

柑桔碎叶病毒研究^{*}

陈集双 张天森^{**} 周雪平 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘 要 用汁液摩擦接种方法对柑桔碎叶病毒 (Citrus tatter leaf virus, CTLV) 进行了进一步的生物学鉴定。结果表明, 该病毒除在豇豆上引起枯斑外, 还侵染克里美兰烟 (*Nicotiana glauca*) 产生系统斑驳和轻花叶, 侵染昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*) 和莧色藜 (*C. amaranticolor*) 引起系统坏死和花叶, 侵染鸡冠花 (*Celosia cristata*) 引起局部环斑。这些草本寄主均可作为 CTLV 的指示植物。在发病的柑桔叶汁液中, 测得 CTLV 的稀释限点为 10^{-5} 。经汁液摩擦接种, 可以将 CTLV 从克里美兰烟传播到木本指示植物柑桔和枳橙上。感病植物材料的组织超微结构观察结果表明: CTLV 感染柑桔、枳橙、克里美兰烟和昆诺藜均使其叶肉薄壁细胞的叶绿体出现淀粉沉积、叶绿体片层结构解体 and 消失; 病毒在受感染的植株叶脉韧皮部细胞中紧密聚集, 形成病毒结晶体; 这种结构也出现在叶肉薄壁细胞中。这是关于该病毒组织病变的首次报道。用直接负染方法从感染 CTLV 的柑桔 (枳橙)、克里美兰烟和昆诺藜病叶中均能检测到线状病毒粒子, 用改良的 Deriick's 免疫电泳方法和琼脂双扩散方法测定均显示该病毒与苹果茎沟病毒 (Apple stem grooving virus, ASGV) 有强阳性反应, 用 ASGV 抗血清可以进行植物材料中 CTLV 的检测。

关键词 柑桔碎叶病毒, 寄主反应, 组织病变, 苹果茎沟病毒, 血清学反应

柑桔碎叶病毒 (CTLV) 是侵染柑桔的重要病原之一。我国柑桔的栽培品种遭受该病毒的侵害严重, 起源于我国的柑桔品种温州蜜桔和北京柠檬被认为是该病毒的最初来源^[1,2]。在我国的台湾及邻近地区如南朝鲜、日本、菲律宾 CTLV 的发生也极其普遍^[3,4]。

自 Wallace 和 Draka (1962) 首次发现 CTLV 以来^[1], 尽管已经有了比较长的研究历史, 但对于该病毒的基本生物学特性尚缺乏了解。该病毒至今还没有被 Description of Plant Viruses 收入为正式的植物病毒成员。Semancik 和 Weathers (1965) 报道 CTLV 通过汁液摩擦接种可以传染到包括茄科心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 在内的 9 科 19 种草本植物上^[5]; Fulton (1966) 还报道 CTLV 可以从草本寄主通过汁液摩擦接种回接到柑桔上, 但是, 以上结果均因为实验中可能污染了毒源保存寄主 (豇豆) 上的种传线状病毒而不够稳定和可靠^[5,6]。草本指示植物更易培养、发病潜伏期短, 因而可以大大提高病毒检测效率。但是到目前为止, 木本指示植物嫁接法仍是 CTLV 鉴定、检测的主要依据和手段^[2,4]。由于对 CTLV 的基本生物学特征缺少了解, 对于该病毒的提纯效果均不甚理

* 浙江省科委重点课题资助。

** 台州农业技术学校, 黄岩 317400。

本文于 1994 年 2 月 2 日收到。

想, Nitshio 等 (1989) 根据 CTLV 具有与 Capilovirus 组的成员苹果茎沟病毒 (ASGV) 相似的病毒粒子形态且与之有血清学关系, 认为 CTLV 是该组病毒的可能成员^[7]。但这一工作没有得到其他人的重复、证实, 也没有被国际病毒分类和命名委员会 (ICTV) 所接受^[8]。

Capilovirus 组是 ICTV 新近确认的一个病毒组, 该组的代表成员即是 ASGV, 另一个已知成员是 Potato virus T (PVT), 此外, 还有两个可能的成员: Lilac chlorotic leaf spot virus (LCLSV) 和 Nandina stem pitting virus (NSPV), 对于这些病毒均有比较系统的研究报道, 其共同特点是: 病毒粒子平均长度约为 650nm, 宽约 13nm, 电镜下病毒粒体上有横纹和十字纹, 病毒外壳蛋白由一种亚基组成, 其分子量约为 27000; RNA 为单一组份, 分子量约为 2.21×10^6 ^[8-10]。对于引起苹果品质退化的主要病原之一的 ASGV 国内外均有较为深入的研究, 王小凤等 (1992) 通过对该病毒在草本寄主上繁殖、提纯病毒并制备了高效价的抗血清, 建立了一套具体的血清学检测方法^[11]。

本项研究的目的在于通过研究 CTLV 在草本寄主上的反应, 探索利用草本指示植物鉴定和检测 CTLV 的生物学方法, 并在此基础上结合该病毒侵染植物后的组织病变的观察, 以便确定适当的病毒提纯方法、进一步研究该病毒。同时进一步确定 CTLV 与 ASGV 的血清学关系, 以及利用 ASGV 的抗血清对 CTLV 进行检测的可能性。

1 材料和方法

1.1 毒源

CTLV 分离物均经过木本指示植物嫁接法鉴定, 保存于柑桔上并表现单一的碎叶病症状^[1]。

1.2 寄主反应和稀释限点测定

均用发病的柑桔叶汁液, 按常规摩擦接种方法进行^[12]。寄主反应测定分别接种草本供试植物、柑桔和枳橙实生苗, 观察 60d 以上; 对于不表现明显症状的供试植物则通过回接草本指示植物进行检查。稀释限点测定以昆诺藜为指示植物。

1.3 病毒粒子检查

显症植株叶片经 0.1mol/L, pH7.0 磷酸缓冲液研磨后用 2% 磷钨酸直接负染, 电镜下观察病毒粒子的有无和形态。

1.4 组织病变观察

采用常规植物材料超薄切片制作方法^[12], 取接种 CTLV 的柑桔、枳橙、克里美兰烟, 昆诺藜叶片分叶脉、叶肉剪成 $2 \times 4 \text{mm}^2$ 小块, 经 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, 丙酮系列脱水, Epon812 (A:B=1:6) 包埋, 超薄切片经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后置电镜下观察。用同龄健康叶片作为对照。

1.5 血清学反应

1.5.1 苹果茎沟病毒抗血清由中国科学院微生物研究所王小凤研究员提供, 效价为 1/4000^[11]。

1.5.2 琼脂扩散反应: 采用常规琼脂双扩散反应方法^[12], ASGV 抗血清先用生理盐水稀释 4 倍。抗原制备方法如下: 接种 CTLV 的病叶组织于 -70°C 冰冻过夜, 然后用

0.5mol/L, pH8.0 Tris · HCl 缓冲液 (含 0.5% SDS) 充分研磨, 超声波破碎 5s 左右, 10000g 离心 5min 取上清液, 用健康的植株叶汁液作为对照。

1.5.3 免疫电泳: 参照改良的 Derrick's 方法进行免疫吸附和免疫修饰^[12]。抗原制备参照琼脂扩散反应的抗原制备方法, 但提取缓冲液中不含 SDS。ASGV 抗血清用生理盐水稀释 200 倍。

2 结果

2.1 CTLV 的寄主反应

用汁液摩擦接种方法测定 CTLV 在 8 科 23 种草本植物以及柑桔和枳橙上的反应结果如表 1。

表 1 柑桔碎叶病毒在测试寄主上的反应

Table 1 Host reaction of citrus tatter leaf virus

寄主植物 Host species		寄主反应 Host reaction
藜 科	昆诺藜 <i>Chenopodium quinoa</i>	接种 3—5d 显症, 黄斑/系统黄斑, 皱缩
	苋色藜 <i>C. amaranticolor</i>	接种 3—5d 显症, 黄斑/系统黄斑, 皱缩
茄 科	心叶烟 <i>Nicotiana glutinosa</i>	不侵染
	普通烟 <i>N. tabacum</i>	不侵染
	黄花烟 <i>N. rustica</i>	不侵染
	德 烟 <i>N. debneyi</i>	不侵染
	克里芙兰烟 <i>N. clevelandii</i>	接种 3—5d 显症, 系统轻斑驳、花叶
	假酸浆 <i>Nicandra physalodes</i>	不侵染
	洋酸浆 <i>N. florida</i>	不侵染
	番 茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	不侵染
豆 科	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	不侵染
	豇 豆 <i>Vigna sinensis</i>	接种 3—5d 显症, 局部枯斑
	蚕 豆 <i>Vicia faba</i>	不侵染
葫芦科	黄 瓜 <i>Cucumis sativus</i>	不侵染
苋 科	千日红 <i>Gompherena globosa</i>	不侵染
	鸡冠花 <i>Celosia cristata</i>	接种 5—7d 显症, 局部环斑
玄参科	金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i>	不侵染
番杏科	番 杏 <i>Tetragonia expansa</i>	不侵染
十字花科	甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	不侵染
	小白菜 <i>B. chinensis</i>	不侵染
	白菜型油菜 <i>B. chinensis</i>	不侵染
	油青菜 <i>B. chinensis</i>	不侵染
	榨 菜 <i>B. juncea</i>	不侵染
芸香科	柑 桔 <i>Citrus reticulata</i>	摩擦接种 45—60d 显症, 系统黄斑, 皱缩
	枳 橙 <i>C. citrange</i>	摩擦接种 45—60d 显症, 系统黄斑, 皱缩

在藜科昆诺藜和苋色藜上接种 CTLV 3—5d 后即表现明显症状 (图 1), 但发病的藜科植物为毒源再接种这两种藜科植物则发病率较低。在茄科供试植物中只有克里芙兰烟发病, 表现轻微症状, 发病的克里芙兰烟转接藜科指示植物和克里芙兰烟均表现症状。豆科指示植物豇豆 (数个品种: 黑皮豇豆、之豇 282、早生豇豆) 接种 CTLV 后均表现为

褐色枯斑,但以豇豆为毒源进一步接种藜科和豆科指示植物其发病率低,由于豇豆本身的种传病毒发病率高,不是理想的指示寄主。苋科鸡冠花接种 CTLV 7d 表现局部症状,该寄主不如昆诺藜和苋色藜敏感。以发病的柑桔叶汁液为接种源,CTLV 的稀释限点为 10^{-5} 。以柑桔和克里芙兰烟为毒源用汁液摩擦接种柑桔和枳橙实生苗表现典型的碎叶病症状、显症时间为 40—60d。其余供试植物均不表现明显症状,经昆诺藜检测也不显症。

以上实验结果经过多次重复说明藜科植物昆诺藜、苋色藜是比较好的草本指示植物,克里芙兰烟为比较好的毒源繁殖寄主。

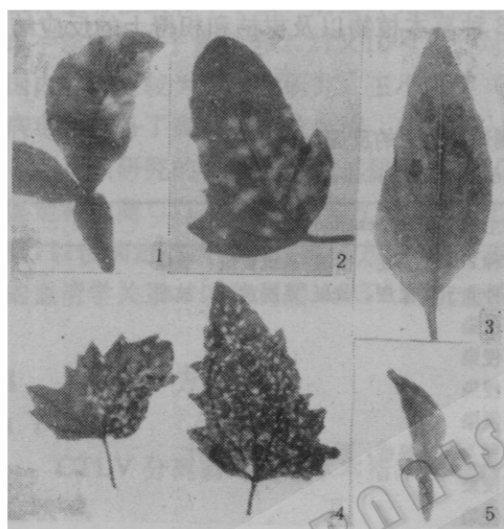


图 1 CTLV 在指示植物上的症状

1. CTLV 经嫁接在柑桔上表现为“碎叶病”症状;
2. CTLV 在昆诺藜接种叶上表现为黄斑;
3. CTLV 在鸡冠花接种叶上表现为局部环斑;
4. CTLV 在昆诺藜非接种叶上表现为系统黄斑,坏死;
5. 发病的克里芙兰烟经汁液摩擦接种枳橙实生苗表现为黄斑、皱缩。

Fig. 1 Symptoms of CTLV on indicator plants

1. "Tatter leaf" disease on *Citrus citrange* by graft-inoculation;
2. Yellow spots on inoculated leaf of *Chenopodium quinoa*;
3. Local ring-spots on inoculated leaf of *Celosia cristata*;
4. Systemic yellow spots and distortion on *C. quinoa*;
5. Yellow spots and crinkle induced by sap-inoculation of CTLV infected *Nicotiana glauca* on *C. citrange*.

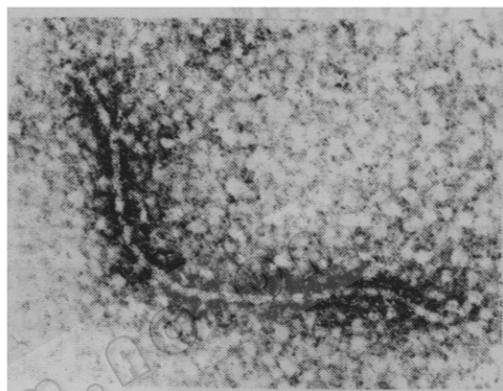


图 2 电镜下 AGSV 抗体对 CTLV 的免疫吸附和修饰 (130000×)

Fig. 2 Immuno absorbing and decorating of CTLV particles by the antibodies to AGSV

2.2 植物材料中的 CTLV 病毒粒子

直接负染后重复多次检查植物材料中 CTLV 病毒粒子的结果显示发病的柑桔和克里芙兰烟叶汁液中病毒浓度为最高,昆诺藜、苋色藜叶汁液中病毒浓度较低;在豇豆接种叶汁液中则基本看不到病毒粒子,经醋酸铀负染后,CTLV 的病毒粒子呈现明显的横纹 (Cross-banding) 结构 (图 2)。

2.3 CTLV 的组织病变特征

在接种 CTLV 的柑桔、枳橙叶脉韧皮部细胞中均观察到由线状病毒粒子紧密聚集而成的结晶体,其横切面上为晶格状,纵切面为线状粒子 (图版 I-1、2);类似结构也在昆诺藜和克里芙兰烟叶肉薄壁细胞中观察到,但结晶体较小,聚集形式较松散 (图版 I-3、4),没有观察到分散的线状病毒粒子。

在 CTLV 感染的以上植物叶肉薄壁细胞中均发生不同程度的叶绿体畸变, 叶绿体片层结构解体、消失、空泡化, 叶绿体内部被类似沉淀粒的结构填充, 叶绿体外形发生明显改变, 在健康对照中叶绿体的结构和外形则比较规则, 相对完整 (图版 1-2、4、5)。

2.4 CTLV 与 ASGV 抗血清的反应

在琼脂双扩散水平上, 接种 CTLV 的柑桔、枳橙、克里芙兰烟和昆诺葵叶汁液均与 ASGV 的抗血清有阳性反应, 形成明显的沉淀带, 接种 CTLV 的豇豆和鸡冠花叶汁液则形成微弱的条带或不形成沉淀带, 不接种的克里芙兰烟和昆诺葵叶汁液不形成沉淀带 (图 3)。

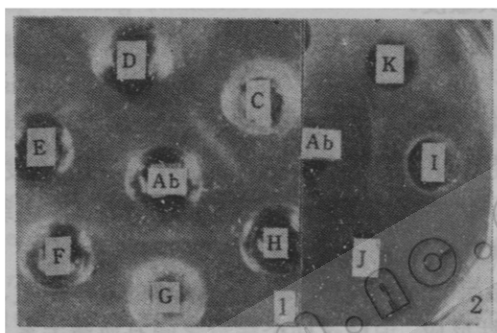


图 3 琼脂扩散反应结果

Ab: ASGV 抗血清 (稀释 4 倍); C: 感染 CTLV 的克里芙兰烟叶汁液; D: 健康的克里芙兰烟叶汁液; E: 健康的鸡冠花叶汁液; F: 健康的昆诺葵叶汁液; G: 感染 CTLV 的昆诺葵叶汁液; H: 缓冲液; I: 感染 CTLV 的枳橙实生苗叶汁液; J, K: 健康的枳橙实生苗叶汁液。

Fig. 3 0.8% agar double diffusion

Ab, Antiserum of ASGV (diluted by four times); C, Leaf sap of *N. clelandii* infected with CTLV; D, Leaf sap of healthy *N. clelandii*; E, Leaf-sap of healthy *Celosia cristata*; F, Leaf-sap of healthy *C. quinoa*; G, Leaf-sap of *C. quinoa* infected with CTLV; H, Buffer; I, Leaf sap of *C. citrange* infected with CTLV; J, K, Leaf-sap of healthy seedlings of *C. citrange*.

在电镜下观察, 经过 ASGV 免疫吸附和修饰能够捕获到典型的 CTLV 病毒粒子并表现强的修饰 (图 2), 用免疫电镜检测感染 CTLV 的柑桔、枳橙、克里芙兰烟、昆诺葵、莧色葵、豇豆和鸡冠花上均能观察到 CTLV 病毒粒子。

3 讨 论

寄主反应是进行植物病毒生物学研究和病毒检测的一个重要方面, 其不仅可以反映有关植物病毒寄主范围、症状和传播途径等重要特征, 也为进一步选择合适的指示植物和繁殖寄主提供前提条件^[9,13]。发生在木本植物上的病毒通常需要采用不同品种或近似种的木本指示植物嫁接法来检测, 但是在木本植物上症状发展慢, 且存在复合侵染的可能, 因此研究 CTLV 在草本寄主上的反应, 对于提高该病毒的生物学检测效率、简化接

种方法和进一步研究该病毒均具有重要意义。与 CTLV 具有类似特征的 ASGV, 曾经是以木本指示植物嫁接方法作为主要研究手段, 通过研究其在草本寄主上的反应, 改进病毒提纯方法, 从而建立了包括生物学和血清学方法的一套有效的病毒检测方法^[11,14]。本文研究结果表明 CTLV 在昆诺藜上症状表现快 (3—5d)、具有典型的系统症状, 在豇豆、鸡冠花上表现局部侵染, 以上寄主可以作为 CTLV 的指示植物; 该病毒在克里芙兰烟上表现系统轻斑驳症状, 具有较高的病毒浓度, 克里芙兰烟可以作为该病毒的繁殖寄主。同时, 从克里芙兰烟回接柑桔也表现碎叶病症状, 这一结果与 Fulton (1986) 等报道的结果相符, 也说明了汁液摩擦接种到克里芙兰烟等草本植物上的病毒即是 CTLV。CTLV 在柑桔叶汁液中的稀释限点达 10^{-5} , 这也说明利用昆诺藜等草本指示植物来检测柑桔中的 CTLV 具有较高的灵敏度。

Lesemann (1988) 曾经描述在 ASGV 侵染的昆诺藜叶肉细胞超微结构中可以观察到分散的线状病毒粒子^[15], Ahamad 等 (1983) 则认为 Capilovisuses 的另一个可能成员 NSPV 局限在感病植株的韧皮部中, 呈结晶状^[16]。本研究结果表明 CTLV 侵染木本和草本植物后在韧皮部细胞和叶肉细胞中均呈结晶状存在, 但没有发现分散的线状病毒粒子。病毒粒子结晶可能是 CTLV 存在于寄主细胞中的主要形式。组织病变的观察结果有利于确立相应的病毒提纯措施。

琼脂双扩散反应结果表明接种 CTLV 后, 敏感的草本寄主、柑桔和枳橙的粗汁液均与 ASGV 抗血清有阳性反应, 说明这两个病毒之间有血清关系, 这一点与 Nishio 等^[7]的结论一致。免疫电镜观察结果进一步表明 ASGV 的抗血清能够在柑桔、枳橙、克里芙兰烟、昆诺藜、桔斑寄主豇豆和鸡冠花上检测到 CTLV, 借助 ASGV 的抗血清来检测植物材料中的 CTLV 是可能的。进行大规模检测的条件, 尚待进一步探索。

致谢 承蒙中国科学院微生物研究所王小凤研究员提供苹果茎沟病毒抗血清, 在工作中提出宝贵建议并审阅论文; 工作中一直得到美国 California 大学 Riverside 分校 C. N. Roistacher 教授的热情帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Wallace J M, Draka A. *Plant Dis Repr*, 1962, **46**: 211—212.
- [2] 张天森, 梁仙友, 龚祖坝, 等. 植物病理学报, 1988, **18**: 79—82.
- [3] Su Hongji, Chen Tsaimel. Proceeding of the 4th International Asia Pacific Congress on Citrus Rehabilitation. 1990. 171—175.
- [4] Roistacher C N, Calavan E C. *Citrograph*, 1972, **57**: 270—271.
- [5] Semancik J S, Weathers L G. *Phytopathology*, 1965, **55**: 1354—1358.
- [6] Fulton R W. *Phytopathology*, 1966, **56**: 575.
- [7] Nishio T. *Ann Rew Phytopath Japan*, 1989, **55**: 254—258.
- [8] Francki R I B, Fauquet C M, Knudson D L *et al*. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. New York: Springer-Verlag, 1991. 339—340.
- [9] Salazar L F, Harrison B D. *Ann Appl Biol*, 1978, **89**: 223—235.
- [10] Nobuyuki Yoshikana, Eimi Sasaki, Mtohiro Kato *et al*. *Virology*, 1992, **191**: 98—105.
- [11] 王小凤, 李秋波, 王 荣, 等. 微生物学报, 1992, **32** (2): 137—144.

- [12] 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法 (上册). 北京: 科学出版社, 1978.
- [13] Hamilton R I, Edwardson J R, Francki R I B *et al.* *J Gen Virol*, 1981, **54**: 223—235.
- [14] de Sequeira O A, Lister R M. *Phytopathology*, 1969, **59**: 1740—1749.
- [15] Lesemann D E. *Capilovirus*. In: R G Milne ed. *Plant Viruses Vol 4*. New York: Plenum Press, 1988. 179—227.
- [16] Ahamad N A, Stephen R C, Zettler F W. *Phytopathology*, 1983, **73**: 470—479.

A STUDY ON CITRUS TATTER LEAF VIRUS

Chen Jishuang Zhang Tianmiao* Zhou Xueping Li Debao

(Institute of Biotechnology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract Citrus tatter leaf virus (CTLV) was mechanically transmitted to 23 herbaceous species from eight families. It induced local lesion on *Vigna sinensis*, systemic yellow spot and distortion on *Chenopodium quinoa* and *C. amaranticolor*, local spot on *Celosia cristata* and systemic light mottle on *Nicotiana glauca*. It was also back transmitted from *N. glauca* to *Citrus reticulata*, *C. citranga* and caused typical “tatter leaf” symptoms. DEP for this virus was 10^{-5} , when tested from infected leaf sap of *C. reticulata*. Virus particles that characterized as Capiloviruses were detected under electron microscope from leaf-sap of diseased hosts above. Herbaceous species can be used as indicators for this virus. Virus crystallized bodies were found in phloem cells of *C. reticulata* and *C. citranga* infected with CTLV, the same structures were also observed in mesophyll cells of *Chenopodium quinoa* and *N. glauca* infected with CTLV. but the crystallization bodies were looser aggregated and smaller. Degradation of reticulum and accumulating of starch bodies was observed on chloroplasts of infected mesophyll cells of above hosts. This is the first report of cytopathological characteristics of this virus disease. Positive serological relationship was found between CTLV and apple stem grooving virus (ASGV) by agar double diffusion test and ISEM. This indicated the possibility for using ASGV antibodies to detect CTLV in plant materials.

Key words Citrus tatter leaf virus, Herbaceous hosts, Cytopathology, Apple stem grooving virus, Serological relationship

图版说明

Explanation of plate

CTLV 的组织病变特征: 1. 接种 CTLV 的枳橙叶脉初皮部细胞横切面, 示在细胞质中由 CTLV 病毒粒子组成的结晶 (13000 \times); 2. 受 CTLV 侵染的柑桔叶肉薄壁细胞, 示叶绿体片层结构被破坏而由淀粉所填充 (12000 \times); 3. 昆诺藜叶肉薄壁细胞中 CTLV 的结晶 (35000 \times); 4. 受 CTLV 侵染的克里美兰烟叶肉薄壁

细胞, 示叶绿体片层结构解体, 代之以淀粉体的形成 (16000 \times); 5. 同龄健康的克里美兰烟叶肉薄壁细胞中的叶绿体 (16000 \times)。VC (病毒结晶体); N (细胞核); CW (细胞壁); CH (叶绿体); V (小液泡); Sb (淀粉体)。

Cytopathological characteristics of CTLV; 1. Cross-section of a phloem cell of *Citrus citrange* infected with CTLV showing a crystallization consisted with filamental virus particles; 2. A mesophyll cell of *C. reticulata* infected with CTLV showing the degradation of lamina and the accumulation of starch bodies in chloroplast; 3. Crystallized CTLV particles in a mesophyll cell of *Chenopodium quinoa*; 4. A mesophyll cell of *N. clevelandii* infected with CTLV showing the degradation of lamina and the formation of starch bodies; 5. A mesophyll cell of healthy leaf of *N. clevelandii*. VC (Virus crystallization body); N (Nucleus); CW (Cell wall); CH (Chloroplast); V (Vacuole); Sb (Starch body).

JOURNALS.IM.AC.CN