

1990年3月

March, 1990

植物检疫研究报告

TECHNICAL BULLETIN OF
PLANT QUARANTINE RESEARCH

花卉病毒研究(二)

Studies of Ornamental Plant Viruses (2)

农业部植物检疫实验所

Institute of Plant Quarantine

Ministry of Agriculture

People's Republic of China

目 录

- 我国兰花主要病毒——建兰花叶和齿兰环斑病毒的分离和鉴定……沈淑琳等(1)
- 从引进的病毒资源中截获一种重要种传病毒——藜草花叶……沈淑琳等(13)
- 建兰花叶、齿兰环斑和藜草花叶病毒外壳蛋白电泳及其蛋白亚基
分子量测定(摘要)……胡伟贞等(20)
- 通过有性繁殖方式对三种花卉进行复壮和脱毒的初步试验……沈淑琳(21)

Contents

- Isolation and identification of main orchid viruses
—*Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ring spot
viruses in China S.L.Shen et al(1)
- Identification of Sowbane mosaic virus—a virus present in imported
dry frozen tissues of GCMV..... S.L.Shene et al (13)
- Electrophoresis of the coat protein and the molecular weight
determination of protein subunit of *Cymbidium* mosaic virus,
Odontoglossum ringspot virus and sowbane mosaic virus(Abs)
..... W.Z.Hu et al(20)
- Use of sexual propagation in ornamental plants for virus-free
seedling S.L.Shen (21)

我国兰花主要病毒——建兰花叶和齿兰环斑病毒的分离和鉴定

沈淑琳、王树琴、朱水芳、舒秀珍、陈燕芳、许宏冠、李晓芹

摘要 (Abstract)

兰花病毒病在我国各地发生很普遍。常复合侵染。自然病株的症状多为复合型, 症状类型有花叶、黑褐色坏死斑或斑块, 有的叶片于褪绿处变薄, 后变灰、干缩、破裂成丝。电镜下见到众多粒体, 以丝状为主, 杆状次之。选取代表性毒株“兰-60”和“兰-108”, 进行系统鉴定。“兰-60”粒体丝状, $418 \times 14 \text{ nm}$, 属马铃薯X病毒组, $A_{260} = 0.920$, $A_{280} = 0.704$, $A_{260}/A_{280} = 1.307$ 、蛋白外壳含一种亚基, 亚基分子量27600。在曼陀罗病株中, 用琼脂糖电泳, 可检出2种dsRNA。人工接种藜科、豆科和茄科等35种植物, 只局部侵染3种藜、望江南、曼陀罗和番杏。致死温度 $60-68^\circ\text{C}$, 稀释终点 $10^{-3}-10^5$, 体外存活期为60-70天(室温)。与同组的马铃薯X、白三叶草花叶和仙人掌X等病毒血清学极远缘。根据以上特性鉴定为建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*)。“兰-108”毒株的粒体直杆状, $300-340 \times 20-21 \text{ nm}$, 属烟草花叶病毒组。 $A_{260} = 2.152$, $A_{280} = 2.188$, $A_{260}/A_{280} = 0.9835$ 。外壳蛋白由一种亚基组成, 亚基分子量为17500。在昆诺阿藜病株中, 用琼脂糖电泳检出一种dsRNA。自然侵染各种兰花, 人工接种仅能系统侵染克里夫兰烟, 局部侵染藜科、茄科和苋科等12种寄主植物。致死温度 $>93^\circ\text{C}$, 稀释终点 $>10^{-18}$, 体外存活期超过673天(室温)。用免疫电镜诱捕和修饰法, 与齿兰环斑病毒抗血清呈阳性反应, 和烟草花叶病毒远缘血清关系。鉴定为齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ring spot virus*)。

一、前言 (Introduction)

我国的温带地区有丰富的兰花资源, 分布着全世界大多数地生兰品种; 在亚热带地区的原始森林中生长着许多热带兰的珍贵品种。我国盆栽养兰始于唐朝, 在以后的宋、元、明清代都有发展, 尤以清代为我国养兰的昌盛时期, 至今已有2000多年历史。

在我国南方, 尤其广东, 盆栽兰花, 远销国内外, 兰花组培也已开始, 并有一定规模。无论盆栽的地生兰或组培的兰花, 病毒病均很普遍, 近来从国外引进的热带兰病情也普遍而严重〔2〕, 因而病毒退化问题已引起养兰和爱兰者们的关注。

早在1943年澳大利亚Magee〔10〕首次描述了建兰上有一种黑病, 当时认为可能是病毒病, 但未试验证实。Jensen(1951)〔8〕鉴定建兰花叶或黑条纹病株的病原为建兰花叶病毒(*Cy-*

本研究属农业部“七五”科研重点项目的专题。是在季良研究员指导下进行的。

Dr. H. L. Paul 赠ORSV抗血清, 本所血清室为两毒株免疫制备抗血清, 吕文学摄制全部照片, 北京植检所陶令珠、韩丽娟、周琪, 北京植检站黄绍华、王沁等同志参加部分试验。还得到厦门、广州、海口、昆明、上海等动植检所和甘肃植检站以及厦门植物园、广州园林所和北京中山公园兰圃等有关单位大力支持。崔秀珍、刘凤琴负责试验辅助工作, 王锡折、张广平和徐亮协助电镜观察等, 在此一并致谢。

mbidium mosaic virus)。同年Jensen和Gold^[9]又在齿兰上分离和鉴定了一种杆状粒体,定为齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ring spot virus*)。Holling和Stone(1963)^[6]从建兰表现轻性褪绿环和斑驳的病株中分离出一种球状病毒,鉴定为建兰环斑病毒(*Cymbidium ring spot virus*)。土居养二等(1968)^[14]分离出一种弹状病毒,鉴定为洋兰斑点病毒(*Orchid fleck virus*)。除此,还报道有万代兰花叶(*Vanda mosaic virus*)、黄瓜花叶(*Cucumber mosaic virus*)、石斛兰花叶(*Dendrobium mosaic virus*)、番茄环斑(*Tomato ring spot virus*)和建兰轻性花叶(*Cymbidium mild mosaic virus*)等病毒(Murakishi 1950^[11], 1952^[12], Inoue 1969^[7], 井上成信 1970^[15], Goff等 1974^[4], 1977^[5]和张茂雄等 1975^[16])。我国兰花病毒的研究工作始于80年代,朱本明等(1983)^[1]从上海地区兰花上分离到丝状和杆状的粒体,根据粒体和寄主反应,鉴定为建兰花叶和齿兰环斑病毒。本文报道这两种主要病毒在我国的分布、鉴定特性和检验技术。

二、材料和方法 (Materials and Methods)

1. 毒株 (Isolates) 供试两毒株——“兰-60”和“兰-108”。“兰-60”于1986年4月22日采自广州兰圃的一株剑兰,表现斑驳和系统黑褐色小斑。经室内接种、电镜观察,发现该病株系一种病毒复合侵染,从接种曼陀罗表现局部枯斑,选取单斑分离得到丝状粒体,编号为“兰-60”。“兰-108”是1987年4月9日从广州园林所采得一株万代兰,表现系统黑褐色斑和坏死纹,电镜检查为杆状和丝状病毒复合侵染,经接种千日红和 Xanthi-nc 烟,连续多次单斑分离,获得含一种杆状粒体的毒株:编号为“兰-108”。

2. 寄主范围测定 (Host range) 供接种的植物包括藜科、豆科和茄科等35种或品种。

3. 稳定性测定 (Stability in sap) “兰-60”的曼陀罗病汁,在同种寄主上测定稳定性。“兰-108”的昆诺阿藜病汁,测定寄主昆诺阿藜。

4. 提纯 (Purifications) “兰-60”于0.5M pH6.5柠檬酸钠缓冲液中,有时加0.1%巯基乙醇。“兰-108”加0.05M pH7磷酸钾缓冲液提取。两种抽提液分别加PEG6000沉淀,差速离心,得到粗提纯液,用于制备兔抗血清和测蛋白外壳亚分子量。

三、试验结果 (Results)

1. 病情 (Incidence) 从1986年以来,相继调查了厦门、广州、顺德、海口、兴隆、通什、昆明、成都、上海、南京、武汉和北京等城市的27处兰圃,其中26处栽种的地生兰和气生兰发病普遍,叶片彦色不正常,小的黑褐色病斑甚多,生长无生气,严重的“一年看花、二年看草、三年死株”。只有海南省通什花卉中心兰圃的病情较轻,那里保存了从五指山原始森林中采集来的野生兰,多半为气生兰,虽已在该中心驯化栽培3年,到1988年去调查时,仍较健壮。1989年在北京举行第二届全国花卉博览会,又调查采集了台湾、湖南、四川、甘肃、浙江、江西、湖北、广东、江苏和云南等省送展样品,随机采集138份样。经室内检测,证明除通什中心和博览会的展样病毒病情较轻外,其余发生普遍,病毒病已成为兰花栽培和出口创汇中的主要病害问题。由于全身发病,易传播,难以防治,使养兰者深感不安,迫切要求进行有效的预防和治疗。

近年来一些单位为外商繁殖兰花组培苗、引进组培苗或兰花资源,有些普遍传带病毒病如1988年新加坡胡姬兰花协会在北京展出气生兰,经抽样检查展出的插花和留京的全部盆花,100%为病毒病株〔2〕。抽检菲列宾和泰国引进的气生兰或鲜花,也是100%有病、所以,加强检疫,尽快制定兰花检疫检验规程,以防治危险性病毒的传入,保护好我国的兰花资源,是十分重要的工作。

兰花病毒病的症状因病毒复合侵染而变得复杂。症状还随品种、季节而变化。自然病株常表现叶片褪绿斑驳、褪绿块、环斑或条纹。有的于褪绿处叶肉变薄,组织由淡绿到灰白仍至于缩、破裂成丝,群众称“白拉丝”。另一种表现为叶片上的黑色斑点,叶正面色浅,叶背面色深。地生兰的斑点小,气生兰斑点大而凹陷。气生兰还常有不规则坏死块、线纹或环斑。从一年不同季节的症状变化来看,在适宜兰花生长的季节,新长幼叶症状明显,气温低时,症状不明显或隐症。从病株发病的时期来看,发病初期症状明显,以后不明显或隐症带毒(图1—3)。

2. 寄主范围 (Host range) 从室内检测的712份病样中,选出“兰-60”和“兰-108”,分别接种茄科、藜科和豆科等35种或品种的植物,结果见表1(下页)。

表1所示,“兰-60”毒株,只在6种植物上显出局部症状,潜育期一般较长,于30℃左右的夏季约10—12天,冬季(约15℃)需30天上下;侵染望江南的潜育期最短,只需7天左右,反应比较稳定的寄主有曼陀罗和莨菪蓼,可用作鉴别寄主。病毒宜繁殖在曼陀罗或白花曼陀罗(*Datura candida*)上。

毒株“兰-108”,在供试12种植物上表现症状,除系统侵染克里夫兰烟外,其余为局部侵染,多为局部坏死斑或环斑。其中以3种藜、*Xanthi-nc*烟、千日红和番杏的反应较稳定,可用作鉴别寄主,克里夫兰烟为适宜的繁殖寄主。“兰-108”侵染寄主的潜育期较“兰-60”短,一般在一周左右。

3. 稳定性 (Stability in sap) “兰-60”在曼陀罗病汁中,“兰-108”在昆诺阿藜病汁中的稳定性,见表2

表2(table 2) “兰-60”和“兰-108”的稳定性(Stabilities of isolates in saps)

毒株 (Isolates)	TIP (℃)	DEP	LIV (室温) (天) (at room temperature) (days)
兰-60 (Orchid-60)	60-68偶尔78	10^{-2} — 10^{-4} 偶尔 10^{-5}	10-36 偶尔 60-70
兰-108 (Orchid-108)	>93	> 10^{13}	>673

以上表明“兰-108”的稳定性明显高于“兰-60”,两者有明显的区别。

4. 提纯和粒体 (Purification and particles) “兰-60”毒株接种曼陀罗后约15-20天,即局部斑出现后2-3天采收,鲜病叶300g,加0.5M柠檬酸钠缓冲液pH6.5(含0.1%巯基乙醇),研磨抽提,氯仿澄清,加0.25%NaCl和4%PEG6000,沉淀悬于0.1M硼酸钠缓冲液pH8.4,SW28转子,22000rpm(70000g),离心2.5小时,沉淀悬于0.01M硼酸钠缓冲液和0.5M尿素pH8.4中,得到粗提纯液10ml,提纯得率为117mg/1000g病叶。供免疫制备抗血清。

表1 (table 1) 寄主范围和症状 (Host range and symptoms)

植物(plants)	症状 (symptoms)*	毒株 (isolates)	兰-60 (Orchid-60)	兰-108 (Orchid-108)
昆诺阿藜 <i>Chenopodium guinoa</i>			LC	LC, LN
苋色藜 <i>C. amaranticolor</i>			LC, LCRS (图4)	LN (图4)
墙生藜 <i>C. murale</i>			LC	LN
土荆芥 <i>C. ambrosioides</i>			0	LCRS, LNRS
叶用甜菜 <i>Beta cicla</i>			0	LN
菠菜“诺维托” <i>Spinacia oleracea</i>			0	0
长豇豆“黑种三尺” <i>Vigna sesquipedalis</i>			0	0
豇豆“黑眼” <i>V. sinensis</i> cv. Black eye			0	0
菜豆“家雀蛋” <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. 家雀蛋			0	0
菜豆“Pinto” <i>P. vulgaris</i> cv. pinto			0	0
菜豆“Topcrop” <i>P. vulgaris</i> cv. Topcrop			0	0
菜豆“沙克沙” <i>P. vulgaris</i> cv. 沙克沙			0	0
菜豆“Monroe bean” <i>P. vulgaris</i> cv. Monroe			0	0
蚕豆“成胡9号” <i>Vicia faba</i> cv. 成胡9号			0	0
蚕豆“74082” <i>V. faba</i> cv. 74082			0	0
大豆“合丰23” <i>Glycine max</i> cv. 合丰.23			0	0
大豆“晋豆84” <i>G. max</i> cv. 晋豆84			0	0
大豆“猴子毛” <i>G. max</i> cv. 猴子毛			0	0
望江南 <i>Cassia occidentalis</i>			LN	
白肋烟 <i>Nicotiana tabacum</i> cv. white Burley			0	0
<i>N. tabacum</i> cv. Harrow velvet			0	LN
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi-nc			0	LN, LNRS (图6)
黄花烟 <i>N. rustica</i>			0	0
心叶烟 <i>N. glutinosa</i>			0	LN
克里夫兰烟 <i>N. clevelandii</i>			0	MO
<i>N. debneyi</i>			0	0
曼陀罗 <i>Datura stramonium</i>			LN (图5)	0
洋酸浆 <i>Physalis floridana</i>			0	0
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>			0	LCRS, LNRS
番杏 <i>Tetragonia expansa</i>			LC	LN, LNRS
百日菊 <i>Zinnia elegans</i>			0	0
北京结球莴苣 <i>Lactuca sativa</i> cv. Capitata			0	0
黄瓜“Apple crystal” <i>Cucumis sativus</i> cv. Apple crystal			0	0
千日红 <i>Gomphrena globosa</i>			0	LN (图7)
千穗谷 <i>Amaranthus caudatus</i>			0	0

* LN=局部坏死斑(Local necrotic lesions), LC=局部褪绿斑(Local chlorotic lesions), LNRS=局部坏死环斑(Local necrotic ring spots), LCRS=局部褪绿环斑(Local chlorotic ring spots), Mo=斑驳(Mottle), 0=无症状(symptomless)

“兰-108”繁殖于昆诺阿藜,取冰冻病叶752g,加0.05M pH7磷酸钾缓冲液抽提,按10%加氯仿、正丁醇澄清,上清液加2%NaCl、4%PEG6000,沉淀悬于0.01M pH7磷酸钾缓冲液,SW28转子,23000rpm(95000g)离心2小时,沉淀悬于0.01M pH7磷酸钾缓冲液,获得11ml提纯液,提纯得率为628mg/1000g病叶,供制备抗血清。以上提纯步骤,在去除的过滤渣和超速离心的上清中还有大量病毒,因而,尚需改进,以提高产量。

粒体(Particles),“兰-60”为丝状粒体(图8),“兰-108”为直杆状(图9),现将2毒株的粒体和提纯液有关特性比较于表3。

表3(table 3) 比较“兰-60”和“兰-108”的粒体特性
(Comparison of properties of particles between“Orchid-60”and“Orchid-108”)

粒体特性 Properties of particles	“兰-60” “Orchid-60”	“兰-108” “Orchid-108”
A260	0.920* ¹	2.152* ²
A280	0.704	2.188
A260/A280	1.307	0.9835
提纯得率(mg/1000g) (yields of virus in purified preparation)	117	628
粒体(particles)形状(Shape)	丝状	直杆状
大小(Size)(nm)	418×14	300—340×20—21
外壳蛋白亚基数(No of subunits)	1	1
亚基分子量(daltons)(M.Wt.of subunits)	27600 [14]	17500 [14]

*¹ 1/20提纯液的吸收值

*² 1/60提纯液的吸收值

5.血清关系(Relationships) 用免疫电泳诱捕和修饰,测定“兰-60”、“兰-108”和各自同组的一些病毒间的血清亲缘关系。

“兰-60”与其本身的抗血清强阳性反应,与同组的马铃薯X病毒的抗血清为弱阳性反应,而与白三叶草花叶病毒、仙人掌X病毒的抗血清为阴性反应;反之,“兰-60”的抗血清与白三叶草花叶、马铃薯X和仙人掌X病毒均为极弱阳性反应。

“兰-108”与Dr. Paul赠的齿兰环斑病毒抗血清呈阳性反应,与烟草普通花叶病毒抗血清呈极弱阳性反应,而与本身的抗血清呈强阳性反应;反之,“兰-108”抗血清与烟草花叶病毒的紫芸英毒株、仙人指毒株分别呈弱阳性反应和极弱阳性反应。说明“兰-108”与齿兰环斑病毒同源,而与烟草花叶病毒两毒株为远缘血清关系。

综上所述,“兰-108”与齿兰环斑病毒的抗原性相同,而与烟草花叶病毒的两毒株远缘关系。“兰-60”与马铃薯X病毒组的马铃薯X、白三叶草花叶和仙人掌X等病毒为极远缘血清关系。

四、讨论和结论(Discussion and conclusion)

1.“兰-60”和“兰-180”的特性分别与文献报道的建兰花叶和齿兰环斑病毒极为相似,现对比如下表:

病毒 鉴定特性		“兰-60” (“Orchid-60”)	建兰花叶 (<i>Cymbidium</i> mosaic) [3]	“兰-108” (“Orchid -108”)	齿兰环斑 (<i>Odontoglossum</i> ring spot) (13)
粒体形状		丝 状	丝 状	直杆状	直杆状
粒体大小 (nm)		418×14	475×13	300—340× 20—21	300×18
A260/A280		1.307	1.11	0.9835	0.99
外壳蛋白亚基数		1	1	1	1
亚基分子量 (daltons)		27600	27640	17500	17598或17300
dsRNA		2种	/	1 种	/
鉴 别 寄 主 反 应	莧色藜 曼陀罗	局部褪绿斑 局部枯斑	局部褪绿斑 局部枯斑	局部小枯斑 无反应	局部侵染 局部枯斑
	Xanthi-nc	无反应	/	局部枯斑, 环斑	局部枯斑、环斑
	昆诺阿藜	局部褪绿斑	局部斑	局部枯斑, 褪绿斑	局部枯斑、褪绿斑
	千日红	无反应	无反应	局部枯斑	局部枯斑
	番 杏	局部褪绿斑	局部褪绿斑	局部枯斑, 环斑	局部枯斑
	望江南	局部枯斑	局部枯斑	无反应	局部小枯斑
稳 定 性	TIP (℃)	60—68	65—70	>93	90±
	DEP	10 ⁻³ —10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁵	>10 ⁻¹⁸	10 ⁻⁵ —10 ⁻⁶
	LIV(天)(室温)	60—70	>7	>673	>10年
血 清 亲 缘 关 系	相 同	/	/	齿兰环斑	兰-108
	远 缘	白三叶草花叶 马铃薯X 仙人掌X	/	烟草花叶	烟草花叶
	无关系	/	白三叶草花叶 马铃薯X	/	/

从以上比较说明：“兰-60”与建兰花叶病毒，“兰-108”与齿兰环斑病毒，在粒体形状，大小，A260/A280，亚基分子量，鉴别寄主反应和稳定性方面相似，或趋势一致。在血清关系方面，“兰-108”与齿兰环斑的抗原性相同，与烟草花叶病毒远缘，从而在血清学方面也证明两者相似。“兰-60”、建兰花叶虽与同组一些病毒的血清关系有所差异，即文献报道建兰花叶与白三叶草花叶、马铃薯X无血清关系，而本试验用免疫电泳法证明有极远缘关系，这种差异很可能与试验方法的灵敏度有关，然而血清关系的趋势是一致的。根据以上比较，初步鉴定“兰-60”为建兰花叶病毒，“兰-108”为齿兰环斑病毒。

2. 建兰花叶和齿兰环斑病毒在我国栽培的兰花和从一些地区引进的兰花资源中普遍存

在。据对12个城市采集的180份病样以及从新加坡、泰国、菲列宾和荷兰等国引进的165份病样的检测结果表明：建兰花叶病毒单独侵染的病株超过一半，在国内病样中占55%，在引进病样中占53.33%；齿兰环斑病毒单独侵染的病株占10%左右，如在国内病样中占11.11%，引进病样占4.24%建兰花叶和齿兰环斑病毒复合侵染的病样占1/3，如国内占33.89%，引进的占43.42%。以上说明：无论国内或引进的兰花病株中，建兰花叶病毒最主要，约占一半；其次为建兰花叶和齿兰环斑复合侵染；两者之和约为90%；而齿兰环斑单独侵染的情况只有10%左右。

3. 侵染我国兰花的其它病毒尚待继续调查鉴定，弄清情况。据资料报道侵染兰花的病毒有10余种，除了这里报道的两种外，其余病毒在我国是否有发生，为害情况如何均有待进一步调查鉴定。我国兰花资源丰富，开发和出口大有前途，为此，加强检疫，防止危险病毒传出和传入。对我国发病严重的兰圃，以及患病严重的名贵品种应进行综合治理和抢救工作，以杜绝病害的继续恶化和名贵品种的丧失，所以，加强检疫和综合治理是保护我国兰花资源的两项急待开展的工作。

4. 兰花病毒病的检验。因为病株体内病毒浓度高，所以，在室内检验时，无论接种鉴别寄主、电镜观察和血清测定，均可获得较为可靠的结果。尤其在夏季气温在30℃左右时的检测效果更佳。这为检疫和防治提供了有利的条件。

参考文献

- [1] 朱本明等 (1983) 上海地区三种花卉病毒病 自然杂志1983(8) 639
- [2] 沈淑琳等 (1988) 新加坡热带兰病毒病检验简报 1988年7月21日
- [3] Francki, R.I.B. (1970) *Cymbidium mosaic virus*. Des. Pl. Viruses No. 27 1970
- [4] Goff, L.M. et al. (1974) A strain of Tomato ringspot virus associated with chlorotic mottle of *Cymbidium*. Proc. Am. Phytopathol. Soc. 1: 149, 1974
- [5] ——— (1977) Association of Tomato ringspot virus with a chlorotic leaf streak of *Cymbidium* orchids. Phytopath. 67(9) 1096-1100, 1977
- [6] Hollings, M. et al. (1963) *Cymbidium* ringspot (a previously undescribed virus). Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. for 1962, 90
- [7] Inoue, N. (1969) Cucumber mosaic virus isolated from *Dendrobium*. Nogaku Kenkyu 53(1-2) 49-60, 1969
- [8] Jensen, D.D. (1951) Mosaic or black streak disease of *Cymbidium* orchids. Phytopath. 41: 401-414
- [9] Jensen, D.D. et al. (1951) A virus ring spot of *Odontoglossum* orchid symptoms, transmission and electron microscopy. Phytopath. 41: 648-653
- [10] Magee, C.J. (1943) Orchid mosaic. Aust. Orchid Rev. 8(4) 51-52, 1943
- [11] Murakishi, H.H. (1950) Colour breaking of *Vanda* orchids. Bull. Pacific Orchid Soc., Hawai 9(1) 13-16, 1950
- [12] ——— (1952) A mosaic of *Vanda* orchids. Phytopath. 42: 178-182, 1952
- [13] Paul, H.L. (1975) *Odontoglossum* Ring Spot Virus. Des. Pl. Viruses No.

[14] 胡伟贞等 (1989) 建兰花叶, 齿兰环斑和藜草花叶病毒外壳蛋白电泳及其蛋白
亚基分子量测定 (摘要) 植物检疫研究报告 1990年3月, 20页

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MAIN ORCHID VIRUSES— CYMBIDIUM MOSAIC AND ODONTOGLOSSUM RING SPOT VIRUSES IN CHINA

Shen Shu-Lin Wang Shu-Qin Zhu Shui-Fang Shu Sui-Zen

Chen Yan-Fang Xu Hong-Guan Li Xiao-Qin

Abstract

Two isolates—"Orchid-60" and "Orchid-108" were isolated from infected *Cymbidium* sp. and *Vanda* sp. respectively. Both show mottle and necrotic spots in leaves.

"Orchid-60": Particles are filamentous, c. 418×14 nm, potexvirus, $A_{260} = 0.920$, $A_{280} = 0.704$, $A_{260}/A_{280} = 1.307$. Particles contain one type of protein subunit, M. Wt. 27600. Natural hosts are species of *Orchidaceae*, about 6 plant species in 35 plants have been infected experimentally by sap inoculation. It shows local lesions in *Cassia occidentalis*, *Chenopodium* spp., *Datura stramonium* and *Tetragonia expansa*. TIP 60–68°C, DEP $10^{-3} - 10^{-5}$, LIV 60–70 days at room temperature. "Orchid-60" is distantly related to PVX, WCMV, CVX. It is identified as *Cymbidium* mosaic virus.

"Orchid-108": Particles are rigid rods, c. $300 - 340 \times 20 - 21$ nm, tobamovirus. $A_{260} = 2.52$, $A_{280} = 2.188$, $A_{260}/A_{280} = 0.9835$. Particles contain one protein subunit that has M. wt. 17500. One kind of dsRNA can be detected on 0.8% agarose gels in TAE buffer. Species of *Orchidaceae* seem to be the only natural hosts, but about 12 plant species in 4 families have been infected experimentally by sap inoculation. It shows local lesions in *Chenopodium* spp., *Beta cicla*, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc and Harrow velvet, *N. glutinosa*, *Petunia hybrida*, *Tetragonia expansa* and *Gomphrena globosa*, systemic mottle only in *N. clevelandii*. TIP $> 93^\circ\text{C}$, DEP $> 10^{-18}$, LIV > 673 days (at room temperature). It is indistinguishable related with antiserum to ORSV and distant related to TMV in ISEM. It is identified as *Odontoglossum* ring spot virus.

Both viruses are widespread in China.



图1 兰花 *Patricia ward* 被齿兰环斑病毒 (ORSV) 侵染, 表现褪绿环斑

Fig.1 *Patricia ward* is infected by ORSV, it shows chlorotic ring spots

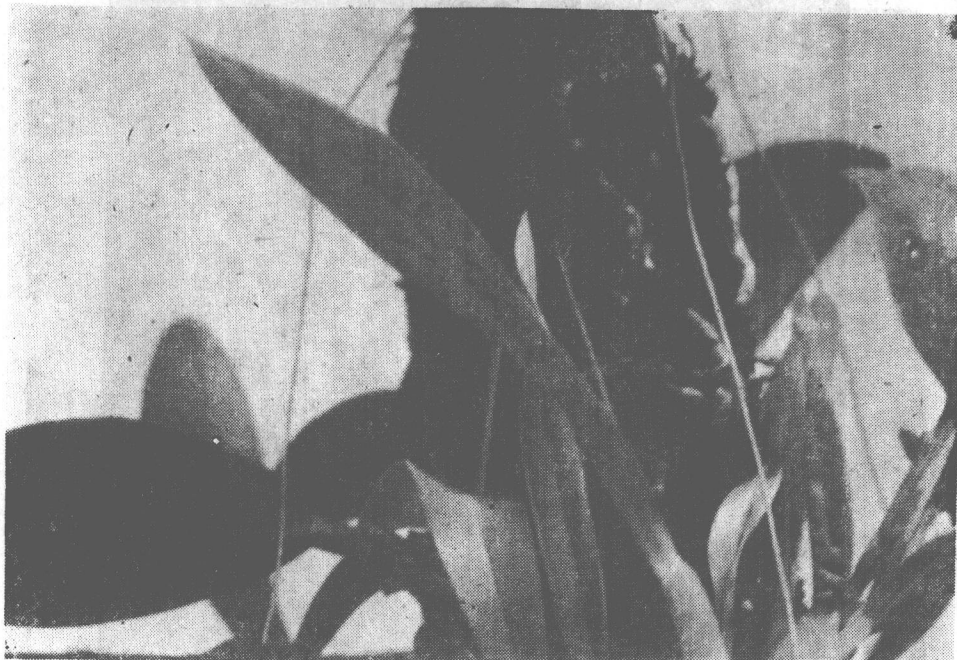


图2 *Oncidium*, 由建兰花叶 (CyMV) 和齿兰环斑病毒复合侵染, 病叶表现黑褐色坏死斑

Fig.2 *Oncidium* infected by CyMV and ORSV, produces necrotic lesions in leaves

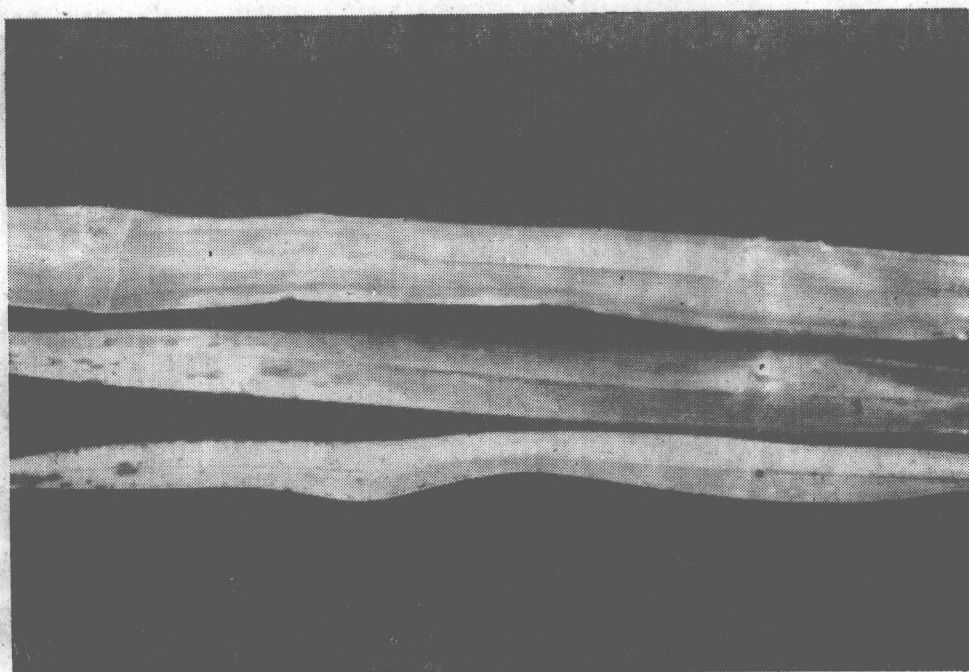


图3 墨兰被建兰花叶和齿兰环斑复合侵染的症状，叶片上产生褪绿环斑，斑驳和小坏死斑

Fig.3 Chlorotic ring spots, mottle and necrotic spots are produced in *Cymbidium sinense* infected by CyMV and ORSV



图4 建兰花叶和齿兰环斑病毒接种苋色藜，前者产生大而边缘模糊的局部褪绿斑或环斑，后者为针尖大小的局部褪绿小点

Fig.4 Local chlorotic spots (diameter c 2mm) (CyMV) and necrotic spots (0.3mm) (ORSV) in *Chenopodium amaranticolor*



图5 建兰花叶病毒接种曼陀罗 (*Datura stramonium*), 15—20天后出现局部坏死斑

Fig.5 Necrotic local lesions in leaves of *Datura stramonium* 15—20 days after inoculation with sap of CyMV



图6 齿兰环斑病毒接种 *Nicotiana tabacum* cv Xanthi-nc 5—7天, 出现局部坏死斑或坏死环斑

Fig.6 Local necrotic spots or ring spots in mechanically inoculated leaves of *N. tabacum* cv xanthi-nc 5—7days after inoculation with ORSV



图7 齿兰环斑病毒接种千日红，约5—7天产生局部红色坏死斑
Fig.7 Local red necrotic spots in *Gomphrena globosa* inoculated by ORSV

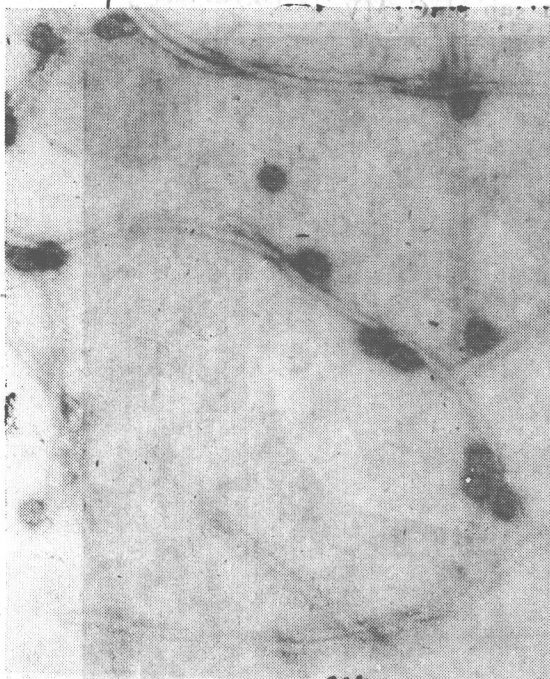


图8 建兰花叶病毒粒体，丝状（放大12万倍） $418 \times 14\text{nm}$ 和未鉴定的球状病毒
Fig.8 particles of CyMV, flexuous filaments and an unknown isometric virus

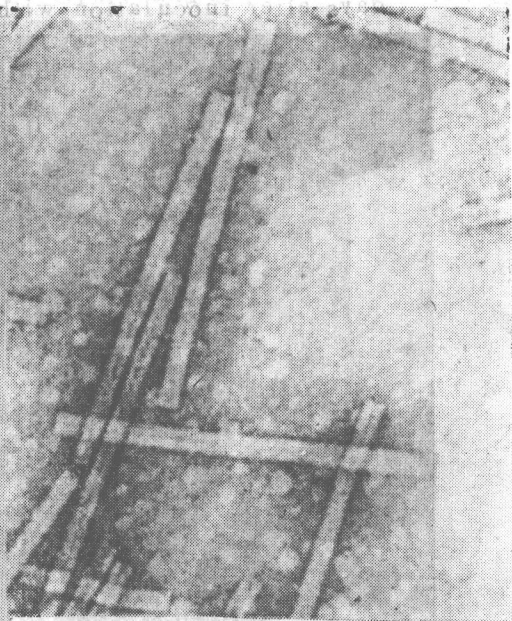


图9 齿兰环斑病毒粒体，直杆状（放大16万倍）， $300-340 \times 20-21\text{nm}$
Fig.9 Rigid rod particles of ORSV

从引进的病毒资源中截获一种重要种传病毒—藜草花叶

沈淑琳 李晓芹 朱水芳 陈燕芳 舒秀珍 王树琴 许宏冠

摘要 (Abstract)

1987年我所从匈牙利引进一支葡萄铬黄花叶病毒的冻干病组织, 随其繁殖寄主昆诺阿藜传入一种病毒。可经种子、蚜虫和汁液传播。寄主范围较窄, 人工接种40种或品种的植物, 只能侵染14种或品种。粒体等轴球状, 直径30—33nm。病毒在病汁中稳定, 致死温度大于98℃、稀释终点 $>10^{-17}$ 、体外存活期114—274天(室温)。在昆诺阿藜体内病毒含量高, 易提纯, 提纯得率为331mg/1000g病叶。 $A_{260}=2.755$; $A_{280}=1.866$; $A_{260}/A_{280}=1.476$ 。外壳蛋白含一种亚基, 亚基分子量为32100daltons。在琼脂糖电泳系统中可检测到2种dsRNA。免疫原性强, 抗血清效价为1/4096(琼脂双扩散法)。与葡萄保加利亚潜病毒等12种球状病毒无血清关系, 与藜草花叶病毒血清学完全相同。根据以上特性, 鉴定该污染病毒是藜草花叶病毒(Sowbane mosaic virus)。

一、引言(Introduction)

1987年我所从匈牙利引进一支葡萄铬黄花叶病毒(Grapevine chrome mosaic virus, 简称匈引GCMV)冻干病组织, 随其繁殖寄主昆诺阿藜传入一种传播极快的污染病毒。于1988年1—6月, 匈引GCMV在一间温室里繁殖时, 污染病毒便在该温室中传开, 至8月又在另一间从未接触过匈引GCMV的温室的昆诺阿藜上发现, 到次年2月止, 污染病毒已蔓延到6间温室, 将温室中检测葡萄、兰花、香石竹、小苍兰、唐菖蒲、菊花、鸢尾、水仙、仙人掌等9种植物的76份材料所使用的昆诺阿藜试验植物全部污染, 严重干扰了试验结果。为了弄清该污染物的种类和传染途径, 以防止其继续干扰温室的试验, 对它进行了系统鉴定, 本文报道鉴定的结果。

二、材料和方法 (Materials and Methods)

1. 毒株来源 1987年从匈牙利引进一支葡萄铬黄花叶病毒的冻干组织, 随昆诺阿藜病组织传入一种污染病毒, 该毒株定名为匈引GCMV。

2. 鉴定 按常规测定寄主范围、症状、稳定性、传播途径、提纯、外壳亚基分子量和dsRNA等, 方法详见结果。

Francki, I. R. B. 博士提供SoMV抗血清。本所血清室提供匈引GCMV, 并免疫制成抗血清。吕文学为试验摄影, 电镜室王锡折张广平大力支持, 崔秀珍、刘凤琴配合各项试验辅助工作, 在此一并致谢。

三、试验结果 (Results)

1. 寄主范围 (Host range)

汁液接种藜科、豆科和茄科等40种或品种的植物, 结果见表1。

表1(table 1) 寄主范围和症状(Host range and symptoms)

接种植物 (Plants inoculated)		症状(Symptoms)*
昆诺阿藜	<i>Chenopodium quinoa</i>	LC→MO (图1)
苋色藜	<i>C. amaranticolor</i>	LC→MO
墙生藜	<i>C. murale</i>	MO
菠菜	<i>Spinacia oleracea</i> cv. 诺维托	S
甜菜	<i>Beta vulgaris</i>	
	cv. AJ polycama	L
	cv. AJ poly ¹ / ₂ n+4n	L
菜豆	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	cv. 沙克沙	L
	cv. Topcrop	L
	cv. Monroe	L
蚕豆	<i>Vicia faba</i> cv. 成胡9号	L
	<i>Nicotiana debneyi</i>	L
番杏	<i>Tetragonia expansa</i>	L
千日红	<i>Gomphrena globosa</i>	L
千穗谷	<i>Amaranthus caudatus</i>	LN

*LN=局部坏死斑(Local necrotic spots)

LC=局部褪绿斑(Local chlorotic spots)

MO=斑驳(Mottle)

S=系统隐症感染(Systemic latent infection)

L=局部隐症感染(Local latent infection)

表1列出了“匈引GCMV”毒株的寄主范围和症状, 供试40种(或品种)植物中, 只感染14种或品种。在三种藜上为有症系统感染; 在千穗谷上为局部坏死斑; 菠菜为系统隐症感染; 其它均为局部隐症感染。

不感染的植物有: 长豇豆“黑种三尺” *Vigna sesquipedalis*, 豇豆“黑眼” *V. sine-*

nsis cv. Black eye, 菜豆 *Phaseolus vulgaris* 品种“家雀蛋”、“pinto”, 美国棉豆 *P. lunatus*, 蚕豆 *Vicia faba* 品种74082, 大豆 *Glycine max* 品种“合丰23”、“猴子毛”、“晋豆84”, 望江南 *Cassia occidentalis*, 普通烟 *Nicotiana tabacum* 品种“Harrow velvet”、“Xanthi-nc”、“White Burley”, 黄花烟 *N. rustica*, 心叶烟 *N. glauca*, 克里夫兰烟 *N. clevelandii*, 曼陀罗 *Datura stramonium*, 洋酸浆 *Physalis floridana*, 番茄 *Lycopersicon esculentum* “早粉2号”、“Momor”, 矮牵牛 *Petunia hybrida*, 商陆 *Phytolacca esculenta*, 金鱼草 *Antirrhinum majus*, 黄瓜 *Cucumis sativus* 品种“Apple crystal”, 罗勒 *Ocimum basilicum* 和 百日菊 *Zinnia elegans* 等26种。

综上所述结果来看, “匈引GCMV”毒株的寄主范围较窄, 且多半为局部隐症侵染。

2. 传染源 (Resources of infection)

为了寻找温室中迅速传开的传染源, 曾对试验用土、土中残株、供试昆诺阿藜的实生苗作了检测, 检测的试验植物为健康的昆诺阿藜幼苗, 分别接种各处理的浸渍液或研磨液, 以清水接种为对照。接种半个月后观察昆诺阿藜的症状, 均未见任何反应。说明试验用土、土中残株、昆诺阿藜实生苗都不是传染源。

随后, 对温室昆诺阿藜病株上的蚜虫 (未鉴定) 进行传病试验。将病株上蚜虫分两种处理进行接种。一为立即放在昆诺阿藜健苗上接种; 另一经1天饥饿, 再接种, 均1—5头/株。前者发病, 症状典型, 后者未发病。说明蚜虫是温室的传播介体, 作非持久性传病。蚜虫可以从正在试验的昆诺阿藜病株上将病毒传到健株。

蚜虫虽能传病, 毕竟温室的蚜虫很少, 还不足以说明病毒得以迅速传开。于是又进行了病株花粉传病的试验, 由于冬季短日照, 试验用的昆诺阿藜在6—7片叶时便开始开花, 花期很长, 常见许多黄色花粉散落在附近的植株上。病株花粉传病试验是人为将花粉抖到待接昆诺阿藜健株上, 按常规蘸清水摩擦沾有病株花粉的叶片, 对照用清水接种, 结果前者出现典型症状, 后者无反应。说明病株花粉是传染源之一。1989年初温室中繁殖数百盆“匈引GCMV”的昆诺阿藜病株, 病株花粉较多, 加上蚜虫防治不及时, 可能是温室中“匈引GCMV”迅速传开的原因。

3. 种传 (Transmission through seed)

人工接种的昆诺阿藜和苋色藜病株, 分别于1988年12月3日和1989年1月4日采收, 在室温下存放至1989年3月14日播种。于实生苗的子叶开展起观察症状。至2片子叶展平后随机取20株的一组, 每株取1片子叶, 研磨后接种健康昆诺阿藜。昆诺阿藜实生苗检测4组共80苗, 苋色藜检测5组共100苗, 结果是4组昆诺阿藜接种后有3组表现典型症状, 5组苋色藜接种后全部显症。同时, 各取昆诺阿藜和苋色藜的可疑症状的实生苗20株, 逐株接种昆诺阿藜, 检测病苗株数。结果接种的昆诺阿藜有4/20为病苗, 苋色藜为5/20发病。

种传苗的症状不明显, 尤其苋色藜更不明显; 据肉眼观察, 真叶长出后比子叶期症状明显, 但不一定都显症, 能肉眼辨别的症状有: 苗矮小, 子叶主脉附近有坏死凹陷纹, 真叶畸形 (图2) 和斑驳。昆诺阿藜的重病苗还表现萌芽推迟, 苗矮小, 子叶小, 个别子叶有沿脉的无定形坏死纹 (图3), 真叶畸形, 有褪绿斑块。症状轻微的病苗, 只表现不明显的褪绿小块。苋色藜的重病苗, 真叶略扭, 斑驳明显; 而轻病苗, 只表现小的褪绿点。

以上说明, “匈引GCMV”毒株可经昆诺阿藜和苋色藜种传, 种传苗有症或无症。