

170-173

17

第13卷第2期  
1998年6月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol. 13 No. 2  
Jun. 1998

## 矮牵牛病毒病的初步研究

周正来 陆仕华<sup>4</sup> 袁贤溶 汪树俊

(上海农业科学研究院植物保护研究所, 上海 201106)

黄济明<sup>5</sup>

(上海市园林科学研究所, 上海 200051)

5436.8

蒋震司

(上海农学院植物保护系, 上海 201101)

关键词 矮牵牛病毒病, 鉴定, 黄瓜花叶病毒, 芜菁花叶病毒, 脱毒 优势种病毒 防治

矮牵牛是一种草本花卉, 主要用来布置花坛, 但病毒侵染却严重地影响其观赏价值。国内外有关危害矮牵牛的病毒报道较多<sup>[1,2]</sup>, 但较系统研究矮牵牛病毒病的报道较少, 本文从矮牵牛病毒鉴定、优势病毒种类确定及防治矮牵牛病毒病进行了初步研究, 现报道如下:

## 材料与方 法

## 1 病毒的鉴定

用摩擦接种方法从 128 个标样中分离出两类病毒分离物, 即(1)P-14; (2)P-a<sub>1</sub> 和 P-33。蚜虫传毒试验、种子带毒试验、电镜观察制样均按常规方法进行。P-14 分离物的提纯是参照 Lot H 等<sup>[3]</sup>的方法进行。P-14 分离物抗血清制备是用部分提纯的 P-14 粒体免疫兔获得的, 免疫电镜修饰法是参照 Stephen A. Hill<sup>[4]</sup>的方法进行。黄瓜花叶病毒抗血清由复旦大学于善谦教授提供, 芜菁花叶病毒抗血清由上海农科院植保所袁贤溶先生供给。

## 2 脱毒组织培养

取感染 P-14 分离物的矮牵牛不同部位进行组织培养, 或先将病株进行高温处理后取材料培养。培养叶片和花芽的培养基是: MS + NAA 0.2 mg/L + BA 2.0 mg/L; 培养(茎尖)的培养基是: 1/2MS + NAA 0.1 mg/L + BAI 0 mg/L(液<sup>[5]</sup>); 生根培养基是: MS + NAA 0.01 mg/L。

## 结果与讨论

1 P-14、P-a<sub>1</sub> 和 P-33 分离物的鉴定

用 P-14 分离物接种 7 科 25 种植物, 可侵染其中的 22 种植物, 在蚕豆、苋色藜上为局部枯

\* 收稿日期: 1997-05-23, 修回日期: 1997-09-08

斑,在心叶烟、普通烟上为花叶;可通过桃蚜、棉蚜进行非持久性传播,但不能通过种子传播;粒体为均一的等轴球状病毒,大小为 $28 \sim 30 \text{ nm}$ ,见图1;琼脂双扩散试验表明,P-14分离物与黄瓜花叶病毒抗血清之间形成沉淀线,并与CMV和CMV抗血清间形成的沉淀线相融合,据此,P-14分离物与CMV有相同的抗原决定簇。根据以上特点,P-14分离物被鉴定为CMV。

分别用P- $a_1$ 和P-33分离物接种9科35种植物,结果表明:P- $a_1$ 可侵染6科14种植物,P-33可侵染6科12种植物。P- $a_1$ 和P-33侵染蚕豆为局部枯斑,在苋色藜和昆藜上为系统褪绿斑,在心叶烟上为花叶和系统褪绿斑,苜蓿上为系统褪绿和叶脉变褐。然而P-33不侵染四月蔓和三仙烟,侵染乌塌菜为花叶,对番杏为隐性侵染,而P- $a_1$ 侵染四月蔓为花叶和矮化,侵染三仙烟为局部枯斑,侵染番杏为局部褪绿,对乌塌菜不侵染。P- $a_1$ 和P-33的体外抗性分别为:TIP为 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 和 $45 \sim 55^\circ\text{C}$ ,DEP为 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 和 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ ,LIV为 $2 \sim 5 \text{ d}$ 和 $3 \sim 6 \text{ d}$ ,两者均能以桃蚜非持久性传毒,P- $a_1$ 粒体为略呈弯曲的线状病毒,长度平均为 $723 \text{ nm}$ ,见图2,P-33也为线状病毒,长度主要在 $720 \sim 730 \text{ nm}$ 之间;P- $a_1$ 的内含体为风轮状和条状,见图3。

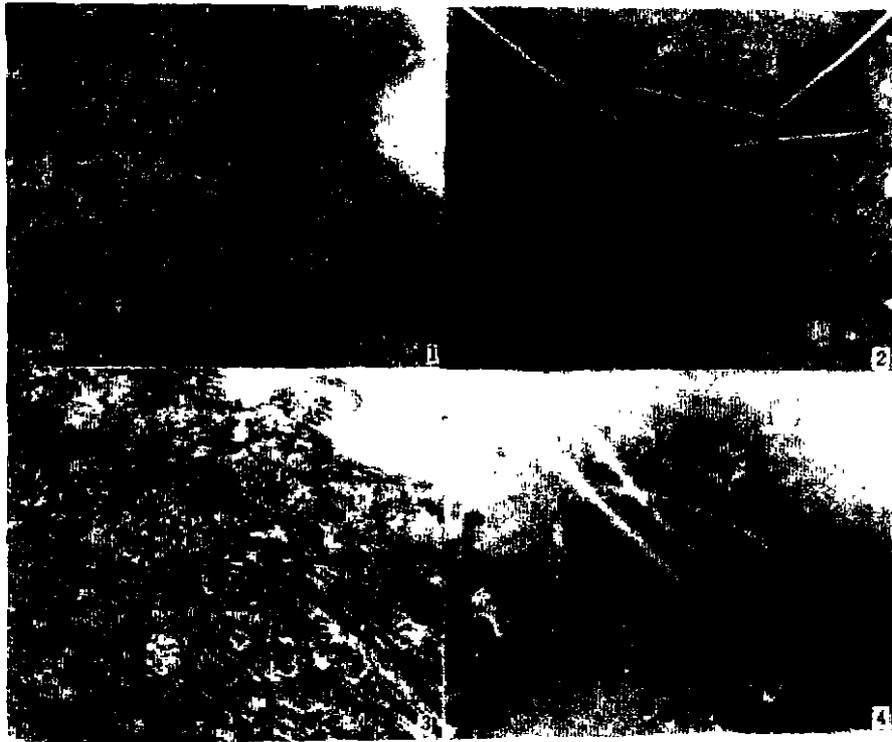


图1 P-14粒体电镜照片( $\times 200\,000$ )

Fig 1 Electron micrograph of P-14 particles ( $\times 200\,000$ )

图2 P- $a_1$ 粒体电镜照片( $\times 40\,000$ )

Fig 2 Electron micrograph of P- $a_1$  particles ( $\times 40\,000$ )

图3 P- $a_1$ 内含体电镜照片( $\times 30\,000$ )

Fig 3 Electron micrograph of P- $a_1$  inclusion bodies ( $\times 30\,000$ )

图4 P- $a_1$ 粒体被TuMV抗血清修饰电镜照片( $\times 60\,000$ )

Fig 4 Electron micrograph of P- $a_1$  particles decorated by TuMV antibodies ( $\times 60\,000$ )

TuMV 抗血清修饰结果表明: P-a<sub>1</sub>、P-33 和 TuMV 的粒体被强烈地修饰, 见图 4。根据以上特征, P-a<sub>1</sub> 和 P-33 两分离物被鉴定为 TuMV, 但它们在少数寄主上症状有所差异, 故认为它们是 TuMV 的不同分离物。

经琼脂双扩散试验, 用 P-14 分离物制备的抗血清效价可达到 1/256, 间接 ELISA 检测法较生物检测法要灵敏 32~640 倍, 说明可用 ELISA 法对早期脱毒苗进行检测。用生物检测法检测 79 个标样, CMV 占 81%, TuMV 占 12.7%、用间接 ELISA 法检测 30 份呈花叶的标样, CMV 占 70%, 说明危害矮牵牛的优势病毒是 CMV。接种试验结果表明: 矮牵牛很容易感染 CMV, 但感染愈早危害就愈重。

## 2 无毒苗技术研究

### 2.1 叶片和花芽的脱毒培养

用 0.5~1.0 cm 叶片培养获得 28 块愈伤组织, 用 0.2~0.5 mm 的花芽培养得到 33 块愈伤组织, 经生物和 ELISA 检测均带有病毒。

### 2.2 茎尖脱毒培养

从病株上分别切取 0.15~0.25 mm、0.3~0.5 mm 和 1.0 mm 茎尖各 40~50 个培养, 结果表明只有用 0.15~0.25 mm 茎尖培养方可获得 6.6% 的无毒苗。

### 3.3 热处理结合茎尖脱毒培养

将病株先进行不同热处理后再切取茎尖培养, 结果见表 1。从表 1 可知, 病株经高温处理后可用较大的茎尖培养而获得无毒苗, 且获得脱毒苗的比例较高, 但高温处理对病株的伤害较大, 而变温处理则比连续高温处理对病株伤害要小。从温度处理对植株存活率、茎尖存活率以及脱毒率等综合来看, 以变温处理 16 d 后再切取 0.3~0.5 mm 茎尖培养为佳。

表 1 不同热处理结合茎尖培养脱除 CMV 效果比较

Table 1 Comparison of CMV-free rate in tip culture after different heat treatments of diseased plants

热处理类型 Types of heat treatment	植株 Plants		茎尖 Tips			愈伤组织 期脱毒率 Virus-free rate at callus stage (%)	移苗期脱毒率 Virus-free rate at seedling stage (%)	开花期 脱毒率 Virus-free rate at flowering stage (%)
	处理数 Number	存活率 Survival rate (%)	大小 Size (mm)	数量 Number	成活率 Survival rate (%)			
连续 40℃ 高温处理 8 d Consecutive heat treatment at 40℃ for 8 days	60	36.6	0.3~0.5	30	33.3	10	10	10
变温处理 16 d Varying heat treatment for 16 days	35	80	0.3~0.5	30	90	11.1	11.1	11.1
变温处理 30 d Varying heat treatment for 30 days	60	66.6	0.3~0.5	55	33.3	11.1	11.1	11.1

注: 变温处理为 38℃ 8h + 22℃ 16h。 Varying heat treatment is 38℃ 8h + 22℃ 16h.

由于矮牵牛易快速繁殖, 可将无毒苗作为原原种进行保存, 快繁后用于生产上, 因矮牵牛苗期感染会严重影响其观赏价值, 因此注意防治苗期感染很重要。关于如何防止无毒苗再感染还有待进一步研究。

**致谢** 本文电镜照片由上海农科院测试中心赵建华先生协助拍摄,特此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 Chester K S. Cucumber mosaic virus in green house petunias. *Plant Dis Repr.* 1938, 22(5): 81 ~ 82
- 2 Rani, Shyama, Verma H N *et al*. A virus disease of petunia hybrida. *Pl Dis Repr.* 1969, 53(1): 903 ~ 907
- 3 Francki RIB, Mossop DW, Hatta T. Cucumber mosaic virus. *CMV/AAB Descriptions of Plant Viruses*, 1979, No. 213
- 4 Stephen A Hill *Methods in plant virology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1984, 150 ~ 153

## Primary Studies on Viral Diseases of Petunia

Zhou Zhenglai Lu Shihua Yuan Xianrong Wang Shujun

(*Plant Protection Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106*)

Huang Jiming

(*Shanghai Horticultural Institute, Shanghai 200051*)

Jinag Zhentong

(*Department of Plant Protection, Shanghai Agricultural College, Shanghai 201101*)

**Abstract** Two kinds of virus isolates P-14 and P-a<sub>1</sub>, P-33 were isolated from the mosaic, crinkled and stunted petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) plants. The isolate P-14 was identified as cucumber mosaic virus (CMV) and the isolates P-a<sub>1</sub> and P-33 as turnip mosaic virus (TuMV). CMV was the prevailing virus in petunia. Virus-free research results showed as follows: (1) CMV-free plantlets were not obtained when the leaves, flower-buds and meristem-tips (more than 0.3mm) were cultured; (2) CMV-free plantlets were gained when 0.15 ~ 0.25 mm meristem-tips from the infected plants or 0.3 ~ 0.5 mm meristem-tips from the infected plants after different heat treatments were cultured.

**Key words** Viral diseases of petunia, Identification, CMV, TuMV, CMV-free