1982年 3 月
March 1982

植物检疫研究报告

TECHNICAL BULLETIN OF PLANT QUARANTINE RESEARCH

侵染大豆、桑的烟草坏死病毒研究

Ⅰ.病毒的分离和生物鉴定
Ⅱ.病毒的提纯及特性

Studies of Tobacco Necrosis Virus Infecting Soybean and Mulberry

Ⅰ.Isolation of Virus and Its Biological Identification
Ⅱ.The Purification of Virus and The Properties

农牧渔业部植物检疫实验所

Institute of Plant Quarantine
Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fishery
People's Republic of China

侵染大豆、桑的烟草坏死病毒研究*

Ⅰ. 病毒的分离和生物鉴定

舒秀珍　沈淑琳　王树琴　陈燕芳

摘　　要

1980年8月在武汉中国农科院油料研究所大豆试验田采到田间表现枯斑和花叶，人工接种大豆表现枯斑反应的毒株。

1981年3月在广东省顺德县力流公社桑园采到系统性退绿褐色环斑症状的桑苗毒株，人工接种大豆表现枯斑反应。

以上两毒株，经人工接种，在豆科、茄科、藜科、菊科、苋科、葫芦科、锦葵科、禾本科等14科37种寄主上，均产生圆形枯斑或围有小坏死斑，新叶无症。不侵染"绿珠"豌豆、决明、补骨脂、多花菜豆、芝麻、洋酸浆和白菜。

病毒稳定性：致死温度75—95℃，稀释终点10^{-9}—10^{-14}，体外存活期22—60天（室温）。

病毒提纯液在电镜下观察为直径约26mm等轴多面体病毒颗粒。

血清学测定用琼脂双扩散法与国外烟草坏死病毒抗血清反应产生明显的沉淀线。

根据以上生物测定，两毒株寄主范围较广，主要产生局部坏死斑反应，病汁液致死温度较高以及病毒提纯电镜观察，血清反应等特性与CMI/AAB Descriptions of Plant Virusse №14，1980所描述的烟草坏死病毒一致，鉴定该病毒是烟草坏死病毒。

前　　言

烟草坏死病毒（Tobacco Necrosis Virus，简称TNV），分布世界各地，一般发生于灌溉田和温室未消毒的土中，但我国尚未有报导。

Smith和Bold（1935年）[1]首次报导TNV在温室侵染烟草（*Nicotiana tabacum*）及心叶烟（*N. glutinosa*）幼苗和其他植物。烟草幼苗受侵可以致死，该病毒特点在所有接种的寄主植物上很少有系统性侵染，只产生局部坏死枯斑，病汁液病毒的致死温度为72℃，稀释终点约10^{-4}，体外存活期约20天，将其定名为"烟草坏死病毒"。

以后 Price 通过人工接种至少可侵染37科双子叶及单子叶植物。田间引起郁金香坏死，菜豆点线条、马铃薯块茎ABC病及一种黄瓜坏死病[2]。Klinkowski（1977年）报导，除能侵

* 承蒙广东省顺德县桑树病虫测报站邱永恒站长，陈康南和何惠芬同志以及中国农科院油料所王国勋等同志协助采集毒样，在此表示感谢。

本工作得到本所季良所长的指导，血清室提纯电镜鉴定，王欣贞和吴玢同志协助工作，特此一并致谢。

染一百多种草木植物外，还能侵染梨、柑桔、李、苹果、葡萄等木本植物[3]，而在我国广东省又首次发现在桑树上引起系统性退绿褐色环斑花叶病，在武汉田间采到侵染大豆的病叶。我们从大豆和桑树上采集的毒株分别进行了生物学性状鉴定。

材料和方法

1. 毒株

1980年8月在武汉中国农科院油料研究所试验田从不同品种大豆上采到表现坏死斑的病叶，人工接种猴子毛大豆均表现深褐色枯斑，从中选取毒株 S_M5306，经单斑分离，纯化作为毒源。

1981年3月在广东省顺德县力流公社桑园，采取系统性退绿褐色环斑花叶症状的桑苗，在温室人工接种大豆表现深褐色枯斑，毒源编号S_N10。

2. 寄主反应试验

供试寄主有豆科、茄科、菊科、藜科、锦葵科、番杏科、葫芦科、旋花科、唇形科、苋科、商陆科、玄参科、大麻科和禾本科等植物约30多种，接种苗龄视不同植物而异，豆科为2片单叶，茄科、菊科为4—5叶，藜科、番杏科、唇形科、旋花科为7—8叶，葫芦科、锦葵科为2片子叶，禾本科为2—3叶，其它科约为4—6叶。

3. 稳定性测定

用*Chenopodium quinoa*（昆诺阿藜）的接种叶，显症明显后，采下研磨过滤的病汁液作稳定性测定，测定寄主为昆诺阿藜或番杏(*Tetragonia expansa*)。

4. 血清测定

用中国科学院微生物所提供的国外烟草坏死病毒的血清，用琼脂双扩散法测毒株的血清亲缘关系。

整个试验从1980年12月至82年3月均在温室进行，夏天最高温达35—37℃，冬天最低温10—13℃，一般为20—30℃。

试验结果

1. 寄主反应

该病毒寄主较广，汁液接种可以侵染14科37种植物。一般接种3—5天产生局部圆形枯斑或围以小坏死斑，有些寄主植物的坏死斑发展快，病斑可愈合成大枯斑或沿叶脉变色坏死呈网状，病叶很快干枯脱落，新叶无症。而有些寄主植物坏死斑发展较慢，叶片不易干枯脱落。所接寄主均未发现系统侵染。

此外，两毒株接种“绿珠”豌豆、决明、补骨脂、多花菜豆、芝麻、洋酸浆和白菜均不表现症状。

现将两毒株的寄主反应列表如下。

表 1　两毒株的寄主反应

鉴别寄主	$S_{M}5306$	$S_{N}10$	症状描述
Glycine max（大豆）品种：猴子毛，合丰23，晋豆84，一齐黄，吉林14等。	LN	LN	接叶3—4天后出现局部圆形深褐色坏死斑，以后病斑扩大互相愈合，10天后病叶干枯脱落。有时可沿叶基部传至邻叶脉发生坏死或产生枯斑，叶柄变褐。
Phaseolus vulgaris（菜豆）品种：Topcrop，Processor，家雀蛋，丰收一号，66—13。	LN	LN	接叶3—4天后，出现圆形或不定形褐色坏死斑（0.5～1mm），病斑扩大可沿叶脉变色坏死呈网状，8—10天后病叶干枯脱落。
P. coccineus（多花菜豆）	O	O	无　症
P. aureus（绿豆）品种：M7A．高阳绿豆	LN	LN	接种叶3—4天出现圆形紫褐色坏死斑（0.5—2mm），发展极慢。
Vigna sesquipedalis（长豇豆）品种：Black eye．红咀燕、黑种三尺	LN	LN	接叶3—4天出现紫褐色斑（1—2mm），病斑扩大可沿叶脉变色坏死呈网状，10天左右病叶干枯。
Vicia faba（蚕豆）品种：成胡9号	LN	LN	接叶5天出现针头大小红点，以后成紫红色圆形斑点，发展较慢，不易干枯。
V. villosa（冬箭舌豌豆）	O	LN	接叶5天出现0.5—1mm褐色坏死斑，病斑发展慢。
Lathyrus odoratus（香豌豆）	O	LN	接叶3天出现灰褐色近圆形坏死斑，10天后约2mm。
Dolichos lablab（扁豆）品种：白扁豆、黑扁豆	LN	LN	接叶4天出现紫褐色坏死斑，四周黄色晕圈
Cyamopsis tetragonoloba（瓜尔豆）	LN	LN	接叶3天出现褐色圆形坏死斑（0.5mm），一周后枯斑3—4mm
Pisum sativum（豌豆）品种："绿珠"豌豆	O	O	无　症
Phaseolus angularis（红小豆）品种："大纳言"红小豆	LN	O	接叶出现针头大小局部枯斑

鉴别寄主	S_M5306	S_N10	症状描述
C. album (藜)	LC—LN	LN	接叶第3—4天出现退绿点，以后成褐色坏死斑。
C. ambrosioides (土荆芥)	LC	LC—LN	同上
Cucumis sativus (黄瓜) 品种"192"，长青黄瓜。	LC—LN	LC—LN	接种子叶3天出现不规则退绿斑，以后呈灰绿色或灰褐色。
Physalis peruviana. (洋酸浆)	O	O	无症
Brassica chinensis (白菜)	O	O	无症
Zea mays (玉米) 品种：中国野鸡红，罗马利亚31，Golden Banten	LN	LN	接叶尖端先枯黄，二周后枯黄 $^1/_3$—$^1/_2$，以后蔓延整叶干枯。

LC：局部退绿斑，　　LN：局部枯斑，　　O：无症

2. 稳定性

两毒株稳定性测定结果如表2。

表2　两毒株的稳定性

毒株	测定日期	繁殖寄主	测试寄主	致死温度	稀释终点	体外存活天数	室温
S_M5306	81.6.4	昆诺阿藜	昆诺阿藜	75—80℃	10^{-10}	22	23—29℃
	82.1.21	〃	番杏	90—95℃	10^{-14}	59	13—23℃
	82.2.13	〃	〃	95℃	10^{-14}	42	16—23℃
S_N10	81.10.29	〃	昆诺阿藜	85—90℃	10^{-9}	25	13—24.5℃
	81.11.9	〃	番杏	85—90℃	10^{-10}	60	14—22.5℃
	82.2.3	〃	〃	95℃	10^{-14}	29	16—23℃
TNV				85—95℃	10^{-4}～10^{-6}	数月	20℃

需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

从上表两毒株测定结果，S_M5306毒株致死温度 75－95℃，稀释终点 10^{-10}—10^{-14}，体外存活期22—59天。S_N10毒株致死温度85—95℃，稀释终点10^{-9}—10^{-14}，体外存活期 25—60天。

从以上结果表明，两毒株的稳定性与TNV基本相似。

3. 血清关系[4]

用琼脂双扩散法，国外烟草坏死病毒抗血清与S_M5306毒株提纯液和S_N10毒株的病汁液均呈阳性反应，S_N10 的抗血清又与S_M5306 提纯液呈阳性反应。表明两毒株的血清学是相同的，均为烟草坏死病毒。

4. 病毒粒体的形态

根据本所和微生物所[4] 对两毒株病汁液提纯物进行电镜观察结果，在电镜下见到大量直径约26毫微米等轴多面体病毒颗粒，与TNV相同。

讨论和结论

根据以上试验，第一，这两毒株可侵染多种植物，形成局部坏死斑。第二，本病毒致死温度75—95℃，稀释限点10^{-9}—10^{-14}，体外存活期22—60天(室温)。第三，病毒粒子为26毫微米的等轴多面体。

以上三点均与Smith and Bald (1935年)[1]，CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No.14 (1980年) [2]及M.Klinkowski (1977年) [3] 等人关于 TNV的有关报导相同，而且与国外的烟草坏死病毒抗血清有明显的阳性反应，因此可确定为烟草坏死病毒。

Klinkowski (1977)报导的TNV的自然发病的寄主中沒有桑和大豆，现我们从桑及大豆中分离出这一病毒，值得特别注意。我们分离的两个毒株在鉴别寄主上的反应基本相同，只是在少数个别植物上略有不同。如采自桑的毒株 S_N10 在冬箭舌豌豆、香豌豆、翠菊上为明显的局部坏死斑，而采自大豆的毒株 S_M5306在这些植物上未显示症状。S_N10在苋色藜、昆诺阿藜上为坏死斑，而S_M5306则有时表现退绿斑。在两毒株分别同时接种同一类鉴别寄主时，Sn10表现发病早，枯斑多，病重，而 S_M5306则表现发病稍晚，枯斑少，病轻。因此，S_N10的致病力似乎较强些。但鉴于两个毒株沒有重大区别，所以，基本上还是同一株系。

鉴于本病毒可经一些木本植物如柑桔、苹果、梨、李、葡萄和桑的苗木传播，又可随同芸苔油壶菌 (*Olpidium brassicae*) 的游动孢子进行土壤传播，一旦传入新的地区，极难根除。而在国内又发现可在田间为害大豆及桑等重要作物，因此，应进一步调查本病毒的发生分布为害情况，对病区采取检疫措施，以防止病害蔓延。

鉴定时建议用猴子毛大豆 (*Glycine max*)，洋麻 (*Hibiscus cannabinus*) 或棉花 (*Gossypium hirsutum*)，烟草 (*Nicotiana tobacum* "white Burley"或*N.rustica*) 等鉴别寄主并结合血清等进行检测。

参考文献

〔1〕 Smith and Bald.Parasitology vol.27.№2.232—246，1935年.

〔2〕 CMI/AAB Deseriptions of Plant Viruses №14.1970年 9 月版.

〔3〕 M.Klinkowski.Pflanzliche Virologie 2:318-322 1977年.

〔4〕 胡伟贞等.«侵染大豆及桑的烟草坏死病毒研究Ⅱ.病毒的提纯及特性». 植物检疫

Studies of Tobacco Necrosis Virus Infecting Soybean and Mulberry
I. Isolation of Virus and Its Biological Identification

(Shu Suizen Shen Shulin Wang Shuqin Chen Yanfang)
(Institute of Plant Quarantine, Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fishery)

Abstract

A isolate of virus showed necrotic spots on soybean in the field. It showed necrotic symptom when inoculated onto soybean. It was collected from the soybean field of the Institute of Oil Crops, Chinese Agricultural Academy in Wuhan in August of 1980.

Another isolate showed systemic chlorotic ring spots symptom on mulberry. It showed necrotic spots when manually inoculated on soybean was collected from the mulberry orchard of Liliu commune, Shunde county of Guangdong province in March of 1981.

These two isolates were inoculated on 37 species that belong to 14 families (e.g. Leguminosae, Solanaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Amaranthaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae and Graminaceae). The symptoms produced on those hosts were necrotic round spots or surrounding small necrotic spots no systematic symptom on new leaves, They did not infect the *pisum sativum* variety "Lu Zhu", *P. coccineus, Cassia tora, Psoralca corylifolia, Sesamum indicum, physalis peruviaua* and *Brassica chinensis*.

TIP 75-95℃, DEP 10^{-9}—10^{-14}, LIV22—60 days (room temperature).

The purified virus was shown as isometric polyhedron particels with the diameter about 26 nm.

It reacted to the antiserum of tobacco necrosis virus. It showed clear precipitating line by the agar double diffusion method.

Based on the above biological tests, these two isolates showed wide host range, and produced mainly the local necrosis, the high temperature of inactivation and the morphology of particles, the serological reactions etc. They were like the tobacco necrosis virus recorded on CMI/AAB Descriptions of plant Viruses No.14.1980. So that these two isolates were identified both as tobacco necrosis virus.

侵染大豆、桑的烟草坏死病毒研究

Ⅱ、病毒的提纯及特性*

胡伟贞　王　洋

（农牧渔业部植物检疫实验所）

邱并生　马德芳　田　波

（中国科学院微生物所）

摘　要

从桑（*Morus alba*）及大豆（*Glycine max*）上分离的二个病毒毒株繁殖在黄花烟上。病叶加蒸馏水匀浆，抽提液纱布过滤，50—55℃热处理5分钟，低速离心去渣，接着二次差速离心提纯病毒。提纯的病毒制剂含有直径约26nm的等轴多面体病毒颗粒，紫外测定具有典型的核蛋白吸收曲线。最高吸收值在260nm，最低在240nm。其抗原性与烟草坏死病毒相同。根据上述特性以及生物鉴定结果[2]，证明它们都是烟草坏死病毒。

据文献报导，烟草坏死病毒 Tobacco necrosis virus（简称TNV）广泛分布于世界各地，但我国国内还未见报导。植检所病毒室于1980年，1981年从大豆和桑上分别分离出二个病毒，经纯化后发现此二种病毒寄主范围较广，症状多为局部枯斑，而且病汁液致死温度和稀释限点很高，初步认为是烟草坏死病毒。在此基础上，我们进行了病毒提纯，病毒粒体形态观察以及血清学鉴定等工作。

材料和方法

一、毒源

由植检所病毒室提供：1.从桑（*Morus alba*）病叶中分离的毒株，编号为 S_N10；2.从大豆（*Glycine max*）病叶上分离的毒株，编号为S_M5306[2]。经分离纯化后，分别用摩擦接种的方法接种在黄花烟（*Nicotiana rustica*）上，在防虫温室里繁殖，待出现枯斑症状时，采收病叶，置于－20℃低温冰箱中保存备用。

二、提纯方法[1]

每100克鲜病叶加200毫升蒸馏水（内含0.1%巯基乙醇），在（D、D，5—300型）组织捣碎机中研碎，匀浆液用二层纱布过滤。滤液经50—55℃热处理5分钟，（Beckman JA-21）高速离心机5000转/分，离心20分钟，取上清液。上清液经二次差速离心，超速（Beckman L8-80型）33000转/分（Ti45转子）离心2小时，高速（JA-21）8000转/分，离心10分钟，最后沉淀用蒸馏水（内含0.1%巯基乙醇）悬浮，用（Beckman JA-21）8000转/分，离心10分钟，上清液即为病毒提纯液，供电镜观察，紫外吸收光谱测定以及作免疫抗原用。

* 此工作是在农牧渔业部植检所季良研究员指导下进行的，并承审定文稿，特此致谢。

三、电镜观察

将上述提纯的病毒制剂适当稀释后，滴一滴在予先铺有Formvar膜的铜网上，用2%醋酸氧铀负染，置日立H-500电镜下观察。

四、血清学鉴定

取上述提纯的S_N10病毒制备的抗血清及国外烟草坏死病毒抗血清，用琼脂双扩散方法进行鉴定。

五、回接试验

将提纯的病毒制剂用蒸馏水适当稀释后，用摩擦接种的方法，接到番杏（*Tetragonia expansa*）上，半叶接提纯液，半叶接病汁液，在防虫温室中观察。

结　　果

一、提纯方法的研究

1. *抽提缓冲液的选择*

用蒸馏水、0.1M 磷酸缓冲液、0.1M 硼酸缓冲液以及0.1M 柠檬酸缓冲液（以上四种溶液中都含有0.1%巯基乙醇）抽提，其匀浆液做回接试验。结果以蒸馏水产生的枯斑最多，柠檬酸、磷酸缓冲液次之，而硼酸缓冲液产生的枯斑最少如（表1）。

（表1）　提纯时不同的缓冲液对病毒侵染性的影响

缓冲液 \ 枯斑数 \ 稀释倍数		10			1000		
		重复一	重复二	平均	重复一	重复二	平均
蒸馏水	pH5.5	178	365	272	235	335	285
0.1M磷酸缓冲液	pH7.4	160	125	143	82	114	98
0.1M硼酸缓冲液	pH7.4	51	53	52	43	27	35
0.1M柠檬酸缓冲液	pH6.5	181	87	134	124	102	113

2. *澄清剂的选择*

去除寄主蛋白采用加10%正丁醇；加1/3氯仿以及50—55℃热处理5分钟三种方法，澄清效果都很好，而且对病毒侵染性影响都不大。用温度处理较为方便又节约，所以我们采用50—55℃热处理5分钟的方法。

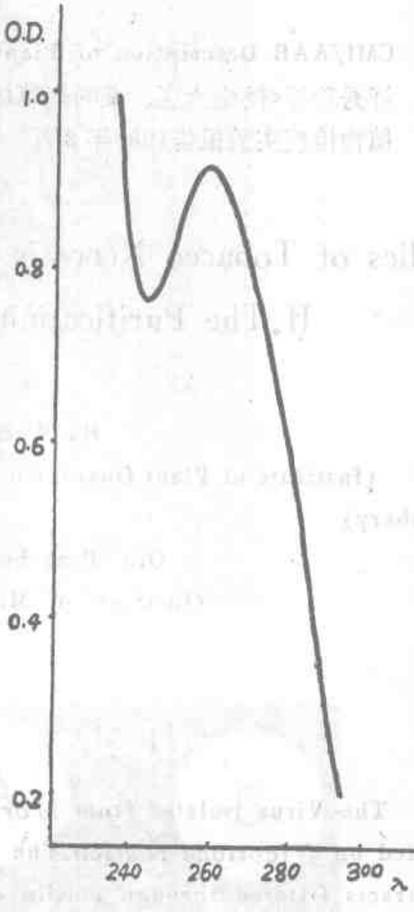
3. *病毒沉淀悬浮液的选择*

最后一次超离心病毒沉淀悬浮在蒸馏水中比较稳定，而用缓冲液悬浮后放置，易产生沉淀，可能是溶液中离子强度高对病毒有影响，因此病毒沉淀采用蒸馏水（内含0.1%巯基乙醇）悬浮为好。

二、提纯病毒制品紫外吸收光谱测定

用上述方法提纯的病毒制品，适当稀释后经（HITACHI-320）分光光度计紫外扫描，呈

现出典型的核蛋白吸收曲线，其最高吸收值在波长260nm，最低吸收值在波长240nm。A260/280为1.5，见右图。与国外文献报导260/280为1.7相近。



S_N10提纯液紫外吸收曲线图

三、病毒粒体电镜观察

S_N10 和S_M5306 提纯病毒制剂适当稀释后，电镜下均能观察到大量直径约 26nm 的等轴多面体病毒粒体(图 1)。与国外文献报导的TNV病毒粒体形态和大小相同。[1]

四、血清学鉴定

用琼脂双扩散方法鉴定，S_N10 和 S_M5306 两个毒株与国外 TNV 抗血清反应均产生明显的沉淀线。S_N10 抗原孔与其相应的抗血清以及国外 TNV 抗血清孔间产生的沉淀线相愈合，说明其抗原性相同(图 2)。S_N10与S_M5306沉淀线也相愈合(图 3)，说明 S_N10 和 S_M5306 两个毒株的抗原性也完全相同，均与 TNV有相同的抗原性。

五、提纯病毒制品回接试验

提纯液稀释到原体积，回接到番杏（*Tetragania expansa*）上，两天以后在叶片上出现很多枯斑，提纯液的枯斑数多于对照（病汁液）。(表 2)

回接试验说明用本文的提纯方法提取的病毒有侵染性。

根据上述特性以及生物鉴定结果[2] 与国外文献报导的 TNV一致，[1] 所以认为 S_N10 和S_M5306都是烟草坏死病毒。

（表 2）　提纯液与病汁液接种比较

接种日期：1982年 3 月 1 日

观察日期：1982年 3 月 3 日

	枯斑数（个）		平均枯斑数	提纯液与病汁液枯斑%
	重复一	重复二		
提纯液	172	86	129	224.3
病汁液	89	26	57.5	

参考文献

1. CMI/AAB Description of Plant Virus (1970)№14.
2. 舒秀珍等《侵染大豆、桑的烟草坏死病毒的研究 I.病毒的分离及生物鉴定》(1982) 植物检疫实验报告1982年3月

Studies of Tobacco Necrosis Virus Infecting Soybean and Mulberry
II. The Purification of Virus and the Properties

Hu Weizhen   Wang Yang

(Institute of Plant Quarantine, Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fishery)

Qiu Bingsheng   Ma Defang   Tian Bo

(Institute of Microbiology, Academia Sinica)

Abstract

The Virus isolates from *Morus alba* and *Glycine max* isolated were propagated on *Nicotiana rustica*. The infected leaves were blended in distilled water, extracts filtered through muslin and the sap heated for 5′at 50-55℃ then passed through low-speed centrifugation discarded pellet, followed by two cycles of differential centrifugation. The virus particles in this preparation were isometric about 26nm in diameter. Ultraviolet absorption spectra showed the typical nucleoprotein at 260nm(max) and 240nm(min). They had the same antigenicity with TNV. By these characteristics togeher with the reaction of biological identification, they were recognized as Tobacco necrosis virus.

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com