维普资讯 http://www.cqvip.com

367—370

6785(16)

第10卷 第4期
1995年12月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol. 10 No. 4
Dec. 1995

侵染菊花的黄瓜花叶病毒的初步鉴定和血清学检测

张海保 朱西儒 张云开

(中国科学院华南植物研究所，广州 510650)

(S432.41 S436.8)

关键词 菊花，黄瓜花叶病毒，间接ELISA 鉴定，血清学检测，植物病毒

菊花(*Chrayanthemum morifolium*)病毒病是危害菊花的一类主要病害。国外文献报道可侵染菊花的病毒和类病毒约有20—30种[1]，国内报道番茄不孕病毒、菊花B病毒、马铃薯Y病毒等均危害菊花[2,3]。为了有效地控制菊花病毒病的发生，提高广东省菊花出口的产量和档次，在广州、顺德和东莞等进行了采样和调查。本文报道侵染菊花的黄瓜花叶病毒的鉴定和检测方法。

材料和方法

1 **毒源及其纯化** 将大田采集的表现花叶、矮化、褪绿黄化等症状的菊花病毒病样本30余份，摩擦接种到苋色藜、昆诺藜、心叶烟、普通烟等鉴别寄主上，经单斑分离和回接试验，获得一个侵染菊花的病毒分离物，定为毒株S_1。

2 **毒株S_1的寄主范围测定** 用汁液摩擦接种茄科、藜科、葫芦科、菊科、豆科和番杏科等6科13种植物，观察其显症情况。

3 **蚜虫传毒试验** 按常规方法用无毒的桃蚜(*Myzus persicae*)进行传毒试验。用接种毒株S_1的菊花病叶接种健康菊花植株。试验重复3次。

4 **病毒粒体的电镜观察** 取接种毒株S_1的普通烟病叶的粗提汁液，悬滴法制样，用1%醋酸双氧铀(pH4.5)负染，在JEM-100 CX Ⅱ型电镜下观察病毒粒体形态。

5 **血清学试验** 用常规间接ELISA方法测定了毒株S_1与黄瓜花叶病毒组的黄瓜花叶病毒(CMV)和番茄不孕病毒(ToAV)的抗血清的反应。CMV和ToAV的抗血清由中国科学院微生物所惠赠。辣根过氧化物酶标羊抗兔和底物四甲基联苯胺(TMB)为华美公司产品。在DG3022A型酶联免疫检测仪上测定反应的OD_{450}值。

6 **毒株S_1的提纯和抗血清制备** 参考田波等(1987)[4]提纯CMV的方法，以普通烟为繁殖材料，取新鲜病叶榨汁，经3次差速离心和10—40%蔗糖密度梯度离心，提纯毒株S_1。病毒提纯液用紫外分光光度计测定其紫外吸收值，确定其纯度。以纯化病毒为抗原，按常规方法经皮下多点注射和耳静脉注射免疫家兔制备毒株S_1的抗血清。

本文于1994年10月25日收到，1995年4月21日修回
广东省科委自然科学基金资助项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

7 **大田菊花病毒病样的检测** 用制备的CMV(毒株S_1)的抗血清,采用间接ELISA法检测了采自广州、顺德和东莞等地的大田菊花病样158个,调查田间菊花CMV的感染率。菊花病叶用0.05 mol/L的碳酸盐包被缓冲液(pH9.6,含0.5% Na_2SO_3(W/V))研磨(1:5,W/V),取病汁包被酶标反应板。并用0.5%的牛血清白蛋白封闭酶标反应板(37℃孵育2 h)。其余步骤同血清学试验。

结果和讨论

1 毒株S_1的生物学特性

1.1 寄主范围 毒株S_1的寄主范围较广,在接种的6科13种植物中,能侵染其中11种植物,并表现症状(表1)。

1.2 蚜虫传毒 毒株S_1能经桃蚜以非持久性方式传播,传毒效率很高。3次重复其传毒效率平均为86.7%(13/15,发病株/蚜虫接种株)。

1.3 病毒粒体形态 电镜观察表明,毒株S_1的病毒粒体为球形,其直径约为28－30nm。图2为提纯病毒制样观察到的这种球状病毒粒体。

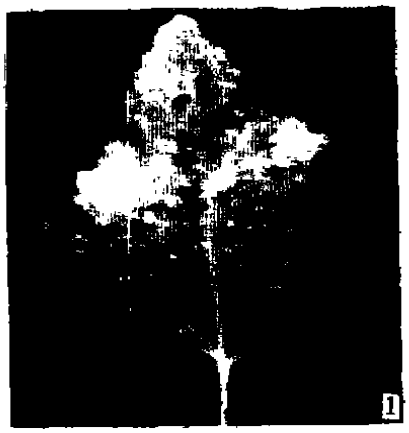

图1 毒株S_1侵染苋色藜表现的局部枯斑症状

Fig1 The local necrosis symptom of *Chenopodium amaranticolor* infected by isolate S_1

图2 提纯毒株S_1病毒粒体的电镜观察(140000×)

Fig2 The electron micro graph of viral particles of purified isolate S_1(140000×)

2 毒株S_1的血清学反应测定

用ELISA方法测定了毒株S_1与黄瓜花叶病毒(CMV)和番茄不孕病毒(ToAV)抗血清的反应(表2)。结果表明,毒株S_1与CMV的抗血清呈阳性反应,而与ToAV的抗血清呈阴性反应。再综合其寄主范围、蚜虫传毒以及病毒粒体形态等特性,鉴定这个侵染菊花的病毒分离物S_1为黄瓜花叶病毒组的黄瓜花叶病毒(CMV)。

3 病毒的提纯及抗血清的制备

毒株S_1经10－40%的蔗糖密度梯度离心,纯度较高。紫外吸收测定表明,其最高吸收峰A_{260}为1.24,最低吸收A_{240}为0.94,$A_{260/240}$值为1.32,与CMV的$A_{260/240}$值1.38很接近[5],进一步证明提纯的毒株S_1为CMV。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1　各种寄主植物接种毒株 S_1 的症状（接种叶/心叶）

Table 1　Symptoms in different host plants inoculated with isolate S_1 (inoculated leaf / top leaf)

寄　主　Host	症　状　Symptom
茄科　Solanaceae	
普通烟　*Nicotiana tobacum*	O/SM
心叶烟　*N. glutinosa*	O/SM
二生烟　*N. tobacum Samsun*	O/SM
番　茄　*Lycopersicum esculentum*	O/O
矮牵牛　*Petunia hybrida*	O/SM
曼陀罗　*Datura stramonium*	O/O
藜科　Chenopodiaceae	
苋色藜　*Chenopodium amaranticolor*	LN/O
昆诺藜　*C. quinoa*	LN/O
葫芦科　Cucurbiaceae	
西葫芦　*Cucurbita pepo*	O/SM
黄　瓜　*Cucumis sativus*	O/SM
菊科　Compositae	
百日菊　*Zinnia elegans*	O/SM
豆科　Leguminosae	
菜豆　*Phaseolus vulgaris*	O/SM
番杏科　Aizoaceae	
番杏　*Tetragonia expansa*	CLL/O

O：无症状（No symptom）SM：系统花叶（Systemic mosaic）LN：局部坏死（Local necrosis）
CLL：褪绿局部枯斑（Chlorotic local lesion）

表2　毒株 S_1 与 CMV 和 ToAV 抗血清的 ELISA 反应的测定

Table 2　The reactions of isolate S_1 with antisera against CMV and ToAV respectively by ELISA test

样　品 Samples	抗　血　清　Antisera			
	CMV-As		ToAV-As	
	读　数　Reads	反　应　Reactions	读　数　Reads	反　应　Reactions
毒株 S_1 (isolate S_1)	0.98	+	0.16	−
CMV (CK_1)	1.15	+	0.12	−
ToAV (CK_2)	0.11	−	1.03	+
健叶（CK_3）(Health leaf)	0.06	−	0.09	−

* 表中读数为 OD_{450} 值（The reads were OD_{450} values）
+：阳性反应　(Positive reaction)　($P/N \geq 2.2$)
−：阴性反应　(Negative reaction)　($P/N < 2.2$)
P/N：样品 OD_{450} 值/健叶 OD_{450} 值　(OD_{450} value of sample / that of health leaf)

利用提纯的毒株 S_1 为抗原，经2次皮下多点注射和4次耳静脉注射免疫家兔，获得了较高效价的抗血清。ELISA 测定其效价为1∶2400。

1　**大田菊花病样的血清检测**　在检测的158份菊花病毒病样品中，与 CMV 抗血清呈阳性反应的有30份，检出率为19.0%。

从本项研究的结果看，CMV 的检出率达19.0%，因此，CMV 是引起菊花病毒病一个不容忽视的病原。CMV 在菊花上的传播，除蚜虫带毒传播外，扦插母枝带毒也是一个主要因素。因此，控制母枝带毒，减少初侵染源是防治该病的主要方法。本研究在制备高效价黄瓜花叶病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

(菊花毒株)抗血清的基础上，改进检测方法，通过在包被缓冲液中加入0.5%的Na_2SO_3减少病汁中的易氧化成分，以及用0.5%的牛血清白蛋白封闭酶标反应板，提高了间接ELISA反应的灵敏度及特异性，这对于大量检测菊花繁殖母株，减少黄瓜花叶病毒侵染菊花将具有积极的意义。

参考文献

1 张健如，沈淑琳. 花卉植物病毒及病毒病. 上海：上海科学技术出版社，1991：87—91

2 陈怀仰，黄锡祥. 菊花病虫发生与防治研究. 广东农业科学，1993，(1)：30—33

3 舒秀珍，朱水芳，许宏冠等. 菊花病毒病的鉴定及其检验技术研究. 花卉病毒研究，1989，(3)：1—10

4 田波，裴美云. 植物病毒研究方法. 北京：科学出版社，1987：159—193

5 Francki, R. I. B, D. W. Mossop, T. Hatta *et al.* Cucumber mosaic virus, CMI/AAB Description of Plant Virus, 1979, No. 213.

Preliminary Identification and Serological Detection of Cucumber Mosaic Virus Infecting Chrysanthemum

Zhang Haibao Zhu Xiru Zhang Yunkai

(*South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou* 510650)

The virus isolate S_1 was isolated from chrysanthemum plants with the symtoms of viral disease. The host range of isolate S_1 was wide. It could infect 11 species plants among tested 6 families by sap-inoculation. The isolate S_1 was also transmitted in non-persistant manner by *Myzus persicae*. The rate of transmission was 86.7%(13/15). The virus particle of isolate S_1 was sphere shape. Its diameter was about 28—30nm. The serological test showed that isolate S_1 reacted positively with the antiserum against CMV but negatively with ToAV antiserum. On the basis of these characteristics, isolate S_1 was identified as a member of cucumber mosaic virus (CMV). The rabbit antiserum against CMV (isolate S_1) was prepared with purified isolate S_1. The highest titer of the antiserum was 1:2400 tested by ELISA. All 158 virus disease samples of field chrysanthemum plants were detected with the prepared antiserum by indirect-ELISA, in which 19.0% samples showed positive reaction.

Key words Chrysanthemum, Cucumber mosaic virus (CMV), Indirect-ELISA