

## 引起番茄坏死病的黄瓜花叶病毒 TN 分离物的研究

程宁辉 濮祖芹<sup>✓</sup> 方中达

(南京农业大学植保系, 南京 210095)

S432.41

A

**提要** 从南京郊区田间番茄坏死病株中分离出黄瓜花叶病毒 TN 分离物, 经人工接种 10 科 39 种植物, 能侵染其中的 8 科 26 种, 接种番茄, 辣椒和普通烟都引起坏死症状。TN 分离物的失毒温度为 50℃, 稀释限点  $5 \times 10^{-3}$ — $5 \times 10^{-4}$ , 体外存活期 1—2 天。蚜虫以非持久性方式传毒, 经免疫双扩散测定, TN 分离物与黄瓜花叶病毒抗血清呈阳性反应。用差速离心提纯的病毒粒子经电镜观察为廿面体, 直径为 28nm。SDS-PAGE 分析病毒外壳蛋白为单一组份, 分子量 27500 D。病毒核酸组份分析发现, 该病毒分离物含有 CMV 基因组核酸和一个低分子量的卫星 RNA。以上结果同已报道的引起番茄坏死的带卫星 RNA 的黄瓜花叶病毒株系一致 (Kearney, C. M. 1990, Jorda, C. 1992)。本文还讨论了该病害的发生和流行。

**关键词** 番茄, 黄瓜花叶病毒, TN 分离物, 卫星 RNA

1991 年秋和 1992 年春, 在本校和南京郊区番茄田中均发生一种引起番茄坏死的病毒病害。1991 年秋在南京近郊调查, 该病毒病零星发生, 但局部地区为害十分严重, 马群乡朱庄 20 亩和紫金山乡 30 亩番茄均因番茄坏死病的危害而毁产绝收。本校番茄试验地发病率高达 100%, 22 个番茄品种 (品系) 全部发生坏死病, 其中有个别品种坏死病发病率为 40%。1992 年春, 除南京地区发病加重外 (发病率已达 30% 以上), 在江苏省苏州市和南通市也发现番茄坏死病, 病情严重的田块发病率达 50—60%。该病发生初期, 番茄植株下部叶片出现坏死褐斑 (图 1), 上部叶片出现卷叶症 (图 2)。叶脉坏死, 至全叶枯死; 中期叶柄和茎秆出现坏死条斑, 枝条坏死, 果实小, 上面有坏死轮纹或条斑, 严重畸形 (图 3)。重病田后期整株枯死 (图 4)。本文还对该病毒分离物的生物学性状, 血清学及理化特性进行了研究。

## 材料与方 法

## 1 TN 分离物生物学性状研究

1.1 毒原纯化及寄主范围测定: 从田间采集的典型症状的样品经三次苜蓿单斑分离, 得到纯化病毒分离物 (TN), 繁殖于三生烟上。在防虫温室内, 人工汁液摩擦接种 (0.01mol/L PBS pH7.0, 含 0.1%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 10 科 39 种植物, 观察并记录症状发展。

1.2 体外抗性: 按常规方法测定, 枯斑寄主选用苜蓿。

1.3 蚜虫传毒试验: 用无毒桃蚜 (*Myzus persicae*) 按常规方法进行传毒试验。饲毒寄主为三生烟, 接毒寄主为番茄和三生烟, 设不饲毒蚜虫为对照, 观察发病情况。



图1 番茄叶片上的坏死褐斑  
Fig. 1 Necrotic brown spot on tomato leaf

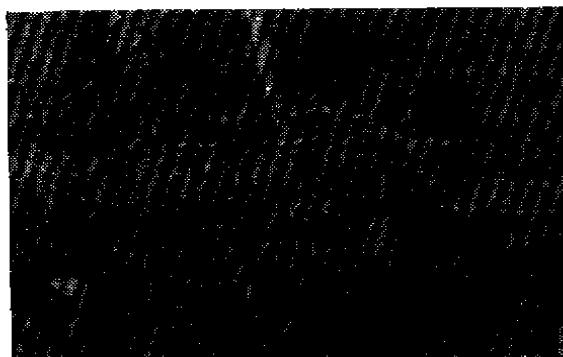


图2 番茄卷叶症状  
Fig. 2 Curling leaf of tomato

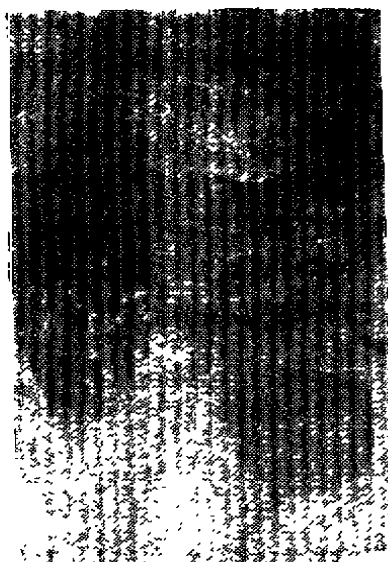


图3 番茄畸形果  
Fig. 3 Deformation fruit of tomato

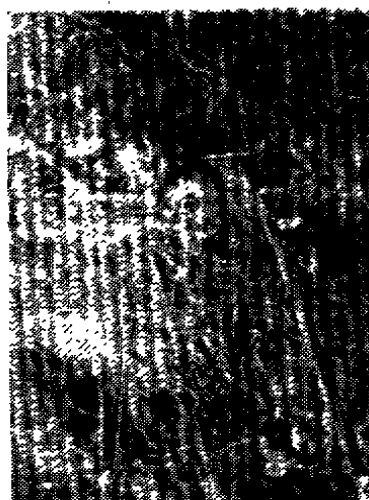


图4 番茄整株坏死  
Fig. 4 Wilting plant of tomato

## 2 TN 分离物血清学鉴定

用免疫双扩散法分别测定 TN 分离物与 CMV 抗血清(山东农业大学植保系提供)、TMV 抗血清和 TAV 抗血清(由农业部植物检疫实验研究所提供)之间的血清学关系。

## 3 病毒提纯及粒子观察

病毒提纯按文献<sup>[1]</sup>进行。提纯的病毒悬浮液直接点到铺有 Formar 膜的铜网上,用 2%醋酸铀(pH5.5)负染,电镜下观察粒子形态及大小。

#### 4 病毒外壳蛋白分子量测定

SDS-PAGE 测定病毒外壳蛋白分子量,方法按文献<sup>[2]</sup>进行。样品处理及电泳,将提纯病毒和标准蛋白(上海东风制药厂生产)分别与等体积裂解缓冲液(蔗糖 10g, SDS 2.3g, Tris 0.756g, 巯基乙醇 5ml, 定容至 50ml, 加少量溴酚兰)混匀,煮沸 3 分钟,上样,40mA 恒流电泳 2 小时,0.05%考马斯亮兰 R-250 染色 12 小时,脱色液脱至背景无色。

#### 5 病毒核酸组份分析

采用 Leoning 系统<sup>[3]</sup>,2.4%聚丙烯酰胺(含 0.3%琼脂糖)凝胶电泳分析核酸组份。核酸提取参照文献<sup>[4]</sup>,纯化病毒 400 $\mu$ l 加入 100 $\mu$ l 0.1mol/L 甘氨酸 pH 9.0(内含 0.05mol/L NaCl,0.01mol/L EDTA,2%SDS),37 $^{\circ}$ C 处理 10 分钟,速冷至 4 $^{\circ}$ C,加入等体积饱和酚/氯仿(1:1)重复抽提数次,氯仿抽提一次,水相加 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH5.5)和 2.5 倍体积 95%乙醇,放置-40 $^{\circ}$ C 沉淀过夜,离心后的沉淀物用 75%乙醇洗一次,真空干燥,沉淀溶于 50 $\mu$ l 去离子水中,-40 $^{\circ}$ C 保存。50 $\mu$ l 核酸样品与 10 $\mu$ l 6 $\times$ 电泳缓冲液指示剂混匀,加入样品孔中,100V 恒电压电泳 70 分钟,溴化乙锭染色 10-20 分钟,紫外灯下观察结果。

## 结 果

### 1 TN 分离物的生物学性状

1.1 TN 分离物的寄主范围:人工接种 10 科 39 种植物,TN 分离物侵染其中 8 科 26 种(表 1),不侵染葫芦科(Cucurbitaceae)的丝瓜(*Luffa cylindrica*),冬瓜(*Bemcasa hispida*),黄瓜(*Cucumis sativus*),菜瓜(*Cucumis melo var. conomon*),南瓜(*Cucurbita moschata*),西瓜(*Citrullus vulgaris*);十字花科(Cruciferae)的白菜(*Brassica chinensis*);豆科(Leguminosae)的大豆(*Glycine max*),菜豆(*Phaseolus vulgaris*),豇豆(*Vigna sesquipedalis*),绿豆(*Phaseolus aureus*);苋科(Amaranthaceae)的千日红(*Gomphrena globosa*);藜科(Chenopodiaceae)的菠菜(*Spinacia oleracea*)。TN 分离物侵染番茄、烟草、辣椒引起的症状同常见的 CMV 不同。接种苗龄为 20 天的番茄,发病后一周内发生急性坏死(图 5),接种苗龄为 60 天的番茄,症状发展较慢,首先出现叶片坏死,后枝条出现坏死条斑,最后全株枯死,发病过程同田间观察结果一致。在辣椒、烟草上 TN 分离物也引起坏死症状(图 6)。在其它寄主上产生的症状同常见 CMV 引起的症状相似。

表 1 TN 分离物侵染植物寄主的症状  
Table 1 Symptoms of plant hosts infected with the isolate TN

科名 family	种名 species	症状 symptom
		上位叶 / 接种叶 top leaves/infected leaves
	普通烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	M. LP/O
	三生烟 <i>N. tabacum var. Summa</i>	M. LP/NRS
	黄苗烟 <i>N. tabacum var. tabacum</i>	M. /NRS
	白烟 <i>N. tabacum var. White Burley</i>	M. /NRS

	心叶烟		M. /NRS
	<i>N. glauca</i>		
	黄烟		M. /NRS
	<i>N. rustica</i>		
	克氏烟		M. St. N/VN
	<i>N. clevelandia</i>		
茄科	大千生		VN. M. /0
Solanaceae	<i>Nicotiana physaloides</i>		
	莫陀萝		O/Chll
	<i>Datura stramonium</i>		
	矮牵牛		M/O
	<i>Petunia hybrida</i>		
	甜椒		M. N. /O
	<i>Caprium annuum</i>		
	番茄		
	<i>Lycopersicon esculentum</i>		
	Jiunongdahong		FN/O
	GeR26		FN/O
	Zao kui su jie		FN/O
	莧色藜		O/LN
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>		
藜科	灰藜		O/LN
Chenopodiaceae	<i>C. glaucum</i>		
	甜菜		O/LN
	<i>Beta vulgaris</i>		
	赤豆		O/LN
	<i>Phaseolus vulgaris</i>		
豆科	蚕豆		O/LN
Leguminosae	<i>Vicia faba</i>		
	豌豆		O/LN
	<i>Pisum sativum</i>		
莧科	莧菜		O/LN
Amaranthaceae	<i>Amaranthus mangostanus</i>		
伞形科	西洋芹		M/O
Umbellifere	<i>Apsium graveolens</i>		
	万寿菊		M/O
	<i>Taraxacum officinale</i>		
菊科	金盏菊		M/O
Compositae	<i>Calendula officinalis</i>		
番杏科	番杏		O/LN
Alzooaceae	<i>Tetragonia esportia</i>		
唇形科	芝麻		O/LN
Labiatae	<i>Sesamum indicum</i>		

符号说明: M. — 花叶 LP — 蚀纹 NRS — 坏死环斑 St. — 矮化  
 Symbols: mosaic; line pattern; necrotic ring spot; stunt;  
 N. — 坏死 VN — 脉坏死 Chll — 局部褪绿 FN — 急性坏死  
 necrosis; vein necrosis; chlorosis local; fast necrosis;  
 LN — 局部枯斑 0 — 无症  
 local necrosis; symptomless.

1.2 体外抗性:TN 分离物失毒温度  $50^{\circ}\text{C}$ , 稀释限点  $5 \times 10^{-3} - 10^{-4}$ , 体外保毒期 1—2 天。

1.3 蚜虫传毒试验:TN 分离物可由桃蚜以非持久性方式传毒, 但传毒效率不高, 在三生烟上, 发病株/接毒株为 4/30(13.33%), 番茄上为 6/40(15%)。



图 5 番茄苗急性坏死

Fig. 5 Fast necrosis of tomato seedling

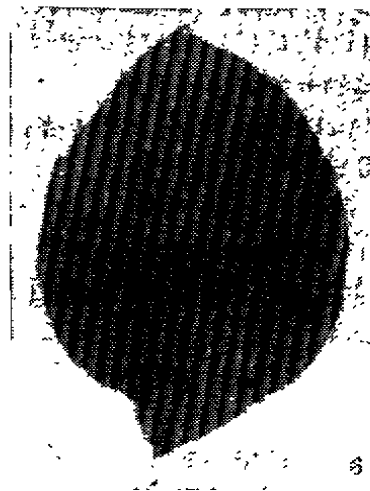


图 6 烟草叶片上坏死症状

Fig. 6 Necrosis on tobacco leaf

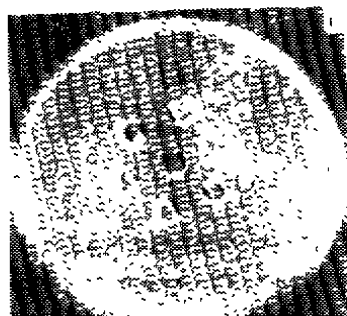


图 7 TN 分离物与 CMV 抗血清反应

1. 4. 对照; 3. 6. TN 分离物

2. 番茄上 CMV; 5. 豌豆上 CMV

Fig. 7 Serological reaction between the isolate TN and CMV antiserum

1. 4. control; 2. CMV from tomato 3. 6. the isolate TN

5. CMV from pea



图 8 TN 分离物粒子形态(放大 150000 $\times$ )

Fig. 8 Electron micrograph of purified virus particles of the isolate TN(150000 $\times$ )

## 2 血清学鉴定

免疫双扩散结果表明, TN 分离物与 CMV 抗血清呈阳性反应, 产生清晰沉淀带(图 7)。该病毒与 TMV 和 TAV 抗血清均呈阴性反应。

## 3 病毒提纯及粒子形态

提纯的 TN 分离物具有典型的病毒的紫外吸收光谱:  $A_{260}/A_{280} = 1.69$ 。电镜观察中的病毒粒子为等轴廿面体(图 8), 直径约为 28nm。

## 4 TN 分离物的外壳蛋白分子量

经 SDS-PAGE 分析, TN 分离物外壳蛋白为单一组份, 由标准分子量推算蛋白亚基分子量为 27500 D(图 9)。

## 5 核酸组份分析

提取的 TN 分离物的病毒核酸, 经 2.4% 聚丙烯酰胺(含 0.3% 琼脂糖)凝胶电泳和溴化乙锭染色, 凝胶中显示出 5 条 RNA 带(图 10), 其中 RNA<sub>1-4</sub> 为 CMV 核酸基因组, RNA<sub>5</sub> 为小分子量的卫星 RNA。

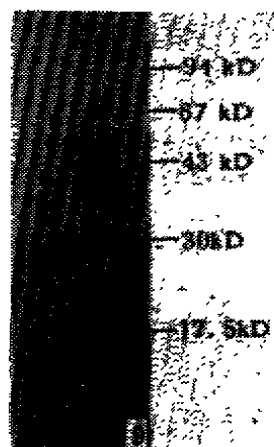


图 9 TN 分离物外壳蛋白的 SDS-PAGE 分析, 中间行: 标准蛋白, 磷酸化酶 94kD, 牛血清白蛋白 67kD, 肌动蛋白 43kD, 碳酸酐酶 30kD, TMV 外壳蛋白 17.5kD。边行: TN 分离物壳蛋白。

Fig. 9 Analysis of the isolate TN coat protein by SDS-PAGE. center lane, protein marker, phosphorylase B 94kD, albumin 67kD, actin 43kD, carbonic anhydrase 30kD, TMV coat protein 17.5kD. side lane, the isolate TN coat protein.

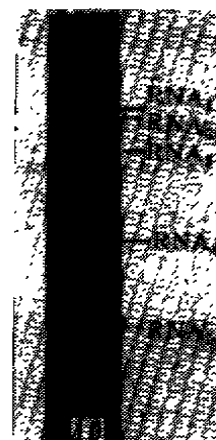


图 10 TN 分离物核酸电泳分析  
Fig. 10 Analysis of RNA components of the isolate TN by polyacrylamide gel electrophoresis. (from up to down, CMV RNA1, RNA2, RNA3, RNA4, CABNA5).

## 讨 论

根据以上试验结果,确定 TN 分离物为黄瓜花叶病毒。TN 分离物在番茄上引起坏死,并在其它茄科植物上产生坏死症状,同国内已报道的 CMV 株系不同<sup>[6-8]</sup>。从人工接种的寄主范围看,TN 分离物除不侵染十字花科和葫芦科寄主外,其它寄主症状反应均与常见 CMV 相同,目前国内报道的 CMV 株系中均有不侵染十字花科和葫芦科寄主的 CMV 存在<sup>[7,9]</sup>。

引起番茄坏死的 CMV 株系,最早于七十年代中期在法国南部流行,造成大面积番茄死亡,损失惨重<sup>[10]</sup>。1976 年 Kaper 等发现在引起番茄坏死的 CMV 株系中存在一个小分子量 RNA(第 5 组份)<sup>[11]</sup>,并进一步证实第 5 组份引起番茄坏死,确定为 CMV 卫星 RNA<sup>[12-14]</sup>。目前世界各地陆续报道了多起引起番茄坏死的带卫星 RNA 的坏死株系流行,造成巨大损失<sup>[16-17]</sup>。1990 年 Kearney 等报道了来自中国福建的番茄坏死材料中含有坏死型卫星 RNA<sup>[18]</sup>。1991 年我们在江苏省部分地区发现引起番茄坏死的 CMV,研究结果表明同 Kearney 报道的坏死株系相似,由于缺乏材料进行直接比较,无法断定两者是否相同。从该番茄坏死病害发生和流行趋势来看,带有坏死卫星 RNA 的 CMV 株系在我国有扩散和加重的趋势。此病八十年代末在福建首先发现,但没有为害情况的报道,1991 年春在长江下游的江苏部分地区发生,为害已逐步加重,1992 年春夏在湖北省部分地区也发现此病为害,可见此病有从南向北扩展趋势。另外从田间观察和温室试验发现,此病害的症状表现同温度存在一定关系。田间发病早期,坏死症状零星出现,并且缓慢,随着气温增高,坏死迅速扩展,植株成片死亡,在温室接种试验也有类似现象。此病毒分离物蚜虫传毒率也较低,因此该病的发生和流行等问题还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 裴美云,邱并生,谢浩,等. 哈密瓜花叶病毒的研究. 植物病理学报,1982,12(4):27-32
- 2 Jacob V, Maizel JR. Gel electrophoresis of viral RNA. In: Methods of virology, Maramorosch, K. & Koprowski, H. ed. Academic Press, INC. 1971:180
- 3 Loening U E. The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. Biochem. J. 1967, 102:251-257
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. Molecular Cloning. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 5 陈保善,高乔婉,骆学海,等. 广东省烟草花叶病原病毒的鉴定. 病毒学报,1986,2(2):166-169
- 6 丁辛顺,朱亚英,徐悌惟,等. 上海郊区番茄的黄瓜花叶病毒株系. 上海农业学报,1986,2(4):13-20
- 7 杨永林,阎素珍,卫慧,等. 辣椒上 CMV 株系鉴别寄主的筛选与应用. 中国病毒学,1992,7(3):317-327
- 8 刘焕庭,朱汉城,严敦余,等. 侵染番茄的黄瓜花叶病毒(CMV)株系特性的比较研究. 中国病毒学,1992,7(2):216-223
- 9 Shintazu M, Palukaitis P. Genetic mapping of cucumber mosaic virus. In: Viral Genes and Plant Pathogenesis. Thomas P. Pirone, John G. Shaw, ed. Springer-Verlag New York INC. 1990:156-164
- 10 Putz C, Kuszala J, Kuszala M, et al. Variation du pouvoir pathogene des isolats du virus de la mosaïque du concombre associé à la necrose de la tomate. Ann. Phytopathol. 1976;6:139-154
- 11 Kaper JM, Tousignant ME, Lot H. A low molecular weight replicating RNA associated with a divided genome plant virus, defective or satellite RNA? Biochemical and Biophysical Research Communications 1976; 72(4):1237-1242
- 12 Kaper JM, Waterworth H E. Cucumber mosaic virus associated RNAs; causal agent for tomato necrosis. Science, 1977,196(4):429-431
- 13 Waterworth H E, Tousignant M E, Kaper J M. A lethal disease of tomato experimentally induced by RNA-5 associated with cu

- cucumber mosaic virus isolated from commelina from El Salvador. *Phytopathology* 1978; 68:561—566
- 14 McGarvey P B, Kaper J M, Avila-Rincon M J, *et al.* Transformed tomato plants express a satellite RNA of cucumber mosaic virus and produce lethal necrosis upon infection with viral RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990; 170 (2):548—555
- 15 Kaper JM, and Collmer C W. Modulation of viral plant diseases by secondary RNA agents. In: *RNA Genetics* Vol. 1. E Domingo, J Holland, and P Ahlquist, ed. CRC Press, 1988; 171—194
- 16 Gallitelli D, di Franco A, Voulas C, *et al.* Infezioni miste del virus del mosaico del cetriolo (CMV) e di potyvirus di colture ortive di Puglia e Basilicata. *Inf. Fitopatol.* 1988; 38:57—64
- 17 Jorda C, Alfaro A, Aranda M A, *et al.* Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in eastern Spain. *Plant Dis.* 1992; 76:363—366
- 18 Kearney C M, Gonsalves D, Providenti R. A severe strain of cucumber mosaic virus from China and its associated satellite RNA. *Plant Dis.* 1990; 74:819—823

## Studies on the TN Strain of Cucumber Mosaic Virus Inducing Tomato Necrosis Disease

Cheng Ninghui Pu Zuqin Fang Zhongda

(*Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095*)

A lethal disease of tomato occurred severely in the vicinity of Nanjing from 1991 to 1992 was caused by a viral pathogen. A virus was isolated from the diseased tomato collected from field and called the isolate TN. It infected 8 families 26 species host plants out of 10 families 39 species inoculated in the host range test and induced necrosis in tomato, pepper and tobacco. Its stability in extracted sap was TIP 50°C, DEP  $5 \times 10^{-3} - 10^{-4}$ , and LIV 24—48hrs. The virus transmitted by aphid in non-persistence and reacted positively with CMV antiserum in agar diffusion test. Purified virions of the isolate TN were obtained by differential centrifugation and its morphology was spherical about 28nm in diameter by electron microscopy. Analysis of SDS-PAGE revealed that virion capsid protein had a single component (monomer), which molecular weight was 27500D. Viral RNAs contained normal CMV RNA 1—4 and additional lower molecular weight RNA5 by polyacrylamide gel electrophoresis. These results were concurrent with the previous reports that CMV strains associated with satellite RNA induced tomato necrosis (Kearney C M, 1990; Jorda C, 1992), so it was suggested that TN be the necrotic isolate of CMV associated with satellite RNA.

**Key words** Tomato, Cucumber mosaic virus, Necrotic isolate, Satellite RNA