

苜蓿花叶病毒马铃薯杂斑株系的分离和鉴定

张鹤龄 郭素华

(内蒙古大学生物系, 呼和浩特)

在前茬为苜蓿的马铃薯田里, 有一种叶上出现鲜黄病斑的马铃薯黄斑花叶病。病叶汁液在普通烟和心叶烟上产生黄斑花叶和斑驳。在菜豆和豇豆上产生红褐色和紫红色局部斑。部分提纯的病毒是平均直径 20.6nm、长 17.5—74nm 的多组分短杆状粒体。致死温度 55—60℃, 稀释限点 10^{-3} , 体外存活期 3—4 天。将分离物回接马铃薯, 3—6 周后, 表现类似田间病株症状。接种紫花苜蓿呈现黄斑花叶。试验证明, 引起上述病害的病原为苜蓿花叶病毒马铃薯杂斑株系, 此种病害与国外报道的马铃薯杂斑病 (Potato-calico disease) 为同一种病害。此病可通过块茎传播。

C. W. Hungerford (1920) 最早在美国报道马铃薯杂斑病, 并认为是遗传上的异常。D. R. Porter (1931) 指出这是一种由汁液和蚜虫传播的传染性病害, 且常常发生在靠近苜蓿的马铃薯田里^[1]。但他没能证明苜蓿是此病原的天然寄主之一。T. P. Dykstra (1938) 根据症状和交互保护试验证明, 马铃薯杂斑病原和奥古巴花叶病毒 (PAMV) 不同, 但仍未发现和苜蓿花叶病毒有关^[2]。L. M. Black 和 W. C. Price (1940) 发现马铃薯杂斑病毒和苜蓿花叶病毒是近缘的, 前者是后者的一个株系^[3]。J. W. Oswald 报道了 AMV 侵染马铃薯导致块茎坏死的株系 (Tuber necrosis virus)^[4]。A. Rozendaal 等与美国加利福尼亚大学 J. W. Oswald 协作, 对荷兰和美国的 AMV 分离物和 PAMV 两个株系进行对比。证明 AMV 和 PAMV 都能在“白玫瑰”和“Friso”马铃薯植株上引起很相似的杂斑和坏死病状^[5]。

国内尚未见报道 AMV 引起的马铃薯杂斑病。本文报告我们于 1979 年分离鉴定这一病毒的结果。

材料和方法

1. 病毒分离: 先以马铃薯 X 病毒 (PVX) 和马铃薯 Y 病毒 (PVY) 抗血清检查田间病株。选取不感染 PVX 和 PVY 的杂斑病株的叶片, 汁液摩擦接种心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*)。再以菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 单斑分离, 进行纯化, 最后在心叶烟上保存病毒并作为接种指示植物的毒源。

2. 指示植物鉴定: 在防虫温室内进行。取保毒的心叶烟叶片, 捣碎, 榨汁, 用 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.0) 稀释至 $1/10^{1.5}$, 摩擦接种。接种的烟草苗龄一般在 4 叶期, 豇豆和菜豆用充分展开的第一对真叶接种。

3. 病毒提纯: 参照 R. Hull 等 (1969) 提纯苜蓿花叶病毒的方法^[6]。增殖寄主为白肋烟 (*N. tabacum* cv. *white Burley*)。取接种 10—14 天的新鲜病叶 100g, 加 100ml 0.01M 磷酸缓冲液 (内含 1g 抗坏血酸, 并用新配制的 50% K_2HPO_4),

本文于 1981 年 3 月 17 日收到。

承中国科学院微生物研究所周家炽教授评阅、修改文稿; 蔡发兴、张秀华同志热情协助制备电镜样品和观察; 甘肃省农业科学院植保所王克恭同志协助进行病毒分布调查; 内蒙古乌盟农业科学研究所赵娥英同志、本校庞瑞杰、江立群同志参加部分试验, 在此一并致谢。

调 pH 至 7.1) 匀浆, 榨汁。汁液中加 100ml 氯仿-正丁醇 (1:1), 在冰浴中搅拌 30 分钟, 经 4,000 rpm, 15 分钟离心, 取上清。每 100ml 上清液中加入 10g PEG, 2g NaCl, 充分溶解, 在 4℃ 冰箱内静置 60 分钟, 经 4,000rpm, 30 分钟离心, 取沉淀。用原体积 1/3 的 0.01M 磷酸缓冲液研磨溶解, 8,000rpm 离心 10 分钟, 取上清。用 MSE-75 型离心机, 8×14ml 角度转头, 在 40,000 rpm (100,000g), 4℃ 下超离心 90 分钟, 取病毒沉淀。用上述磷酸缓冲液溶解, 在 8,000rpm 离心 10 分钟, 取上清。重复两次上述差速离心, 得部分提纯的病毒悬液。

4. 电镜观察: 按照 A. J. Gibbs 等 (1963)^[1] 和 R. Hull 等 (1969) 的方法^[4] 制备病毒样品。取病毒悬液 (0.1mg/ml) 和等量的 2% 甲醛混合固定 10 分钟, 或用 4% 戊二醛固定 10 分钟, 再和等量的 pH7.0 的磷钨酸钠混合, 染色 1—3 分钟。在 H-500 型电镜下, 放大 2—4 万倍, 观察并拍照片。

结 果

(一) 田间症状

1978 年内蒙古生物制品厂由内蒙乌兰察布盟后旗种子站调入种薯“里外黄”“深眼窝”和“高原一号”, 1979 年种植在厂内一块耕翻和整过地的苜蓿地上。六月中旬, 三个品种个别植株叶片上开始出现黄斑。这种感病植株不断增加。在绿叶丛中可见成片分布的鲜黄斑花叶。到八月中旬, 三个品种的发病率分别约为 12%, 13.5% 和 5%。

马铃薯植株症状: 先是上部叶片的小叶中部及复叶顶小叶基部出现鲜黄色病斑或褪绿斑。病斑沿小叶中脉向两侧叶缘发展。有的可占小叶面积的 70—90%, 最后叶脉也转为黄色。一般病斑并不转为坏死。叶片不变形或轻度变形。少数病叶枯萎, 下垂。病株比健株略低或无明显差别。病株及病叶上的症状见图版 I-1、2。

(二) 病原分离物在指示植物上的症

状

取病叶汁液摩擦接种指示植物, 并用 PVX、PVY 抗血清鉴定。结果表明多数病株不感染 PVX、PVY、PAMV、马铃薯 S 病毒及马铃薯 M 病毒等。将取自不同品种的病叶分离物接种心叶烟和普通烟, 出现轻度斑驳花叶。经菜豆单斑分离, 分别从“里外黄”, “高原一号”及“深眼窝”得到三个分离物, 分别为 CL, CG 和 CS。1980 年又从“紫花白”种薯田分离到 CZ。四个分离物在指示植物上的病状基本相似, 现将“里外黄”(CL) 分离物在各种指示植物上的症状列入表 1, 并参见图版 1-3—5。

根据指示植物上的症状, 我们把 CL 分离物和报道的苜蓿花叶病毒有关株系进

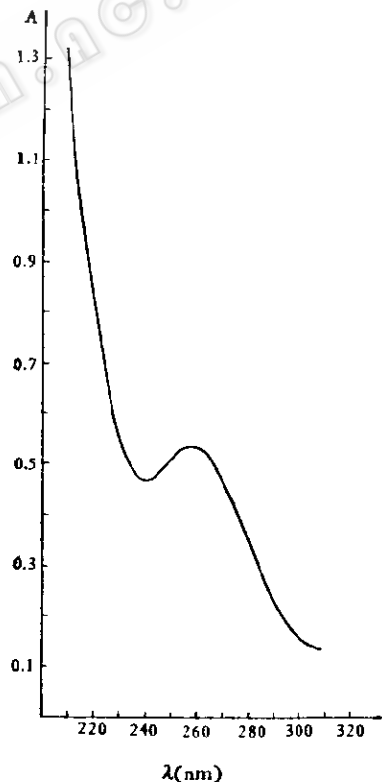


图 1 部分提纯“里外黄”杂斑分离物的紫外吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of partially purified potato-calico virus preparation

表 1 “里外黄”杂斑分离物 (CL) 在几种主要指示植物上的症状

Table 1 The symptoms on test plant caused by potato-calico virus isolated from potato “Liwhuang”

指示植物 Test plants	局部症状 Local symptoms	系统症状 Systemic symptoms
心叶烟 (<i>N. glutinosa</i>)	—	接种 5 天后, 呈现黄色斑驳花叶, 进一步形成暗绿色脉带 Yellow mottling, dark green veinbanding, in 5 days following inoculation
普通烟 (<i>N. tabacum</i> cv. <i>huangmiao</i>)	—	接种后两周, 系统浅黄色斑驳花叶, 沿脉绿带 Light yellow mottle mosaic, green veinbanding in 2 weeks after inoculation
白肋烟 (<i>N. Tabacum</i> cv. <i>white Burley</i>)	—	接种后 10 天, 被接叶呈黄斑花叶, 脉带, 系统斑驳花叶, 有时叶脉坏死 Yellow mottle mosaic, veinbanding on inoculated leaves, systemic mottle, occasionally, vein necrosis in 10 days after inoculation
黄 烟 (<i>N. rustica</i>)	—	接种后 7 天, 系统脉间块状黄斑花叶, 褪绿, 绿色脉带 Systemic yellow blotches, chlorotic spots, green veinbanding in 7 days after inoculation
德伯纳烟 (<i>N. debneyi</i>)	—	接种 6—7 天后, 轻花叶, 不均匀褪绿斑 Mild chlorotic mosaic in 6—7 days following inoculation
菜 豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	接种后 3—5 天, 接叶上出现小红褐色斑点和环斑, 直径 1—1.5mm, 数量较少 Small reddish brown local lesions (1—1.5mm) or rings on inoculated leaves in 3—5 days following inoculation	不转为系统 Not systemic
豇 豆 (<i>Vigna sinensis</i>)	接种 6—8 天后, 接叶上呈现暗紫红色近圆形局部斑, 直径 3—5mm Large round shaped brick red local lesions (3—5mm) on rubbed leaves in 6—8 days after inoculation	不转为系统 Not systemic
曼陀萝 (<i>Datura stramonium</i>)	—	系统浅黄色斑驳花叶 Systemic light yellow mottling
酸 浆 (<i>Physalis floridana</i>)	—	系统成片鲜黄斑或褪绿斑 Systemic bright yellow blotches or chlorotic flecks
辣 椒 (<i>Capiscum annuum</i>)	—	褪绿斑, 轻花叶 Chlorosis, mild mosaic

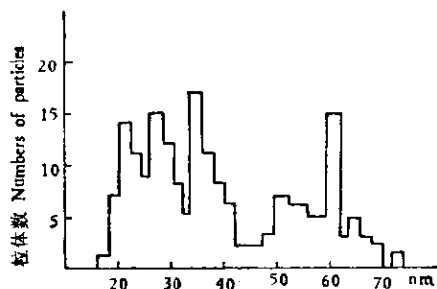


图2 “里外黄”杂斑分离物粒体长度频率分布直方图

Fig. 2 Histogram of particle length distribution of potato-calico virus isolated from "liwaihuang"

行比较。由于此分离物在普通烟、心叶烟和菜豆上症状轻微,在马铃薯植株上能引起明显症状,而有别于文献上描述的苜蓿花叶病毒普通株系。同时分离物只在马铃薯上引起黄斑花叶,而不引起植株及块茎坏死,故不同于 J. W. Oswald (1950) 分离的块茎坏死株系 (Tuber necrosis virus)^[1],而同 L. M. Black 和 W. C. Price (1940) 报道的马铃薯杂斑病毒 (Potato-calico virus) 相一致^[3]。

(三) 病毒提纯及电镜观察

部分提纯的“里外黄”杂斑分离物的紫外吸收光谱见图1。其最大吸收峰在 260 nm, 最低吸收在 240 nm, A_{260}/A_{280} 为 1.45。

电镜下观察为不同长度的短杆状粒体 (图版 I-8, 9), 平均直径为 20.6 nm, 粒体长度为 18—74 nm。图2为 190 个病毒粒体长度频率分布直方图。图中有五个高峰, 分别为 20—22, 26—28, 34—36, 50—52 和 60—62 nm 左右。

从电镜粒体形态、大小及不同组分粒体长度频率分布来看, 里外黄杂斑分离物和报道的 AMV 基本一致^[6,7]。只是我们的分离物中, 20—30 nm 的短杆状粒体数量较多。

(四) 体外生物活性测定

取增殖在白肋烟上 12 天的“里外黄”杂斑分离物, 汁液摩擦接种菜豆第一对真叶和白肋烟, 分别测定其致死温度, 稀释限点和体外存活期。结果致死温度为 55—60℃, 稀释限点为 10^{-3} , 体外存活期 (室温) 为 3—4 天。

(五) 回接试验

将保毒在心叶烟上的“里外黄”杂斑分离物, 在防虫温室中, 汁液摩擦接种马铃薯“燕子”×“卡它丁”实生苗。接种后三周, 接种叶片变黄, 中上层叶片出现鲜黄斑, 病斑面积有的占小叶一半。叶尖部有轻微坏死。依同法接种脱毒“里外黄”幼苗五株, 35 天后顶部小叶叶缘开始褪绿, 渐变为浅黄色。经 41—46 天, 叶片上呈现鲜黄斑, 叶缘上出现褐色坏死。

用同一个分离物, 汁液摩擦接种培育在防虫温室中的紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 高 4—5 cm 的幼苗, 在冬季温室温度较低的情况下, 接种后 40—45 天, 叶片呈现鲜明的黄色斑驳花叶, 见图版 I-6。

(六) 块茎传播试验

1979 年单株收获“深眼窝”病株 7 株, “高原一号”6 株, “里外黄”1 株。收获时, 检查块茎无明显病状。经过冬季窖藏, 于 1980 年春天取出, 统计各单株病薯率。“深眼窝”为 0—18.8%, “高原一号”为 0—18.1%, “里外黄”为 0, 大部分块茎表面仍无病状。1980 年将这此单株的块茎, 分别种植。苗高 20 cm 时, 统计发病株数。“深眼窝”5 个单株中, 3 个单株块茎长出的病株, 分别为 30%, 50% 和 100%。“高原一号”的 6 个单株中, 4 个单株块茎的病株分别为 20%, 25%, 80% 和 100%。植株的病状是先在底部叶片叶缘或叶面出现黄斑。病斑逐渐向上层叶片发展, 可占叶面积的 80—90%, 甚至可扩展到各个枝条叶

片上。病株在开花期病状减轻。一般病株较健株稍矮小,但仍能正常开花(见图版 I-7)。以上试验结果表明,块茎带毒率和初感病程度和时间有关。

(七) 马铃薯杂斑病的分布

我国马铃薯杂斑病分布尚缺少资料。据我们 1979—1980 两年在内蒙古自治区和甘肃省的初步调查,自然情况下,在某些马铃薯栽培种中有所发生。而且凡是杂斑病发病率较高的品种和地块,其前茬大多是紫花苜蓿。^[1,4]这和以前报道是一致的^[1,4]。

讨 论

已知 PAMV 和 AMV 都能引起以鲜黄斑花叶为特征的马铃薯杂斑病 (Potato-calico)^[3,4]。C. E. Fribourg (1977) 分离出 TRSV 的新株系,能在秘鲁马铃薯栽培种上引起类似杂斑症状。定名为安第斯马铃薯杂斑株系,并指出这种病毒广泛分布于秘鲁各种马铃薯栽培地区^[8]。我们的实验表明,我国自然感染马铃薯引起杂斑症状的病毒是 AMV 的一个株系。由于这一株系在马铃薯上不引起植株和块茎坏死,因此有别于 J. W. Oswald 的块茎坏死株系,同时也不同于 AMV 的普通株系,而定为苜蓿花叶病毒马铃薯杂斑株系。

试验表明,马铃薯杂斑病的发生和病毒自然宿主苜蓿有关。尤其当在耕翻过的苜蓿地上种植马铃薯时,由于耕翻并不能杀灭多年生牧草,在这种马铃薯田中,常常见到感染苜蓿花叶病毒的年幼的紫花苜蓿病株。于是,蚜虫便很容易将病毒传播到马铃薯上,从而导致较高的发病率。其结果既影响产量,又使块茎失去种用价值。为预防这种病害,种薯不宜植在苜蓿地附近和前茬为苜蓿的田里。马铃薯田中的豆科杂草,尤其是苜蓿,三叶草等,应作为病毒的自然宿主和田间侵染源及时加以清除。

参 考 文 献

- [1] Oswald, J. W.: *Phytopathology*, 40: 973—999, 1950.
- [2] Dykstra, T. P.: *Phytopathology*, 29: 917—933, 1939.
- [3] Black, L. M. and W. C. Price: *Phytopathology*, 30: 444—447, 1940.
- [4] Oswald, J. W. et al.: *Proc. Second. Conf. Potato-Virus Diseases*, Lisse-Wageningen, 1954: 137—147, 1955.
- [5] Ross, A. F.: *Phytopathology*, 31: 410—420, 1941.
- [6] Hull, R. et al.: *Virology*, 37: 416—428, 1969.
- [7] Gibbs, A. J. et al.: *Virology*, 19: 441—449, 1963.
- [8] Fribourg, C. E.: *Phytopathology*, 67: 174—178, 1977.

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ALFALFA MOSAIC VIRUS STRAIN CAUSING POTATO-CALICO

Zhang Heling Guo Suhua

(Department of Biology, Nei Mongol University, Huhhot)

A potato-calico disease has been found in 1979 in three principal varieties of potatoes in Huhhot, Nei Mongol Autonomous Region. The primary symptoms were irregular bright yellow blotches on the middle leaves of infected plants. Then the leaf spots enlarged and sometimes the whole leaflet shows yellow colour. The mosaic symptoms are very pronounced and usually the calico symptoms do not become necrotic.

A virus was isolated from diseased potato plants and identified on the test plants. According to the symptoms, the causal agent of this potato disease was a AMV strain causing potato-calico.

The virus was multiplied in *Nicotiana tabacum* and purified according R. Hull et al. (1969). The rod shaped particles with

different lengths of 18—74 nm have been observed by electron microscope type H-500. The average diameter of particles was about 20.6 nm. The thermal inactivation point, delution end point and stability in vitro of this virus strain were 55—60° C, 10^{-3} and 3—4 days respectively.

Further investigations showed this virus was transmitted to progeny through tubers and this disease has been found naturally in some potato varieties in Nei Mongol Autonomous Region and Gansu Province. The diseased potato plants occur more often in potato crops planted in ploughed lucerne fields or neighbouring lucerne.

The potato-calico disease is the first report due to this virus in our country.

图 版 说 明

1. 感染马铃薯杂斑病的马铃薯植株的田间症状。2. “里外黄”品种叶片上呈现的鲜黄病斑。3. 杂斑分离物在菜豆上引起的红褐色局部斑。4. 杂斑分离物在豇豆上引起的暗紫红圆形局部斑。5. 杂斑分离物在酸浆上的黄斑。6. 回接紫花苜蓿 40 天后出现的黄色斑驳花叶。7. 第三年继发感染的“里外黄”杂斑病株。8—9. “里外黄”杂斑分离物电镜照片(8. $\times 120,000$; 9. $\times 288,000$)。

1. The symptoms on potato plants infected by potato-calico virus. 2. Bright yellow blotches on the leaves of potato “Liwaihuang” infected by potato-calico. 3. Reddish brown small local lesions on rubbed leaves of *Phaseolus vulgaris* caused by potato-calico virus isolate from potato “Liwaihuang”. 4. Large round brick red local lesions on rubbed leaves of *Vigna sinensis* produced by potato-calico virus isolate from potato “Liwaihuang”. 5. Bright yellow blotches on *Physalis floridana* caused by potato-calico virus isolated from potato “Liwaihuang”. 6. Yellow mottle mosaic symptoms on *Medicago sativa* inoculated with isolated potato-calico virus. 7. The symptoms of secondary infection by potato-calico virus (third year) on potato “Liwaihuang”. 8—9. Electron micrograph of purified potato-calico virus isolated from potato “Liwaihuang”, fixed in 4% glutaraldehyde, negatively stained.