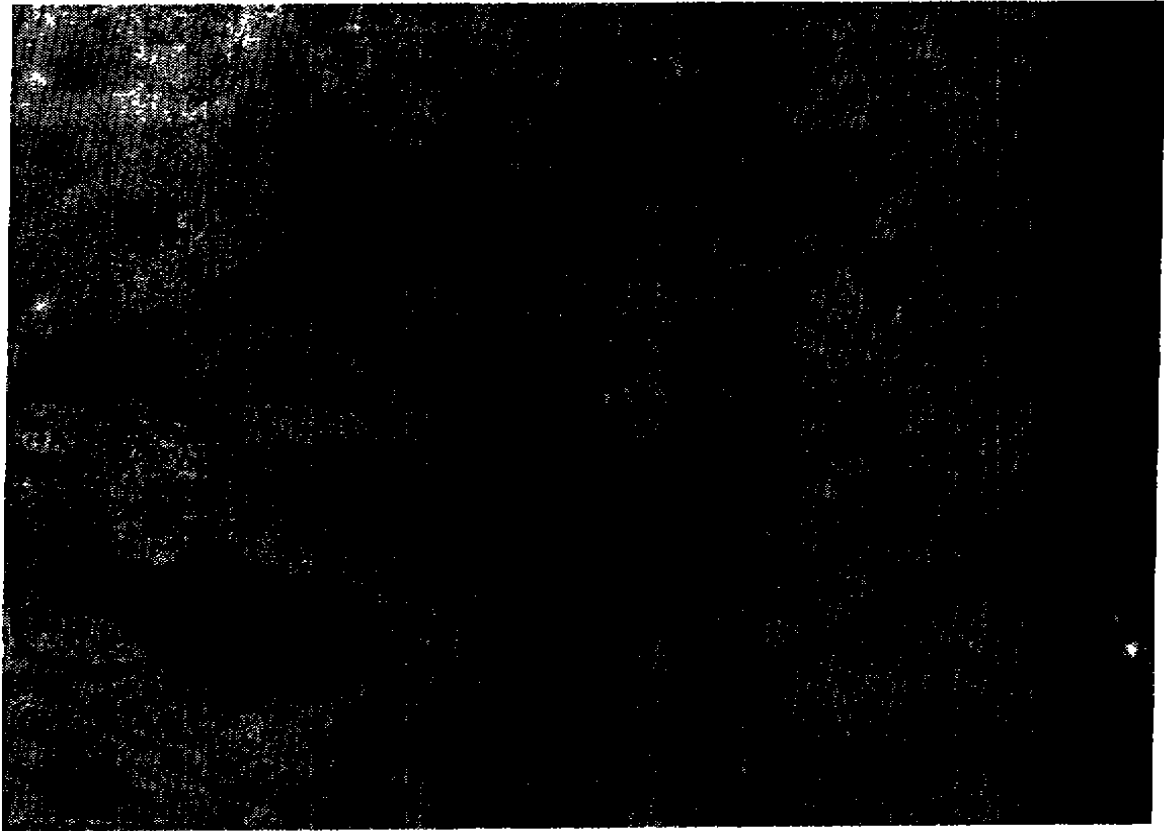


图4. 大蒜病毒粒子、内含体、细胞病变和免疫电镜

Fig 4. Particles, inclusions, ultrastructure changes of cells from infected garlic and immuno-electron microscopy

- (1) Filamentous particles 丝状粒子 (2) Pinwheel and scroll inclusions 风轮状和涡轮状内含体
- (3) Gaps and blanks of cell and cavities in chlorophyll 细胞空泡和叶绿体空腔
- (4) ISEM photomicrograph showing that particles are decorated by antibody 免疫电镜示粒子被抗体修饰

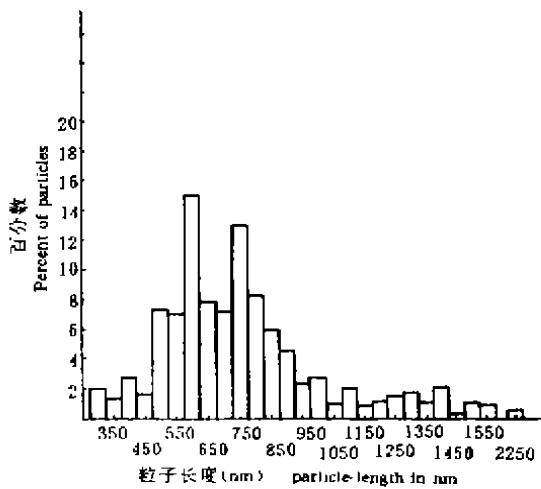


图5. “余姚白蒜”叶片中的病毒粒子长度分布
Fig 5. Histogram of the particle length distribution of garlic virus

毒粒子，其中长度在 550—650nm 的占 29.6%，700—800 nm 的占 28%，在 600nm 和 750 nm 处出现较明显的两个分布峰。见粒子长度分布，图 5。

从指示植物蚕豆的褐色斑汁液中检查到的粒子数量较多，长度也较为均一（600—650nm）的线形病毒粒子。

3. 内含体和细胞病变特征

大蒜叶片超薄切片，在表皮、薄壁细胞、维管束传递细胞和伴胞的细胞质中镜检到大

量风轮状、束状、涡轮状、环状和管状内含体, 图4(2)没有薄片状聚集体, 按Edwardson划分Potyviruses群内含体的四种类型应归属于第一类。

感病细胞变成显著的空泡化, 核变形, 病毒粒子散布于细胞质中, 无病毒集集体, 叶绿体产生空腔, 并逐渐瓦解破裂, 这和宏观上植株外观表现黄化褪绿条斑的病状是吻合的, 见图4(3)。

4. 血清学检测

用OYDV抗血清, 经ISEM测定, 见到线状病毒粒子周围被抗体分子修饰吸附, 呈现阳性相关, 见图4(4)。

5. 病毒耐温限点测定

本研究应用热处理法测定病毒的温度钝化点(TIP)比常规的致死温度应高些, 因蒜瓣组织内的病毒要比离体汁液的感温慢。测定结果是: 50℃处理10min 50%不发芽, 50℃20min以上95%不发芽, 凡是能发芽成活的就表现出病状, 因此大蒜的耐温阈限为50—55℃, 而病毒的耐温阈限在55℃以上, 两者没有交叉重叠。这也证明了热处理不能防治大蒜病毒病, 而采用茎尖培养生产无毒大蒜是防沿途径之一^[13]。图6表示大蒜致死临界点比病毒TIP低。

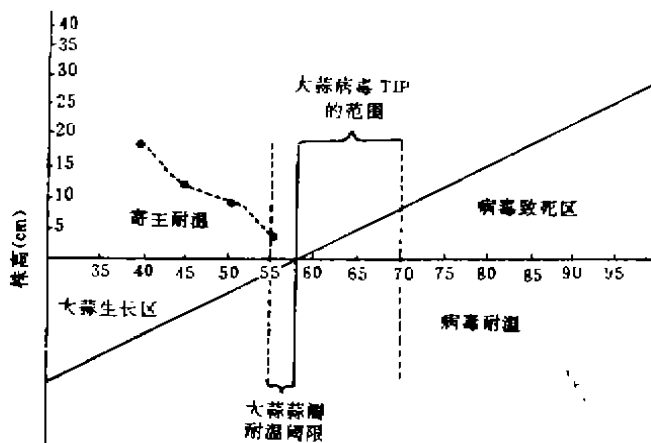


图6 大蒜病毒热处理图示

Fig 6. Comparison of thermal test on Garlic and Garlic virus

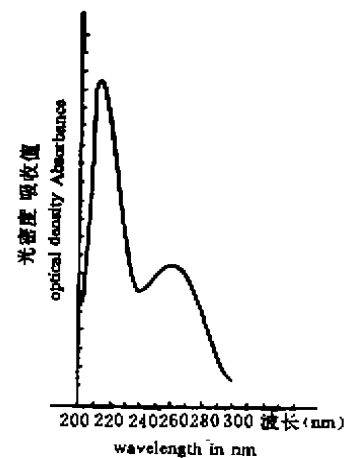


图7 大蒜病毒紫外吸收曲线

Fig 7. U.V. absorption spectrum of a partially purified preparation of Garlic virus

四、大蒜病毒的提纯和紫外吸收值

本研究应用磷酸缓冲液系统采用超离心(流程1)和PEG两次沉淀(流程3), 或用硼酸缓冲系统PEG和超离心结合(流程2)三种方法, 加有还原剂和防粒子凝集添加剂, 经化学澄清和级差离心后均可得到较满意的粗提物。镜检能见许多线形病毒粒子。提纯液测得紫外吸收曲线, 其最大吸收峰在257nm处, 最小吸收峰在239nm处, $A_{max}/min = 1.075$, 见图7。

讨 论

浙江大蒜病毒毒株按其寄主和寄主范围不同,表明不存在 LYSV 和 OYDV,因此实际只有可能存在 GMV、GLV 和 GYSV 三种。GMV、GLV 和 GYSV 的区别是前两种不感染墙生藜,但能感染前二者不感染的苋色藜和昆诺阿藜;GMV 和 GLV 的区别是 GMV 能感染干日红、GLV 不能,但它能感染蚕豆和番杏。根据浙江大蒜病毒不感染干日红、苋色藜和昆诺阿藜,因此不存在 GMV,见表 1^[1,2,4,8,9,12]。

本文根据田间采集的隐症株和蚕豆局部斑中镜检到较均一的 600—650nm 长的粒子,能感染蚕豆的称 GLV,这和近年报道认为 GLV 在大蒜上表现隐症、蚕豆枯斑可纯化 GLV 的结果是一致的^[4,12]。和他们大不相同的是不侵染苋色藜、昆诺阿藜和番杏。我们认为感染墙生藜和豇豆、粒子长度 750nm 左右、具风轮状内含体的称 GYSV。但和新西兰的也有不同^[4]。这些差异可能因地区株系、品种(包括测试寄主)、栽培和实验条件的差异而不同。

根据当前对线状病毒分类所用的特征(表 2),浙江大蒜所有的两种粒子长度峰、内含体形状和 TIP 55℃ 以上等特点把 GLV 归属 Carlaviruses, GYV 归属 Potyvirusen 是符合的^[8]。

表 2. 三种线状病毒群的特征

Table 2. Characteristics of the three groups of filamentous virus

组 群 Groups	内含体 Inclusions	粒子大小(nm) Particle dimensions(nm)	稳定性		
			TIP(°C)	DEP	LIV(day)
石竹隐潜病毒群 Carlaviruses	—	600—700×13 (620—690×12)	55—70	10 ⁻³ - ⁻⁵	2—6
丝状病毒群 I Closteroviruses I	+	1250—2000×12	40—60	10 ⁻¹ - ⁻⁴	2—6
丝状病毒群 II Closteroviruses II	—	600—750×12	40—60	10 ⁻⁴ - ⁻⁶	2—6
马铃薯 Y 病毒群 Potyvirusen	风轮状 Pinwheel shape 柱状 Column shape	720—900×11 (680—900×11)	55—65	10 ⁻² - ⁻⁴	2—6

ISEM 测定和 OYDV 有血清学相关,这和前人报道相同,但都没有做交互测定,制备的血清还可能和脱毒蒜健汁有反应,也可能含正常植物抗原的抗体,加以和异原也有低效价的反应,因此可能是远相关或假阳性。

大蒜病毒的命名至今还比较混乱的原因是,葱属病毒的形态、生理性状(沉降系数、浮力密度、蛋白和 RNA 分子量)、稳定性等非常相似,血清学检测有一定程度相关,寄主范围特别狭窄,自然感染率高而且复合感染,这就造成鉴定上有许多困难。有关葱属植物病毒的鉴定还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Bos, L., 1976, CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 158, p4.
- [2] Bos, L., 1982, Acta Horticulturae, 127: 11—29.
- [3] Fraenkel-Conrat H., 1985, The viruses catalogue, Characterization and classification, p107.

- [4] Havranek, P. 1973. Proc. 7th. Conf. Czech. PL. Virol. High Tatras. 1971, 133—136.
- [5] Mohamed, N. A. et al., 1980, N. Z. Journal of Agricultural Research 23: 129—131.
- [6] Mohamed, N. A. et al., 1981, Ann. Appl. Biol. 97: 65—74.
- [7] Pera-Iglesias, A. et al., 1982, Acta Horticulturae 127: 193—193.
- [8] 李龙雨等, 1979, 日植病报 45: 727—734。
- [9] 赵顺庆等, 1987, 病毒学杂志 2: 75—88。
- [10] 谢浩等 1981, 植病学报 11(3): 57—59。
- [11] 丁辛顺, 1988, 上海农业学报 4(1): 23—28。
- [12] 周桂珍等, 1989 植病学报 19(3): 145—149。
- [13] 陆关成等, 1991, 浙江农业学报3(3): 133—137。

Diagnosis of Virus on Garlic Virus Disease of Zhejiang

Lu Guan-cheng

(Department of Plant Protection, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Hong Jian, Xu Zheng

(Central Laboratory of Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Hu Shi-Meng

(Plant Protection Station, Agriculture Bureau of Cixi County, Cixi 315300)

In Zhejiang, Jiangsu and other provinces, 5 varieties of the garlic crops are totally diseased. The virus disease frequently causes degeneration of viruliferousness, loss of yields and reduction of tolerant to store.

Symptoms due to the infection of virus are chlorotic mottling between the veins, yellow streaking and mosaic, scarcely visible and leaf distortion or deformation. The virus can be artificially inoculated on *Vicia faba*, then produces brown local lesions, slight spot on *Chenopodium murale*, necrotic spots and mosaic on *Vigna sinensis*.

The flexuous filamentous particles purified from naturally infected garlic are about 600—700 nm long under the electron microscope. Leaf dip method may be observed containing filamentous particles. They are $300-2250 \times 11-12$ nm. 29.6% are 550—650 nm in which 28% are 700—800 nm and 60% of the particles are in the range of 550—800 nm.

Typical pinwheel type, bundle, scroll and circular cytoplasmic inclusions are found in the cytoplasm and could be observed by ultrathin section of garlic leaves, but no aggregation is found and the chlorophylls are destroyed.

By detection of immuno-electron microscopy, the viruses are related to OYDV

serologically.

Evidence from study, Zhejiang garlic is jointly infected by two or more kinds of virus. One is the Potyvirus which we describe here as garlic yellow streak virus (GYSV). Another belongs to Carlaviruses, it called garlic latent virus (GLV). Naturally the garlic crops are doubly infected with GYSV and GLV.

Key words, Garlic yellow streak virus (GYSV) Garlic latent virus (GLV) Virus diagnosis Double infection