

芝麻病毒病害研究

II. 芝麻黄花叶病病原鉴定*

杨书军 余子林[✓] 许泽永

(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉, 430062)

S435.653

提 要 继对芝麻矮化坏死病源研究之后, 又对普遍发生的芝麻黄花叶病分离物(YMo-1)进行了系统鉴定, 该分离物普遍存在于各芝麻主产区, 普通年份发病率为1~5%。YMo-1 侵染芝麻引起叶片褪绿及黄绿相间花叶。摩擦接种能够侵染4科12种(品种)植物。局部侵染觉色藜、昆诺藜; 系统侵染大豆、花生、望江南、克氏烟等。该病毒能够由桃蚜、花生蚜、大豆蚜以非持久性方式进行传播。ELISA 检测其病株种子带毒率为0.5%, 但尚未发现种生病苗, 病毒在组织汁液中存活期3天; 钝化温度55~60℃, 稀释限点 4×10^3 。提纯病毒为弯曲线状粒体, 大小约为 $13 \times 730\text{nm}$, 并有极易凝聚的趋势。病组织中诱导大量典型PVY第一亚组的风轮形和卷筒状细胞质内含体和少数多边形结晶核内含体。血清学上该病毒与花生条纹病毒(PSiV)、西瓜花叶病毒-2(MMV-2)密切相关, 与花生斑驳病毒、大豆花叶病毒弱相关, 与芜菁花叶病毒不相关。但它不侵染WMV-2的寄主—黄瓜, 并且该病害田间的发生流行与芝麻、花生的间作方式以及PSiV在花生田间的流行密切相关。根据上述结果, YMo-1分离株被鉴定为花生条纹病毒的一芝麻分离株。

关键词: 芝麻黄花叶病害 花生条纹病毒

病毒病

芝麻(*Sesamum indicum*)为我国的主要油料作物之一。近年来, 芝麻病毒病的发生和危害逐渐严重。流行年份局部产区产量损失高达80%以上。我国早在五十年代就发现有芝麻花叶病害的存在^[1]。直至八十年代后期, 少数研究者对芝麻黄化花叶、黄化卷曲、花叶等症候病害的研究表明, 它们是由一线状的马铃薯Y组病害侵染所致^[2,3]。由于这些报道对上述病害病源尚未最终鉴定并且彼此不同的病害命名给进一步的研究带来了一定的混淆。发病率较低但危害严重的芝麻矮化坏死病害已被鉴定为芜菁花叶病毒一株系(TuMV-DN)侵染所致^[4]。国外严重发生的由球状的烟草卷叶病毒引起的芝麻卷叶病害在我国尚未见报道^[5]。本研究针对另一普遍发生的黄花叶分离物YMo-1进行了病原及田间发生方面的研究。结果报道如下:

材料与方 法

- 1 分离物的纯化: 黄花叶分离物(YMo-1)采自于自然感染的芝麻病株。该分离物经在芝麻接种叶上产生的局部褪绿斑连续三次单斑分离纯化后, 繁殖保存于大豆上。
- 2 寄主范围及蚜传测定: 大豆病叶用0.05mol/L pH7.0 PBS 研磨后, 摩擦接种8科40种(品种)植物, 网温室观察记载症状表现。回接大豆、芝麻或ELISA 测定是否隐症带毒。脱毒后繁殖的无毒桃蚜(*Myzus persicae*)、花

本文于1992年2月20日收到, 1993年3月15日修回。

* 本研究为国际科学基金(IFS)及国家自然科学基金资助课题。

生蚜(*Aphis craccivora*)和大豆蚜(*A. glycine*)饥饿3~4小时后,在芝麻离体病叶上饲毒1~2分钟,然后转移至芝麻健株。5~10头/株,24小时后喷抗蚜威杀蚜。

3 病毒的提纯:与DNe-I提纯步骤基本相同^[9]。采集新鲜大豆病叶,低温冷冻后,1:2加入0.3mol/L pH8.8磷酸钾溶液(含0.01mol/L DIECA和0.1%巯基乙醇)匀浆,纱布过滤,15%氯仿乳化,低速离心澄清。上清液用0.2% TritonX-100处理后,70000g离心2小时。沉淀悬浮于0.02mol/L pH8.5磷酸钾缓冲液中(含0.5mol/L尿素和0.1%ME)。20%蔗糖液垫底,再差速离心一次。最后经0~40%蔗糖密度梯度114000g离心1.5小时,取病毒带,稀释后34000r/m离心沉淀病毒。

4 抗血清制备及血清学试验:提纯病毒1mg/ml与等体积 Freund 完全佐剂乳化,肌肉注射家兔。此后二周内,分别用不完全佐剂乳化抗原并肌肉注射2次,最后加强注射一次。血清学试验采用琼脂双扩散和间接 ELISA 方法(步骤略)。

结 果

1 YMo-I 的田间症状表现及寄主范围

几年来的田间调查和不同症状样品的血清学测定表明:YMo-I在田间芝麻上引起的症状比较稳定。表现为叶片均匀淡绿、或黄绿相间花叶,植株稍矮化。对50多个品种进行田间小区人工接种,其症状基本一致,表现为黄花叶症状。YMo-I摩擦接种8科40种(品种)植物,引起接种叶局部褪绿斑的有苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*),昆诺藜(*C. quinoa*)和大豆(徐豆2号);引起新生叶系统花叶或卷叶的有:克氏烟(*Nicotiana clevelandii*)、大豆(*Glycine max* cv. 1138-2)、花生(*Arachis hypogaea*)、望江南(*Cassia occidentalis*)及 *Cyamopsis tetragonbi* cv. Pusa; 陷立的有豌豆(*Pisum sativum*),杂三叶草(*Trifolium hybridum* cv. Alaska)和 *N. benthamiana*。

此外 YMo-I 不侵染下列植物:普通烟(*N. tabacum*),心叶烟(*N. glutinosa*),黄烟(*N. rustica*),*N. occidentalis*,辣椒(*Capsicum annuum* cv. 华农青椒),曼陀罗(*Datura stramonium*),酸浆(*Physalis alkekengi*),白花矮牵牛(*Petunia hybrida*),蕃茄(*Lycopersicon esculentum* cv. 佛洛雷特),菜豆(*Phaseolus vulgaris* cv. 西宁豆、龙早豆、Topcrop),绿豆(*P. radiatus*),豇豆(*Vigna sinensis* cv. 红嘴燕、白鳍鱼骨、C-152),蚕豆(*Vicia faba*),木豆(*Cajanus cajan*),鹰嘴豆(*Cicer arietinum*),决明(*C. tora*),白三叶草(*T. repens*),红三叶草(*T. pratense*),田菁(*Sesbania cannabina*),菘麻(*Crotalaria juncea*),黄瓜(*Cucumis sativus* cv. 一串连),百日菊(*Zinnia elegans*),油菜(*Briassica campestris*),白菜(*B. chinensis*),千日红(*Gomphrena globosa*)等。

在芝麻上,接种叶局部褪绿斑,新生叶黄绿相间花叶,继而整个叶片淡绿,稍下卷。植株稍矮化不能正常开花结实。

2 蚜虫传播

对桃蚜、花生蚜和大豆蚜分别蚜接测定芝麻93株、16株和40株。结果表明该病毒分离株能够分别由上述蚜虫以非持久性方式在芝麻植株间以较高传毒效率进行传播,其传毒率分别为57%,37%和27.5%。同时,该病毒也能够由大豆蚜从花生病株传播至芝麻上。

3 体外稳定性状

YMo-I在0.01mol/L pH7.0磷酸缓冲的植株汁液中,其体外保毒期为3天;钝化温度为55~60℃(10分钟);稀释限点为 4×10^3 。

4 病毒粒体及病组织的超薄切片电镜观察

病毒样品经线性蔗糖密度梯度离心,其组份为位于离心管中部的单一带。因而该分离物

为单分体病毒类型,提纯病毒的紫外吸收光谱接近于典型核蛋白吸收曲线, $A_{260}/A_{280}=1.17$ 。由此计算的病毒核酸含量在PVY组病毒的核酸含量范围之内。纯化病毒电镜观察,可见大量弯曲线状病毒粒体 10~20 个首尾及侧面相聚呈巨大网络状(图 1)。病毒粒体直径为 12~14nm,长度约为 730nm。该提纯方法可获得的病毒产量为 15mg/公斤组织。



图 1 提纯后的 YMo-1 病毒粒体(54000X)

Fig. 1 The purified virus particles of YMo-1 (54000X)

图 2 YMo-1 诱导的风轮形细胞质内含体(45000X)

Fig. 2 The pinwheel cytoplasmic inclusions induced by YMO-1 (45000X)

YMo-1 侵染的芝麻病组织中,可见典型的风轮状及卷筒状细胞质内含体(图 2)。风轮状内含体的中心孔径为 26~33nm。其风轮叶片最多为 9 个,其峡距为 50nm。卷筒状或管状内含体外径约为 345~456nm,内径为 155~162nm。该内含体为典型的 Edwardson 第一亚组类型^[7]。切片中亦可观察到不规则多边形晶状核内含体和大量分布于细胞质中的聚集成束的病毒颗粒。

5 YMo-1 的血清学性质

5.1 血清学试验 采用几种马铃薯 Y 组病毒的抗血清,用酶联免疫吸附法(ELISA)对此分离株的亲缘关系进行了测定。结果表明该病毒与花生条纹病毒(PSiV)和西瓜花叶病毒(WMV-2)具有强阳性反应(+++),与大豆花叶病毒(SMV)和花生斑驳病毒(PMV)具有弱阳性反应(+),与芜菁花叶病毒(TuMV)无反应。

SDS-agar 双扩散测定结果与 ELISA 相同。YMo-1 能够与 PSiV、WMV-2 和 PMV 抗血清形成明显免疫沉淀线。与 TuMV 抗血清则无沉淀线形成。

5.2 抗血清制备及其效价 提纯的 YMo-1 免疫兔所获得的抗血清,琼脂双扩散形成明显沉淀线的效价为 1:2。具有强阳性反应的该抗血清最大 ELISA 稀释度为 1:8000。

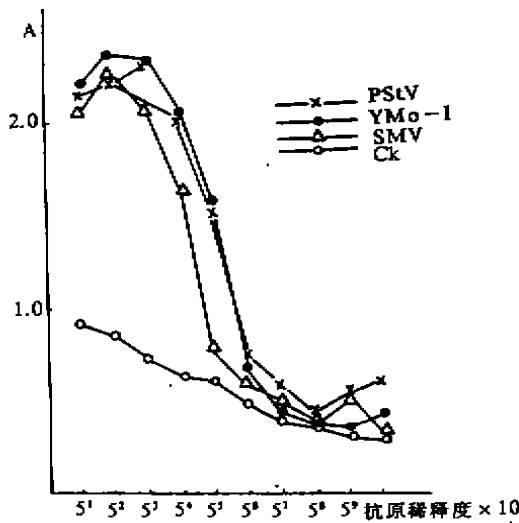


图 3 YMo-1 和 PSiV 与 PSiV 抗血清反应强度比较
Fig. 3 The serological comparison between PSiV and YMo-1 using PSiV antiserum

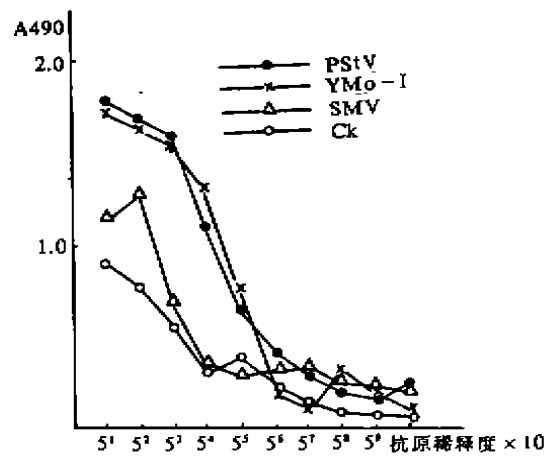


图 4 YMo-1 和 PSiV 与 YMo-1 抗血清反应强度比较
Fig. 4 The serological comparison between YMo-1 and PSiV using YMo-1 antiserum

5.3 YMo-I 与花生条纹病毒的血清学同源性比较 分别采用制备的 YMo-I 抗血清和 PSIV 抗血清对 YMo-I 和 PSIV 二抗原的 5 倍系列稀释度进行 ELISA 反应,最后进行反应强度消光值测定。SMV 作为对照病毒。PSIV 和 YMo-I 毒株无论是与 PSIV 抗血清或是与 YMo-I 抗血清反应,二者的反应强度无明显差异。不同抗原稀释度 A_{490} 吸收曲线基本吻合。而对照病毒与两抗血清则有很弱的反应强度(见图 3,图 4)。另一方面,在琼脂双扩散测定中,YMo-I 和 PSIV 与两抗血清的沉淀线皆无刺突形成。因此说明两病毒具有很高的同源性。

6 YMo-I 和 PSIV 田间发生相关性研究

选择 12 个不同芝麻品种,分小区夹种、隔种或撒种于花生田中。其现蕾期调查发病率:夹种芝麻小区的发病率(8.7%)明显高于 20 米之外四周并有芝麻相隔的同样品种组合的发病率(1.8%)。特别是花生田中撒种芝麻,其发病率可高达 82.13%。而本年度其它田块现蕾期发病率平均为 1~3%。该结果说明:芝麻黄花叶病害的田间发生与花生和芝麻二作物间的种植方式密切相关。

另一方面,把 YMo-I 和 PSIV 的新鲜病叶汁液分别接种芝麻、大豆、花生、克氏烟等寄主进行比较。两病毒在上述寄主上的症状发展和表现完全一致。

7 种子传毒力测定

人工接种苗期发病芝麻植株,其种子在 25℃ 下保湿萌发 24 小时后,用制备的该病毒抗血清进行间接 ELISA 测定。在所测定的 1242 粒种子中,有 8 粒为阳性反应,平均带毒率为 0.6%。而田间自然病株种子在所测定的 1400 粒种子中,有 7 粒呈阳性反应,带毒率为 0.5%。上述病株种子经防虫网室直播测定 4700 株,皆未发现带毒病苗。

8 田间病害发生及不同症状病株样品的 ELISA 测定

田间苗期调查(四片真叶期),病株症状主要有三种类型,即斑驳型(病株率 3.4%)、黄化型(2.7%)和矮化坏死型(0.8%)。芝麻田间经间苗和定苗生长至成株期则主要以褪绿斑驳型为主,平均发病率为 1~3%,局部可达 5.8%。同样为 YMo-I 侵染,由于生长条件及被侵染时期的不同,而表现出略有不同的症状类型:均匀褪绿、褪绿斑驳及其部分枝等症状。在对来自驻马店、武昌等地的褪绿斑驳、黄化、矮化坏死等症状的 74 个样品的 PSIV 和 TuMV 抗血清测定中,有 43 个样品与 PSIV 抗血清存在阳性反应。其中仅有 7 个样品与 TuMV 抗血清呈阳性反应。因而可知:田间芝麻主要发生的为 PSIV 侵染所引起的褪绿斑驳及黄花叶症状病害。

讨 论

已有报道认为,普遍发生于我国的芝麻黄花叶病害,是由 PVY 组病毒侵染所引起^[2,3]。本研究在病原方面的系统鉴定的结果表明:芝麻黄花叶病毒病害分离物(YMo-I)属于花生条纹病毒(PSIV)一株系。暂定为花生条纹病毒的芝麻黄花叶分离株(PSIV-YM)。

从侵染性方面来看:YMo-I 与 PSIV 在芝麻、大豆、花生、克氏烟等鉴别寄主上的症状表现和危害程度完全一致。同时二病毒对其它有关寄主的侵染能力也基本一致^[6]。在血清学上,YMo-I 与 PSIV 密切相关。用 YMo-I 和 PSIV 抗血清对 YMo-I 和 PSIV 进行血清学同源性相互比较时,二者的反应强度曲线也基本一致。与 PSIV 相同^[6],YMo-I 在病组织中也诱导典型的马铃薯 Y 组第一亚组风轮形和卷筒形细胞质内含体。

虽然血清学上 YMo-I 与 WMV-2 抗血清也有密切的相关性,并且 WMV-2 亦有报道能

够自然侵染芝麻引起花叶和坏死^[9],但其区别在于 WMV-2 可以系统侵染黄瓜而 YMo-I 不能,并且 WMV-2 在病组织中诱导 Edwardson 第三亚组类型胞质内含体^[7],而 YMo-I 在病组织中诱导第一亚组类型胞质内含体。YMo-I 和 WMV-2 人工接种芝麻,前者接种叶为局部褪绿斑,新生褪绿花叶,而后者接种叶上无症状,新生叶系统花叶或坏死^[9]。YMo-I 与花生斑驳病毒(PMV)之间有弱的血清学关系,但是 PMV 不能侵染时对 YMo-I 等多种病毒敏感的苋色藜。PMV 的内含体也不同于 YMo-I 而分属于第三亚组类型。马铃薯 Y 组病毒诱导细胞质内含体是由较多的病毒基因所控制,它的形态类型及血清学性质可反映出病毒本身固有特性,因而可以作为该组病毒鉴定和诊断的可靠依据。

芝麻黄花叶病害田间发生与 PSV 侵染花生引起的轻斑驳病害的流行相关现象也表明两种病害的病源很可能为同一种病毒。尽管芝麻病株种子不太可能形成次年带毒植株,但在花生与芝麻混种地区,流行于花生上的 PSV 极易由花生蚜和桃蚜传播至芝麻上而成为田间的主要初侵染源。特别是花生条纹病毒流行时期恰与芝麻易感苗期相吻合。因此,实际生产上,要注意对花生和芝麻进行合理布局。

参 考 文 献

- 1 杨新美,邴广兰. 湖北芝麻病害调查. 华中农学院学报, 1959, (3), 9-15
- 2 许泽永,张宗义. 芝麻黄花叶病毒病. 中国油料, 1985, (2), 73
- 3 赵书训,付仓生. 芝麻病毒病研究初报. 中国油料, 1985, (4), 56-58
- 4 杨书军,余子林,许泽永. 芝麻病毒病病原研究 I. 芝麻矮化坏死病害的鉴定. 病毒学杂志, 1989, (3), 308-314
- 5 Prasad B, Verma O P. Effect of leaf curl disease on seed and oil quality of sesame. Current Science (India), 1985, 4(8), 388-389
- 6 Sako N, Matsuo K. Purification of watermelon mosaic virus. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1980, 46(5), 639-646
- 7 Edwardson J R, Christie R. G. Potyvirus cylindrical inclusion subdivision 4. Phytopathology, 1984, 74(9), 1111-1114
- 8 J W Demski, Reddy, D V R et al. Peanut stripe virus—a new seedborn potyvirus from China infecting groundnut (*Arachis hypogaea*). Annual Applied Biology, 1984, 105, 495-501
- 9 Chang M U, Lee C. A virus disease of sesame caused by watermelon mosaic virus. Korean Journal of Plant Protection, 1980, 19(4), 193-198

Studies on Sesame Virus Diseases

I. Identification of the Pathogen of Sesame Yellow Mosaic Disease

Yang Shujun Yu Zilin Xu Zeyoung

(Oil-Crops Research Institute, CAAS, Wuhan, 430062)

Following the successful identification of sesame dwarf necrosis disease, this study focused on the identification of sesame yellow mosaic disease which widely spreaded all over the sesame-grown

areas in China with general infecting rate of about 5%. The virus (YMo-I) infected sesame (*Sesamum indicum*) plant inducing symptoms of evenly chlorotic, yellowing mosaic or mottle of leaves with slight plant stunt. YMo-I could infect mechanically 12 plant species or cultivars of 4 families. Its local hosts were *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*; and its systematic hosts were peanut, soybean, *Cassia occidentalis* and *Nicotiana clevelandii*. It was transmitted by *Myzus persicae*, *Aphis craccivora* and *A. glycine* nonpersistantly from sesame or peanut to sesame. The longevity of the virus in vitro was 3 days, the dilution end point was 4×10^{-4} and the thermal inactivation point was $55 \sim 60^{\circ}\text{C}$. The purified virus particles were flexuous filamentous and were $13 \times 730\text{nm}$ in size. The isolate induced typical pinwheel and scroll cytoplasmic inclusions and crystal nuclear inclusions in diseased sesame tissues. YMo-I was closely related to Peanut Stripe Virus, Watermelon Mosaic Virus-2; weakly to Soybean Mosaic Virus, Peanut Mottle Virus; and not to Turnip Mosaic Virus in serology. The occurrence of this disease in field was correlated with both the cropping pattern between sesame and peanut crops and the epidemic of PStV in peanut. According to all the results, YMo-I was identified as a strain of peanut stripe virus. The transmission rate of the virus through seeds from diseased plant was 0.6% by ELISA test. But there were not any diseased seedlings to develop from the seeds.

Key words: Sesame yellow mosaic disease Peanut stripe virus