

黄瓜花叶病毒(CMV)亚组 I、II 分离物 生物学特性比较研究

田兆丰¹,于嘉林²,刘伟成¹,裘季燕¹,刘德文¹

(1. 北京市农林科学院 植保环保所,北京 100097;2. 中国农业大学 生物学院,北京 100094)

摘要:从福建、浙江、湖南、宁夏、安徽、山西、河南、河北、北京等省市采集并收集到 16 个黄瓜花叶病毒(CMV)样品,用亚组特异性抗血清以 ELISA 方法对这些样品进行了亚组鉴定。同时,选取亚组 I、II 病毒部分分离物进行了症状、致病性和体外稳定性比较研究。结果表明,亚组 II 病毒分离物的症状和致病性受温度、湿度和光照强度等的调节,在不同环境条件下呈现复杂的寄主适应性变化,总的症状比较温和。我国收集的 CMV 样品以亚组 I 为主,检出率占样品总数的 75%。但由两亚组病毒生物学特性比较研究结果表明,亚组 II 病毒在采样和检测中易于被忽略或丢失,据此,探讨了 CMV 亚组 II 存在的生态意义及其样品检出率与田间实际发生率之间可能存在的较大差异。

关键词:黄瓜花叶病毒;亚组 I、II;生物学特性;比较研究

中图分类号:S436.421 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)05-0201-05

Comparative Study on Bio-characteristics of Cucumber Mosaic Virus(CMV) Subgroup I and II

TIAN Zhao-feng¹, YU Jia-lin², LIU Wei-cheng¹, QIU Ji-yan¹, LIU De-wen¹

(1. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. State Key Laboratory for Agro-Biotechnology, College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: 16 CMV samples from Fujian, Zhejiang, Hunan, Ningxia, Anhui, Shanxi, Henan, Hebei and Binjing were collected and identified by DAS-ELISA with subgroup specific Antisera. The symptoms, pathygenicities, and *in vivo* stabilities of part of the isolates were compared in *Nicotiana tabacum*. The results showed that the majority of the CMV samples belong to the subgroup I virus, consisting of 75% of the samples. The symptoms and pathygenicities of subgroup II virus were generally mild and flexible, and adjusted by temperature, humidity and light intensity, suggesting its complex flexibility to the host plant. These results suggested that the subgroup II virus was prone to be neglected or discarded in sample collecting or experimenting. The differences between detection frequency and actual existence, also the ecological significance of subgroup II virus were discussed.

Key words: Cucumber mosaic virus; Subgroup I and II; Bio-characteristic; Comparative study

黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)是雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)黄瓜花叶病毒属(Curcuvirus)的典型成员。CMV 的侵染能引起多种重要农作物严重减产,造成巨大的经济损失,是寄主植物最多、分布最广、最具经济重要性的植物病毒之一。自 Doolittle 和 Jagger^[1,2] 分别报道 CMV 是黄瓜花叶病的病原以来,大部分国家都相继发现有 CMV

的发生^[3]。在过去 80 多年时间内,被鉴定的 CMV 寄主植物种类不断增加。至 20 世纪 90 年代中期,已在 85 科 365 属 1 000 多种单、双子叶植物上发现有 CMV 的危害^[4,5]。近 10 多年来,CMV 在一些国家和地区的许多作物上造成严重危害^[6],如引起番茄等茄科植物的坏死、香蕉的花叶^[3,7]、豆科植物的花叶、瓜类的花叶、西番莲的死顶等^[8,9]。

收稿日期:2009-02-16

基金项目:北京市自然科学基金资助(5002005)

作者简介:田兆丰(1966-),女,山西榆社人,博士,副研究员,主要从事植物病毒及其生物防治的研究。

通讯作者:于嘉林(1956-),男,山东人,博士,教授,主要从事植物病毒及抗病毒基因工程研究。

CMV 有很多株系,在症状、寄主范围、致病性、抗原性、蚜传特性等方面都表现有差异。根据这些差异及核苷酸序列同源性的差异,这些株系被分为两个亚组,及亚组 I 和 II。相同亚组株系间核苷酸序列有 90%~99% 的同源性,不同亚组间有 75% 左右的同源性^[10]。几十年来,各国学者根据他们分离到的 CMV 寄主范围及症状表现得到许多新的株系或分离物,许多过去报道被认为是新的病毒,现已证实为 CMV 的株系^[8]。迄今,全世界已报道了 100 多个 CMV 群系或分离物^[8,5]。

多年来,CMV 在我国蔬菜等作物上造成的损失都一直非常严重。近年由于保护地栽培、新品种引进及农业生态气候的变化,使 CMV 的危害更加猖獗^[11]。过去对 CMV 病原的报道虽然很多,但多数都未进行亚组区分。随着生物技术及病毒分子生物学的进一步发展,有关 CMV 病原的研究多数都进行了亚组鉴定,由此发现亚组 II 病毒株系在我国发生的报道频率明显增加^[12-16],具有与亚组 I 病毒混合爆发的趋势。基于对这种新的现象及 CMV 极强的进化和适应能力的考虑,我们应及早对 CMV 亚组 I、II 病毒的分布、生物学特性进行比较研究,了解其相互关系及发生规律,提出相应的预防和控制措施。

本研究首先对我国不同省市收集或采集的 CMV 样品以血清学方法进行了亚组分类鉴定,初步明确了我国部分地区 CMV 亚组 I、II 病毒的发生概况,并对部分亚组分离物的症状、致病性、稳定性等基本生物学特性进行了比较研究,为进一步开展两亚组病毒在介体传播、寄主体内的竞争及其流行趋势等生态学规律的研究提供了理论指导。

1 材料和方法

1.1 试剂

CMV 抗血清:包括能够捕捉所有 CMV 分离物的包被抗体以及具有亚组 I、II 特异性的检测抗体和酶标抗体(碱性磷酸酯酶)。ELISA 缓冲液:包被缓冲液,洗涤缓冲液,抗体稀释缓冲液,样品抽提缓冲液,酶底物缓冲液。以上血清及缓冲液均由美国 Agdia 公司订购。

1.2 供试植物

繁殖毒原植物:CMV 系统侵染寄主三生烟(*Nicotiana tabacum*)。

供试病毒寄主植物:CMV 系统侵染寄主三生烟健康幼苗,在 4~5 叶期接种病毒。

1.3 毒原及保存

CMV 亚组 I 病毒 NX、YQ 分别采自宁夏惠农的

烟草和北京延庆的番茄,分别由北京农林科学院植保所裴季燕、李兴红提供。

CMV 亚组 II 病毒 XB、CH(原名 PF)分别来自福建的香蕉^[2]和西番莲^[3],由厦门华侨亚热带植物引种园李梅提供。亚组 II 分离物 AG、ZL 分别采自安徽安庆的烟草和浙江丽水的番茄。

CMV 亚组 I、II 病毒阳性样品购自美国 Agdia 公司。其他未命名的 CMV 样品由北京农林科学院植保所病毒研究室以干样保存。

采集或收集的病毒样品先以 CaCl_2 置备干样,于 -20℃ 冰箱冷冻保存。使用时以摩擦接种方法接种在 4~5 叶期的三生烟幼苗上:即病毒鲜样以 1:10 (干样 1:15) 的稀释倍数在 pH 6.9 的磷酸缓冲液中研磨成汁液后备用,用喉头喷雾器把 200 目的金刚砂均匀喷洒于幼苗叶片上,蘸取病毒汁液,轻轻摩擦 4~5 叶期三生烟幼苗的第 3、4 片叶,然后用蒸馏水冲洗接种叶片,接种后的幼苗置防虫笼内培养,在温室内繁殖备用。

1.4 CMV 样品的采集和收集

2002-2005 年的 4-10 月份,分别于浙江丽水,福建福州、厦门,湖南益阳,宁夏惠农,安徽滁洲、安庆,山西晋中,河南新乡,河北承德,北京房山、延庆、密云、平谷等县市采集或收集到确定或未确定亚组地位的 CMV 样品,共计 16 份, CaCl_2 制备干样,于 -20℃ 冰箱中保存或在三生烟上繁殖保存。

1.5 CMV 样品的亚组鉴定

分别对采集和收集到的所有 CMV 样品以摩擦接种方式在三生烟上繁殖,15 d 后用 CMV 亚组特异性抗血清进行 ELISA 检测,鉴定 CMV 各样品的亚组地位。

1.6 CMV 两亚组分离物症状和致病性观察

选择在三生烟上症状具有较明显特征的亚组 I 病毒 YQ、NX 和所有亚组 II 病毒 AG、ZL、XB、CH 分离物,摩擦接种于三生烟幼苗上,每个分离物接种 5~8 株,于温室内在 18~35℃ 变温条件下观察记录两亚组病毒在三生烟上的症状变化。

1.7 CMV 两亚组部分分离物体外稳定性研究

从 CMV 毒原植物上采集症状易于区分的亚组 I 病毒 YQ、NX 及症状较为明显的亚组 II 病毒 AG、ZL 三生烟感病叶片,用于测定包括致死温度,稀释终点及体外保毒期三项稳定性指标。测定按常规方法处理病毒汁液,处理后的病毒汁液,按汁液摩擦接种法分别接种在烟草上。每一温度、浓度或时间处理接种三生烟苗 10 株,接种后的烟苗置温室中培养,15 d 后用 ELISA 法检测病毒侵染情况。

2 结果与分析

2.1 不同地区 CMV 样品的血清学检测结果

从我国不同地区收集的 CMV 样品的亚组检测结果如表 1。

由表 1 检测结果可见,亚组 I、II 病毒的每个样

品对所使用的抗血清没有交叉反应。在各地不同寄主植物上收集到的 CMV 当中,以亚组 I 病毒为主,在南方和北方均有较多的分布,检出率占 CMV 样品总数的 75 %,亚组 II 病毒的检出率相对较低,占被检样品总数的 25 %。

表 1 来自不同地区的 CMV 样品的 ELISA 亚组鉴定

Tab.1 Subgroup identification of CMV from different areas by ELISA					
样品编号 Samples	样品采集地区 Areas	自然寄主 Nature host	田间症状 Symptoms	ELISA 检测结果	
				CMV I	CMV II
1	湖南益阳	甜椒	黄化、落叶	+	-
2	浙江丽水(ZL)	番茄	轻花叶	-	++
3	福建福州	甜椒	黄化、落叶	++	-
4	福建厦门(XB)	香蕉	花叶	-	+
5	福建厦门(CH)	西番莲	花叶、皱缩	-	+
6	宁夏惠农(NX)	甜椒	蕨叶、畸形	++	-
7	安徽滁州	甜椒	黄化、落叶	++	-
8	安徽安庆(AG)	烟草	轻花叶	-	++
9	山西晋中	甜椒	花叶	++	-
10	河南新乡	甜椒	花叶	+++	-
11	河北承德	番茄	蕨叶、畸形	++	-
12	北京房山	甜椒	花叶、畸形	+	-
13	北京延庆	甜椒	花叶、畸形	++	-
14	北京延庆(YQ)	番茄	蕨叶、畸形	+++	-
15	北京密云	甜椒	蕨叶、畸形	+	-
16	北京平谷	甜椒	花叶、畸形	++	-

2.2 CMV 部分亚组分离物(株系)在三生烟上侵染的症状

CMV 不同亚组分离物(株系)在三生烟上侵染的症状如表 2。

表 2 CMV 不同亚组分离物侵染三生烟的症状

Tab.2 Symptom of CMV isolates belonging to different subgroups in <i>Nicotiana tabacum</i>				
病毒分离物 Isolates	采集地点 Areas	自然寄主 Nature host	在三生烟上的症状变化	
			Symptom variation in <i>Nicotiana tabacum</i>	
NX(I)	宁夏	甜椒	18~30	均表现系统花叶伴有泡斑、畸形、矮化、坏死
YQ(I)	北京延庆	番茄	18~30	均表现系统花叶(无泡斑)、畸形、矮化
AG(II)	安徽安庆	烟草	接种叶	弧线形斑点
			18~20	轻度不规则坏死斑驳
			20~25	系统明脉
			25~30	光照较强时,隐藏症状;阴雨潮湿时,系统轻花叶
ZL(II)	浙江丽水	番茄	类似 AG(II)	
XB(II)	厦门	芭蕉	低温时表现褪绿斑、其他温度条件下表现黄化、叶片变窄变尖	
CH(II)	福建	西番莲	类似 XB(II)	

由表 2 结果可见,以上 CMV 亚组 I、II 分离物在三生烟上的症状有明显区别,亚组 I 病毒 NX 和 YQ 有较强的致病力,造成的症状也明显比所试验的亚组 I 其他病毒严重。亚组 I 病毒在不同环境温度下表现的症状和致病性基本一致,均表现有系统花叶、畸形、矮化、坏死,但 NX 造成的花叶伴有泡斑,YQ 造成的花叶较细碎,没有泡斑产生,症状略轻于 NX;而亚组 II 病毒的致病性及症状表现远比亚组 I 复杂,亚组 II 病毒 AG、ZL 分离物的症状基本一致,都受温度、湿度和光照等条件的调节。在不同环境条件下症状可以分别表现为接种叶片的弧线形斑点、

轻度不规则坏死斑驳、系统明脉、系统轻花叶、极轻微花叶到症状潜隐等不同类型;亚组 II 病毒 XB、GH 在不同条件可表现黄化、叶片变窄变尖或浅褪绿斑。总的来说,亚组 II 病毒的症状及危害相对较轻,在田间调查和采样时容易被忽略。

2.3 CMV 部分亚组分离物的体外稳定性研究结果

由于亚组 I 病毒 NX 和 YQ 症状特点鲜明,二者易于区分,亚组 II 病毒 AG、ZL 发病症状较明显,所以,选择了亚组 I 病毒 NX 和 YQ 及亚组 II 病毒 AG、ZL 四个均来自于茄科蔬菜的分离物进行了体外稳定性研究,ELISA 检测结果如表 3。

表 3 4 个 CMV 分离物的稳定性测定结果

Tab. 3 Stability in sap of four CMV isolates

病毒分离物 Isolates	致死温度/ Thermal inactivation point	TIP	稀释限点 DEP Dilution end point	体外存 活期/d LIV Longevity in vitro
NX(I)	55 ~ 60		$10^{-3} \sim 10^{-4}$	4 ~ 5
YQ(I)	55 ~ 60		$10^{-3} \sim 10^{-4}$	4 ~ 5
AG(II)	50 ~ 55		$10^{-2} \sim 10^{-3}$	3 ~ 4
ZL(II)	50 ~ 55		$10^{-2} \sim 10^{-3}$	4 ~ 5

由表 3 可见: NX、YQ 病毒的致死温度为 55 ~ 60 ,亚组 II 病毒 AG、ZL 较亚组 I 病毒 NX、AQ 的失毒温度低 5 左右,表明亚组 II 病毒较亚组 I 病毒对温度更敏感;同样可见,亚组 I 病毒 NX、YQ 病毒的稀释限点为 $10^{-3} \sim 10^{-4}$,比亚组 II 病毒 AG、ZL 的稀释限点高约 10 倍左右,但这也可能是由于在试验条件下,亚组 I 病毒 AG、ZL 在毒原植株中的浓度积累较低所致;亚组 II 病毒 NX、YQ 及亚组 II 病毒 ZL 病毒的体外保毒期为 4 ~ 5 d,而亚组 II 病毒 AG 的体外保毒期略低于其他 3 个病毒分离物,比其他 3 个分离物短 1 ~ 2 d。总的来看,与亚组 I 病毒相比,亚组 II 病毒分离物的体外稳定性稍差。

3 讨论

近年来,尽管亚组 II 病毒在我国报道的频率不断增加^[12,13,15,16],但和亚组 I 病毒的报道频率相比仍然很低^[17,18]。国外有报道认为,亚组 I 病毒主要在热带和亚热带流行,而亚组 II 病毒主要发生在温带^[18,19],但多数有关 CMV 的报道并没有进行亚组区分^[5,10]。从本研究结果来看,亚组 II 病毒在我国检出和报道的频率较低,并不能完全代表它在我国各地作物上存在和发生的实际情况。首先,亚组 II 病毒总的症状比较轻微,且随环境气候因素而发生较大变化,虽然低温和阴湿时症状较明显,但仍然只表现轻花叶,而且高温,强光照时症状发生潜隐,与亚组 I 病毒相比采样时容易被忽略。其次,亚组 II 病毒稳定性较差,对温度较敏感,容易降解失活,在进行血清学检测时免疫原性也较弱,检测时往往也容易被忽略或丢失。另外,亚组 II 病毒在复合侵染时往往更易被丢弃,如在我国云南烟草上发现的 CMV 亚组 II 分离物 CMV-Ynb,就是在与 TMV 复合侵染的烟草中以负染方式电镜观察时较偶然地发现的^[15]。本研究的两个亚组 II 分离物 AG、ZL 分别采自安徽安庆、浙江丽水,采样时期正好是当地的多雨潮湿季节,这与本试验中亚组 II 病毒在阴凉潮湿的环境下症状较明显相吻合,所以,对亚组 II 病毒样品的采集还受当时气候因素的影响。所以,国外关于 CMV 亚组 II 病毒在热带和亚热带占优势,而亚组

II 病毒更高频率地在温带被发现^[18,19]的报道,与本研究关于 CMV 亚组 I 有很宽的温度适应性及亚组 II 病毒在高温时隐症等温度敏感性的结果相吻合。由此看来,亚组 I 病毒的实际存在和发生的频率很可能远远高于所报道频率。那么,CMV 亚组 II 病毒报道频率在近年来的增加,除去采样的原因之外,还可能与近年来分子生物学技术及病毒分子生物学的发展有关,一些不稳定或浓度较低、较难发现的微生物也可以用现代生物学的方法较容易地被检测到。

本试验结果表明,亚组 II 病毒分离物的症状受温度、湿度和光照强度的调节,在不同的温度、湿度、光照范围内,症状可表现为弧形、轻度坏死斑驳、系统明脉、系统轻花叶及症状隐藏等丰富的变化,总的症状表现温和。这表现了亚组 II 病毒在不同环境条件下对寄主适应性的调节,应该是病毒适应能力、生存能力及高级进化的表现之一。那么,目前国内外的研究结果所表现出的亚组 II 病毒株系少,进化分支少^[20,21],有一个重要因素应该是亚组 II 病毒被发现和采集的样品数量远远少于亚组 I^[18]。因此,温和的亚组 II 病毒很可能广泛存在。从病毒和寄主相互依赖生存的角度出发,弱病毒是适应力强的病毒,它在 CMV 和寄主的生态平衡及病毒的弱株系交叉保护中应该起重要作用。

无论怎样,CMV 有极强的进化和适应能力,且其传毒蚜虫的种类为数众多^[8,22],致使其具有最广泛的寄主范围和地理分布^[10],所以,下一步应从介体传播及病毒竞争等生态学方面入手,搞清 CMV 两亚组病毒的传播和流行特点,为今后对 CMV 的预防和控制措施的实施提供理论指导。

参考文献:

[1] Doolittle S P A. new infectious mosaic disease of cucumber [J]. Phytopathol, 1916, 6: 145 - 147.

[2] Jagger I C. Experiments with the cucumber mosaic disease of cucumber [J]. Phytopathol, 1916, 6: 148 - 151.

[3] Bouhida M, Lockhart B E. Increase importance of cucumber mosaic virus infection in greenhouse-grown bananas in Morocco [J]. Phytopathology, 1990, 80: 981.

[4] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus Taxonomy [C]. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag, Wien, 1995: 450-457.

[5] Kaper J M, waterworth H E. In Handbook of Plant virus Infections and Comparative Diagnosis (E. Kurstak, ed) [M]. Elsevier/ New Holland. New York, 1981: 257 - 332.

[6] Flasiniski S, Scott S W, Barnett O W, et al. Diseases of Peperomia, Impatiens and Hibbertia caused by cucumber mosaic virus [J]. Plant Dis, 1995, 79: 843 - 848.

- [7] Gafny R, Wexler A, Mawassi M, *et al.* Natural infection of Banana by a satellite-containing strain of cucumber mosaic virus: nucleotide sequence of the coat protein gene and the satellite RNA[J]. *Phytoparasitica*, 1996, 241: 49 - 56.
- [8] Palukaitis P, Roossinck M J, Dietzgen R G, *et al.* Cucumber mosaic virus[J]. *Adv Virus Res*, 1992, 41: 281 - 348.
- [9] 徐平东, 李梅, 林奇英, 等. 黄瓜花叶病毒两亚组分离物寄主反应和血清学性质比较研究[J]. *植物病理学报*, 1997, 27(4): 353 - 360.
- [10] Edwardson J R, Christie R G. Cucumoviruses in: *CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes* [M]. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991: 293 - 319.
- [11] 陈集双, 柴立红, 李全胜, 等. 黄瓜花叶病毒猖獗与气候变暖关系及其对策[J]. *生态农业研究*, 2000, 8(4): 23 - 26.
- [12] 王海河, 谢联辉, 林奇英. 黄瓜花叶病毒香蕉株系 (CMV-Xb) RNA3 eDNA 的克隆和序列分析[J]. *中国病毒学*, 2001, 16(3): 252 - 256.
- [13] 徐平东, 李梅, 柯冲. 福建西番莲病毒病的发生及其病原黄瓜花叶病毒亚组鉴定[J]. *植物保护学报*, 1999, 26(1): 50 - 54.
- [14] 徐平东, 谢联辉. 黄瓜花叶病毒亚组研究进展[J]. *福建农业大学学报*, 1998, 27(1): 82 - 91.
- [15] 李凡, 周雪平, 戚益军, 等. 从云南烟草上检测到的黄瓜花叶病毒亚组 分离物[J]. *微生物学报*, 2000, 40(4): 346 - 351.
- [16] 莫笑晗, 刘勇, 邓建华, 等. 黄瓜花叶病毒云南峨山分离物外壳蛋白基因的序列测定[J]. *福建农业大学学报*, 2001, 30(增刊): 114 - 116.
- [17] García A J. Deteccion y variabilidad del cucumovirus del mosaico del pepino en *Cucumis melo* L. [M]. Department of Chemistry, Universidad de Costa Rica, San Jose, 1998.
- [18] Hord M J, García A, Villalobos H, *et al.* Field survey of Cucumber mosaic virus subgroups I and II in crop plants in Costa Rica[J]. *Plant Disease*, 2001, 85(9): 952 - 954.
- [19] Singh Z, Jones R A C, Jones M G K. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR[J]. *Plant Disease*, 1995, 79(7): 713 - 716.
- [20] Roossinck M J, Zhang Lee, Hellwald K H. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups[J]. *J. Virol*, 1999, 73(8): 6752 - 6758.
- [21] Moury B. Differential selection of genes of cucumber mosaic virus subgroups[J]. *Mol Biol Evol*, 2004, 21(8): 1602 - 1611.
- [22] Gallitelli D. The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture[J]. *Virus Research*, 2000, 71(1 - 2): 9 - 21.