

蚕豆萎蔫病毒——新疆番茄分离株的鉴定

周俊

(新疆农业科学院中心实验室, 乌鲁木齐 830000)

尹玉琦 崔星明 李国英

(石河子农学院植保教研室, 新疆石河子)

李维琪

(中国科学院新疆化学研究所, 乌鲁木齐)

S432.41

A **提要** 在新疆番茄斑驳病株上分离出一种球状病毒, 回接到番茄上产生斑驳症状。病毒粒体为 20 面体, 平均直径 25nm。经汁液摩擦接种可感染昆诺阿藜、苋色藜、蚕豆、番茄等 18 种植物, 不感染菜豆、豇豆、豌豆、六叶茄、黄瓜等。可由桃蚜传毒。在琼脂双扩散试验中, 能与蚕豆萎蔫病毒(BBWV) 抗血清产生明显的沉淀线, 与豇豆花叶病毒(CpMV)、黄瓜花叶病毒(CMV) 抗血清均不发生反应。纯化病毒紫外扫描呈典型的核蛋白吸收曲线。病毒衣壳蛋白由两种蛋白亚基构成, 其分子量分别为 45900 和 20400 道尔顿, 由 18 种氨基酸约 255 个氨基酸残基组成。病毒核酸是双组份的, 它们的分子量为 1320000 和 2340000 道尔顿。根据上述结果认为该病毒是蚕豆萎蔫病毒侵染番茄的一个株系。

关键词 蚕豆萎蔫病毒, 番茄分离株

鉴定

番茄病毒是蔬菜上的重要病害, 病毒种类多达 30 多种, 严重影响了番茄的产量和品质。据《植物病毒分类信息管理系统》的微机检索结果, 能侵染番茄的病毒类型有 80 多种, 目前国内只报道了 9 种^[1]。蚕豆萎蔫病毒(BBWV) 最初从澳大利亚自然感病的蚕豆上发现^[2], 后来相继在英、美、法等世界各地许多重要经济植物上发生, 对广大地区的果蔬、药物和木材生产造成严重威胁。我们对新疆部分番茄产区进行病毒调查, 从中分离鉴定出能自然侵染番茄的蚕豆萎蔫病毒, 现将鉴定结果报道如下:

材料与amp;方法

1 病毒的分离、纯化及形态观察

从新疆石河子、乌鲁木齐、伊犁、吐鲁番等地区采集番茄斑驳花叶病株, 通过汁液摩擦接种到昆诺阿藜和蚕豆上, 经单斑分离纯化并验证可侵染番茄, 将所得分离物保存在蚕豆和昆诺阿藜上。该病毒分离物的代号为 87-35。病毒的提纯参考文献^[3,4]的方法, 用昆诺阿藜作繁殖寄主, 通过 PEG 沉淀, 差速离心及蔗糖梯度离心进行纯化。用提纯病毒点样, 以 1% 醋酸铀负染后, 于 JEM-1200EX 电镜下观察粒体形态。

2 生物学性状测定

• 本文于 1993 年 8 月 18 日收到, 1994 年 1 月 3 日修回

2.1 寄主范围测定 摩擦接种法接种9科50种供试植物幼苗,于1个月内逐日观察记载现症情况,无症状者回接昆诺阿藜或用血清反应检测是否隐症带毒。

2.2 体外稳定性测定 按常规方法测定分离物87-35的致死温度、稀释限点及体外保毒期。测试寄主为昆诺阿藜。

2.3 蚜传实验 在防虫网室内,将人工饲养的无毒桃蚜(*Myzus persicae*)饥饿2小时后,在蚕豆或昆诺阿藜病株上饲毒30分钟,再移接到昆诺阿藜健株上,每株接5~10头,传毒12小时后,喷药杀死蚜虫,一周后观察记录发病情况。

3 血清学试验

采用琼脂双扩散法。凝胶浓度为1%。所用BBWV抗血清系日本大阪府立大学井上忠男教授赠送,CpMV抗血清系在美博士研究生陈小江赠送。

4 病毒外壳蛋白生化特性的测定

用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分离物87-35外壳蛋白分子量^[6]。缓冲体系为Tris-甘氨酸缓冲液,考马斯亮兰R250染色。将测定结果进行统计分析计算病毒外壳蛋白分子量。外壳蛋白氨基酸组成分析采用郑巧兮等^[6]的方法。

5 病毒核酸组份及分子量测定

综合参照^[7-9]方法,用SDS对病毒外壳进行降解,再用乙二胺及重蒸甲酰胺对病毒核酸进行变性处理后进行单分子展层。用50%的重蒸甲酰胺作下相液,0.1mg/ml的细胞色素C及73%的重蒸甲酰胺作上相液,火棉胶膜铜网制片,5×10⁻⁴mol/L的醋酸铀负染,钨铀合金丝旋转投影后,于电镜下观察拍照、描图、统计核酸分子长度并计算分子量。单链核酸分子量和分子长度的关系是:1微米=1.2×10⁶道尔顿^[7,9]。

结果与分析

1 病毒的纯化与形态

分离物87-35纯化病毒制剂浓度为4mg/ml,紫外吸收光谱呈典型的核蛋白吸收曲线(图1),最大吸收波长在258.5nm,最小吸收波长在241.7nm,A₂₆₀/A₂₈₀=1.43,病毒核酸含量约为13.37%,质粒消光系数为5.4,质粒密度为1.32。微分比容为0.75。纯化病毒在电镜下为25nm的球状病毒粒子(图2)。

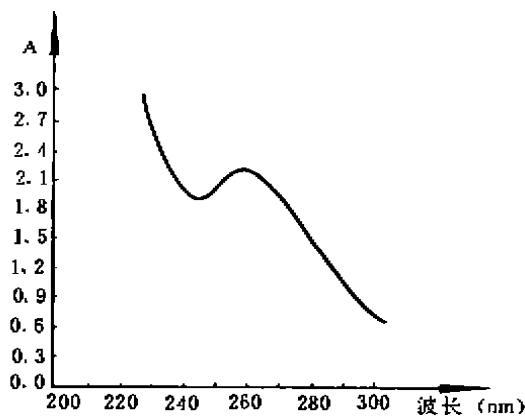


图1 提纯分离物的紫外吸收曲线

Fig. 1 UV absorption profile of purified isolate 87-35



图2 病毒粒子形态(×40000×3)

Fig. 2 Morphology of the virus particles(×40000×3)

2 生物学性状

2.1 寄主范围及症状 9科50种植物的测定结果表明,87-35病毒分离物可侵染茄科、豆科、藜科、苋科和番杏科的18种植物(表1,图3和4),不能侵染豌豆、北农2号、三棱豌豆、箭舌豌豆、菜豆、白豆、品托、绥农2号、豇豆、黑种三尺、大青条、羽豆、绿豆、三叶草、苜蓿、六叶茄、三生烟、黄花烟、亮黄烟、枸杞子、蔓陀罗、假酸浆、白菜、大丽菊、百日草、罗勒、西葫芦、黄瓜、南瓜、丝瓜、西风古和苋菜。

2.2 体外稳定性 87-35分离物的纯化温度55~60℃,体外存活期10~11天(室温),稀释限点 10^{-4} ~ 10^{-5} 。

2.3 蚜传试验 分离物87-35可由桃蚜以非持久性方法传播,发病率为80~100%。



图3 苋色藜局部坏死斑和系统褪绿斑症状

Fig. 3 Local necrosis spots and system chlorosis spots on *C. amaranticolor*



图4 蚕豆系统斑驳花叶

Fig. 4 System mottle mosaic on broad bean

3 血清学试验

在琼脂双扩散试验中87-35能与蚕豆萎蔫病毒抗血清形成明显的沉淀线,不能与CpMV及CMV等抗血清发生反应,由此可见分离物87-35与CpMV及CMV等无血清学亲缘关系。

表1 分离物87-35寄主范围及症状表现

Table 1 Host ranges and symptoms of isolate 87-35

寄主 Hosts	症状 Symptoms
番茄(<i>Lycopersicon esculentum</i>)	SMo
辣椒(<i>Capiscum frutescens</i>)	SC, SMo
矮牵牛(<i>Petunia hybrid</i>)	LN-SMo
珊瑚烟(<i>Xanthox</i>)	LN
心叶烟(<i>Nicotiana glauca</i>)	LN
白烟(<i>Nicotiana glauca</i>)	SMo
黄苗榆(<i>N. tabacum</i>)	SMo
哈瓦纳38号(<i>N. tabacum</i> var <i>amurensis</i>)	LN
克利夫兰烟(<i>N. clevelandii</i>)	SN
蚕豆(<i>Vicia faba</i>)	SMo, SN
昆诺阿藜(<i>Chenopodium quinoa</i>)	LN-SC, SN
苋色藜(<i>C. amaranticolor</i>)	LN-SC
墙生藜(<i>C. murale</i>)	LN-SN
灰藜(<i>C. glaucum</i>)	LN
菠菜(<i>Spinacia oleracea</i>)	LC-SMo, SN
甜菜(<i>Beta vulgaris</i>)	LR
番杏(<i>Tetragonia expansa</i>)	LR, LN
千日红(<i>Gomphrena globosa</i>)	LN-SMo

注:SMo,系统斑驳花叶;SC,系统褪绿斑;LN,局部坏死斑;SN,系统坏死;LC,局部褪绿斑;LR,局部环斑。

Note, SMo, system mottle mosaic; SC, S. chlorosis spots; LN, Local necrosis spots; SN, S. necrosis; LC, Local chlorosis spots; LR, Local ring spots.

4 病毒外壳蛋白特性

分离物 87-35 经 SDS-PAGE 电泳,结果显示其外壳蛋白亚基是由两种蛋白亚基构成的,其分子量分别约为 45900 道尔顿和 20400 道尔顿(图 5 和 6)。其外壳蛋白氨基酸组成分析结果见表 2,其中色氨酸(Trp)在酸水解时分解损失,因此未测定。

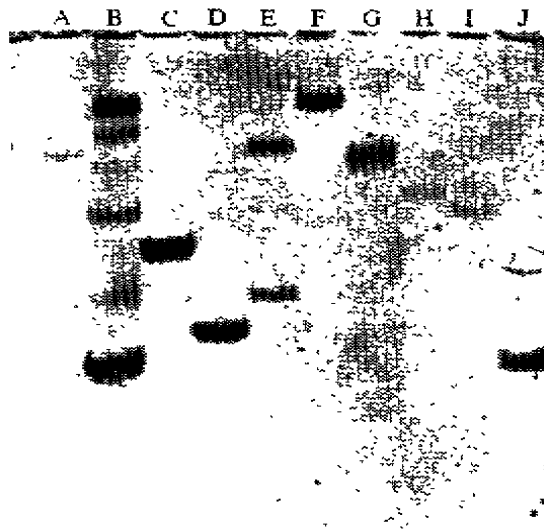


图 5 分离物 87-35 外壳蛋白电泳图谱

- A, 分离物 87-35 外壳蛋白;
- B, 标准蛋白和分离物 87-35 外壳蛋白;
- C, 黄瓜花叶病毒外壳蛋白(26300);
- D, 烟草花叶病毒外壳蛋白(17500);
- E, 分离物 87-35 外壳蛋白;
- F, 牛血清清蛋白(68000);
- G, 人血清清蛋白(45000);
- H, 大菜粉蝶颗粒体病毒外壳蛋白(27500);
- I, 胰凝乳蛋白酶原 A(25000);
- J, 细胞色素 C(12500)

Fig. 5 Electrophoretogram of coat protein of isolate 87-35

A, Coat protein of isolate 87-35; B, Standard protein and isolate 87-35 coat protein; C, Cucumber Mosaic Virus coat protein (26300); D, Tobacco Mosaic Virus coat protein (17500); E, Coat protein of isolate 87-35; F, Rinder serum albumin (68000); G, human serum albumin (45000); H, Protein of large white butterfly granular virus (27500); I, Chymotrypsinogen A (25000); J, Cytochrom C (12500).

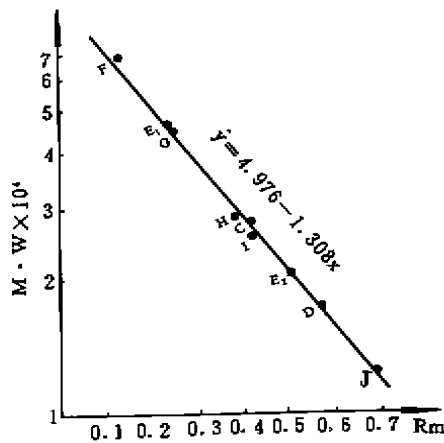


图 6 分离物 87-35 衣壳蛋白分子量的测定

Fig. 6 Determination of coat protein molecular weight of isolate 87-35

表2 分离物 87-35 衣壳蛋白亚氨基酸组成测定结果

Table 2 Determination of coat protein amino acid composition of isolate 87-35

氨基酸 Amino acid	数目 Number	氨基酸 Amino acid	数目 Number
ASP	23	ILE	9
THR	13	LEU	19
SER	22	TYR	9
GLU	27	PHE	12
GLY	27	LYS	20
ALA	19	HIS	4
GYS	2	ARG	17
VAL	15	PRO	17
MET	1	TRP	/

5 病毒核酸组份及分子量

采用单分子展层技术,利用电镜对核酸分子长度及分子量进行测定,在电镜下可看到长短不等的 RNA 单链分子,对 106 个核酸分子长度的测定及生物统计分析结果表明:病毒核酸分子长度有两种分布,分别为 1.1 μ m 和 1.95 μ m,说明该病毒 RNA 是双组份的,经换算可知其分子量分别为 1320000 道尔顿和 2340000 道尔顿。

讨 论

新疆地处欧亚大陆腹部地带,具有独特的生态环境和干燥少雨的气候条件,因而发生在新疆的病毒病就可能具有其独特的地方。我们在田间调查的基础上,分期分批采集花叶、蕨叶、条斑等各种类型的番茄病样及可疑病株,从番茄花叶类型中分离出一类分离物,以 87-35 为代表,对其寄主范围、传毒介体及血清反应等做了广泛的研究,研究结果表明其生物学特性、血清学特性及粒体形态等与文献报道的蚕豆萎蔫病毒(BBWV)基本一致,只是该病毒分离物在豆科植物上的寄主范围很狭窄,只感染蚕豆,这说明新疆番茄上发生的 BBWV 很可能是不同于文献报道的一个新株系,这还需就特异性抗血清及病毒基因组 RNA 同源性等方面做进一步研究才能定论其株系。

对于象 87-35 这样长的且又是两个组份的单链 RNA 分子的单分子展层,从所掌握的资料来看,在国内外还是第一次报道。从 106 个核酸分子长度的统计来看,可明显看见有两种长度分布,因此初步推断 87-35-RNA 是双组份的。结合核酸电泳来看,电泳中 87-35-RNA 呈现出两条谱带,进一步证实了以上的推断。由于我们没有标准 RNA,因此,从核酸电泳中无法测得其分子量,但通过核酸电镜技术,测出其分子量分别为 1320000 和 2340000 道尔顿,这和蚕豆枯萎病毒血清 1 型的核酸分子量^[10]比较接近。对于应用单分子展层法通过电镜来测定植物病毒核酸分子量的方法;还有待进一步探讨和研究。

参 考 文 献

- 1 郑燕棠,曹为玉,赵万英,等.天津近郊番茄病毒类型的研究.病毒学杂志,1990,1:78-81
- 2 奚仲学,徐绍华,莽克强.引进北京豇豆系统坏死和花叶的一个分离物 1.寄主范围.提纯和超薄切片.植物病理学报.

- 1982, 12(4), 38~42
- 3 冯兰香. 菠菜病毒病的毒原鉴定分离和提纯. 中国蔬菜, 1986, 2: 37~39
 - 4 石川亮, 难波成任, 山下修一, 等. ソラマメウィルトウイルス (broad bean wilt virus, BBWV) の纯化と理化学的性状について. 日本植物病理学会报, 1985(昭和 60 年), 51(3), 352~353
 - 5 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等主编. 生化实验方法和技术. 第 1 版, 北京: 高等教育出版社, 1981, 112~119
 - 6 郑巧兮, 龚祖坝, 全德全. 刺槐花叶病毒的研究 I. 病毒分离纯化及其生物学和生物化学特性. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(6), 540~544
 - 7 Moore C L. The Electron Microscopy of Ribonucleic Acids. In: Electron Microscopy in Biology, Griffith J D, ed. John Wiley And Sons, New York; A Wiley-Interscience Publication, 1981, 1: 67~88
 - 8 洪述. 核酸分子的电镜观察技术. 见: 林钧安主编. 高等农林院校应用电子显微镜技术[论文选编增刊]. 北京: 高等农业教育出版社, 1986, 1~13
 - 9 徐有成, 戴培华, 龚祖坝. 用电镜直接观察核酸分子的制样技术. 生物化学与生物物理进展, 1975, 2: 9~12
 - 10 吴纪荣. 国际病毒分类委员会最近批准的新病毒科和组. 病毒学报, 1988, 4(2): 187~188

Study on Broad Bean Wilt Virus Isolated from Tomato

Zhou Jun

(Central Laboratory of Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi 830000)

Yin Yuqi Cui Xingming Li Gouying

(Laboratory of Plant Pathology, Shihezi Agricultural College, Shihezi)

Li Weiqi

(Xinjiang Institute of Chemistry, Academia Sinica, Urumqi)

The isolate 87-35 was isolated from tomato in Xinjiang. After inoculating to tomato inducing motile, the virus particles were isometric, and about 25nm in diameters, The virus infected 18 species plant—*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, broad bean and tomato etc. It was transmitted by aphid (*Myzus persicae*) in nonpersistent manner. In the agar double-diffusion tests between the virus and broad bean wilt virus antiserum, a clear band of precipitate was observed, but it was not seen reaction between the virus and antisera of cowpea mosaic virus, and cucumber mosaic virus. Absorption spectrum of the virus was maximum in 258.5nm and minimum in 241.7nm. The virus particle contained two protein subunits, their electrophoresis molecular weights were about 45900 Dalton and 20400 Dalton respectively. And they were composed of 18 kinds amino acids with 255 residues. Genome nucleic acid of the virus consisted of two components RNA, their molecular weights were about 1320000 Dalton and 2340000 Dalton respectively. According to the above results, the isolate 87-35 was identified as a strain of Broad Bean Wilt Virus (BBWV).

Key words Broad Bean Wilt Virus, Tomato's isolate