

91-94

20183(16)

第12卷第1期  
1997年3月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol. 12 No. 1  
Mar. 1997

## 侵染香蕉的黄瓜花叶病毒株系的血清学特征<sup>\*</sup>

李华平<sup>1\*</sup> 胡晋生<sup>2</sup> 范怀忠<sup>1</sup><sup>1</sup>(华南农业大学植保系, 广州 510642)<sup>2</sup>(University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA)

关键词: 香蕉, CMV 株系, 血清学

植物病毒 (University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA) S432141  
S436421.2

香蕉花叶病三类不同症状, 即断续条纹类(BS)、连续条纹类(CS)和斑驳类(MM)在田间广泛存在, 经过血清学、生物学、核酸斑点杂交和反转录聚合酶链反应, 已确定它们都由黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)所引起<sup>[1]</sup>。这三类症状分离物在鉴别寄主、粒子形态、粒子电泳相对迁移率以及在西葫芦(*Cucurbita pepo*)和烟草(*Nicotiana tabacum* cv. HV38)上增殖和运转动力学的特征也表现不同<sup>[2]</sup>。这些不同可能揭示了香蕉三类分离物分属不同的株系。

血清学是鉴定和研究 CMV 株系间亲缘关系的重要依据。大量文献<sup>[3,4]</sup>报道众多的 CMV 株系已划分为亚组 I 和亚组 II, 即分别相当于 DTL 和 ToRS 血清型。本研究利用 CMV 不同抗血清、采用 ELISA 法测定了侵染香蕉的黄瓜花叶病毒几种分离物间的血清学关系。

### 材料和方法

香蕉 CMV 不同分离物(BS、CS、MM 和 HI)分别分离于广东省和美国夏威夷香蕉产区, CMV-37 和 CMV-18(分离于番茄)、CMV-C 和 CMV-WL 分别由华南农业大学高乔毓教授和夏威夷大学胡晋生博士提供。所有分离物和株系经免色藜(*Chenopodium amaranticolor*)单斑纯化后, 采用 Lot *et al.*<sup>[5]</sup>法(两次差速离心和一次蔗糖梯度离心)提纯病毒。CMV-T37、CMV-C 和 CMV-WL 的抗血清分别由华南农业大学高乔毓教授和美国夏威夷大学胡晋生博士提供。碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶标记的 A 蛋白等分别购于 Sigma 公司和上海生物制品所。

香蕉 BS 分离物的抗血清(CMV-BS)的制备, 选用体重约 3 kg 雄兔, 进行一次静脉、一次皮下、两次肌肉注射, 每次间隔一星期。注射物为充分乳化的等量病毒与福氏不完全佐剂, 共注射纯化病毒 13.2 mg。最后一次注射后一星期采血测定其效价。

香蕉三个分离物(BS、CS 和 MM)和 CMV-T37 以及 CMV-L18 的提纯制剂, 用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)从浓度 1 mg/mL 用 10 倍系列稀释法稀释到 10<sup>-6</sup> mg/mL, CMV-T37 和 CMV-BS 的抗血清用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4, 内含 0.05% 吐温, 0.2% 牛血清蛋白)稀释到 1:500 倍进行间接 ELISA 反应<sup>[6]</sup>。

CMV-C(CMV 亚组 I)和 CMV-WL(CMV 亚组 II)的专化性抗血清(IgG)1 μg/mL, 分别用碳酸盐缓冲

收稿日期: 1996-04-01, 修回日期: 1996-08-19

\* 广东省科学基金和高等学校博士点科研基金资助

\*\* 现在华中农业大学植保系(武汉 430070)工作

液(pH9.6)包被聚乙烯微孔板;香蕉三个分离物(BS、CS和MM)和夏威夷 HI 分离物提纯制剂、分别用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4, 内含 0.05% 吐温 2% PVP-40)从浓度 1 mg/mL 以 10 倍系列稀释法稀释到  $10^{-8}$  mg/mL, 然后进行 DAS-ELISA 法反应<sup>[7]</sup>。

## 结果和讨论

用 BS 分离物的提纯制剂注射雄兔不同部位四次后, 可产生较高效价的抗血清。在间接 ELISA 法中, 当用 BS 纯化病毒 3.24  $\mu$ g/mL 作为抗原时, BS 的抗血清可稀释至 1/4096, 当抗血清以 1:100 倍稀释时, 可探测到 BS 纯化病毒 10 ng/mL 的水平; 但与 1:10 倍稀释的健康烟叶和香蕉叶粗汁液则无任何反应。

不同 CMV 分离物提纯制剂与所测定的两种 CMV 的抗血清都能起较强的阳性反应, 各分离物的病毒的稀释度与 OD 值的线形关系因抗血清种类的改变而不同(图 1)。用 CMV-T37

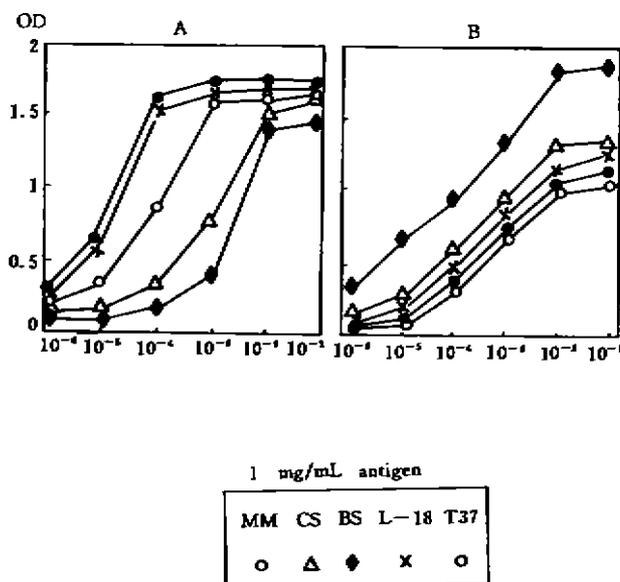


图 1 不同 CMV 分离物在间接 ELISA 法中的血清学关系  
A: 抗血清为 CMV-T37; B: 抗血清为 CMV-BS; OD<sub>492</sub> 为三次结果平均值

Fig. 1 Serological relationships of different CMV isolates  
determined by Indirect-ELISA

A: Antiserum to CMV-T37; B: Antiserum to CMV-BS; OD<sub>492</sub>: Mean  
values of three absorbance.

的抗血清时, 阳性反应由强到弱依次为: CMV-T37、CMV-L18、MM、CS 和 BS; 而且 CMV-T18、CMV-T37 和 MM 的反应曲线非常接近。用 CMV-BS 的抗血清时, 阳性反应曲线由强到弱却为: BS、CS、CMV-L18、CMV-T37 和 MM。这表明分离物间的血清学亲缘关系并不完全相同。在广东香蕉三个分离物间, BS 和 MM 的关系较远, 而 CS 处于二者之间。香蕉三

个分离物与分离于番茄的 CMV - T37 和 CMV - T18 比较而言, MM 比 BS 或 CS 与其亲源关系更紧密。先前我们曾对香蕉三个分离物和 CMV - T37 的形态和生物学进行了研究<sup>[2]</sup>, 发现香蕉三个分离物中的 MM 与 CMV - T37 十分相似, 而 CMV - T37 能够侵染香蕉<sup>[8]</sup>, 这初步表明这两个分离物有可能是同一个株系, 当然其最后的确定还得依赖于核苷酸序列的分析。

采用分属 CMV 两个亚组的纯化抗血清 (IgG) 进行 DAS - ELISA 法测定时, 所测定的 BS、CS、MM 和夏威夷 HI 分离物在两种抗体反应中表现明显不同 (图 2)。利用抗血清 CMV - C (CMV 亚组 I) 时, 除 CMV - WL (CMV 亚组 II 对照) 外, 所有的其它分离物都有较强的阳性

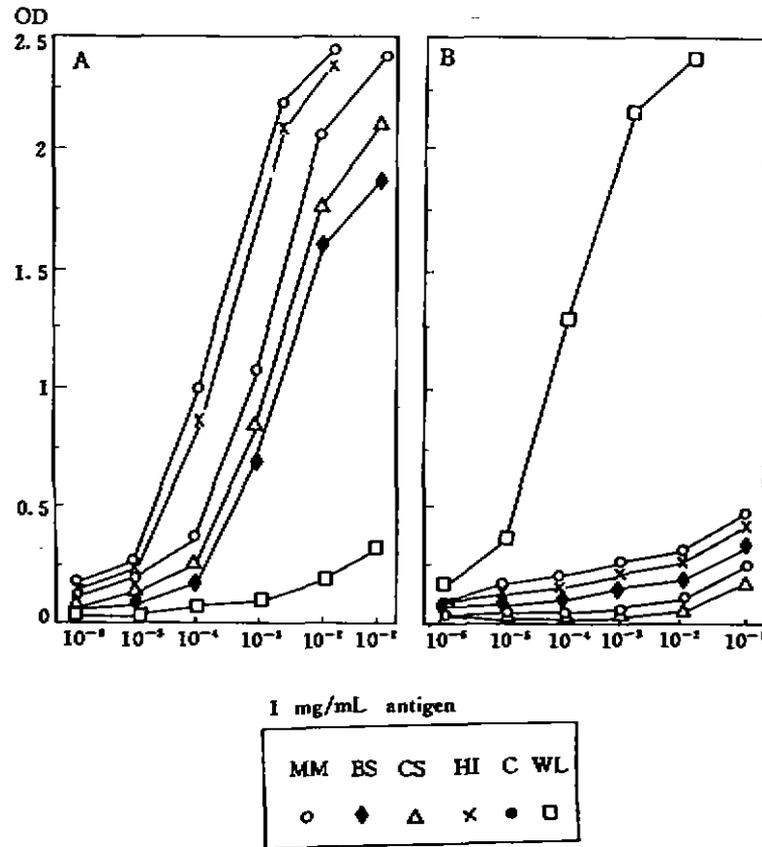


图 2 不同 CMV 分离物在 DAS - ELISA 法中的血清学关系  
A: 抗血清为 CMV - C; B: 抗血清为 CMV - WL; OD<sub>492</sub> 为三次结果平均值

Fig. 2 Serological relationships of different CMV isolates determined by Indirect - ELISA

A: Antiserum to CMV - C; B: Antiserum to CMV - WL; OD<sub>492</sub>: Mean values of three absorbance

反应, 当其纯化病毒量为 1 μg 时, 其 OD<sub>405</sub> 都在 0.5 以上。而用 CMV - WL (CMV 亚组 II) 的抗血清时, 只有 CMV - WL 具有较强的阳性反应, 而其它分离物的反应微弱, 即使其纯化病毒含量为 100 μg 时, 其 OD<sub>405</sub> 也都在 0.32 以下。这表明所测定的四种分离物与 CMV 亚组 I 的

CMV-C 具有密切的血清学关系, 而与 CMV 亚组 II 的 CMV-WL 则关系较远, 即上述四种分离物都属于 CMV 亚组 I, 属 DTL 血清型。Thomas<sup>[3]</sup>曾报道, 在澳大利亚香蕉上不仅发现了 DTL 血清型、还发现了 ToRS 血清型的株系。因此, 在广东和夏威夷香蕉上是否也存在 ToRS 血清型的株系, 有待今后研究证实。

### 参 考 文 献

- 1 李华平, 胡晋生, 范怀忠. 香蕉花叶病检测技术的研究. 病毒学报, 1996, 12(2)
- 2 李华平, 范怀忠. 侵染香蕉的黄瓜花叶病毒株系的形态学和生物学的特征. 中国病毒学, 1996, 11(2): 149~156
- 3 Thomas J E. Virus indexing procedures for banana in Australia. In: Valmayor R V *et al.* ed, *Banana Diseases in Asia and the Pacific INIBAP network in Asia and the Pacific*. 1991, 144~155.
- 4 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
- 5 Lot H and Marrou J. A contribution of the study of cucumber mosaic virus. II. Quick method of purification. *Ann. Phytopathol.* 1972, 4: 25~38
- 6 肖火根. 番木瓜环斑病毒株系间的交互保护作用及其机理研究. [博士论文]. 华南农业大学, 广州, 1992
- 7 Hu J S, Xu M Q, Wu Z C *et al.* Detection of banana bunchy top virus in Hawaii. *Plant Dis.* 1993, 77: 952~954
- 8 高乔婉. 香蕉花叶病侵染源的研究. 华南农业大学学报, 1992, 13: 48~52

## Serological Characterization of Cucumber Mosaic Virus Strains Infecting Banana

Li Huaping<sup>1</sup> John S. Hu<sup>2</sup> Faan Hweichung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

<sup>2</sup>(University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA)

Serological characterization of three strains (BS, CS and MM) from Guangdong and one strain (HI) from Hawaii of cucumber mosaic virus infecting banana were first studied. These four strains were confirmed to belong to CMV DTL serotype. The serological relationships between BS and CS were closed while the relationships between BS and MM were less closed.

**Key words** Banana, CMV strains, Serology