

新疆花椰菜花叶病毒 (63-3 毒株) 的初步研究

谢 浩 李 树 兰

(新疆维吾尔自治区五家渠农垦局农业研究所, 五家渠)

李维琪 尼 沙 李玉贞

(新疆维吾尔自治区化学研究所, 乌鲁木齐)

1963 年在新疆石河子的甘蓝留种植株分离到的病毒 (63-3), 鉴定为花椰菜花叶病毒的一个毒株: 致死温度 75—80℃, 体外存活期 7—14 天, 稀释限点 1:3000—5000, 寄主范围限于十字花科植物。甘蓝上初呈明脉, 后期病状隐蔽; 花椰菜上是明脉; 大白菜和萝卜上是明脉和枯纹。病毒是球状, 直径 50 毫微米。桃蚜和甘蓝蚜可传病。63-3 (花椰菜花叶病毒), 和新疆的孤丁一号 (芜菁花叶病毒), 新疆的萝卜环斑病毒 (萝卜花叶病毒) 的抗血清之间无反应, 三者之间也没有相互保护作用。

十字花科蔬菜上, 我国未见报道花椰菜花叶病毒。我们在 1963 年新疆石河子的甘蓝留种植株上分离到一个毒株, 接种在甘蓝和花椰菜上出现系统的明脉病状, 和孤丁一号、萝卜环斑病毒所致病状显然不同, 因此进行了有关这个毒株 (编号为 63-3) 的特性的初步研究。

材料与方法

把甘蓝留种植株上的毒原用 600 筛目金刚砂汁液摩擦接种在大白菜、甘蓝和花椰菜上, 先后转接多次分别出现相似病状; 又把体外贮存七天的毒原汁液接种于千日红、大白菜和花椰菜上, 不侵染千日红, 仅在大白菜和花椰菜上出现典型的、稳定明脉病状 (图版 1-2、3) 作为纯化的毒原, 保存在油青菜上备用。

供试的各种寄主都培育在防虫温室内, 于 2—3 叶期接种。用“杜宁”小室装带毒蚜, 在健苗上进行传毒实验, 饲毒和传毒时间都是 24 小时。

用 Day 和 Venables (1960) 的方法^[1]提取病毒, 供电镜观察和制备抗血清。

结 果

(一) 病毒的抗性测定

用接种后感病的油青菜叶汁, 装在小试管内, 放置在 22℃ 恒温箱内 1—16 天, 在不同的温度 55、60、65、70、75、80、85℃ 水浴锅内保温 10 分钟, 又以不同稀释度 (1:500, 1:1000, 1:3000, 1:5000, 1:10000) 分别接种油青菜健苗 12 株, 观察 40 天; 这三种实验重复 2—4 次。结果是: 63-3 毒株的致死温度为 75—80℃, 稀释限度在 1:3000 与 1:5000 之间, 体外存活期在 7—14 天之间。

(二) 病毒的寄主范围及病状

测定了 7 个科的植物共 21 种, 都在温室内接种, 这种测定实验重复 2—3 次, 均观察 40 天, 结果见表 1。63-3 毒株只能侵染十字花科所试的 7 种, 不能侵染藜科、

本文于 1977 年 12 月 20 日收到。

生物鉴定得到胡吉成先生指导。周家炽先生和田波同志审阅并修改稿件。

表 1 63-3 毒株侵染十字花科植物出现的病状

接 种 的 植 物	病 状	潜育期(天)
甘 蓝 (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)	系统明脉	14—18
大白菜 (<i>B. pekinensis</i> Rupr.)	系统明脉, 又有淡褐色枯纹, 叶片一般不皱缩	10—14
油青菜 (<i>B. chinensis</i> L.)	明脉花叶, 有枯斑或枯纹, 叶片很少扭曲或皱缩	9—13
芥 菜 (<i>B. juncea</i> var. <i>napiformis</i>)	明脉花叶, 有枯纹, 后期病状不明显	7—10
花椰菜 (<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>)	系统明脉, 偶有扭曲和枯纹	15—20
苤 蓝 (<i>B. oleracea</i> var. <i>caulorapa</i>)	明脉花叶, 微皱缩, 后期病状不明显	15
萝 卜 (<i>Raphanus sativus</i> L.)	明脉花叶, 有枯纹	15—20

表 2 63-3 病毒、萝卜环斑病毒和孤丁一号病毒的相互保护作用的实验

接 种 寄 主	病 毒 组 合	发病株数/第二次接种株数	第二次接种后又出现的病状
	已感染的病毒: 第二次接种的病毒		
油 青 菜	63-3病毒: 萝卜环斑病毒	4/9	萝卜环斑病毒*
油 青 菜	萝卜环斑病毒: 63-3病毒	6/9	63-3病毒
大 白 菜	孤丁一号病毒: 63-3病毒	5/9	63-3病毒
甘 蓝	63-3病毒: 孤丁一号病毒	5/9	孤丁病毒*

* 又在千日红上验证。

苋科、茄科、菊科、葫芦科和豆科的 14 种植物(菠菜、千日红、假酸浆、蔓陀罗、番茄、普通烟、三生烟、38 号烟、心叶烟、百日菊、茼蒿、甜菜、黄瓜、豇豆)。

(三) 病毒形态初步观察

用汁液接种后感病的大白菜叶片, 参照 Day 和 Venables (1960) 的方法^[1]提取病毒, 电镜观察两次, 病毒是球状的, 直径 45—55 毫微米, 60% 以上为 50 毫微米, 见图版 I-4。

(四) 蚜虫传毒实验

桃蚜(*Myzus persicae*)——吉林省公主岭进行和甘蓝蚜(*Brevicoryne brassicae*)——新疆石河子进行分别繁殖在健康大白菜上, 之后分别将无毒蚜移到汁液接种后感病的油青菜上饲毒 24 小时, 再分别移到 2—3 叶期的健康大白菜苗上接毒 24 小时。每苗分别接毒蚜 10、5、3、1 头, 各处理接

种 12 苗; 实验重复两次。接毒 24 小时后灭蚜, 又通过汁液接种验证。结果桃蚜和甘蓝蚜都能传病, 传病株率分别为 100%、87.5%、62.5%、25% 和 87.5%、91.6%、54.2%、29%。

(五) 相互保护作用实验

利用两种病毒在同一株寄主植物上出现不同病状, 进行了 63-3 病毒、萝卜环斑病毒、孤丁一号病毒各种组合的相互保护作用的实验。在已感染了一种病毒的寄主上再接种另一种病毒, 观察第二种病毒所致病状能否出现。从表 2 可见这三种病毒并不能产生相互保护的现象。

(六) 病毒的血清学实验

1963 年我们做过抗原粗制备, 未能再重复。最近我们又进行了这方面的工作。

粗制备: 用病状明显的叶, -4°C — -6°C 冰冻 24 小时, 解冻, 研碎, 把纱布滤

表 3 63-3 病毒提纯制备的抗血清的滴定*

测定法	反应抗原	抗血清稀释度								
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
试管反应 ¹	感病大白菜提纯制品**	+++	+++	++++	++++	++++	+++	+	+	-
	感病花椰菜粗制品***	+++	+++	++++	++++	+++	++	+	±	-
玻片反应 ²	感病大白菜提纯制品**	+++	+++	++++	++	+	-	-		
	感病花椰菜粗制品***	+++	+++	+++	++	+	-	-		

注: 1. ++++: 沉淀快,集中在管底,上层液清; +++: 沉淀快,上层液混; ++: 沉淀慢,上层液混; +: 沉淀慢又少,上层液混; ±: 反应不清楚; -: 无反应。

2. ++++: 凝集快,成大片; +++: 凝集快,成片小; ++: 凝集慢,片小; +: 凝集慢; ±: 反应不明显; -: 无反应。

*: 健血清和感病大白菜或花椰菜粗制品之间,抗血清和健康大白菜或花椰菜对照之间,都无反应。

** : 稀释 8 倍。

***: 未稀释。

出的汁液,在 54℃ 左右的恒温水浴锅内处理 5 分钟,冷却后离心除去杂质,用上清液作反应抗原。

又参照 Day 和 Venables (1960) 的方法^[1]进行了制备。用接种后感病的大白菜病状明显的叶,去叶脉,把叶肉捣成浆,通过三层纱布滤出汁液,在 58℃ 恒温水浴锅内处理 10 分钟,离心 15 分钟除去杂质,在上清液中加聚乙二醇使病毒沉淀,又把沉淀物溶解在 0.01M 磷酸缓冲液中,再离心,留上清液,再重复以上操作一次。最后所得上清液作为提纯后的病毒液制备抗血清。

用大小约 2 公斤的家兔,耳静脉注射共 8 次。前 5 次每隔一天注射一次,共 6 毫升。后 3 次每隔 5 天注射一次,共 4 毫升。加佐剂 3 毫升振摇成乳化液后注射。在最后一次注射后的第九、十天取血得抗血清。

用试管(口径 7 毫米)反应和玻片点滴反应,测抗体效价和专化性;用玻片点滴反应测田间病株率。试管反应在 40℃ 左右 2 小时后看结果,24 小时后复查,重复三次。玻片反应在室温 2—5 分钟看结果,重复 5 次。结果见表 3。试管反应滴度在

256—512 之间,玻片反应滴度在 32—64 之间,不如试管反应敏感。

63-3 病毒提纯制备的抗血清只能对该病毒有反应,对孤丁一号病毒和萝卜环斑病毒都无反应,有专化性。

为利用抗血清测田间发病率,我们采集病状明显的大白菜 20 株,甘蓝 10 株,以及并无病状的大白菜 30 株,甘蓝 20 株,用玻片反应法进行了测定;所用 63-3 病毒抗血清稀释度是 1:16。表 4 实验结果表明,即可测定病状明显的,又可测定病状隐蔽的带病毒的植株。

表 4 63-3 病毒抗血清田间测定

田间病状	大白菜	甘蓝
病状明显植株	20/20(100%)	10/10(100%)
无病状的植株	4/30(13.3%)	3/20(15%)

讨 论

Pound 和 Walker (1945)^[2] 根据病毒的致死温度和寄主范围,将十字花科蔬菜的病毒分为芜菁花叶病毒类群(致死温度 55—65℃,寄主范围不限于十字花科植物)和花椰菜花叶病毒类群(致死温度 70—

表 5 63-3 病毒与有关病毒比较

病毒名称	报告人	病毒抗性			寄 主 反 应												
		稀 释 限 点 (1 倍)	失 毒 温 度 (°C)	体 外 存 活 期 (天)	甘 蓝	花 椰 菜	苜 蓿 蓝	大 白 菜	萝 卜	普 通 烟	心 叶 烟	黄 瓜	番 茄	菠 菜	茼 蒿	百 日 菊	豇 豆
甘蓝B病毒	Walker 1945	1:5000	75	6	S	S	S	S	S	O	O	O	O	O	-	-	-
花椰菜花叶病毒	Tompkins 1937	1:3000	75	15	S	S	S	S	S	O	O	O	O	O	-	-	-
花茎花椰菜花叶病毒	Caldwell 1942	1:3000	80	8	S	S	S	S	O	O	O	O	O	O	-	-	-
大白菜花叶病毒	Tompkins Thomas 1938	1:6000	75	4	S	S	S	S	S	L	L	O	O	O	-	-	-
花椰菜花叶病毒	栢原比吕志 1960	1:2000— 10000	75— 80	25— 35	S	S	S	S	S	O	O	O	-	O	O	O	O
63-3病毒	作者	1:3000— 5000	75— 80	7— 14	S	S	S	S	S	O	O	O	O	O	O	O	O
孤丁一号	裴维蕃 1963	1:3000— 5000	55— 60	2—4	S	S	-	S	-	L	S	O	O	S	-	S	-
白菜枯纹病毒	胡吉成 1964	1:3000	75	3—4	S	S	-	S	S	L	O	O	O	S	-	S	-
萝卜环斑病毒	胡吉成 1963	1:2000— 10000	65	16— 19	S	S	S	L	S	O	O	O	O	S	O	O	-

注: S——系统侵染; L——局部侵染; O——不侵染; ——未接试。

80°C, 寄主范围限于十字花科)。与文献对照, 新疆的 63-3 病毒似是花椰菜花叶病毒类群, 见表 5。虽然我国胡吉成等(1964)^[3]报道的白菜枯纹病毒的致死温度和部分寄主反应与 63-3 病毒近似, 但体外存活期短, 尤其球状病毒较大(直径70毫微米)^[4]。63-3病毒的形态与 Day 和 Venables(1960)^[1]以及栢原比吕志(1960)^[5]的花椰菜花叶病毒近似。

Thomas (1960)^[6]制备的花椰菜花叶病毒的抗血清效价是 1:512, 比本实验的高。我们比较 63-3 病毒、萝卜环斑病毒和孤丁

一号病毒的相互保护反应也证明了 63-3 病毒抗血清的专化性。玻片反应虽不如试管反应敏感, 但也可应用。

参 考 文 献

- [1] Day, M. F. and D. G. Venables: *Virology*, 11:502, 1960.
- [2] Pound G. S. et al.: *J. Agr. Res.*, 71:255, 1945.
- [3] 胡吉成等: 植物保护学报, 1:25—34, 1962.
- [4] 裴美云、湛章群: 微生物学报, 13:81—82, 1973.
- [5] 栢原比吕志: 日本植物病理学会报, 25:185—192, 1960.
- [6] Thomas, H. R.: *Nature*, 186:656—657, 1960.

A PRELIMINARY STUDY OF CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS STRAIN 63-3

Xie Hao

Li Shu-lan

(The Agricultural Institute of Wujiaqu, Xinjiang Uygur Autonomons Region, Wujiaqu)

Li Wei-qi

Ni Sha

Li Yu-zhen

(The Chemical Institute of Xinjiang Uygur Autonomons Region, Ürümqi)

A virus strain 63-3 was isolated from *Brassica oleracea* var. *capitata* in the year 1963; T. D. P. 75—80°C, D. E. P. 1: 3000—5000, longevity in vitro 7—14 days, host range within the limits of cruciferous plants. This isolate is therefore identified as a strain of the cauliflower mosaic virus. On *B. oleracea* var. *capitata*, the symptom is at first vein-clearing, then masked. The main symptom on *B. oleracea* var. *botrytis* is vein-clearing. In addition to the vein-

clearing symptom, necrotic streaks appear also on the leaves of *B. pekinensis* and *Raphanus sativus*. Viral particles are spherical, 50 nm in diameter. Vectors are *Myzus persical* and *Brevicoryne brassicae*.

Recent serological studies indicate that there is no cross-protection and antigenic relationship between 63-3 isolate, turnip mosaic and *Raphanus* mosaic viruses.