216—223 3175(18)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第7卷第2期 1992年6月 | 中国病毒学 VIROLOGICA SINICA | Vol.7 No.2 Jun. 1992

侵染番茄的黄瓜花叶病毒(CMV)株系特性的比较研究

刘焕庭 朱汉城 严敦余 郭兴启

（山东农业大学植保系，泰安 271018）

S436.412.1

提 要

从山东省主要番茄种植区病毒样本中分离到111个黄瓜花叶病毒（CMV）分离物，根据病毒的寄主范围和症状，初步鉴定为三个株系：番茄蕨叶株系（CMV-ToF）、番茄花叶株系（CMV-ToM）和番茄轻花叶株系（CMV-ToL）。三株系除在生物学特性存在明显差异外，其病毒粒体形态大小，电泳迁移率，病毒外壳蛋白亚基分子量、核酸组分以及病毒粒体血清学特性亦存在差别。

关键词： 番茄 黄瓜花叶病毒 株系

黄瓜花叶病毒（CMV）是番茄病毒病的主要病原病毒之一[1-3]，引起的症状变化较大。黄瓜花叶病毒株系较多[4]，株系之间相互作用明显，在番茄上引起的症状和造成的损失也不同[5]，有的弱株系已作为生防制剂应用于生产。为了搞清山东省侵染番茄的黄瓜花叶病毒株系种类、分布及危害，研究不同株系之间的作用以及CMV卫星RNA对不同株系的作用，进一步为CMV卫星RNA防治番茄病毒提供依据，1986～1989年，从山东16个地（市）、县的主要番茄种植区采集了349个病毒样本，分离到111个CMV分离物，用鉴别寄主区分成为三个株系，并对三个株系的生物学特性、病毒粒体形态大小、生化特性和血清学特性进行了比较研究，其结果如下。

材料与方法

一、毒原的分离、纯化与鉴定 将田间不同地区采集到的349个样本，分别用苋色藜（*Chenopodium amaranticolor*）、昆诺阿藜（*C. quinoa*）、曼陀罗（*Datura metel*）进行三次单斑分离或经心叶烟（*Nicotiana glutinosa*）系统转接，得111个病毒分离物，确定无复合感染后，用CMV鉴别寄主和抗血清鉴定，毒原保存在白肋烟上，

二、病理株系划分 将111个病毒分离物人工汁液摩擦接种到防虫温室内盆栽的鉴别寄主上，重复测定三次。将症状反应相似的病毒分离物划分成病理株系，各病理株系取代表株进一步研究。

三、三株系的生物学特性测定 寄主范围测定按常规方法在防虫温室内进行，每种植物接种5株，重复3次，症状观察1个月。蚜虫传毒试验供试蚜虫为桃蚜（*Myzus persicae*），饥饿4

本文于1991年5月11日收到，7月21日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

小时后饲毒10分钟，在健白肋烟上传毒1小时后喷药杀死蚜虫，每株接蚜5头，每处理接种5株，重复3次。20天后记录结果。体外稳定性测定用同时繁殖的病毒，常规法测定，重复3次。

四、病毒提纯及电镜观察　接种后20天的白肋烟叶片用于三个株系的提纯，病毒的部分提纯参阅以前的报道[4]。部分提纯病毒用蔗糖密度梯度（10—40%）100000g离心2小时，取病毒带1：2加入5mmol/L硼酸缓冲液（含0.5mmol/L EDTA，pH9.0）稀释后250000g离心90分钟，沉淀回溶后即为提纯病毒。用分析超离心检查提纯纯度，测定200—400nm全波紫外吸收，并接种苋色藜测定生物活性。

将提纯病毒10倍稀释后，用12%的甲醛固定，1.5%磷钨酸负染，透射电镜观察，测量100个毒病粒体计算平均粒体大小。

五、抗血清制备与血清学关系测定　采用福氏不完全佐剂乳化，按0.2、0.4、0.8、1.2mg病毒4次肌肉和皮下交替免疫家兔，每次间隔7天，最后肌肉注射2mg病毒（不乳化），10天后测定效价，15天后采血析出血清。血清学关系的测定采用琼脂免疫双扩散法和间接酶联免疫吸附测定（In-ELISA）法[7]。辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG为北京生物制品厂产品。

六、病毒粒子泳动率和扩散形状测定　测定方法参照Walkey（1985）描述的方法[8]，测定用pH8.6，0.06mol/L巴比妥缓冲液，22℃ 20V稳压电泳12小时，计算迁移距离。

七、病毒外壳蛋白亚基分子量的测定　采用SDS-聚丙烯酰胺不连续梯度垂直凝胶电泳法，参阅以前报道[1]，标准蛋白为上海中国科学院生物化学所生产的低分子量套装标准蛋白，磷酸化酶B（Phosphorylase B）94KD，血清白蛋白（Albumin）67KD，肌动蛋白（Actin）43KD，碳酸酐酶（Carbonic Anhydrase）30KD，和烟草花叶病毒外壳蛋白（TMV coat protein）17.5KD。

八、病毒核酸提取及电泳分析　三株系病毒核酸提取参照郑巧兮（1984）的方法[9]，核酸电泳采用SDS-聚丙烯酰胺琼脂糖垂直凝胶电泳法[10]，电泳2小时，硝酸银染色[11]，CS-930薄层扫描仪扫描，波长530nm。

结　果

一、病理株系及其寄主范围

根据在番茄、白肋烟、假酸浆、洋酸浆、曼陀罗、矮牵牛、南瓜和金鱼草上的症状反应，111个病毒分离物可分成三个株系类型，番茄蕨叶株系（CMV-ToF），约占67.6%，番茄花叶株系（CMV-ToM），约占21.6%和番茄轻花叶株系（CMV-ToL），约占10.8%。各株系在鉴别寄主上的特征见表1。

寄主范围测定表明，在接种的12个科共34种植物中，CMV-ToF可侵染10科的28种植物，CMV-ToM可侵染11科的31种，而CMV-ToL则可侵染11科的32种植物。除上述鉴别寄主外，三个株系均能侵染下列植物。茄科（*Solanaceae*）：亮黄烟（*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow）、黄花烟（*Nicotiana rustica*），克里夫兰烟（*Nicotiana clevelandii*），曼陀罗（*Datura stramonium*），辣椒（*Capsicum frutescens*），茄子（*Solanum melongena*）。藜科（*Chenopodiaceae*）：苋色藜（*Chenopodium amaranticolor*），昆诺藜（*C. quinoa*）。葫芦科（*Cucurbitaceae*）：黄瓜（*Cucumis sativus*）、甜瓜（*C. melo*）。菊科（*Compositae*）：百日菊（*Zinnia elegans*）。苋科（*Amaranthaceae*）：反枝苋（*Amaranthus retroflexus*）

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 三株系的鉴别寄主及反应症状

Table 1 Diagnotic species and symptoms of the three strains

寄主植物 Diagnotic species	症状 Symptoms		
	CMV—ToF	CMV—ToM	CMV—ToL
番茄 *Lycopersicon esculentum*	上位叶先出现系统花叶，以后蕨叶。 Systemic mosaic on epigynous leaves, followed by fern leaves.	上位叶出现系统花叶 Systemic mosaic on epigynous leaves	上位叶花叶症状很轻，有时不明显。 Very slight systemic mosaic on epigynous leaves, sometime symptomless.
白肋烟 *Nicotiana tabacum* Burley 21	上位叶出现系统花叶，以后叶片畸形。 Systemic mosaic on epigynous leaves, followed by leaf distortion.	接种叶上产生褪绿环斑，上位叶系统花叶。 Local chlorotic ring spots on inoculated leaves, systemic mosaic on epigynous leaves.	上位叶出现系统花叶 Systemic mosaic on epigynous leaves
假酸浆 *Nicandra physalodos*	上位叶先出现系统花叶，以后出现蕨叶。 Systemic mosaic on epigynous leaves, followed by fern leaves.	上位叶出现系统花叶 Systemic mosaic on epigynous leaves	接种叶产生坏死斑，上位叶产生系统花叶。 Local necrotic spots on inoculated leaves, followed by systemic mosaic.
洋酸浆 *Physalis floridana*	上位叶出现系统花叶 Systemic mosaic on epigynous leaves	上位叶出现系统花叶 Systemic mosaic on epigynous leaves	上位叶先系统花叶，以后蕨叶。 Systemic mosaic on epigynous leaves, followed by fern leaves.
蔓陀罗 *Datura metel*	接种叶出现褪绿斑 Local chlorotic spots on inoculated leaves	接种叶及上位叶都产生褪绿斑，以后局部坏死。 Local chlorotic spots on epigynous leaves and inoculated leaves, followed by local necrosis	接种叶产生褪绿斑，上位叶花叶。 Local chlorotic spots on inoculated leaves, followed by systemic mosaic on epigynous leaves.
矮牵牛 *Petunia hybrida*	系统花叶 Systemic mosaic	无症状但带病毒 Infected with symptomless	系统花叶 Systemic mosaic
南瓜 *Cucurbita moschata*	系统花叶 Systemic mosaic	系统花叶 Systemic mosaic	无症状但带病毒 Infectd with symptomless
金鱼草 *Antirrhinum majus*	系统花叶并矮化 Systemic mosaic followed by stunting	无症状但带病毒 Infectd with symptomless	无症状但带病毒 Infected with symptomless

维普资讯 http://www.cqvip.com

xus），千日红（*Gomphrena globosa*）。番杏科（*Aizoaceae*）：番杏（*Tetragonia tetrogonioides*）。玄参科（*Scrophulariaceae*）：金鱼草（*Antirrhinum majus*）。十字花科（*Cruciferae*）：白菜（*Brassica pekinensis*）。蝶形花科（*Papilionaceae*）：大豆（*Glycine max*），菜豆（*Phaseolus vulagaris*），绿豆（*P. radiatus*）。商陆科（*Phytolaccaceae*）：商陆（*Phytolacca acinosa*）。CMV-ToM 和 CMV-ToL 还能侵染豇豆（*Vigna sesquipedalis*）、花生（*Arachis hypogaea*）和禾本科（*Gramineae*）的小麦（*Triticum aestivum*）。CMV-ToL 还能侵染蚕豆（*Vicia faba*）。三株系均不能侵染决明（*Cassia tore*）和玉米（*Zea mays*）。

二、各株系的体外抗性

测定结果表明，三株系的体外稳定性存有差异，见表2。

表 2. 三株系的体外稳定性

Table 2. Stability in extracted sap of the three strains

株　系 Strains	钝化温度℃ TIP(℃)	稀释限点 DEP	体外存活期（小时） longivity in vitro(hr)
CMV-ToF	55—60	10^{-3}	72
CMV-ToM	65—70	10^{-3}	48
CMV-ToL	45—50	10^{-3}	24

三、蚜传特性

结果表明，三个株系均可由桃蚜传毒，但传毒效率存在差异，CMV-ToF 传毒率最高，为67%；CMV-ToM 次之，为60%；CMV-ToL 最低，为40%。

图1. 提纯的病毒粒子形态（150000倍）

Fig 1. Electron micrograph of purified virus particles (150000X)

a. CMV-ToF　　b. CMV-ToM　　c. CMV-ToL

维普资讯 http://www.cqvip.com

四、病毒提纯和粒体大小

三个株系均能得到纯度较高的提纯病毒制品，提纯病毒具有典型的核蛋白紫外吸收曲线，其 OD260/OD280：CMV-ToF 为1.66，CMV-ToM 为 1.72，CMV-ToL 为1.70。病毒提纯产量 CMV-ToF、CMV-ToM 和 CMV-ToL 分别为 87.3mg/kg、84.0 mg/kg 和 47.7mg/kg 病叶。提纯病毒分析超离心只出现一条沉降带，稀释后接种苋色藜产生大量枯斑，其病毒的生物活性较高。

电镜观察病毒粒体为球形，其直径 CMV-ToF 为 25.9±1.2nm，CMV-ToM 为 26.1±1.2nm，CMV-ToL 为29.1±1.4nm（图1）。

五、抗血清制备及血清学关系

三个株系均可制备较高效价的抗血清，特异性较高，CMV-ToF、CMV-ToM 和 CMV-ToL 抗血清效价，琼脂免疫双扩散分别为 1/64、1/64和1/32。在琼脂免疫双扩散中，三株系的沉淀带存在差异，但不明显，间接 ELISA 测定结果见图 2。

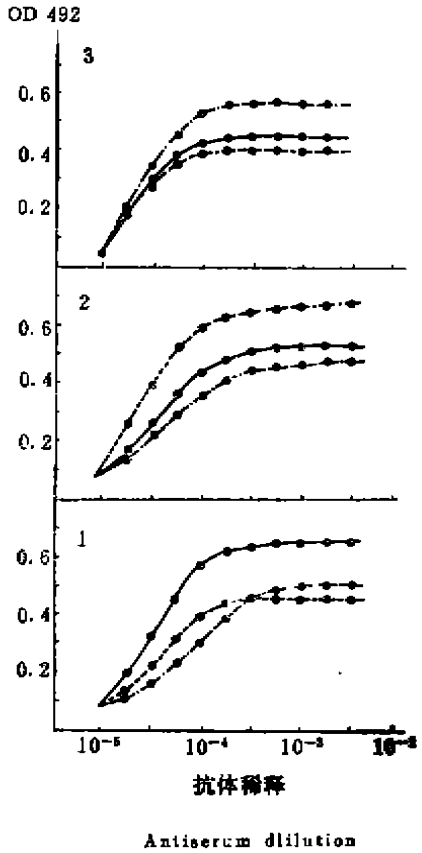


图 2. 三株系间接测定曲线

1. CMV-ToF 包被反应板
2. CMV-ToM 包被反应板
3. CMV-ToL 包被反应板

Fig 2. Serological relationship in indirect ELISA of the three strains

1. Well coated with CMV-ToF
2. Well coated with CMV-ToM
3. Well coated with CMV-ToL

———CMV-ToF; — — —CMV-ToM; —·—·— CMV-ToL

六、病毒粒体泳动率和扩散形状

在 1% 离子琼脂中，各株系病毒粒体的带电状况不同，各株系病毒粒体泳动率和泳动形状存在差异（图 3），CMV-ToF、CMV-ToM 和 CMV-ToL 病毒粒体电泳迁移率分别为 $7.58\times10^{-8}cm^2V^{-1}sec^{-1}$、$7.80\times10^{-8}cm^2V^{-1}sec^{-1}$ 和 $9.0\times10^{-6}cm^2V^{-1}sec^{-1}$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

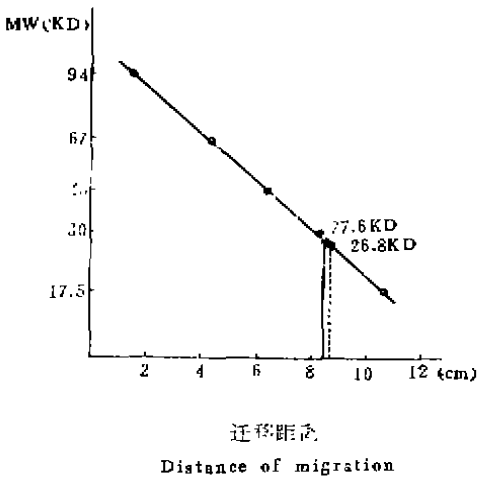
图3．在pH8.6，1%离子琼脂中病毒粒子电泳迁移率和扩散形状

Fig 3．Electrophoretic mobility of the strains in agar gel buffered at pH8.6.

a：CMV-ToF　　b：CMV-ToM　　c：CMV-ToL

七、病毒粒体外壳蛋白亚基分子量

SDS-不连续梯度聚丙烯酰胺垂直凝胶电泳解离病毒，三株系病毒外壳蛋白亚基均表现为一条多肽链，CMV-ToF 和 CMV-ToM 外壳蛋白亚基分子量相同，为27600道尔顿，而 CMV-ToL 则为26800道尔顿（图4）。



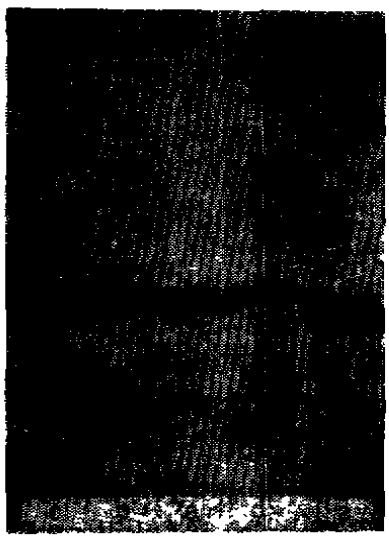


图4．SDS-不连续梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳三株系病毒衣壳多肽组分及分子量

Fig 4．The component and molecular weight of capsid polypeptide of the three strains during SDS-discontinous polyacryamide gel electrophoresis

——a：CMV-ToF；——b：CMV-ToM；——c：CMV-TOL；d：protein markers

八、病毒核酸及其组分

用水饱和酚法可以制备三株系的核酸，核酸电泳分析表明，CMV-ToF和CMV-ToM都含有4条核酸片段，CMV-ToL 含有5条核酸片段（图5）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

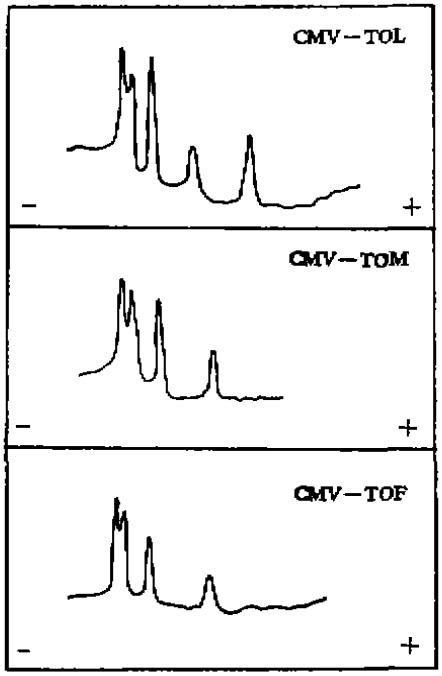


图5. 三株系病毒核酸组分电泳扫描曲线

Fig 5. Densitometer trace indicating absorbance (530nm) with distance of migration for RNA species of the three strains

讨 论

根据寄主范围及其反应症状，病毒粒体形态、血清学和生化特性，初步认为山东省侵染番茄的黄瓜花叶病毒（CMV）存在三个株系，在生产上引起不同程度的危害。CMV-ToF 分布最广，危害比较严重，是山东番茄上的主要致病株系。CMV-ToM 在番茄上引起花叶，在田间分布不广，其危害性比 CMV-ToF 低。CMV-ToL 在番茄上引起症状很轻或无症状，初步认为是番茄上的一个弱株系。三个株系除在生物学特性方面存在差异外，在病毒粒体形态大小、生化特性以及血清学特性方面也存在明显的不同。

目前尚未有统一的鉴定方法进行黄瓜花叶病毒的株系鉴定。许多研究只限于病理株系的范围之内，而对病毒本身的生化特性研究较少。本研究用指示植物将山东省侵染番茄的 CMV 初步区分为病理株系，然后对各株系的生化特性以及血清学特性进行了比较研究，明确了各株系在生化特性上的差异。但本研究中三个株系与国内外已报道的不同作物上 CMV 株系之间的关系以及用病毒本身的生化特性来鉴定 CMV 株系的方法还需进一步研究。

已报道的黄瓜花叶病毒株系较多[4]，株系之间相互作用明显，并且存在有假重组现象。这种相互作用与田间症状以及寄主范围之间的关系尚不完全清楚。本研究只初步鉴定了番茄上存在的三个株系并比较了其生化特性，三个株系之间的相互作用以及 CMV 卫星 RNA 对三个株系的作用尚在研究中。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

〔1〕 王小凤等，1976，微生物学报 16(1)：71。
〔2〕 丁辛顺，1986，中国蔬菜 (1)：41—43。
〔3〕 濮祖芹等，1981，南京农业大学学报 (2)：69。
〔4〕 Kurstak, E., 1981, Handbook of Plant Virus Infections and comparative Diagnosis, Elsevier/North-Holland Biochemical Press 269-272.
〔5〕 Kaper, J. M. et al., 1977, *Science* 196：429-431.
〔6〕 刘焕庭等，1989，山东农业大学学报 20：(1)：6—11。
〔7〕 Devergne, J. C. et al., 1981, *Journal of Virological Methods* (3)：193-200.
〔8〕 Walkey, D. G. A., 1985, Applied Plant Virology, published by Wiley-Interscience Divison of Johe Wiley & Sons Inc.
〔9〕 郑巧兮等，1984，生物化学与生物物理学报 16：540—545。
〔10〕 Peacock, A. C. et al., 1968, *Biochemistry* 7(2)：668—674.
〔11〕 周本正，1988，实用电泳及免疫电泳技术，湖北科学术技出版社，109—114。

Studies on Strains of Cucumber Mosaic Virus on Tomato

Liu Huan-ting　　Zhu Han-cheng　　Yan Dun-yu　　Guo Xing-qi

(*Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University. Taian City, Shandong Province* 271018)

During 1986—1989, 111 isolates of cucumber mosaic virus were ohtained from tomato fields in Shandong province. According to the host ranges and symptoms on different hosts, three pathogen strains of CMV were established as tomato fern leaf strain (CMV-ToF), tomato mosaic strain (CMV-ToM) and tomato latent (light mosaic) strain (CMV-ToL). There were some difference not only in hio-characteristics, but also in electrophoretic mobility and morphology of purified virus particle, molecular weight of capsid polypeptide, components of viral RNA and serological relationship.

Key words: Tomato　　Cucumber mosaic virus　　Strain