

广东番茄花叶病毒的鉴定

范怀忠 孙芥菲 高乔婉
张曙光 骆学海 邹 丹

(植保系)

提 要

在1979~1981年间进行了本项调查研究工作,根据病毒粒子形态、血清学反应、物理性质、鉴别寄主植物和寄主范围等特性,广东番茄花叶病的病原病毒经鉴定有CMV和TMV—普通株系和TMV—番茄株系,在全省16个地点采集的223个标样中,它们分别分布于16,8和4个地点;它们所占比例分别约为74.4%、12.6%和13.9%。

前 言

番茄花叶病是国内外番茄生产上的一个重要病害。据国外报道^{[1][2]},番茄花叶病的病原病毒主要有TMV,CMV和PVX等,TMV的株系比较复杂,但主要是TMV—普通株系和TMV—番茄株系。在国内,已有的报道表明,TMV,CMV和PVX三种病毒在北京、昌黎、武汉^[2]和山东都有所发生,而在山东的番茄条斑病则是上述两种以上的病毒复合侵染所引致的;在西安的番茄条斑病则认为是由TMV的一个株系所引起的^[1];在杭州^[4]和兰州^[4]番茄花叶病的病原病毒已发现为TMV^[4];而在南京则是TMV—番茄株系和CMV^[5],这两种病毒分别是塑料棚架和大田里的主要病原病毒。在广东各地,番茄病毒病也相当严重发生。为了寻找有效防治途径,有必要首先进行本项调查研究。

材 料 和 方 法

自1979年5月至1981年12月,先后从广州市郊及广东各地区采集番茄病毒样本223个,在温室用汁液摩擦方法接种于番茄、黄瓜、心叶菸、普通菸、千日红等鉴别寄主植物(各3株)上,根据它们在这些鉴别寄主植物上所引起的症状特点,把类似的分离物归类,每类选出一个分离物作为病原鉴定的代表株(表1)。

• 本院电镜室李济和同志协助作电镜观察,谨此致谢。

试验用的毒源植物 分离物 I—37 为黄瓜 (*Cucumis sativus*)，分离物 II—105 连续在心叶菸上进行单枯斑分离 3 次，然后用普通菸哈瓦那 38 号为毒源植物；分离物 III—129 则用普通菸 38 号连续进行单枯斑分离 3 次，然后用番茄为毒源植物；供各项测定用。

各分离物的寄主范围，物理性质均按常规方法进行，每项试验重复 2—3 次，每单位试验用的寄主植物为 3 株。

表 1 番茄花叶病分离物在鉴别寄主上的症状

分 离 物	鉴 别 寄 主 植 物 上 的 症 状				
	番 茄	黄 瓜	心 叶 菸	普 通 菸	千 日 红
I—37 (初步认为是 CMV)	M	M	M	M	O
II—105 (初步认为是 TMV 普通株系)	M	O	LNS	M	LNS
III—129 (初步认为是 TMV 番茄株系)	M	O	LNS	LNS	LNS

注：M = 花叶 LNS = 局部枯斑 O = 不感染

试 验 结 果

(一) 广东各地区番茄花叶病各分离物的分布情况

从各地采集的 223 个标样按照它们在鉴别寄主植物上的症状特点分成 3 类(见表 2)。从表 2 可见，分离物 I—37 (初步鉴定为 CMV) 在 16 个调查点中都有分布，占总标样数的 74.4%；分离物 II—105 (初步鉴定为 TMV—普通株系) 在 8 个点中都有分布，占总标样数的 12.6%；分离物 III—129 (初步鉴定为 TMV—番茄株系) 只在 4 个点有分布，占总标样数的 13.9%。在 16 个点中，TMV 两个株系都同时有分布的为三水县和东莞县 2 个点；只有 TMV—普通株系的有广州和佛山市郊 6 个点；只有 TMV 番茄株系的有潮阳县和汕头市郊 2 个点。

(二) 分离物 I—37 病原鉴定 (鉴定为 CMV)

1. 寄主范围试验：1980 年 3~5 月和 1981 年 10~12 月按常规方法接种 7 科 37 种植物。

产生花叶症状的寄主植物有：番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 品种天津和穗城一号，野生番茄 (*L.sp*)，茄子 (*Solanum melongena*)，品种岑村红茄和杭州红茄，指天椒 (*Capsicum frutescens* var. *conoides*)，岑村尖椒 (*C. frutescens* var. *longum*)，心叶菸 (*Nicotiana glutinosa*)，普通菸品种哈瓦那 38 号 (*N. tabacum* var. *conneticut Havana 38*)，酸浆 (*Physalis peruviana*)，黄瓜 (*Cucumis sativus*)，白兰瓜 (*C. melo*)，西葫芦 (*Cucurbita pepo*)，南瓜 (*C. moschata*)，冬瓜 (*Benincasa hispida*)，节瓜 (*B. hispida* var. *chich-qua*)，西瓜 (*Citrullus vulgaris*)，丝瓜 (*Luffa cylindrica*)，白瓜 (*Cucumis melo* var. *conomon f. albus*)。

表2 本试验的三类分离物在广东各地的分布情况

采 样 地 点	采样时间	采样数	I—37 CMV	I—105 TVM(普通株系)	II—129 TMV(番茄株系)
三水县范湖公社	1981年9月29日	15	12	1	2
东莞县常坪公社	1981年10月7日	9	7	1	1
广州石牌本院蔬菜场	1979年5月17日	17*	5	13	0
广州石牌广东省农科院	1979年10月6日	7	4	3	0
广州赤岗广州市农科所	1979年11月25日	24	22	2	0
广州三元里	1979年11月7日	18	17	1	0
广州龙眼洞	1979年10月16日	5*	4	2	0
佛山市郊区	1980年1月15日	6	1	5	0
潮阳县城郊公社	1981年10月31日	18	1	0	17
汕头市郊下蓬公社	1981年10月31日	12	1	0	11
顺德县大良镇	1979年10月28日	21	21	0	0
花县花山公社	1981年10月7日	7	7	0	0
清远县石角公社	1981年10月12日	11	11	0	0
韶关市郊新召公社	1981年11月3日	16	16	0	0
湛江市郊湖光公社	1981年10月30日	26	26	0	0
海南琼山县府城公社	1981年12月10日	11	11	0	0
合 计		223	166 (74.4%)	28 (12.6%)	31 (13.9%)

* 复合感染 I—37 和 I—105。

产生局部枯斑的寄主植物有：昆诺阿藜 (*Chenopodium quinoa*)，苋色藜 (*C. amaranticolor*)。

不感染的植物有：元岗甜椒 (*C. frutescens* var. *grossum*)，曼陀罗 (*Datura stramonium*)，苦瓜 (*Momordica charantia*)，君达菜 (*Beta cicla*)，千日红 (*Gomphrena globosa*)，商陆 (*Phytolacca acinosa*)，矮牵牛 (*Petunia hybrida*)，黄豆 (*Glycine max*)，豌豆 (*Pisum sativum*)，蚕豆 (*Vicia faba*)，红豆 (*Phaseolus angularis*)，菜豆 (*P. vulgaris*)，绿豆 (*P. aureus*)，豇豆 (*Vigna Sinensis*)。

2. 物理性质测定：1980年9月~11月进行，供试植物为黄瓜和苋色藜，在两种作物上试验结果一致。试验结果：致死温度为55~60℃；稀释终点为 10^{-4} ~ 10^{-5} ；体外保毒期为5天。

3. 病毒粒子形态观察：病毒的粗提纯：黄瓜病叶100克，加0.5M柠檬酸缓冲液(pH6.5含0.5%巯基乙醇)100毫升氯仿50毫升，匀浆，冰箱静置3小时，4000转离心20分钟，上清液加6%聚乙二醇(分子量6000)和3%氯化钠搅拌溶解后，放置冰箱过夜。7000转离心30分钟，0.05M柠檬酸缓冲液重悬沉淀1小时，4000转离心20分钟，重复两次。上清液30000转离心2小时，0.05M柠檬酸缓冲液重悬沉淀，5000转离心20分钟，上清液为病毒的粗提纯液。

病毒粗提纯液按常规方法制样：2%醋酸铀负染3~5分钟，在EM—400电镜下观

察有大量病毒粒子, 球状, 大小约30nm (图1)。以少量粗提纯液接种黄瓜和番茄植株, 7天后黄瓜上呈现花叶症, 10天后番茄呈现蕨叶症, 证明球状粒子是番茄花叶病的病原病毒。

4. 血清学试验: 1981年9月进行测定, 采用常规的琼脂双扩散法, 抗血清分别用CMV—黄色株系的和CMV—豇豆株系的 (农业部植物检疫实验所提供)。抗原分别为分离物Ⅰ—37的病叶压出汁液和粗提纯液、CMV—黄色株系病叶压出汁液、CMV—豇豆株系病叶压出汁液和粗提纯液。

试验结果表明: CMV—黄色株系和豇豆株系的抗血清与分离物Ⅰ—37的病叶压出液和粗提纯液均呈阳性反应。且与黄色株系和豇豆株系抗原产生的沉淀线互相吻合, 证明它们之间的亲缘关系密切。

上述所有试验结果表明分离物Ⅰ—37是CMV的一个株系。

(三) 分离物Ⅱ—105及分离物Ⅲ—129的病原鉴定 (分别鉴定为TMV—普通株系和TMV—番茄株系)

1. 寄主范围: 在1980年11月和1981年2~4月间进行, 分别用分离物Ⅱ—105和分离物Ⅲ—129接种37种植物。试验结果表明这两个分离物的寄主范围基本相同。

发生花叶症的寄主植物有: 普通菸、番茄 (品种天津和穗城一号)、野生番茄、酸浆; 发生局部枯斑症的寄主植物有: 心叶菸、指天椒、岑村尖椒、蔓陀萝、苋色藜、昆诺阿藜、君达菜和千日红等。

不感染的植物有: 节瓜、冬瓜、丝瓜、苦瓜、白瓜、西瓜、南瓜、西葫芦、地黄瓜、白兰瓜、黄瓜、黄豆、豌豆、蚕豆、红豆、菜豆、豇豆、绿豆、茄子、矮牵牛和商陆等。

两分离物的主要差别在于: 分离物Ⅱ—105感染普通菸哈瓦那38引致花叶症, 而分离物Ⅲ—129则引致局部小枯斑症; 在酸浆上Ⅱ—105引致黄斑驳症, 而Ⅲ—129则引致绿斑驳症。

2. 物理性质测定: 按常规方法测定, 试验结果表明Ⅱ—105和Ⅲ—129两分离物的致死温度分别为90~95℃和85~90℃, 稀释终点均为 10^{-6} ~ 10^{-7} , 体外保毒期分别为14个月和2个月以上。

3. 病毒粒子形态观察: 病毒粗提纯, 两分离物的粗提纯均按 Gooding & Hebert (1967) [7] 的提纯程序进行。病毒粗提纯液按常规方法制样, 3%磷钨酸负染5分钟, 置EM—400电镜下观察, 两分离物均显示大量杆状粒子。Ⅱ—105的粒子大小为 $300 \times 18\text{nm}$, Ⅲ—129粒子大小为 $300 \times 15\text{nm}$ (图2)。

4. 血清学试验:

(1) 抗血清的制备: 用分离物Ⅱ—105的粗提纯液 (浓度19mg/ml) 作免疫抗原, 加等量不完全福氏佐剂乳化后, 在家兔后腿作肌肉注射, 每次注射抗原量为2毫升, 每周注射一次, 共3次。最后一次注射后20天, 采用耳静脉法放血。血清分离后, 置-20℃冰箱中保存备用。试管沉淀测定抗血清效价为1:512。

(2) 血清反应测定: 为了测定分离物Ⅱ—105与Ⅲ—129的相关性, 用分离物Ⅱ—

105抗血清和美国TMV—普通株抗血清(农业部植物检疫实验所提供)对分离物Ⅱ—105, Ⅲ—129和菸草TMV*的抗原进行琼脂双扩散反应测定。

琼脂双扩散反应结果: 分离物Ⅱ—105的抗血清和分离物Ⅱ—105, Ⅲ—129及菸草TMV的抗原的反应为阳性, 它们所产生的沉淀线互相吻合, 表明它们之间的亲缘关系密切。而美国TMV—普通株的抗血清和分离物Ⅱ—105、Ⅲ—129及菸草TMV的抗原均呈阴性反应, 表明美国TMV—普通株和本试验的两种分离物关系较疏远。

5. 交互保护作用试验: 在1982年4月进行, 先用分离物Ⅱ—105接种普通菸哈瓦那38号, 待充分显现花叶症状后, 再在显症的叶片上接种Ⅲ—129的粗提纯液, 另选健康的普通菸38号植株用Ⅲ—129粗提纯液接种作对照, 重复两次。

试验结果: 对照的植株接种5—7天后在接种叶出现大量小枯斑, 而处理的植株接种后20天仍未见任何斑枯。这表明分离物Ⅱ—105和Ⅲ129的关系是密切的。

讨 论

我们在广东对番茄花叶病毒的鉴定结果表明, 广东的情况和全国的情况有许多共同之处, 即主要的病原病毒是CMV、TMV—普通株系和TMV—番茄株系。在我国北方发生较多的PVX和由它与TMV或CMV复合侵染所引起的“双病毒”条斑病, 在广东还未有发现。由TMV—条斑株系所引致的所谓“单病毒”条斑病的症状虽有所发生, 但回接后只出现花叶症状, 还未能予以证实。

对于番茄花叶病的综防措施, 目前国内外都侧重于应用弱株系的保护作用^{[3][4][6]}和选育抗(耐)病品种^[6]这两个方面。

应用弱株系的保护作用来防治番茄花叶病, 其成功和失败主要决定于花叶病的发生流行程度及其最主要的病原病毒的鉴定的准确程度。由于在番茄上, 不仅不同病原病毒没有交互保护作用, 而且, 和我们的试验结果不同, 我们认为TMV—普通株系对TMV—番茄株系有保护作用而国外认为TMV—番茄株系和TMV—普通株系间没有交互保护作用^[6], 这也是一个值得进一步研究的问题, 因此, 鉴定工作更要细致。我们认为, 这很可能就是应用TMV—弱株系的保护作用, 在国内外外的温室和塑料大棚里比较成功, 而在大田里则少数成功而大多数不成功^{[4][6][8]}的原因。何况应用弱株系实际上是把一种病毒强加于全部栽种的植株体内, 如果番茄花叶病发生较少、或者所针对的病毒(强株系)实际上并不是主要的病原病毒时, 往往还会造成减产和其他不良后果。

根据广东番茄花叶病的病原病毒以CMV为主, TMV两个株系为次的情况, 在抗病育种上也应有所侧重。可是, 对于CMV所引起的番茄花叶病, 迄今在国内外还没有发现抗(耐)病品种, 起码还没有关于这方面的报道。但番茄不同品种间的抗(耐)病性肯定有所不同。这些都是值得认真调查研究的问题。至于对TMV特别是TMV—番茄株系所引起的番茄花叶病, 现已有抗(耐)病品种,^[8]但抗(耐)TMV—番茄株系的品种不一定能抗(耐)TMV—普通株系, 所以, 还应根据各该地区的优势株系来进行选

* 菸草TMV是从广州石牌菸草花叶病株分离获得的

育种工作。由于番茄青枯病在广东是一个重要的病害，在这种情况下，选育工作应以同时能抗（耐）青枯病以及CMV、TMV株系所引起的花叶病为目标。

考虑到上述情况，认为我们这个研究结果只是表明了广东番茄花叶病原病毒的种类及其分布概况。至于在一个具体地点里的具体情况还有作进一步深入调查鉴定的必要。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组等, 1975, 西安地区的番茄为什么发病, 《生物化学与生物物理学报》7 (2): 175—178。
- [2] 王小凤、周家炽, 1976, 番茄病毒病害鉴定中的三个问题, 《微生物学报》16 (1): 71—74。
- [3] 张秀华等, 1979, 植物病毒弱毒系及其应用。I. 烟草花叶病毒番茄株弱毒系的诱变和性质的研究。《植物病理学报》10 (1): 49。
- [4] 田波等, 1979, 植物病毒弱株系及其应用。II. 烟草花叶病毒番茄株弱株系N₁₁对番茄的保护作用《植物病理学报》10 (2): 109—112。
- [5] 濮祖芹、薛宝娣, 1981, 南京郊区番茄病毒病的毒源类型分析《南京农学院学报》1981 (2): 1—3。
- [6] Broadbent, L., 1976. Epidemiology and control of tomato mosaic virus. Ann. Rev. Phytopath. 14: 75-96.
- [7] Gooding, G. V & T.T. Hebert, 1967. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. Phytopathology. 57: 1285.
- [8] Yuji, Nagai., 1976. Control of the mosaic disease of tomato by seedling inoculation with the attenuated strain of TMV. Symposium on virus diseases of tropical crops. Tropical Agr. Res. Series No. 10: 179-183.

IDENTIFICATION OF THE CAUSAL VIRUSES OF TOMATO MOSAIC IN GUANGDONG PROVINCE

Faan Hwei-chung San Gi-fei Kao Chiao-wan
Chang Shu-gun Lo Xue-hai Chou Dan

(Department of Plant Protection,)

ABSTRACT

The present study was carried on in the years of 1979 to 1981. Based on the morphology of the virus particles, serological reactions, physocal properties, symptom expressins on differential host plants and ranges, the causal viruses of the tomato mosaic in Guangdong province were identified to be CMV, TMV-common strain and TMV-tomato strain.

A total of 223 mosaic specimens(isolate) were collected from 16 major tomato growing localities in the province. The above mentioned 3 causes were found to exist in 16, 8 and 4 localities respectively and among the 223 mosaic specimens they occupied 71.4%, 12.6% and 13.9% respectively.

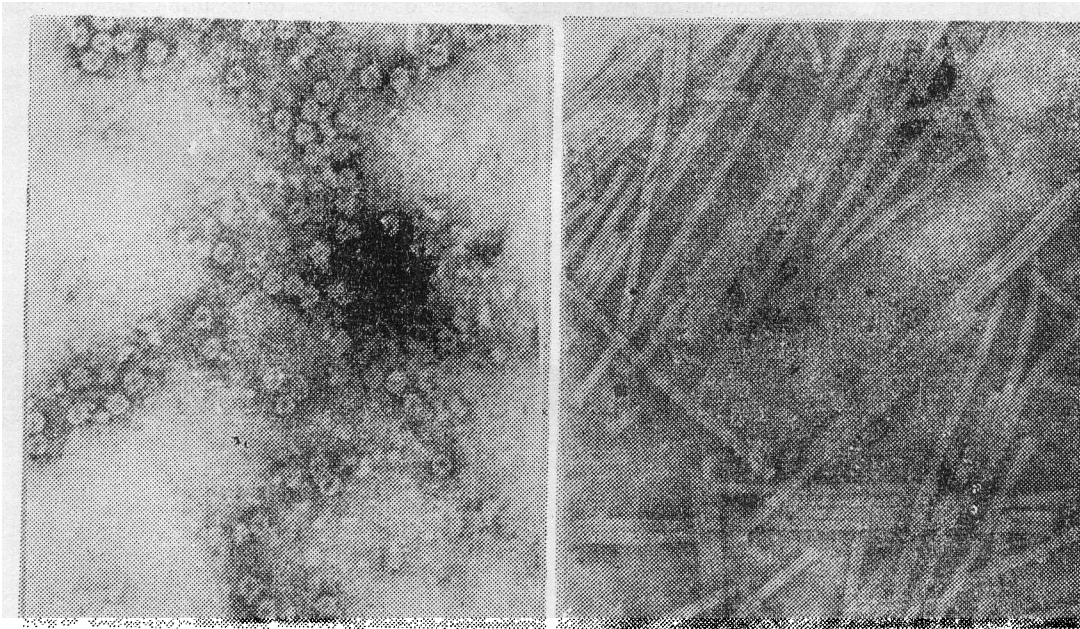


图1 分离物Ⅰ—37 (CMV) 病毒粒子

图2 分离物Ⅲ—129(TMV—番茄株系)病毒粒子