149—156 15971(10)

第11卷第2期 中国病毒学 Vol.11 No.2
1996年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1996

侵染香蕉的黄瓜花叶病毒株系的形态和生物学特征*

李华平** 范怀忠
(华南农业大学植保系,广州 510642)

S432.41 S436.68

提要 对香蕉花叶病广东三个代表分离物的形态和生物学特征进行了较为全面的研究。在六种鉴别寄主上,斑驳类(MM)和断续条纹类(BS)分离物侵染较多的寄主种类诱导较为严重的症状,连续条纹类(CS)分离物侵染能力较弱。电镜观察表明:BS、CS和MM三个代表分离物的粒子呈球状、其粒子直径分别为22.5、24.3和27 nm,纯化的病毒粒子电泳相对迁移率分别为0.72、0.56和0.51,在西葫芦上的增殖速度:不管在子叶或真叶,都是MM最快、BS次之、CS最慢。从西葫芦接种叶运转出接种叶的速度:MM和BS相似、CS明显较慢。在烟草上,三个分离物的运转速度和增殖速度以MM最快、BS次之、CS最慢;而且在烟草上随着接种后时间的延长,三个分离物除MM维持高浓度的时间较长外,BS和CS的都很短。在西葫芦和烟草上提纯产量,MM类最多、BS类次之、CS类最低。

关键词 香蕉,CMV株系,形态学特征,生物学特征 香蕉花叶病,黄瓜花叶病毒

在香蕉花叶病调查及检测研究中[1],我们已证实来源于广东香蕉主产区的272个花叶病标样都含有黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV),其三类症状(断续条纹类,BS;连续条纹类,CS;斑驳类,MM)很可能分别是由CMV三个不同的株系所引起的。

CMV存在很多株系,即使在同一作物上也有许多不同的株系[2,4],病毒粒子形态和生物学研究往往是株系鉴定的基础,通过这些试验,一方面可排除是否存在其它病毒,另一方面可初步确定CMV株系的种类和数目。CMV属三分体基因组,分别包装在同形的粒子衣壳内,其粒子直径大多数株系的约28 nm,但也有大于或小于这一直径的[2]。粒子直径的大小可以反映在粒子电泳相对迁移率上[4]。CMV寄主范围极其宽广[2,3],不同株系可以通过不同的寄主范围予以区分。此外,根据一定寄主上不同株系侵染力、增殖和运转速度不同,也可以作为鉴定CMV株系的依据[5,6]。

本工作通过对香蕉花叶病三类分离物对香蕉的回接、寄主范围测定、粒子形态的电镜观察、粒子电泳相对迁移率和在西葫芦以及烟草上增殖和运转的动力学等研究,试图探讨广东香蕉花叶病三类分离物的形态和生物学特征。

材料和方法

1 病毒和抗血清

选取香蕉广东三类分离物各4~5个在苋色藜(*Chenopodium amaranticolar*)上进行单斑纯化,以西葫芦

本文于1995年7月11日收到,11月20日修回
* 广东省科学基金和高等学校博士点专项科研基金资助项目
** 现在华中农业大学植保系(武汉市,430070)工作

维普资讯 http://www.cqvip.com

(*Cucurbita pepo*)和烟草(*Nicotiana tabacum* cv. HV38)为繁殖寄主、采用 Lot 等法[7](经两次高低速离心后，采用 10～40%蔗糖梯度离心)提纯病毒。分离物 CMV-T37 和 CMV-L18 以及 CMV-T37 的抗血清由本研究室高乔婉教授提供。

2 不同类型症状的分离物回接香蕉植株

香蕉三个代表分离物(BS、CS 和 MM)通过常规机械接种法接种于烟草或西葫芦后，再采用同样方法和蚜虫介体传毒法回接香蕉，供试香蕉植株选用组织培养的幼嫩苗，每个试验用 5 株。机械接种法的缓冲液为磷酸盐缓冲液(pH 8.0，内含 0.02% DIECA 和 0.1% $NaSO_3$)。蚜虫传毒法，选用喂养于健康烟草上的棉虫(*Aphis gossypii*)5 头和 15 头，饥饿 2 小时后在烟草病株上饲毒 1 h，在香蕉苗上传毒 24 h 后予喷药杀死，接种和传毒后的香蕉苗置于温室养虫笼内生长观察两个月。

3 寄主范围的测定

香蕉花叶三类症状分离物各 4～5 个，分别用 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)，在同一天机械接种于所选择的 13 种寄主植物上。每个单位试验的寄主植物株数为 6 株，接种后置于防虫网室或温室内，观察一个月。无症的植株通过常规接种法回接昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)和利用间接 ELISA 法[8]测定，以证实是隐症或免疫的。

4 病毒粒子形态的电镜观察

纯化的病毒，经 1%醋酸双氧铀(pH 5)负染后进行电镜观察，。每个分离物病毒粒子的大小至少测定 60 个粒子，取其平均数。

5 病毒粒子的电泳相对迁移率

用每个分离物的纯化病毒 、点样 1 μg 进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳。电泳缓冲液为 192 mmol/L 甘氨酸－25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3)，电泳后的凝胶用 50%甲醇-10%冰乙酸-0.25%考马斯亮蓝染色，并测定染色前后胶长及粒子移动等距离，计算粒子相对迁移率[4]。

6 在西葫芦和烟草上增殖和运转的动力学

6.1 不同分离物在西葫芦上的增殖速度

将浓度为 100 μg/ml 的不同分离物的提纯病毒分别接种于西葫芦(子叶期)子叶上，接种后每隔 3 d 采集 4 株植株上的子叶和第 1、第 2 片真叶，分别用间接 ELISA 法测定病毒浓度，重复三次。

6.2 不同分离物在西葫芦上的运转速度

100 μg/ml 浓度的不同分离物的提纯病毒分别接种在西葫芦子叶上，在不同间隔时间(3、6、9、12、24、36、48、72 h)把接种叶摘除，接种 15 d 后记录各处理症状，并用间接 ELISA 法测定。每个处理用 4 株植株。

6.3 不同分离物在烟草上不同叶位的浓度

选取 6 叶期的烟草植株，分别在基部的第 1 叶采用机械接种法接种不同分离物的提纯病毒 100 μg/ml，于接种后的第 3 d 和第 6 d 分别采集 4 株从接种叶到顶部第 6 叶不同组织，用间接 ELISA 法[8]测定各叶的病毒浓度。

6.4 不同分离物在烟草上不同时间的浓度

选取 4 叶的烟草植株，在基部的第 1 叶分别接种不同分离物的提纯病毒 100 μg/ml，于接种后的第 3、6、9、12、15、18 d，采集全株叶组织为一个标样进行 ELISA 测定，重复四次。

结 果

1 不同症状类型的分离物回接香蕉

香蕉花叶三类症状的三个代表分离物(BS、CS 和 MM)用保毒棉蚜和机械摩擦法回接香蕉苗，都能产生各自典型的症状，而相应的健康对照(缓冲液或健康蚜虫)都不产生症状，这表明我们所获得的三个分离物是导致香蕉产生三种症状的病原病毒。

维普资讯 http://www.cqvip.com

就两种接种方法而言,香蕉症状出现时间多在21～28 d,以后直至60 d只是症状加重,而很少有病株数增加,机械摩擦法的发病率介于20～60%;蚜虫接种法用15头的效率较高,发病率为60～80%。

对病株的间接ELISA测定表明:所有显症的植株都能与CMV抗血清起阳性反应,而无症的对照植株无反应。

2　寄主范围测定

香蕉三类共13个分离物(BS类5个;CS类和MM类各4个)接种西葫芦(*Cucurbita pepo*)、烟草(*Nicotiana tabacum* cv. HV38)、丝瓜(*Luffa cylindrica*)、节瓜(*Benincasa hispida* var. *chiehqua*)、心叶烟(*Nicotiania glutinosa*)、苦瓜(*Momordica charntia*)均产生系统花叶,在苋色藜(*Chenopodium amaranticolar*)上产生局部枯斑,不侵染菜豆(*Phaseolus vulgaris*)和豇豆(*Vigna sinensis*)。

在夏青二号黄瓜(*Cucumis sativus*)上,MM类和BS类分离物都产生花叶,而CS类的除G-4产生隐症外,其余的分离物都不侵染。

在烟草上,接种叶表现的局部斑除MM类和MM分离物为坏死斑外,其它MM类的三个分离物以及CS类的分离物均为失绿斑,BS类的所有分离物都产生坏死斑,但MM类是产生沿叶脉不规则坏死,而BS类却引致较规则(通常园形)坏死斑,所有的分离物都产生系统花叶,但MM类和BS类产生明显花叶,而CS类仅产生轻微花叶。

在早粉二号番茄(*Lycopersicon esculentum*)上MM类和BS类的分离物均产生花叶,而CS类产生隐症或不侵染。

在哈蜜瓜(*Cucumis melo* var. *saccharinus*)上,MM类和BS类分离物均产生明显花叶,而CS类两个分离物产生隐症,两个分离物不侵染。

在蓖麻(*Ricinus communis*)上,MM类除MM分离物在接种叶产生坏死斑外,其余的分离物产生局部失绿斑,都引起系统花叶;CS类的分离物都不侵染;BS类的分离物在接种叶产生局部失绿斑,P-1和Bm-6产生系统花叶,其余的分离物产生系统失绿斑后随即坏死。

在寄主范围测定上,尽管选取了14种(品种)不同的寄主植物,但能够较好区分三类分离物的寄主植物为:香蕉、黄瓜、普通烟、番茄、哈蜜瓜和蓖麻,其中最好的为香蕉。

3　病毒的提纯及提纯产量的测定

两次重复试验结果表明:香蕉三类分离物和CMV-L18分别在西葫芦和烟草上的提纯产量明显不同(表1)。在西葫芦上,CMV-L18提纯产量最高,大大高于三类分离物(最高达83倍)。在三类分离物中以MM类为最高、其次为BS类、最低为CS类。而且两次提纯的平均产量MM类高于BS类4.9倍、高于CS类12.9倍。在烟草上,三类分离物的提纯产量从高到低仍然为:MM、BS和CS,但提纯产量相差程度较之在西葫芦上明显减少,MM类高于BS类1.6倍、高于CS类2.7倍。可见,香蕉分离物不同,其增殖量也有较显著的差异。

表1　香蕉CMV三类分离物和CMV-L18的提纯产量

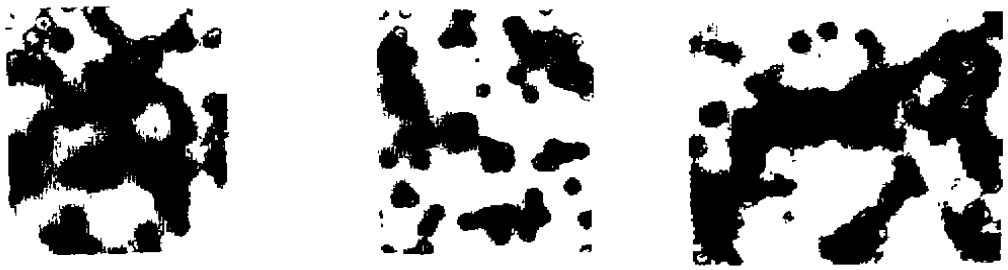
Tab 1　Purified yields of CMV isolates infecting banana

症状类型 Pattern	分离物 Isolate	西葫芦(mg/kg) Squash	烟草(mg/kg) Tobacco
MM	MM	78.87	161.54
	P-4	69.90	
CS	CS	6.95	58.89
	G-8	4.54	
BS	BS	14.65	101.79
	P-1	15.76	
CMV-L18		374.13	

维普资讯 http://www.cqvip.com

4 病毒粒子形态和大小的电镜观察

香蕉三个分离物和 CMV-T37 及 CMV-L18 的粒子经电镜观察表明：其粒子形态基本相同，都具有典型的球状粒子形态特征(图 1)。但上述 5 种分离物粒子直径都不相同，以 CMV-L18 最大(28.5 nm)，其次为 MM(27.0 nm)，与广东较广泛流行的 CMV-T37 (26.5 nm)相近；而后是 CS(24.3 nm)；最小为 BS(22.5 nm)。



MM(Mottle Mosaic) BS(Break Streak) CS(Continuous Streak)

图 1 豌蕉 CMV 三个分离物提纯制剂的电镜照片(放大 75000 倍)

Fig. 1 Electron micrograph of CMV isolates' particles infecting banana(Magnified 75 000 ×)

5 病毒粒子的电泳相对迁移率

香蕉三类共 6 个分离物和 CMV-T37 以及 CMV-L18 在其迁移率上表现明显不同(图 2)。BS 类最快(0.72)；CS 类次之(0.56)；MM 类(0.51)与 CMV-T37(0.52)，较慢；CMV-L18 最慢(0.42)，这与它们的粒子大小差异一致，也与电镜观察的结果一致。

6 在西葫芦和烟草上增殖和运转的动力学

6.1 在西葫芦上的增殖速度

三次重复结果表明：香蕉三个分离物和 CMV-L18 接种西葫芦后，其增殖速度在子叶和真叶明显不同。在子叶中(图 3A)，四个分离物增殖速度以 CMV-L18 最快、MM 次之、BS 和 CS 较慢。CMV-L18 在接种后 12～15 d、香蕉 三个分离物在接种后 15 d 其浓度达到最高峰，随后开始下降。

在真叶中(图 3B)，四个分离物增殖速度与在子叶中的增殖速度基本相同，但 CMV-L18 和 MM 在接种 9 d 后浓度增殖近似直线上升，CMV-L18 在 15 d 达到最高峰，而 MM 在 15 d 后继续缓慢上升，BS 和 CS 浓度增殖平缓，其增殖浓度显著低于 MM 和 CMV-L18。

6.2 在西葫芦植株体内的运转速度

香蕉花叶三类症状的 6 个分离物、及 CMV-L18 在接种西葫芦子叶后，其运转出子叶的速度也明显不同(表 2)。CMV-L18 在接种 6 h 后就运转出了子叶，MM 类的 MM 运转出子叶只要 9 h，P-4 要 12 h，BS 类两个分离物都要 12 h，然而 CS 类却要 21 h。可见，在西葫芦上 L-18 运转速度最快、MM 类和 BS 类次之、CS 类最慢。

维普资讯 http://www.cqvip.com

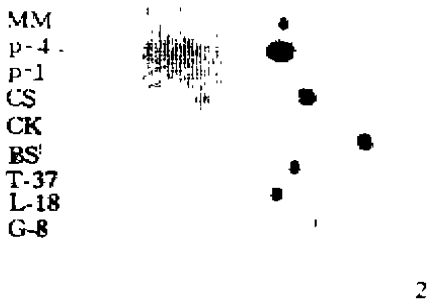


图 2　不同 CMV 分离物粒子电泳图谱

Fig. 2　Particle electrophoretic mapping of CMV isolates in 0.8% agarose

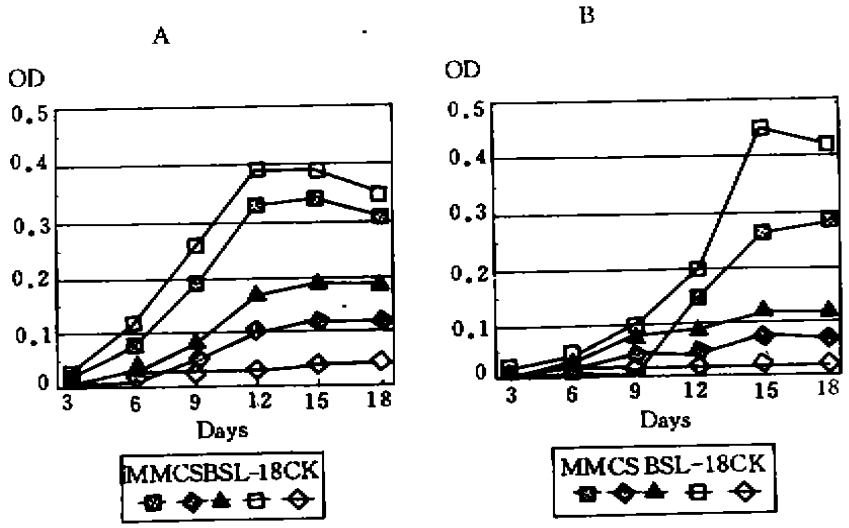


图 3　不同 CMV 分离物在西葫芦子叶和真叶中的浓度(用 CMV-T37 的抗血清测定)

OD_{492}nm 值为三次试验结果平均值;　A:子叶;　B:真叶

Fig. 3　Virus concentrotion of CMV isolates in the cotyledon and the true leaves of squash

OD_{492}: Mean values of three absorbances; A: Contyledon; B: True Leaves

表 2　CMV 不同分离物从西葫芦接种叶上运转出的速度*

Tab 2　Movement speed of CMV isolates from inoculated leaf to other non-inoculated leaves

分离物 Isolate		时间 Time(h)							
		3	6	9	12	15	18	21	24
MM	MM	−	−	+	+	+	+	+	+
	P-4	−	−	−	+	+	+	+	+
CS	CS	−	−	−	−	−	−	+	+
	G-8	−	−	−	−	−	−	+	+
BS	BS	−	−	−	+	+	+	+	+
	P-1	−	−	−	+	+	+	+	+
CMV-L18		−	+	+	+	+	+	+	+

维普资讯 http://www.cqvip.com

* 在子叶接种后的3、6、9、12、15、18、21和24 h,分别将接种叶摘除,以间接ELLISA法和观察植株症状的有无确定病毒是否运转出了接种叶。

－:阴性反应; ＋:阳性反应

* During different hours (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21and 24) after inoculation, the inoculated cotyledons were excised, the virus in plants was respectively detected by ELISA to decide whether the virus moved out of the inoculated cotyledons.

6.3 接种后若干天在烟草不同叶位的病毒浓度

四次重复试验结果表明:香蕉花叶病三个分离物分别接种烟草上后若干天,它们在烟草不同叶位(第1～6叶分别代表从接种叶到植株顶第6叶)的叶片里病毒浓度是不同的。在接种后第3 d,MM在第1、第2、第3片叶,BS在第1、第2片叶,CS在第1片上含有明显可探测的病毒浓度;在第6 d时,MM和BS分别在第2、第3、第6片叶,CS在第2、第3、第4片叶中含有较高的病毒浓度。三类分离物相比较,MM明显较BS为高,CS最低(图4)。

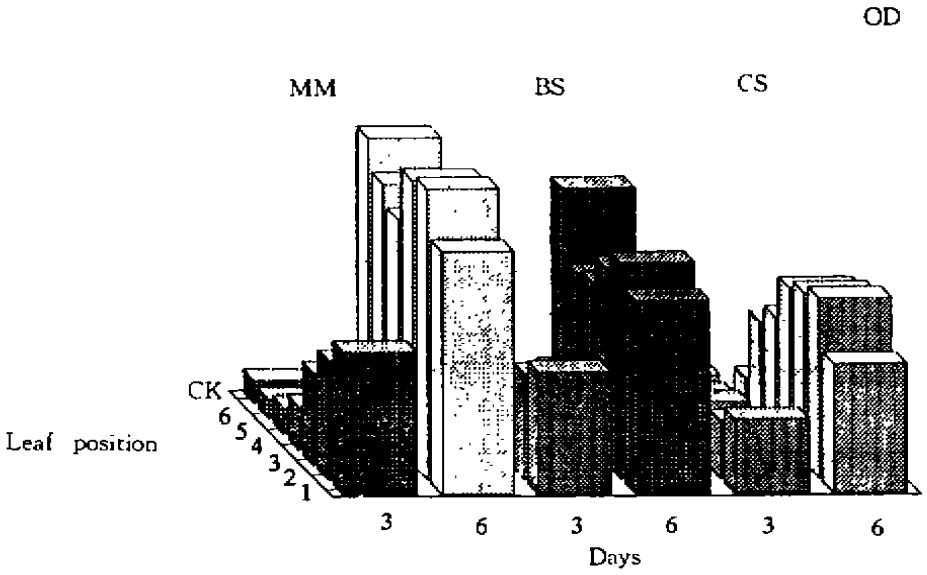


图4 香蕉CMV三个分离物在烟草上不同叶位叶片的病毒浓度(用CMV-T37抗血清测定)

叶位:1～6=从接种叶到顶叶;柱状高度显示四次ELISA测定的OD_{492}平均值

Fig 4 Viral concentrations of CMV Isolates in leaves of different position (Antiserum to CMV-T37)

Leaf position: 1～6 = from basal inoculated leaf to the youngest leaf; Cylindrical heights show the OD_{492} mean value of four absorbances

从接种后时距看,MM和BS在接种后第6 d、CS在接种后第9 d,其整株浓度最高,随着接种后时间的延长,除MM浓度下降较慢外,其它两个分离物在第9 d后迅速下降。到第18 d时,CS病毒在烟株里少到几乎测定不出来(图5)。这表明:香蕉三个分离物接种后保持较高浓度的时间,除MM相对较长(6～15 d)外,其它两个分离物都只有6～10 d时间左右。

讨 论

由CMV不同株系所引致的作物病害大量见于文献报道[9-11],但香蕉CMV株系的研究

维普资讯 http://www.cqvip.com

却很少报道,本文较为系统地报道了广东香蕉 CMV 三个分离物的形态和生物学特征。

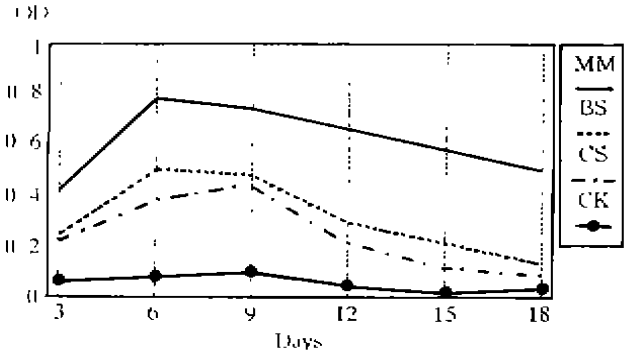


图 5　香蕉 CMV 三个分离物接种烟草后不同时间的病毒浓度(用 CMV-T37 抗血清测定)

OD_{492}nm 为四次结果平均值

Fig.5　Viral concentrations of CMV isolates in different time after inoculation in tobacco

OD_{492}: Mean value of four absorbences

我们所获得的三个分离物回接香蕉成功,奠定了进一步研究的基础。香蕉富含酚类等氧化物质,在采用汁液机械接种时选择合适的缓冲液很重要。尽管我们在缓冲液中添加了还原物和螯合剂(NaSO3 和 DIECA),但接种成功率仍然只有 20～60%。蚜虫接种法用 15 头蚜虫明显比 5 头蚜虫接种效率高,但最高也只有 80%,这表明对香蕉的接种存在一定难度,进一步的研究很有必要。

粒子大小电泳相对迁移率的研究表明,香蕉三个分离物间存在较大的差异。粒子最大的 MM 类的 MM 分离物直径为 27 nm,最小的 BS 类的 BS 分离物为 22.5 nm。我们的结果支持了前人[2,12,13]的观点,即株系不同其粒子直径可能不同,香蕉三类共 6 个分离物以及 CMV-T37 和 CMV-L18 的粒子电泳相对迁移率的结果,BS 类粒子最小,其电泳中相对迁移率最大;CS 类粒子大小次之,迁移率居中;MM 类最大,迁移率最小。这表明粒子电泳相对迁移率与粒子大小是相关的,因而可以认为粒子大小和电泳相对迁移率在香蕉 CMV 株系的鉴定上有一定的参考价值。

CMV 株系对不同寄主植物的致病能力和引致的症状特点,是区分 CMV 株系的重要依据之一,CMV 不同株系除了能侵染一些共同寄主并显示类似的症状外,往往还能侵染各自的特定寄主而显示特定的症状[2,8,9,11,13]。本研究的香蕉三类共 13 个分离物在 14 种选择的寄主植物上,特别是在香蕉上引致不同的症状表明,寄主范围特别是从寄主范围中选出的鉴别寄主植物,在株系鉴定中有较大的参考价值。

香蕉花叶病三个代表分离物(BS、CS 和 MM)既然在烟草和西葫芦上的增殖和运转速度明显不同,则它们在烟草不同叶位上的分布以及整株维持较高浓度的时间不同是理所当然的。结果进一步支持了前人[5,6]对其它植物病原 CMV 株系的研究结论。近年来,对 CMV 在植物体内的增殖和运转机理[3]研究表明:CMV 株系的增殖能力的大小主要是由 CMV、RNA1、RNA2 的基因所决定,而其运转速度是由 RNA3 中的 3a 基因决定的。因此,株系的增殖和运转速度是株系的特征,在株系鉴定上有一定的参考价值。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 李华平，胡晋生，范怀忠.香蕉花叶病调查和检测研究.病毒学报，1996；12(2)

2 李华平，胡晋生，范怀忠.黄瓜花叶病毒的株系鉴定研究进展.中国病毒学，1994，9：187－194

3 Palukaitis P, roosinck M J, Dietzgen R G, *et al*. Cucumber mosaic virus. Advances in Virus Research. 1992；41：281－348

4 Lot H, Kaper J M. Physical and chemical differentiation of three strains of cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. Virology, 1976；74：209－222

5 Pink D A, Walkey D G A. Resistance in marrow(*Cucurbita pepo L.*) to different strains of cucumber mosaic virus. J Agric Sci, 1984；103：519－521

6 Rossinck M J. Temperature sensitive replication of cucumber mosaic virus in muskemelon(*Cucumis melo* cv. *Iroqquois*) maps to RNA1 of a slow strain. J Gen Virol, 1991；72：1747－1750

7 Lot H, Marrou J. A contribution to the study of cucumber mosaic virus(CMV) Ⅱ. Quick method of purification. Ann Phytopathol, 1972；4：25－38

8 Lommel S A, McCain A H, Morris T J. Evaluation of indirect enzyme－linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathol. 72：1018－1022

9 Sangar R B S, Rai M K. A mosaic disease of sunflower from Satpura region of India. Farm Science Journal, 1988；3：185－187

10 Singh B R, Shuka P. Properties of a new strain of cucumber mosaic virus from Chill. Indian J Virol, 1990；6：58－63

11 Has Y H, Lin F Z, Hu C C, *et al*. Host reaction, serology and RNA pattern of cucumber mosaic virus isolates. Plant Prot. Bull. (Taiwan), 1989；31：51－59

12 郑冠标，高乔婉，张曙光，等.鸡蛋果花叶病病原病毒的鉴定.华南农业大学学报，1987；8(2)：40－44

13 高乔婉，范怀忠.引致香蕉花叶病的黄瓜花叶病毒株系 华南农业大学学报，1983；4(4)：43－48

Morphological and Biological Characters of Cucumber Mosaic Virus Strains Infecting Banana

Li Huaping Faan Hweichung

(*South China Agricultural University*, *Guangzhou* 510642)

The morphological and biological characters of three CMV isolates infecting banana from Guangdong were studied. According to the different reactions in six kinds of host plants including *Cucumis sativus*, *Nicotiana tabacum* cv. HV38, *Lycopersicon esculentum*, *Cucumis melover*. *Saccharins*, and sepecially *Musa acuminata*, the three isolates could be distinctly distinguished. The diameters of the virus particle of BS, CS and MM were 22.5, 24.3 and 27 nm, and the relative electrophoretic mobilities of their particles were 0.72, 0.56 and 0.51, respectively. The MM isolate multiplied and spreaded more rapidly with higher concentrations in *Cucurbita pepo* and *Nicotiana tabacum* than the BS or the CS isolate, and in turn then BS isolate more rapidly than the CS isolate.

Key words Banana, CMV isolates, Morphology character, Biology