271—276
422(10)

第8卷 第3期
1993年9月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol. 8 No. 3
Sept. 1993

引起马蹄莲花叶病的芋花叶病毒*

陈集双 高其康 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所，杭州，310029)

S432.41

提 要 在采自杭州、北京、上海等地的表现花叶和扭曲症状的马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica*)上检测到一种线状病毒。经测定，其平均粒子长度为745nm，病毒粒子最大分布范围为720—750nm。该病毒经免疫电镜观察与芋花叶病毒(DMV)有紧密的血清学关系，且与3个PVY抗血清也有一定的反应。在病叶细胞中观察到紧密聚集。松散聚集和分散的线状病毒粒子和典型的风轮状内含体。作者认为：感染马蹄莲的该种病毒符合芋花叶病毒的特征。本文对该病毒的血清学关系和组织病变情况进行了分析讨论。

关键词： 马蹄莲 芋花叶病毒 PVY 血清学关系 组织病变 植物病毒

芋花叶病毒(Dasheen mosaic virus，DMV)侵染天南星科植物，在热带亚热带地区尤为普遍，是引起天南星科植物病毒病的主要病原[1-3]。Zettler等(9187)曾认为天南星科栽培植物芋(*Colocasia esculenta*)很可能无一例外地遭受该病毒侵害[4]。马蹄莲属(*Zantedeschia*)也是该病毒的自然寄主[1]。Abo等(9176)曾认为DMV在琼脂扩散水平上与Potyvirus组的黑眼豇豆花叶病毒(BCMV)和烟草蚀纹病毒(TEV)有血清学关系而与同组的PVY和芜菁花叶病毒(TuMV)没有血清学关系。

我国范怀忠等(1984)根据广州自然发病的红芽芋(*Colocasia esculentan*)上的症状和病叶汁液负染观察到线状病毒粒子，认为该种病毒可能就是国外报道的DMV[5]；陆关成(1985)曾认为在杭州引起马蹄莲花叶病的病原即是DMV[6]；韦石泉等(1991)也曾描述了辽宁发生马蹄莲花叶病的情况并认为其病原即是DMV[7]。以上作者均没有进行具体的病原鉴定。

Zettler等曾收集了我国福建、广东、浙江三省四个芋的栽培品种的发病材料，用琼脂双扩散方法从139份材料中检测到52%的材料能与DMV抗血清起反应；从出口到香港和美国旧金山的中国芋头培育的幼苗中也用抗血清检测到该病毒并观察到线状病毒粒子，从而认为中国芋花叶病的病原即是DMV[4]。

我国常见花卉马蹄莲(*Z. aethiopica*)普遍发生花叶病。作者于1989～1991年间在杭州、上海、北京等地调查数千株马蹄莲，感病率均为100%。病叶经汁液负染后能检测到线状病毒粒子。现将病毒粒子检查、病毒血清学反应测定和病组织超微结构观察结果报道如下。

材料与方法

1 毒源与抗血清

* 本文于1991年11月23日收到，1993年2月24日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

自然感病的马蹄莲病株：M_{13}、M_{14}、M_{17}分别采自杭州花圃、杭州植物园和浙江农业大学植物园；MB、MS分别采自北京农业大学植物园和上海植物园。毒源植物用盆栽保存于防虫温室。

DMV抗血清：由美国加州大学植病系F. W. Zettler教授提供。

PVY毒原：由农业部植检所舒秀珍研究员提供，繁殖于普通烟上。

PVY抗血清：分别由北京农业大学植保系蔡祝南教授、植检所舒秀珍研究员和浙江农科院病毒室陈剑平研究员赠送（为描述方便分别编号为PVY抗血清[1]、PVY抗血清[2]、PVY抗血清[3]）。

TMV毒源：由本实验室提供，繁殖于普通烟上。

2 病毒提纯和病毒粒子检查

直接负染：病叶汁液经0.2mol/L(pH7.2)磷酸缓冲液研磨提取后按常规磷钨酸方法负染、检查病毒粒子。

病毒粗提纯：参照Zettler等(1978)所述方法[2]，粗提纯病毒用0.1mol/L(pH7.4)磷酸缓冲液悬浮。

病毒粒子大小测定：提纯病毒经磷钨酸负染后于电镜下测量200个完整病毒粒子的长度，统计其分布情况(OPTON,OPDEN PLAN图像处理系统)。

3 免疫修饰电镜观察

马蹄莲病叶汁液经0.2mol/L(pH7.4)磷酸缓冲液研磨提取后按徐均焕等(1991)所采用的改良Derick's方法进行免疫吸附和免疫修饰[3]，DMV抗血清和PVY抗血清均分别用生理盐水稀释到1/500和1/200。

4 病组织超微结构观察

病组织经2.5%(pH6.8)戊二醛磷酸缓冲液和1%锇酸双固定、丙酮系列脱水后用Epon812(A∶B=1∶6)包埋。超薄切片经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后，置电镜下观察组织病变情况。

结 果

1 病害症状：病叶出现褪绿条斑，沿叶脉扩展，严重者只在叶脉间残存"绿岛"，叶脉萎缩，新出叶片扭曲，不能正常伸展，老叶片上病状减轻或消失。叶柄呈现褪绿条斑，花梗及花瓣上为褪绿条斑或斑块。

表1 几种病毒抗血清对马蹄莲病叶汁液中病毒粒子进行免疫吸附的情况(PVY和TMV作为对照)

Table 1 Results of capturing virus particles from infected leaf sap of *Z. aethiopica* with several virus antisera by ISEM (PVY and TMV as CK)

病毒 Viruses	病毒抗血清 Antisera of viruses				
	DNV抗血清 AS-DMV	PVY抗血清[1] AS-PVY[1]	PVY抗血清[2] Anti-PVY[2]	PVY抗血清[3] A-PVY[3]	TMV抗血清 Anti-TMV
M13	++++	++	++	++	−
M14	++++	++	++		−
M17	++++	++	++	++	−
MB	++++	++	++	++	−
MS	++	++			−
PVY	++	++++	++++		−
TMV	−	−	(+)	−	++++

*："+"数量表示捕获病毒粒子的相对数量(参照文献[6])

"+"Represents the relative amount of virus particles captured (Reference [6])

维普资讯 http://www.cqvip.com

图1　(1)自然感病的马蹄莲病叶症状；(2)M13病毒粒子被DMV抗血清所修饰(31,000×)；(3)PVY被PVY抗血清所修饰(44,000×)；(4)M13病毒粒子被PVY抗血清所修饰(44,000×)；(5)M13病毒粒子(PTA直接负染,31,000×)

Fig. 1　(1)Leaf symptoms of natural－infected *Z. aethiopica* in the field; (2)M13 decorated by DMV antiserum (31000×); (3)PVY decorated by PVY antiserum (44000×); (4)M13 decorated by PVY antiserum (44000×); (5)Virus particales from M13 (negative stained with PTA, 31000×)

2　马蹄莲病株中病毒粒子检查：马蹄莲病株汁液经磷钨酸负染后检查到一种线状病毒粒子，大小为700～800nm(图1－②)。

统计测定200个病毒粒子的平均长度为745nm，其最大分布范围为720～750nm。病毒粒子形态符合Zettler等(1978)所描述的DMV病毒粒子的特征。

3　马蹄莲上的病毒与DMV和PVY的血清学反应：经免疫电镜(免疫修饰方法)测定，供试DMV抗血清、PVY抗血清从感病的马蹄莲叶汁液中捕获病毒粒子的情况如表1所示。

根据表1和图1，马蹄莲上的该种线状病毒能够被DMV抗血清捕获和修饰，表现为强阳性反应(图1－④)；3个供试PVY抗血清也能捕获到一定数量的病毒粒子并对其修饰；同时，DMV抗血清亦能捕获到一定数量的PVY病毒粒子，但相对数量少于PVY抗血清对PVY的捕获量。

4　感病植物组织超微结构：感病组织超微结构如图2所示。在病叶细胞质中观察到典型的风轮状内含体，其结构与Zettler等(1970)所描述的DMV内含体相似；类似结构在花瓣和球茎细胞中亦能观察到。不同组织中的内含体具有相同的结构特征：风轮状结构均有较多的外臂

维普资讯 http://www.cqvip.com

(plate)，有的风轮状结构中有25个以上外臂(图2—②)；少数内含体呈卷轴状(tubular scroll—like)。在病叶细胞质中观察到大量密集的线状病毒粒子，多数病毒粒子聚集成紧密的束状结构、或以较松散的方式聚集、部分病毒粒子在细胞质中排列成单层。

图2 (1)自然感病的马蹄莲叶片组织超微结构，显示细胞质中聚集成束状和分散的线状病毒粒子；(2)病叶细胞质中的风轮状内含体；(3)和(4)分别为病株球茎和花瓣细胞之超微结构(CW：细胞壁；VP：病毒粒子；PW：风轮状内含体；CH：叶绿体；V：空泡；S：淀粉粒；M：线粒子 体；G：高尔基体)

Fig. 2 (1)Ultrastructure of infected leaf cell of *Z. aethiopica*, showing numerous virus particles aggregated as bundles and scattered in the cytoplasm; (2) Pinwheel inclusion bodies in the cytoplasm; (3), (4)Ultrastructure of

维普资讯 http://www.cqvip.com

cells of diseased bulb and petal respectively(CW=cell wall, VP=virus particle, PW= pinwheel inclusion, CH=chloroplasm, V=vesicles, S=starch body, M=mitochondrion, G=golgicomplex).

讨 论

1 国外报道在马蹄莲上检测到的病毒有：芋花叶病毒(DMV)、番茄斑萎病毒(TOSWV)、南芥菜花叶病毒(ArMV)和黄瓜花叶病毒(CMV)[9—12]。其中ToSWV、ArMV、CMV均为球状，而DMV则为线状，属于potyvirus组的成员。根据本文研究结果，在我国杭州等地感病的马蹄莲病组织中有典型的potyviruses所产生的风轮状内含体结构，且在病株汁液中检测到的该种线状病毒具有与DMV相似的粒子形态和大小分布，尤其是该病毒与DMV有强的血清学反应，因此作者认为：来自杭州、北京、上海等地的感病马蹄莲上检测到的该种线状病毒即是DMV。

2 免疫修饰电镜观察结果显示：在马蹄莲上发生的该种线状病毒与PVY有一定血清反应，同时，用DMV抗血清也能捕获到PVY的病毒粒子。这一结果与Abo等[10]的结论有所出入，可能是不同测试方法的灵敏度不同所致。本结果拓宽了DMV血清学关系的范围。

3 所观察到的风轮状内含体有较多的外臂结构，这符合DMV组织病变的特征(Zettler 1992，私人通信)。Francki(1985)认为在Potyviruses感染的细胞中，病毒粒子形成明显聚集的情况并不常见、多数是以分散方式存在[14]。在受感染的马蹄莲细胞质中同时存在紧密聚集的和分散的病毒粒子。风轮状内含体具有较多的外臂结构和病毒粒子以紧密聚集形式可能是DMV组织病变的特征之一。

参 考 文 献

1 Zettler F. W. et al. Filementous viruses infecting dasheen and other Areaceal plants. Phytopathology, 1970, 60: 983—987

2 Zettler F W, Abo EL—Nil M M and Hartman R D Dasheen mosaic virus. In: Descriptions of Plant Viurses. England: CMI/AAB, 1978, No191

3 Zettler F W and Hartman R D Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. Plant Disease, 1987, 71(11): 958—963

4 Zellter F W et al. Dasheen mosaic virus infecting taroin People's Republic of China, Plant disease, 1987, 71: 837—839

5 范怀忠，孙芥菲. 广州芋花叶病及其病原病毒的初步研究简报. 华南农学院学报，1984，5(1)：104—106

6 陆关成. 杭州花卉病毒鉴定初报. 第一届全国病毒学学术会议论文集，1985，267—268

7 韦石泉，吴元华，辽宁省常见花卉病毒病调查及鉴定. 第二届全国病毒学学术会议论文集，1991，267—268

8 徐均焕，李德葆. 用免疫电镜技术研究长叶车前花叶病毒株系的血清学关系. 病毒学报，1992，8(2)：174—177

9 Klinkowski M. Pflanzliche Virologic Band4, Die Virosen an Zierpflanzen, Gerholzen und Wildpflanzen in Europa. Berlin Academie-verlag, 1077, 2—7

10 Abo El—Nil M M. et al. Purification, serology and some physical properties of Dasheen mosaic virus, Phytopathology. 1977, 67: 1445—1450

11 Chase A R and Zettler F W. Dasheen mosaic virus in feeting diffenbachia cultivars. Plant Disease, 1982, 66: 891—893

12 张健如，沈淑琳. 花卉病毒鉴定手册(内部发生). 1984，28—29

13 陈集双，李德荷，几种天南星科上的病原病毒初报，第二届全国病毒学学术会议论文集，1991，268—269

14 Francki R I B. Robert G Milne and Hatta T. Atlas of Plant Viruses Vol II. USA: CRC Press, 1985, 191—211

维普资讯 http://www.cqvip.com

Study on Dasheen Mosaic Virus from *Zentedeshia Aethiopica*

Chen Jishuang Gao Qikang Li Debao

(*Institute of Biotechnology, Zhejiang Agric. Univ., Hangzhou*, 310029)

A filemental virus was detected from natural-infected *Z. aethiopica* showing mosaic and distortion symptoms in Hangzhou, Beijing and Shanghai. The average length of the virus particles was 745nm and the most distribution was 720—750nm. The virus became strongly decorated with an antiserum of Dasheen mosaic virus (DMV) and decorated loosely with three different antisera of PVY by ISEM test. There were numerous virus particles aggregated as bundles and scattered in the cytoplasm in ultra-section of diseased leaf cell, pinwheel inclusions were observed in cells of leaf, bulb and petal. The type of pinwheel inclusions were considered belong to type I that discripted by Edwardeson et al. 1987. This virus infecting *Z. aethiopica* in those placws of Chian was considered as Dasheen mosaic virus.

Key words: *Zentedeshia aethiopica* Dasheen mosaic virus PVY Serology relationship Ultrastructure alteration