



湖南小白菜病毒病原种类鉴定

欧阳本友 谢丙炎 刘富春

(湖南省衡阳市蔬菜研究所)

摘要 1983—1988 年从湖南各地(以衡阳市郊为重点,包括湘北的岳阳,湘中的长沙、湘潭,湘南的郴州、零陵等地区)采集了小白菜病毒病标样 812 个,经指示植物鉴定、酶联检测、稳定性测定等方法将它们分为 8 个类型,其中有 3 类是单独侵染的,4 类是复合侵染的,还有一类反应不明(待鉴定)。鉴定结果表明,湖南小白菜病毒病原的优势种类是芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV),其次是黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 和烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)。它们的单独侵染率分别占被测标样数的 48.77、13.79 和 11.03%, 加上相互复合感染的部分则分别占被测标样数的 61.33、21.67 和 19.09%。不同季节和不同地区的毒原种类亦是以 TuMV 为主。

关键词 小白菜;病毒种类鉴定;芜菁花叶病毒

小白菜是我省的主要蔬菜种类之一,特别在蔬菜淡季中起着重要作用。而小白菜病毒病每年都有不同程度的发生,特别是 70 年代中期以来,有明显加重的趋势,严重地影响着小白菜的产量和品质。该病一般发病率在 30% 以上,但对于大田中以小苗移栽的种植和在生育期较长的栽培中,小白菜的发病率可达 80% 以上,严重的甚至失收。

据资料报道^[1-6],小白菜病毒病的主要毒原种类有芜菁花叶病毒 (TuMV)、黄瓜花叶病毒 (CMV) 和烟草花叶病毒 (TMV), 其次还有车前草花叶病毒 (RMV) 等,但在湖南地区目前有哪些主要毒原,尚不清楚。为此我们从 1983—1988 年对湖南小白菜病毒病的主要毒原种类进行了调查和鉴定,现将结果报道于后。

材料和方 法

(一) 材料

1. 指示植物鉴定用材料: 本试验所用鉴别寄主谱包括下述指示植物: 小白菜 (*Brassica chinensis* L.)、心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*)、黄苗榆 (*Nicotiana tabacum* L.)、蔓陀罗 (*Datura stramonium*)、莧色藜 (*Chenopodium*

amaranticolor)、灰藜 (*Chenopodium album*)。作为病毒繁殖所用的寄主材料有小白菜、黄苗榆和三生烟 (*Nicotiana tabacum*-Samsun NN) 等植物。

2. 消毒与接种: 培育指示植物和繁殖寄主所用的土壤与苗钵均经 1.5kg/cm² 高压蒸汽消毒 3 小时,其它检测试验用具和接种用品均经 160℃ 干热消毒 3 小时。接种是用 0.01mol/L pH7.0 磷酸缓冲液和 600 目金刚砂。接种用的清洁剂为磷酸钠肥皂(肥皂中含有 10% 磷酸钠)。

3. 血清学检测所用材料: TMV 和 CMV 的抗血清大部分是自制的。TMV 和 CMV 的白鼠腹水抗体和部分 TMV、CMV 的家兔抗血清是农牧渔业部植物检疫实验所血清室张成良先生提供。TMV 和 CMV 的标准抗原由植物检疫实验所病毒室提供。TuMV 的标准抗原和部分 TuMV 的抗血清由中国农科院蔬菜研究所提供。辣根过氧化物酶标记的酶标抗体是卫生部北京生物制品研究所生产。DG3021 型酶标检测仪是南京华东电子管厂生产,反应板是上海产 40 孔塑料板。

(二) 方法

1. 标样采集: 小白菜病毒病毒原标样采集自衡阳市郊和本所试验地及岳阳、长沙、湘潭、郴州、零陵等地。一年中除因气温低病毒病发生轻微的1、2月份外,其余10个月均采集了标样。采样时选择菜田中病毒症状(如严重花叶、皱缩、畸形、“瘤球”状等)明显的小白菜植株,用10×20cm规格的无毒小塑料袋,将袋套在重病叶上,隔膜采摘,互不接触。从1983—1988年共采集了812个标样。

2. 接种方法: 从田间采集的病毒标样置4℃冰箱中冷贮1—3天,将标样置于研钵中加适量缓冲液和少许600目金刚砂研磨,用磨碎的病汁液进行摩擦接种,一般接种到指示植物的中上部叶片(不接心叶),每株接种2至3片叶。接种后立即用清水冲洗被接叶片。试验均在防虫温室内按严格的无毒操作程序进行。

3. 鉴定方法: 主要是经典的指示植物鉴定和血清学鉴定。

(1) 指示植物鉴定: 将每次采集的小白菜病毒病的毒原标样逐一地分别接种在鉴别寄主谱上,根据各个接种物在鉴别寄主上的症状反应进行初步鉴定和分类,从各反应类型中选出典型代表物进行分离,经连续3次单斑分离后进行繁殖,然后再血清学方法进行验证性检测。

(2) 血清学鉴定: 标样经指示植物初步鉴定后,又用异种动物双抗体夹心法^[7]或间接法^[8]二种酶联免疫吸附检测技术进行验证。

4. 钝化温度测定: 取典型的单一毒原(即

TuMV、TMV、CMV单独侵染)的分离物,经3次单斑分离后用小白菜进行繁殖,再用繁殖后的新鲜病叶榨汁,将汁液分装于12个2ml安瓿瓶中,每瓶装1ml。处理温度在45—100℃之间,每隔5℃为一档,共设12个处理温度。将盛有病汁液的安瓿瓶分别置于相应温度的水浴中处理10分钟,立即取出置冷水中冷却,然后迅速接种到相应的枯斑寄主上,待后观察寄主的症状反应,即测出该病毒失去活力的温度。

5. 稀释终点测定: 用TuMV、TMV、CMV单独侵染的分离物繁殖的病叶榨汁,各取汁液1ml逐级稀释成10⁻²—10⁻⁷浓度后,分别接种到枯斑反应的寄主上,测定出病毒失去致病力的浓度。

试验结果

(一) 指示植物鉴定分类

将采集的小白菜病毒病标样利用指示植物进行初步鉴定,根据各个接种物在鉴别寄主谱上的症状反应分为8个类型,其中有3个单独侵染类型的毒原: TuMV、CMV和TMV; 4个复合侵染类型的毒原: TuMV + TMV, TuMV + CMV、TMV + CMV、TuMV + TMV + CMV; 另外有一类毒原在鉴别寄主谱上无明确的反应类型,难以归类(表1)。

(二) 毒原种类鉴定结果

从全省各地采集的小白菜病毒病的毒原标样,经指示植物鉴定,同时用TuMV、TMV和

表1 接种物在指示植物上的反应类型

反应 类型	指示植物						鉴定结果
		心叶烟	黄苗榆	苋色藜	小白菜	灰藜	
I		O	O	LS	S	L	TuMV
II		L	S	L	S	O	TMV
III		S	S	L	S	O	CMV
IV		L	S	LS	S	L	TuMV + TMV
V		S	S	LS	S	L	TuMV + CMV
VI		L-S	S	L	S	O	TMV + CMV
VII		L-S	S	LS	S	L	TuMV + TMV + CMV
VIII					S		待定

L-局部枯斑 LS-系统枯斑 S-系统花叶 O-无反应

表 2 小白菜病毒病病毒原种类鉴定结果

年度	毒原	结果							
		TuMV	TMV	CMV	Tu + T	Tu + C	T + C	Tu + T + C	待定
1983		24	9	13	5				8
1984		42	5	4	10	8	1	3	3
1985		38	3	5	4	9	1	2	13
1986		108	23	40	16	12	2		15
1987		137	31	43	8	18	7		32
1988		47	19	7	4	1			7
合计		396	90	112	49	48	11	5	101
占总数%		48.77	11.08	13.79	6.03	5.91	1.36	0.62	12.44

“Tu” 示 TuMV; “T” 示 TMV; “C” 示 CMV

CMV 三种抗体进行酶联免疫吸附技术的检测, 证明湖南小白菜病毒病的毒原种类及其各类所占比例见表 2。

从表 2 可见, 湖南小白菜病毒病的主要毒原为 TuMV, 其次为 CMV 和 TMV, 它们的单独侵染率分别为 48.77、13.79 和 11.08%。如果加上其复合感染数, 则 TuMV 所占比例更大, 它们分别占 61.33、21.67 和 19.09%。

(三) 指示植物鉴定与酶联检测相互验证结果

在用指示植物鉴定小白菜病毒病病毒原种类时, 对其中的 108 个标样同时采用了 ELISA 技术检测, 进行相互验证。从验证的结果来看, 指示植物鉴定与 ELISA 检测的吻合率为 93.75—95.24%, 平均为 94.44%, 误差率平均为 5.56% (见表 3)。

表 3 指示植物鉴定与 ELISA 检测的吻合情况

年度	项目	结果				
		验证样数	吻合数	吻合率 (%)	误差数	误差率 (%)
1986		42	40	95.24	2	4.76
1987		48	45	93.75	3	6.25
1988		18	17	94.44	1	5.56
合计		108	102	94.44	6	5.56

(四) 病毒活力测定结果

对经指示植物鉴定和酶联免疫吸附试验检

测验证后的各类单独侵染的毒原中的典型分离物, 分别取代表株进行了钝化温度和稀释终点的测定, 其结果 (见表 4) 与相应病毒相符^[9]。

表 4 病毒活力测定结果

结果	处理	分离物		
		钝化温度 (°C)	稀释终点	鉴定结果
TuMV 的分离物		55	10 ⁻⁷	TuMV
TMV 的分离物		95	10 ⁻⁵	TMV
CMV 的分离物		65	10 ⁻⁴	CMV

讨 论

湖南小白菜病毒病的毒原种类经指示植物鉴定、酶联检测和病毒测定结果均表明, 其主要毒原种类为芜菁花叶病毒、黄瓜花叶病毒和烟草花叶病毒。就其在鉴定标样中所占比例和在生产中的危害程度都说明是以芜菁花叶病毒占优势。

病毒病以复合感染的形式危害小白菜的情况不少, 有时 2 种甚至 3 种毒原同时感染同一植物。复合感染的危害方式使小白菜病毒病的防治工作更加困难了。

芜菁花叶病毒、黄瓜花叶病毒和烟草花叶病毒的寄主范围都相当广泛, 特别是后二者, 在小白菜的各个生育阶段中, 田间都有毒原存在, 随时都可感病。因此黄瓜花叶病毒和烟草花叶

病毒虽然不是优势毒原,亦不可忽视其危害性。

由于在鉴定中采用的鉴别寄主谱和抗血清种类有限,在部分待定标样中究竟是些什么毒原?在已经明确鉴定的标样中是否还有其它毒原复合感染?主要毒原种类中的株系状况如何?这些问题都有待进一步研究。

参 考 文 献

1. 朱培坤: 上海农业科技, 1: 8, 1981。

2. 裴美云: 植物病理学报, 9(2): 137, 1979。

3. 朱培坤: 植物病理学报, 13(1): 3, 1983。

4. 李彦勇: 植物病理学报, 14(4): 219, 1984。

5. 姚文岳等: 上海农业科技, 10: 22, 1979。

6. 丁正民: 上海农业科技, 4: 1, 1979。

7. 陆家珏等: 植物病理学报, 17(4): 241, 1987。

8. 裘维蕃: 植物病毒学(修订版), 农业出版社, 北京, 282页, 1982。

9. 保坂康弘等著(梁训生等译): 植物病毒图鉴, 农业出版社, 北京, 19—24页, 102—107页, 1980。