

# 不同蚜虫对黄瓜花叶病毒(CMV)亚组 I、II 分离物传播效率比较研究

田兆丰<sup>1</sup>,刘伟成<sup>1</sup>,罗 晨<sup>1</sup>,于嘉林<sup>2</sup>

(1.北京市农林科学院 植物保护环境保护研究所,北京 100097;2.中国农业大学 生物学院 农业生物技术国家重点实验室,北京 100094)

**摘要:** 采用北京地区发生的5种主要蚜虫桃蚜、棉蚜、萝卜蚜、豆蚜、修尾蚜,对黄瓜花叶病毒亚组 I、II 的两个分离物 YQ 和 ZL 进行了室内蚜虫传毒效率比较研究。同时,在田间露地栽培条件下,混合投放了5种蚜虫,研究了它们对亚组 I、II 病毒传播效率的差别。结果表明,不同种类的蚜虫对亚组 I、II 病毒 YQ 和 ZL 的室内传毒效率有不同的偏向,而多种蚜虫混合投放于田间时,这些蚜虫对 CMV 亚组 II 病毒 ZL 的田间综合传播效率显著高于对亚组 I 病毒 YQ 的传播效率。

**关键词:** 黄瓜花叶病毒;亚组株系;蚜传比较

中图分类号:S436.42 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)05-0234-05

## Transmission Comparison of Cucumber Mosaic Virus Subgroup I and II Isolates by Different Aphid Species

TIAN Zhao-feng<sup>1</sup>, LIU Wei-cheng<sup>1</sup>, LUO Chen<sup>1</sup>, YU Jia-lin<sup>2</sup>

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

**Abstract:** A comparative study with five aphid species *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Lipaphis erysimi*, *Aphis craccivora* and *Megoura viciae* were carried out in laboratory and field experiments to evaluate spread of CMV Subgroup I YQ and subgroup II ZL isolates in tobacco. Both YQ and ZL showed variability in their transmission efficiency by the five aphids. And the overall transmission efficiencies of the subgroup II ZL were significantly high in the field transmission with the five mixed aphid species. Hopefully, our study will aid in understanding implications of the spread between CMV subgroups and will lead to development of more specific control measures.

**Key words:** Cucumber mosaic virus; Subgroup isolate; Transmission efficiency

黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)主要由蚜虫以非持久性方式进行传播。最常见的是棉蚜(*Aphis gossypii*)和绿色桃蚜(*Myzus persicae*)。CMV 传播专化性较低,目前认为 CMV 可以由80多种蚜虫传播<sup>[1-2]</sup>。蚜虫刺吸病毒侵染的植物不到一分钟即可获毒,然后可迅速地传播到感病植物上。

CMV 传播效率受蚜虫种类、毒源植物种类等多种因子影响。不同种类寄主上常见不同蚜虫种群。蚜虫的成功传毒依赖于获毒、持毒、病毒稳定性、病毒释放等几个环节,蚜虫获毒前饥饿可以增加传毒

效率<sup>[3-4]</sup>,任意环节的变化均可能影响蚜传效率<sup>[5]</sup>。目前,造成我国 CMV 频发的原因除与气候变暖、种植结构和种植制度改变有关之外,更直接的原因可能是因此而引发的传毒介体的发育速度和繁殖率的加快,因为传毒介体连年不间断地大发生,可以直接导致 CMV 的危害猖獗<sup>[6]</sup>。

近年来,黄瓜花叶病毒亚组 II 株系在我国危害的报道不断增加,具有与亚组 I 病毒混合爆发的趋势<sup>[7-10]</sup>。本研究通过北京地区主要发生的几种传毒蚜虫,对 CMV 亚组 I、II 的两个分离物进行了室

收稿日期:2011-05-02

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(5002005)

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

内及田间模拟传毒试验,通过传毒效率比较,期望获取一些关于 CMV 两亚组病毒传播和流行趋势方面的信息,为预测 CMV 两亚组病毒在我国进一步的流行并制定相应的预防控制措施提供科学依据。

## 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。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 公司订购的 ELISA 试剂盒提供。

### 1.2 供试植物及毒原

繁殖毒原植物: CMV 系统侵染寄主三生烟 (*N. tabacum* cv. Samsun NN)。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。病毒毒原: CMV 亚组 I 强致病病毒株系 YQ, 采自北京延庆的番茄; 亚组 II 温和病毒株系 ZL, 采自浙江丽水的番茄。病毒样品以摩擦接种的方法接种在 4~5 叶期的三生烟幼苗上,接种后的幼苗置防虫笼内培养,在温室内繁殖备用。

### 1.3 传毒蚜虫的采集

采集北京地区十字花科、茄科、葫芦科及豆科植物材料上常见的几种蚜虫,用于脱毒饲养。其中桃蚜 (*Myzus persicae*)、萝卜蚜 (*Lipaphis erysimi*) 采于北京种植的甘蓝 (*Brassica oleracea*); 棉蚜 (*Aphis gossypii*) 采于北京种植的西瓜 (*Citrullus lanatus*); 豆蚜 (*Aphis craccivora* Koch) 采于北京种植的菜豆 (*Phaseolus vulgaris*); 修尾蚜 (*Megoura japonica* Matsumura) 采自北京阳台山的山黧豆 (*Lathyrus* sp)。

### 1.4 无毒蚜虫的饲养

将从田间捕捉到的桃蚜、棉蚜、萝卜蚜、豆蚜和修尾蚜 5 种蚜虫饥饿 3 h 进行初脱毒,然后饲养在防虫网室的无毒苗上。其中桃蚜、萝卜蚜饲养在雪里蕻 (*Brassica juncea*) 上,棉蚜饲养在黄瓜 (*Cucumis sativus*) 苗上,豆蚜和修尾蚜饲养在蚕豆 (*Vicia faba*) 苗上。取在植株上刚出生且未取食的若蚜,再转移到新的无毒植株上饲养。防虫网室内单克隆繁殖 3 代,经 ELISA 检测证实无毒以后,大量繁殖获得无毒蚜,供试验所需。一般 1 周后可得到大量的若蚜,待发育至 4 龄无翅若蚜时方可供传毒试验使用。

### 1.5 蚜虫对 CMV 不同亚组分离物的室内传毒效率试验

#### 1.5.1 蚜虫的饥饿处理

为保证接种效果,接种前必须使蚜虫饥饿一定时间,方法如下: 取培养皿数个,将口用玻璃纸封好,并用橡皮筋缚紧,在玻璃纸中间开一小洞,用柔软毛笔取蚜虫从小洞放入培养皿(取蚜虫时可将带蚜虫的叶片,轻轻敲打或稍加热烘一下,使蚜虫自己掉下,以免蚜虫的口器受伤),每皿放入蚜虫 50 个左右,然后用玻璃纸将小洞重新封闭,将培养皿放在 25~30℃ 的温暖处。为使蚜虫下一步在烟草上充分取食,蚜虫饥饿 3 h。

1.5.2 饲毒 将经过饥饿的蚜虫重新用毛笔从玻璃小洞中取出,挑到毒原植株发病症状明显的嫩叶上饲喂,饲毒时间为 15 min(一般 5 min 即可充分获毒),以保证每头蚜虫带毒的一致性。获毒饲育时间为蚜虫口针刺入吸食的时间。

1.5.3 传毒及病毒检测 蚜虫饲毒达到所要求的时间后,用毛笔将其移置无病的烟草幼苗上。为避免转移时损伤蚜虫口针,转移前先将带蚜虫的叶片移近热源微热使蚜虫自动拔出口针,再用小毛笔将其轻轻挑下,置于 100 mL 玻璃杯中备用。每株幼苗接种蚜虫 12 头,每个病毒分离物接种 15 株三生烟苗。供试的病毒分离物有 YQ(I)、ZL(II),接种后的幼苗放在防虫笼内培养,接种 24 h 后,先用毛笔挑走蚜虫,再喷 20% 菊杀乳油(稀释 2 000 倍)进一步灭蚜。对照接种是将饥饿后的蚜虫放在无病毒的健康烟草植株上吸食 15 min,然后用毛笔移到另一株无病烟草幼苗上,其他操作步骤与传毒相同。每个传毒试验重复 2 次。将传毒的烟苗置 25℃ 左右的防虫温室中继续生长 15 d,以繁殖的毒原为阳性对照,健康烟苗为阴性对照,ELISA 检测传毒烟苗的带毒情况,计算蚜虫传毒效率,并以卡平方方法统计传毒效率的差异显著性。

### 1.6 CMV 两亚组分离物蚜虫田间模拟传播试验

1.6.1 试验地点及幼苗移栽 为防止人为的 CMV 两亚组分离物的传播和蔓延,试验地点选择在远离其他菜地、相对独立的两个防虫网室内进行。在温室内培育的健康三生烟苗出 4~5 片叶时移栽于露地的网室,每个网室移栽三生烟苗 150 株,移栽后进行常规的浇水管理,出入网室要防止环境中带毒蚜虫飞入。

1.6.2 毒原投放 定植于网室的烟苗缓苗 10 d 后,随机选择 5 点,每点选择相邻烟苗 2 株,分别摩擦接种两亚组病毒 YQ(I) 和 ZL(II) 5 点共计接种 10 株烟苗,作为蚜虫传播的毒原植物,并标记被接种植物。

1.6.3 传毒蚜虫的迁入及结果检测 5 d 后,接种的毒原植物已产生轻微症状,在每株毒原植物上,按

放经饥饿处理 3 h 的桃蚜、棉蚜、萝卜蚜、豆蚜、修尾蚜 5 种无毒蚜虫各 20 头,定时观察每种蚜虫的取食、迁移情况及病毒病发病情况。地块管理以保持干旱为主,以促进蚜虫的繁殖、扩散及病毒传播。投放传毒蚜虫后,每日观察蚜虫的增殖数量及扩散情况。20 d 后,随机采样 30 株(不包括接种植株),以 ELISA 方法测定每个样品中的亚组 I、II 病毒分离物,计算蚜虫传毒效率(发病株数/检测株数),并以卡平方方法统计差异显著性。

表 1 5 种传毒蚜虫对 CMV 亚组 I、II 分离物的室内传毒效率

Tab. 1 Aphid transmission efficiency of CMV subgroup I and II isolates in laboratory by five aphid species

蚜虫种类 Aphid species	重复试验 Repeated assay	病毒分离物 CMV solates	传毒效率/% Transmission efficiency <sup>1</sup>	差异显著性 Significance of difference	P
桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	1	YQ( I)	63 ( 19/30)	a	0.01 < P < 0.05
		ZL( II)	40( 12/30)	b	
	2	YQ( I)	64( 18/28)	a	0.01 < P < 0.05
		ZL( II)	40( 12/30)	b	
棉蚜 <i>Aphis gossypii</i>	1	YQ( I)	33( 10/30)	A	P < 0.01
		ZL( II)	80( 24/30)	B	
	2	YQ( I)	30( 9/30)	A	P < 0.01
		ZL( II)	75( 21/28)	B	
萝卜蚜 <i>Lipaphis erysimi</i>	1	YQ ( I)	57 ( 16/28)	a	P > 0.05
		ZL( II)	50( 15/30)	a	
	2	YQ ( I)	50( 15/30)	a	P > 0.05
		ZL( II)	57( 15/26)	a	
豆蚜 <i>Aphis craccivora</i>	1	YQ ( I)	40( 12/30)	a	P > 0.05
		ZL( II)	33( 10/30)	a	
	2	YQ ( I)	37( 11/30)	a	P > 0.05
		ZL( II)	30( 9/30)	a	
修尾蚜 <i>Megoura viciae</i>	1	YQ ( I)	53( 16/30)	a	P > 0.05
		ZL( II)	47( 14/30)	a	
	2	YQ ( I)	55( 16/29)	a	P > 0.05
		ZL( II)	47( 14/30)	a	

注: <sup>1</sup>. 表示感病百分率 括号内的数值表示感病植株数比接种植株数 传毒效率后面的字母表示卡平方统计的差异显著性 表 2 同。

Note: <sup>1</sup>. The percentages of infected plants. Number of diseased plants versus inoculated plants is in parentheses. Different letters following transmission ( %) within each assay indicates significant differences (  $P \leq 0.05$  or  $P \leq 0.01$  ) according to a chi-square test.

由表 1 统计结果表明,桃蚜对亚组 I 病毒 YQ 的传毒效率高于是对亚组 II 病毒 ZL 的传毒效率,两者在  $P < 0.05$  水平上差异显著。相反 棉蚜对亚组 II 病毒 ZL 的传毒效率高于是对亚组 I 病毒 YQ 的传毒效率,两者在  $P < 0.01$  水平上差异显著。桃蚜和棉蚜都是食性和分布较广泛传毒蚜虫,它们对 CMV 不同亚组分离物的传播效率的差异将会直接影响病毒的传播和流行。萝卜蚜、豆蚜、修尾蚜对亚组 I 病毒 YQ 及亚组 II 病毒 ZL 的传毒效率均没有显著性差异。萝卜蚜在茄科和十字花科蔬菜上发生普遍,它对 CMV 不同亚组分离物的传播效率也对病毒的传播和流行起着重要的作用。豆蚜主要危害豆科植物,也取食茄科植物。修尾蚜主要取食豆科植物,也可以在烟草等茄科植物上暂时取食。豆蚜、修尾蚜

## 2 结果与分析

### 2.1 不同蚜虫对两亚组病毒分离物的室内传毒效率

分别采用桃蚜、棉蚜、萝卜蚜、豆蚜及修尾蚜对 YQ( I )、ZL( II ) 2 个分离物进行了室内传毒效率测定,通过对传毒幼苗的症状观察及 ELISA 检测,各种蚜虫传毒效率及统计结果见表 1。

对 CMV 不同亚组分离物的传播效率对 2 亚组病毒的流行也有一定的影响。

### 2.3 混合蚜虫对两亚组病毒分离物的田间模拟传毒试验

由表 2 的统计结果可见,两个重复试验中,亚组 II 病毒 ZL 分离物的检出率分别为 83% 和 87%,显著高于亚组 I 病毒 YQ 的检出率 60% 和 63%,高出 20% 以上。这一结果与前面的室内传毒效率试验结果有很强的相关性。室内传播效率试验中,棉蚜对亚组 II 病毒 ZL 的传播效率在  $P < 0.01$  水平上显著高于对亚组 I 病毒 YQ 的传播,而且在露地试验当中,因为烟草不是棉蚜的最适宜寄主,它的频繁试探取食和快速扩散,也大大地促进了亚组 II 病毒 ZL 的传播。这一结果证明了在本试验条件下,CMV 亚

组 II 温和株系 ZL 的综合传播扩散能力高于亚组 I 强致病株系 YQ。

表 2 5 种蚜虫对 CMV 两亚组病毒分离物的田间混合传毒效率

Tab.2 Aphid transmission efficiency of CMV subgroup I and II strains in the field by five mixed aphid species

蚜虫种类 Aphid specie	重复试验 Repeated assay	病毒分离物 CMV solates	传毒效率/% Transmission efficiency <sup>1</sup>	差异显著性 Significance of difference	P
<i>Myzus persicae</i> <i>Aphis gossypii</i> , <i>Lipaphis erysimi</i> <i>Aphis craccivora</i> , <i>Megoura viciae</i>	1	YQ ( I ) ZL( II )	60 ( 18/30 ) 83( 25/30 )	a b	<0.05
	2	YQ ( I ) ZL( II )	63( 19/30 ) 87( 26/30 )	a b	<0.05

3 讨论

CMV 是植物病毒中最具经济重要性的病毒之一,CMV 可以由桃蚜、萝卜蚜、甘蓝蚜、棉蚜、豆蚜、茄无网蚜、豌豆蚜等 80 多种蚜虫非持久性传播<sup>[1-2]</sup>。既然非持久性蚜传病毒的介体种类和传毒效率是有专化性的,那么对 CMV 两亚组病毒分离物室内传毒效率的比较研究可以在一定程度上反应病毒在传播和流行上的差异。本研究所采用的 5 种传毒蚜虫中,桃蚜对亚组 I 病毒 YQ 的传毒效率显著高于对亚组 II 病毒 ZL 的传毒效率,这一结果似乎与目前我国流行的 CMV 主要以亚组 I 为主相吻合<sup>[10]</sup>。但棉蚜对亚组 I、II 两个分离物的传毒效率恰好相反,棉蚜对亚组 II 病毒 ZL 的传毒效率显著高于对亚组 I 病毒 YQ 的传播。所以,如果在某一地区或某一寄主上的蚜虫以棉蚜为主时,亚组 II 病毒 ZL 在传播和流行上便有可能会占优势。由此看来,单从蚜传效率高低的角度出发,并不能解释我国 CMV 的流行以亚组 I 病毒为主的现象,即,亚组 II 病毒同样具有大范围流行的蚜传条件。

在自然条件下,由于病毒的复合侵染、蚜虫的取食行为以及传毒过程中病毒-蚜虫-寄主之间的互作,使得病毒侵染、传播和流行的过程和最终结果更为复杂。所以,在自然条件下,病毒的田间传播试验才能更真实地反映蚜虫介体对病毒病流行的影响。本研究在露地传播试验中,投放了同等数量 5 种传毒蚜虫,病毒的田间传播结果,包含了以上几种蚜虫对病毒的传毒效率及其在烟草寄主上自由取食、自由扩散等行为特性的综合影响。研究结果表明,亚组 II 病毒 (ZL) 在田间的传播率高于亚组 I 病毒 (YQ)。这一结果与室内传毒效率的研究结果共同佐证了亚组 II 病毒也具备了与亚组 I 病毒同样的介体传播的流行条件,也在一定程度上解释了近年来亚组 II 病毒株系在我国报道频率的增加<sup>[7-10]</sup>。这对综合分析 CMV 两亚组病毒未来在我国的流行趋势有重要参考价值。

但本研究中使用的方法也存在许多限制,由于开放型的田间传播试验无法完全控制周边迁飞蚜虫的带毒情况,而更多的不同种类的蚜虫脱毒饲养也存在难度,所以在田间试验中仅投放了固定数量的少数几种蚜虫。这一试验仅是对田间蚜虫传播试验的一种模拟,而不能完全反映自然条件下复杂的蚜传情况。刘爱芝等<sup>[11]</sup>曾在烟草栽培区,利用黄皿和绿皿共诱集传毒介体有翅蚜 32 种,其中桃蚜和棉蚜分别占诱集蚜虫总量的 70%,在烟草发育的不同阶段,诱集到的蚜虫种类及组成比例也不同。而且,过去的研究认为,迁飞来的非寄生性“过路”蚜虫在非持久性蚜传病毒病的流行中起着重要作用<sup>[12,13]</sup>。所以,可以想象,在不同的气候条件及不同的作物栽培结构条件下,有不同的蚜虫种群结构,而特定的介体种群结构将会对当地 CMV 不同株系类群的传播产生不同的影响。所以,病毒病在田间的实际传播和流行,同时受到气候、传毒蚜虫的种类、数量、蚜虫传毒效率、病毒-蚜虫-寄主之间的互作等诸多因素的影响<sup>[6]</sup>。

总之,蚜虫与病毒病的流行关系密切。蔬菜上能够传播 CMV 的蚜虫种类多、繁殖快、适应性强,从露地到温室都有危害。不同蚜虫传毒效率不同,同种蚜虫在不同温度或寄主条件下传毒效率也有很大差异。所以,用有限的几种蚜虫在某一寄主上进行的传播效率研究,还不能完全反应 CMV 两亚组病毒在自然条件下传播流行的实际差异。尽管如此,蚜虫室内和模拟露地传播试验仍然对 CMV 亚组 I、II 病毒流行趋势的预测有重要参考价值。同时,这一传播效率研究给笔者以重要启示,即,作为温和株系的亚组 II 病毒在传播和流行能力上并不一定亚于亚组 I 强致病株系<sup>[10]</sup>。试验结果也提示了 CMV 亚组 II 温和株系在自然界的传播能力、竞争能力及实际存在的数量可能远比我们目前了解到的更多<sup>[14]</sup>。作为 CMV 的一个进化分支,CMV 亚组 II 病毒可能在 CMV 的生态平衡中起着不同寻常的重要作用。这一研究使我们对病毒-介体-寄主植物间的互作

及 CMV 两亚组病毒的传播和流行有了更为深入的了解。

#### 参考文献:

- [1] Palukaitis P ,Roossinck M J ,Dietzgen R G *et al.* Cucumber mosaic virus [J]. *Adv Virus Res* ,1992 ,41: 281 – 348.
- [2] Gallitelli D. The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture [J]. *Virus Research* ,2000 ,71( 1 – 2) : 9 – 21.
- [3] Ng J K ,Perry K L. Transmission of plant viruses by aphid vectors [J]. *Mol Plant Pathol* 2004 ,5: 505 – 511.
- [4] Pirone T P ,Perry K L. Aphids-Nonpersistent transmission [J]. *Adv Bot Res* 2002( 36) : 1 – 19.
- [5] Perry K L. Cucumoviruses [M]//Harris K. *Virus Insect Plant Interactions*. San Diego: Academic Press ,2000: 167 – 180.
- [6] 陈集双 ,柴立红. 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.
- [7] 王海河 ,谢联辉 ,林奇英. 黄瓜花叶病毒香蕉株系 ( CMV-Xb) RNA3 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *中国病毒学* 2001 ,16( 3) : 252 – 256.
- [8] 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 II 分离物 [J]. *微生物学报* ,2000 ,40( 4) : 346 – 351.
- [9] Yu C ,Wu J ,Zhou X. Detection and subgrouping of cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR [J]. *J Virol Methods* 2005 ,123( 2) : 155 – 161.
- [10] Tian Z ,Qiu J ,Yu J *et al.* Competition between Cucumber mosaic virus subgroup I and II isolates in tobacco [J]. *J Phytopathol* 2009 ,157: 457 – 464.
- [11] 刘爱芝 ,李世功 ,王雪芬. 河南省烟草病毒病的介体蚜虫种类及与发病关系的研究 [J]. *华北农学报* ,1999 ,14( 1) : 115 – 117.
- [12] Summers C G ,Newton A S ,Kirk M *et al.* Transmission of beet yellows and beet mosaic viruses by noncolonizing aphid vectors [J]. *Journal of Economic Entomology* ,1990 ,83( 6) : 2448 – 2451.
- [13] Yuan C ,Ullman D E. Comparison of efficiency and propensity as measures of vector importance in zucchini yellow mosaic potyvirus transmission by *Aphis gossypii* and *A. craccivora* [J]. *Phytopathology* ,1996 ,86( 7) : 698 – 703.
- [14] Power A G. Competition between viruses in a complex plant-pathogen system [J]. *Ecology* ,1996 ,77: 1004 – 1010.