维普资讯 http://www.cqvip.com

268—276

第11卷第3期 中国病毒学 Vol.11 No.3
1996年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1996

侵染番茄的番茄花叶病毒的研究

周雪平 钱秀红 刘勇 薛朝阳 李德葆
(浙江农业大学生物技术研究所,杭州 310029)

S436.412.1
S436.41

提要 从种传番茄苗中获得一病毒分离物To-SI,人工摩擦接种7科24种植物,To-SI能侵染4科15种植物,在番茄上产生花叶,在白肋烟上为局部枯斑。To-SI的钝化温度为85~90℃,稀释限点为10^{-6}~10^{-7},体外保毒期在一个月以上。病毒粒体杆状,长度主要分布于281~300 nm之间,平均长度288 nm。病毒衣壳蛋白亚基只有一条多肽链,分子量为21 kDa。dsRNA分析测得其基因组长度为6.4 kb。琼脂糖双扩散和胶内交叉吸附试验证明,To-SI与TMV有血清关系,但有一定的差异,病毒粒体电泳分析也表明To-SI与TMV粒体有差异。在交叉保护试验中,TMV和To-SI之间均无保护作用。根据以上试验结果To-SI被鉴定为番茄花叶病毒。这是我国首次系统报道番茄上番茄花叶病毒的侵染。

关键词 番茄,番茄花叶病毒,病毒病 植物病毒

番茄是我国广为栽培的蔬菜作物。番茄病毒病自六十年代起已在我国各种植地区广为传播,且日趋严重,春番茄常年减产30%以上,夏番茄几乎绝产,成为威胁番茄生产的主要病害。我国自1979年起对番茄病毒病的鉴定和抗病育种进行了协作攻关并鉴定出了烟草花叶病毒(TMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、马铃薯X病毒(PVX)和马铃薯Y病毒(PVY),且证明TMV、CMV为主要病毒[1]。郑燕棠等应用ELISA间接法从天津近郊番茄上检测出9种病毒[2],盛方镜等则报道了杭州地区番茄上长叶车前草病毒(RiMV)侵染[3]。

1993年3月,作者从杭州市蔬菜种子公司购买的番茄种子播种的苗床中发现了一株表现花叶症状的病株,编号为To-S1,经生物学、血清学等测定,证明其为番茄花叶病毒(ToMV),现将结果报道如下:

材料与方法

1 毒源的分离纯化

分离物To-SI为1993年3月从种子播种的番茄苗床中一株呈花叶症状的病株上采集获得,经昆诺藜单斑分离后繁殖保存于番茄。烟草花叶病毒(TMV)分离物B-935A由作者分离鉴定[4]。

2 生物学特性测定

寄主范围、体外抗性测定均按常规方法进行[5]。

3 病毒提纯及粒体形态的电镜观察

将To-SI接种三生烟,15 d后采收病叶,并按周雪平等提纯CMV的方法[6]提取病毒。病毒提纯液及粗

本文于1995年10月23日收到,1996年2月2日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

汁液经2%磷钨酸(pH 6.7)染色后置JEOL,JEM-1200EX电镜下观察粒体形态。

4 血清学试验

4.1 琼脂双扩散法 采用常规方法进行[5]。

4.2 胶内交叉吸附试验(Intragel cross-absorption tests)按照Reddick[7]的方法进行,胶浓度为0.8%琼脂糖,0.85% NaCl和0.25% NaN_3。将吸附病毒To-S1和TMV B-935A粒体(2 mg/mL)分别放于中央孔,24 h后中央孔分别加入TMV-PM2,TMV B-935A,TMV 2S-S,TMV-Korea分离物和齿兰环斑病毒(ORSV)抗血清,周围孔分别加入提纯的To-S1和TMV B-935A(2 mg/mL)。24 h后观察结果。TMV-Pm2,TMV 2S-S抗血清由英国洛桑试验站提供,TMV-Korea分离物和ORSV抗血清由韩国汉城大学罗容俊教授提供,TMV B-935A抗血清由本研究所制备。

5 病毒外壳蛋白亚基分子量测定

采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法,标准蛋白为Promega公司产品。

6 感染组织中病毒双链RNA检测

To-S1接种三生烟,7 d后采收5 g组织,然后按周雪平等[6]的方法进行提取和电泳分析。

7 病毒粒子的电泳分析

参照Asselin和Grenier的方法进行[8]。采用琼脂糖水平平板电泳,胶浓度为1.2%,电泳缓冲液为TBE(0.09 mol/L Tris,0.09 mol/L硼酸,2 mmol/L EDTA)。取TMV B-935A和To-S1的提纯病毒液20 μL(共60 μg)加入样品孔内,50 mmol/L稳流电泳数小时,然后用考马氏亮蓝G-250染色1 h,甲醇和醋酸脱色,观察结果。

8 To-S1抗血清制备

参照周雪平等的方法[10]制备抗血清,抗原浓度为4 mg/mL,采用琼脂双扩散法测定血清效价。

9 交叉保护反应

9.1 TMV保护接种试验 普通烟小苗分两组,一组接种TMV B-935A,另一组接种0.05 mol/L磷酸缓冲液,10 d后在各接种叶上同时接种To-S1,观察并记录接种叶片的枯斑数。

9.2 To-S1保护接种试验 普通烟小苗分两组,一组接种To-S1,另一组接种0.05 mol/L磷酸缓冲液,10 d后在各接种叶上同时接种TMV B-935A,观察植株症状,并按四级分级标准[10]记载每株的病级数。

结果与分析

1 To-S1在寄主植物上的反应

人工摩擦接种7科24种植物,To-S1在番茄上表现为花叶症状(图1),在普通烟和白肋烟上为局部枯斑(图2),在心叶烟上也为局部枯斑,但枯斑较普通TMV形成的小。To-S1不能侵染豆科的蚕豆、大豆、豌豆,十字花科的青菜、白菜、萝卜,胡芦科的黄瓜和菊科的百日菊等植物。

2 体外抗性

To-S1的钝化温度为85~90 ℃,稀释限点为10^{-6}~10^{-7},体外保毒期在1个月以上。

3 病毒提纯及粒子形态观察

用三生烟作繁殖寄主,采收获得340 g病叶,提取病毒后获得2.5 mL提纯液,稀释50倍后测定200~300 nm的紫外吸收曲线,其最高吸收峰为260 nm,最低吸收峰为246 nm,A_{260}=1.054,A_{280}=0.890,$A_{260/280}$=1.18,吸收曲线为典型的核蛋白吸收曲线,平均每公斤鲜叶可提取到125 mg病毒。提纯病毒制剂用磷钨酸负染后可观察到大量的杆状病毒粒子,长约300

维普资讯 http://www.cqvip.com

nm，宽约 15 nm，但有些粒体较短，有的粒子则首尾相连，形成不同的长度。杆状粒子中央能观察到明显的核酸孔(图 3)。用病叶粗汁液测定了 199 个粒体的长度，其分布主要集中在 281～300 nm 之间，平均长度 288 nm(图 4)。

图 1 To－S1 在番茄上的花叶症状

Fig 1 Systemic mosaic symptoms on *Lycopersicum esculentum*

图 2 To－S1 在白肋烟上的局部枯斑症状

Fig 2 Local lesions on *Nicotiana tabacum* － White Burley

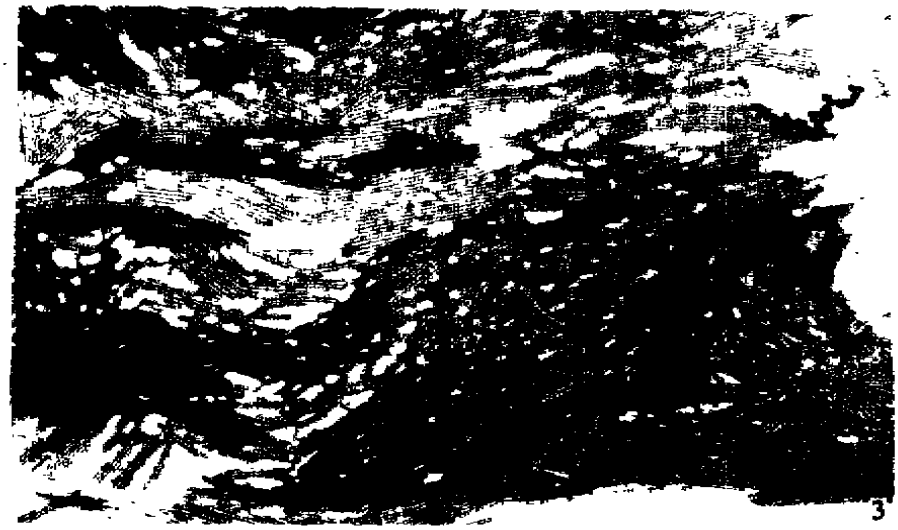

图 3 To－S1 提纯病毒粒子形态(30000×)

Fig 3 Electron micrograph of purified virus particles (30000×)

维普资讯 http://www.cqvip.com

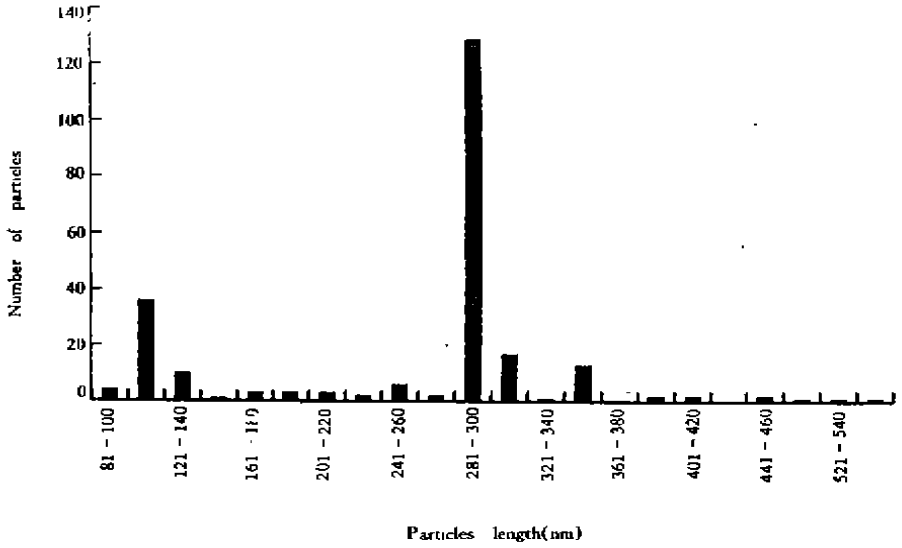

图4　To-S1病毒粒子长度分布图

Fig 4　Length distribution of particles of To-S1

表1　To-S1在寄主植物上的反应及症状

Table 1　Symptoms induced in different plant species by To-S1

植物 Plant			症状 Symptom
茄科 Solanaceae	番茄	*Lycopersicum esculentum*	La/SM
	普通烟	*Nicotiana tabacum*	LN/-
	白肋烟	*N. tabacum* - White Burley	LN/-
	三生烟	*N. tabacum* - Samsum	La/SM
	心叶烟	*N. glutinose*	LN/-
	黄苗烟	*N. tabacum* - Huang Miaoyu	LN/-
	克氏烟	*N. clevelandii*	Y/SM, N
	矮牵牛	*Petunia hybridum*	Y, N/SM
	大千生	*Nicandra physolodes*	La/SM
	曼陀罗	*Datura stramonium*	LN/-
藜科 Chenopodiaceae	昆诺藜	*Chenopodium quinoa*	LN/-
	苋色藜	*C. amaranticolor*	LN/-
豆科 Leguminosae	菜豆	*Phaseolus vulgari*	LN/-

注 Note:接种叶症状/系统叶症状 systemic symptoms/local symptoms;

La:隐症带毒 latent;LN:局部坏死 local necrosis;N:坏死 necrosis;RS:环斑 ringspot;

SM:系统花叶 systemic mosaic;Y:黄化 yellowing;-:不侵染 no infection

4　血清学反应

在琼脂双扩散试验中,To-S1和TMV B-935A均能与TMV B-935A、TMV-Pm、TMV 2S-S、TMV Korea分离物的抗血清形成沉淀线,但To-S1和TMV B-935A之间均形成一刺角,说明To-S1与TMV之间有一定的血清关系,但在抗原上有差异(图5)。在与

维普资讯 http://www.cqvip.com

ORSV 抗血清反应中，To－S1 能产生沉淀线，而 TMV B－935 则不能产生，证明了 To－S1 与 TMV B－935A 之间在抗原上确有差异(图 5)。胶内交叉吸附试验结果见表 2，当四种 TMV

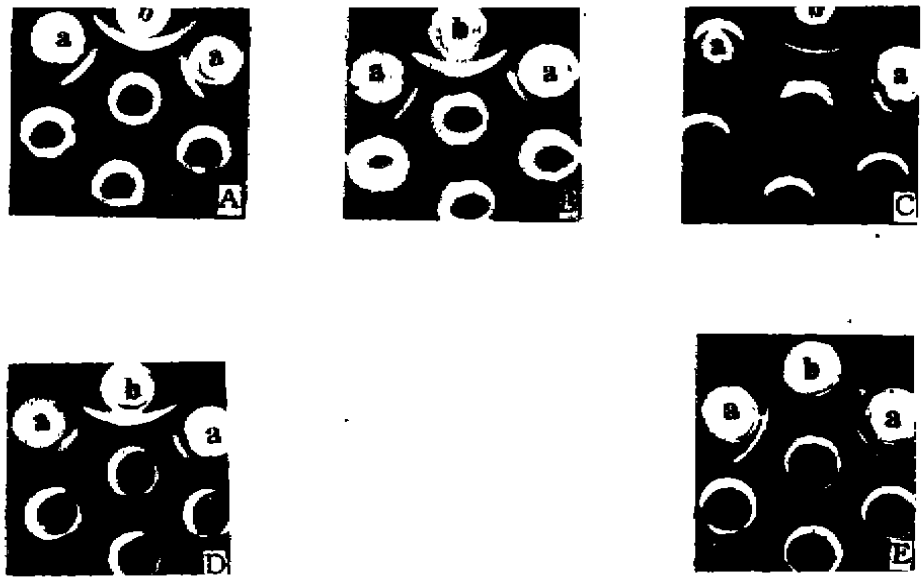

图 5 琼脂双扩散试验结果

周边孔为提纯病毒，中央孔为不同的抗血清

Fig 5 Results of immunodiffusion tests

Peripheral wells contained virions of: a = To－S1, b = TMV B－935A; Central wells contained (A) TMV－Pm2 antiserum. (B) TMV B－935A antiserum. (C) TMV－Korea antiserum. (D) TMV 2S－S antiserum, (E) ORSV antiserum

表 2 胶内交叉吸附试验

Table 2 Intragel cross－absorption test

血清 Antiserum	吸附抗原 Antigen used for absorption	抗原 Challenging antigen	
		To－S1	TMV－B935A
TMV－B935A	TMV－B935A	－※	－
TMV－B935A	To－S1	－	+
TMV－2S－S	TMV－B935A	－	－
TMV－2S－S	To－S1	－	+
TMV－Pm2	TMV－B935A	－	－
TMV－Pm2	To－S1	－	+
TMV－Korea	TMV－B935A	－	－
TMV－Korea	To－S1	－	+
OPSV	TMV－B935A	+	－
OPSV	To－S1	－	－

注：－ = 抗原与抗血清之间无沉淀线 + = 抗原与抗血清之间形成沉淀线

Note: － = No precipitation lines formed between the antiserum and the challenging antigens, and + = A precipitin line formed between the antiserum and the challenging antigen

维普资讯 http://www.cqvip.com

抗血清用B-935A病毒吸附后不能与To-S1和B-935A形成沉淀线,而用To-S1吸附后能与B-935A形成沉淀线,而与To-S1不产生沉淀线,说明To-S1与B935A之间血清学上有差异。用ORSV抗血清进行反应也证明ORSV与To-S1有较近的血清关系,而与TMV B-935A无血清关系,这些结果与双扩散试验结果相符。

5 病毒外壳蛋白亚基分子量测定

经多次SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,To-S1的衣壳蛋白亚基只有一条多肽链组成,相对分子量约为21 kDa(图6)。

6 感染组织中dsRNA分析

从感染To-S1的烟草组织中提取dsRNA进行1.2%琼脂糖电泳,发现只有一条特异的dsRNA条带,长为6.4 kb(图7)。

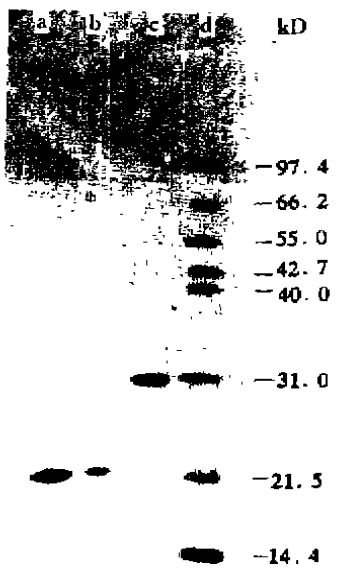

图6　To-S1衣壳蛋白分子量

Fig 6　Molecular weight of coat protein of To-S1

a: TMVB-935A b: To-S1

c:CMV d:Protein markers

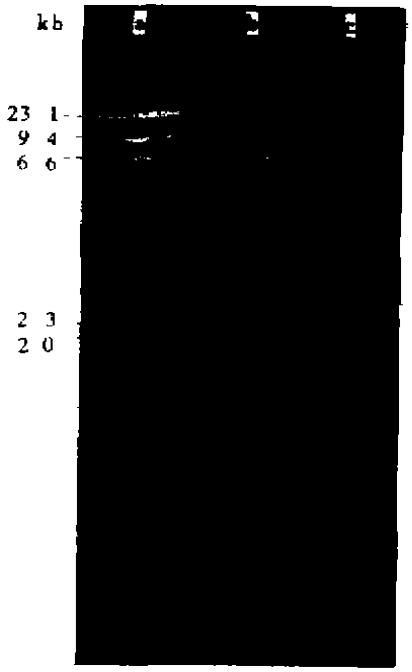

图7　To-S1侵染的烟叶中dsRNA分析

Fig 7　Analysis of dsRNA extracted from infected tobacco plants

a: DNA molecular marker b: To-S1

c: Healthy plant extract

7 病毒粒子的电泳分析

To-S1和TMV-B935A电泳后的条带见图8,从图8可知To-S1和TMV B-935A的电泳带有差别,B935A有两条迁移带,而To-S1只有一条迁移带,说明两者之间病毒粒子存在着差异。采用本方法可将烟草花叶病毒组病毒区分为亚组[8,9]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

8 To－S1 抗血清制备

采用皮内注射及肌肉注射方法免疫家兔，获得 20 mL 抗血清，其双扩散效价为 1/128。用获得的 To－S1 抗血清作双扩散测定，也证明 To－S1 和 TMV B－935A 之间能形成沉淀线，但沉淀线之间有刺角，进一步证明 To－S1 和 TMV B－935A 之间存在差异(图 9)。

图 8 To－S1 病毒粒子琼脂糖电泳
Fig 8 Electrophoresis in agarose gel of To－S1 virions
a: To－S1 b: TMV B－935A

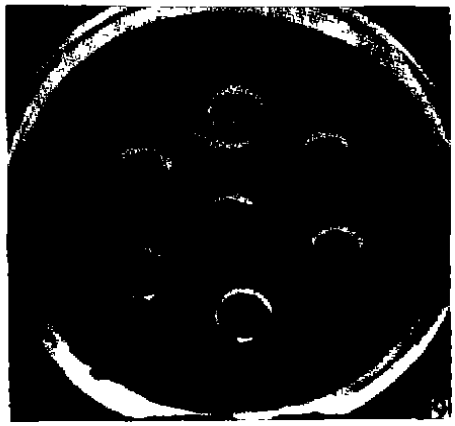

图 9 To－S1 抗血清琼脂双扩散试验
Fig 9 Results of immunodiffusion tests with antiserum of To－S1
a: To－S1 b: TMV B－935A

9 交叉保护试验

9.1 TMV 保护接种试验 To－S1 在普通烟上产生局部枯斑，TMV 保护接种的普通烟与非保护接种的普通烟同时接种 To－S1，统计 16 片接种叶片上的枯斑数，TMV 保护接种的叶片平均枯斑为 103 个/叶，未保护接种对照为 100 个/叶，两者之间无差异，说明 TMV 对 To－S1 无保护作用。

9.2 To－S1 保护接种试验 由于 To－S1 在普通烟上产生局部枯斑，TMV 产生系统症状，因而系统叶上的症状即为 TMV 所致，To－S1 保护与非保护植株，10 d 后同时接种 TMV，统计 15 株保护与非保护植株的病级，保护植株平均病级为 2 级，非保护植株也为 2 级，保护与非保护植株发病率及病级无任何差异，说明 To－S1 对 TMV 也无保护作用。

讨 论

番茄花叶病毒 1909 年首次在美国报道，并已广泛分布于世界各国的番茄种植地区。由于 ToMV 与 TMV 有较密切的血清关系，因而 ToMV 曾被认为是 TMV 的一个株系，但由于两者在寄主范围、血清关系和衣壳蛋白的氨基酸组成和序列方面有一定的差异，因此 1971 年后已将其作为单一病毒从 TMV 中分出。1976 年 Hollings 和 Huttinga 等详细报道了 ToMV 的特性[11]。ToMV 和 TMV 在蔓陀罗、白肋烟和 *N. sylvestris* 上的症状不同，前者产生局部症状，

维普资讯 http://www.cqvip.com

而后者为系统症状,ToMV的体外抗性与TMV普通株系相比相对较弱。ToMV虽然与TMV有血清关系,但两者之间存在差异,两者之间的血清偏异指数(SDI)为1.1[12],其差异在琼脂双扩散试验和胶内交叉吸附测定中表现明显[7,13]。ToMV和TMV衣壳蛋白氨基酸序列及核酸序列比较表明,两者间有30个氨基酸变化(占18%),核酸序列同源性为75%[14]。ToMV和TMV相互间无交叉保护作用[11]。作者从番茄上分离的To-S1在蔓陀罗、白肋烟上产生局部症状,在琼脂双扩散反应中To-S1与TMV间形成刺角,胶内交叉吸附反应进一步证明To-S1与TMV之间存在着差异。在交叉保护试验中,To-S1与TMV之间无任何保护作用。病毒粒体电泳也充分证明To-S1与TMV之间有差异。根据这些特征,我们将To-S1鉴定为番茄花叶病毒。

根据烟草花叶病毒组成员衣壳蛋白的氨基酸序列和核酸序列,Brunt将该组各成员之间的亲缘关系用分叉图列出[12],从分叉图查得ToMV与ORSV之间的亲缘关系较TMV与ORSV之间近些,本研究中血清学试验也证明ORSV与To-S1有较近的血清关系,而与TMV则较远。

我国番茄病毒病在南北各地的番茄产区都很严重,并有大量报道以TMV和CMV及两者混合侵染为主[15,16]。文献报道,一般TMV由于其复制和传播的速度较ToMV慢,因而TMV很少在番茄上发生[11]。由于对我国侵染番茄TMV的生物学特性未曾作详细的研究,其它学者报道的TMV是否即为ToMV尚待证实。作者建议今后报道番茄病毒病时,应对病毒生物学、血清学进行较为深入的研究,以便弄清我国番茄上究竟是TMV还是ToMV为害,如为ToMV,则不宜再将ToMV称作TMV的株系。由于我们从种传番茄中鉴定出ToMV,因而ToMV在番茄上可能发生,需对田间番茄上的发生情况作进一步调查研究。除TMV外,我国侵染番茄的烟草花叶病毒组病毒尚有RiMV[3]和一种未鉴定的分离物[2],因而有必要对我国番茄上烟草花叶病毒组病毒作系统的鉴定和比较研究,以明确病毒的种类和各病毒在各地区的分布及比例,为育种工作者进行抗病育种打下基础。

ToMV除侵染番茄外,还可自然侵染辣椒、马铃薯、樱桃、梨树、苹果、葡萄、来木、云杉、丁香等[7,13,16],且还曾从灌溉水中发现[13],因此ToMV很有可能存在于我国的其它作物上。

我们已克隆并测定了TMV蚕豆株的3′端序列(待发表),并已用ToMV特异引物扩增和克隆了To-S1的基因组,通过基因组序列分析可比较我国ToMV分离物与国外ToMV分离物之间的核酸序列差异。

参 考 文 献

1 冯兰香,蔡少华,郑贵彬等.我国番茄病毒病的主要毒原种类和番茄上烟草花叶病毒株系的鉴定.中国农业科学,1987,20(3):60~66

2 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,1990,5(1):78~81

3 盛方镜,陈集双,徐平等.番茄乌心果病病原的进一步研究.浙江农业大学学报,1993,19(3):331~334

4 周雪平,张龙存,陈集双等.侵染蚕豆的烟草花叶病毒研究.中国病毒学,1995,10(1):81~85

5 田波,裴美云.植物病毒学研究方法.北京:科学出版社,1987,505

6 周雪平,徐志新,徐静等.侵染丝瓜的黄瓜花叶病毒研究.华南农业大学学报,1995,16(2):74~79

7 Reddick B B. Isolation and partial characterization of a tobamovirus from flowering dogwood in Tennessee. Plant Disease, 1989,

维普资讯 http://www.cqvip.com

73:174～176

8 Asselin A, Grenier J. Detection of tobamoviruses from purified or crude extracts after agrose gel electrophoresis. Can J Plant Pathol, 1985, 7:223～227

9 Zhou Xueping, Qian Xiuhong, Zhang Longchun, *et al*. Isolation and identification of broad bean wilt virus in faba bean. J Zhejiang University(Natural Science), 1994(Supp.):271～277

10 周雪平.含卫星RNA的黄瓜花叶病毒(CMV)弱株系防治植物病毒研究.[学位论文].南京:南京农业大学植保系,1992

11 Hollings M, Huttinga H. Tomato mosaic virus C.M.I./A.A.B. Description of Plant Virus 1976. No.156

12 Brunt A A. Tomato mosaic virus. In: The plant Viruses Vol.2. Van Regenmortel M H V, *et al* eds. New York and London: Plenum Press, 1986. 181～203

13 Jacobi V, Castello J D. Isolation of tomato mosaic virus from waters draining forest stands in New York State. Phytopathology, 1991, 31:1112～1117

14 Takamatsu N, Ohno T, Meshi T. Molecular cloning and nucleotide sequence of the 30k and the coat protein cistron of TMV (tomato strain) genome. Nucleic Acid Res, 1983, 11:3767～3778

15 郑贵彬,徐鹤林,熊助功.我国为害番茄的病毒种群与烟草花叶病毒(TMV)株系分化的初步鉴定.病毒学杂志,1988,3(1):64～69

16 Jacobi V, Castello J D, Flachmann M. Isolation of tomato mosaic virus from red spruce. Plant Dis, 1992, 76:518～522

Isolation and Characterization of Tomato Mosaic Virus from Tomato

Zhou Xueping · Qian Xiuhong Liu Yong Xue Chaoyang Li Debao

(*Institute of Biotechnology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou* 310029)

A virus isolate (To－S1) from tomato was collected in Hangzhou, Zhejiang Province. To－S1 could infect 24 plant species of three families. To－S1 produced mosaic symptoms on tomato, and local leision on *N. tabacum* White Burley. Its thermal inactivation point was 85～90 ℃, dilution end point was 10^{-6}～10^{-7}. The virus particles were rod－shaped with the average length of 288nm. The molecular weight of To－S1 coat protein estimated was 21000 Da. dsRNA analysis showed that To－S1 consisted of one single strand RNA with the length of 6.4 kb. In double－diffusion tests, spur formation was observed between To－S1 and TMV, and the results of intragel cross－absorption tests agreed with the double－diffusion tests. In gel electrophoresis, the patterns of To－S1 virions were different from TMV. To－S1 shared one bands with TMV, but TMV had another band with slow migration. Cross protection tests showed To－S1 had no protection effect to TMV, and vice versa. On the basis of these characteristics the To－S1 was identified as tomato mosaic virus (ToMV). This is the first report of ToMV on tomato in China.

Key words Tomato, Tomato mosaic virus, Virus disease