

# 番木瓜环斑病毒株系的生物学和血清学研究

肖火根 范怀忠

(华南农业大学植物病毒研究室, 广州, 510642)

**摘要** 本文对华南地区番木瓜环斑病毒(Papaya Ringspot Virus, PRV)的 Ys、Vb 和 Sm 3 个株系和夏威夷 HA<sub>5-1</sub> 弱株系的生物学和血清学等进行了进一步的研究。确证了 PRV 在华南地区至少有 3 个株系。在株系间亲缘关系方面, 华南 3 个株系间的关系较密切, 而与 HA<sub>5-1</sub> 株系的较疏远。在西葫芦植株体内增殖和运转方面, Sm 株系病毒增殖和运转最快, 在体内的浓度最高; Vb 次之; Ys 再次之; 而 HA<sub>5-1</sub> 则更次之。

**关键词** 番木瓜环斑病毒; 株系

**中图分类号** S432.41

番木瓜 (*Carica papaya*) 环斑病毒病 (Papaya Ringspot Virus, PRV) 是世界热带和亚热带地区番木瓜上的一种重要病害。蔡建和 (1989) 根据症状反应, 初步鉴定认为华南地区存有 4 个 PRV 株系, 即 Ys、Vb、Lc 和 Sm。Yeh 和 Gonsalves (1984) 通过化学诱变获得了夏威夷 HA<sub>5-1</sub> 弱株系, 对夏威夷 HA 株系有良好的保护作用。我们在防虫网室内测定其对 PRV 华南株系的保护作用。为此, 需先了解 HA<sub>5-1</sub> 的特点, 及它与 PRV 华南株系的关系。本文是对上述的 Ys、Vb、Sm 和 HA<sub>5-1</sub> 株系的生物学、血清学和理化特性的研究报告。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

华南 PRV 株系 Ys、Vb 和 Sm 由本研究室提供, 并繁殖于西葫芦 (*Cucurbita pepo*) 上。HA<sub>5-1</sub> 由我国台湾叶锡东博士提供, 并繁殖于角葫芦 (*Cucumis metuliferus*) 上。

番木瓜栽培品种——穗中红种籽购于广州市河南园艺场, 西葫芦种籽购于兰州市西固区种子公司。

HA<sub>5-1</sub> 株系兔抗血清 (Anti-HA5-1 Serum, 简称 AS<sub>HA5-1</sub>) 由叶锡东博士提供, Ys 株系兔抗血清 (AS<sub>Ys</sub>) 由本研究室提供, Vb 株系兔抗血清 (AS<sub>Vb</sub>) 由作者自制。

### 1.2 方 法

1.2.1 PRV 株系在不同寄主植物上的症状特点和潜育期 在温室, 用常规汁液摩擦法把 4 个株系分别接种于番木瓜和西葫芦上, 每个株系接种 8 株苗, 然后观察。

1.2.2 PRV 株系在西葫芦植株上的运转和增殖 (1) PRV 株系从西葫芦植株接种叶上运转出的速度: 把不同处理 (见表 1) 的接种物 (病毒粗提纯制剂) 接种在 4 株西葫芦子叶期植株 (放在光温室, 温度 28 ~ 30 °C, 光照充足) 的子叶上, 在不同间隔时间把接种叶摘除掉。接种 20 天, 记录各处理的症状表现, 并用 DAC-ELISA (肖火根, 1992) 法进行检测。

1993-12-23 收稿

(2) PRV 株系在西葫芦植株上的增殖情况:把浓度为 100 mg/L 病毒的 Ys、Vb、Sm 和 HA<sub>5-1</sub> 株系的粗提纯制剂分别接种于西葫芦苗(放在光温室,温度 28 ~ 30 °C,光照充足)子叶上。接种后每隔 3 天采集 4 株植株上的子叶和第一真叶,用 DAC-ELISA 法测定病毒浓度,用 OD 492 nm 值表示浓度的高低。

## 2 结果与分析

### 2.1 PRV 株系在不同寄主植物上的症状特点和潜育期

2.1.1 在番木瓜上的症状特点和潜育期 Ys、Vb 和 Sm 株系在番木瓜上的症状很相似,都引致叶片斑驳、花叶,茎上出现水渍状斑和线条,果上产生水渍状环斑,植株矮化;不同之处表现在叶片是否畸形。Vb 和 Sm 在病害发展后期引致叶片畸形,这与骆学海等(1988)和蔡建和(1989)的观察结果一致。但本研究还发现,在较低温度(10 ~ 20 °C)下,Ys 也会引致叶片畸形,只是 Sm 或 Vb 则使叶片畸形更为严重而已。上述 3 个株系的差异还表现在潜育期上,在 25 ~ 30 °C 下,Ys、Vb 和 Sm 的潜育期分别为 15 ~ 25、10 ~ 20 和 8 ~ 15 天,也就是说,Sm 的症状表现最快,Vb 次之,Ys 最慢,这与蔡健和(1989)的研究结果一致。

HA<sub>5-1</sub> 一般不表现症状,有时可在有些植株上看到褪绿斑,但随后又消失。这与 Yeh & Gonsalves(1984)的研究结果一致。

2.1.2 在西葫芦上的症状特点和潜育期 4 个株系在西葫芦上的症状有明显的差异,这是鉴定和区分这几个株系的重要性状。Ys 引致褪绿黄点、轻花叶,Vb 引致沿叶脉变灰白色,Sm 引致严重花叶、叶畸形,这与蔡建和(1989)的报道一致。Yeh & Gonsalves(1984)报道 HA<sub>5-1</sub> 在西葫芦上不表现症状,本研究则发现它引致不明显的沿叶脉变灰白色症状。

西葫芦子叶期进行接种,4 个株系在潜育期上也有差异。在 25 ~ 35 °C 下,Sm、Ys、HA<sub>5-1</sub> 和 Vb 的潜育期分别为 4 ~ 6、6 ~ 8、6 ~ 7 和 8 ~ 12 天。

### 2.2 PRV 株系在西葫芦植株上的运转和增殖

2.2.1 PRV 株系从西葫芦植株接种叶上运转出的速度 试验结果(表 1)表明:接种浓度都为 100 mg/L 病毒的 Sm、Vb、Ys 和 HA<sub>5-1</sub> 分别在接种 24、36、53.8 和 53.8 h 后运转出接种叶(同一处理 4 株植株的结果相同),这表明 Sm 运转最快,Vb 次之,Ys 和 HA<sub>5-1</sub> 最慢。

表 1 4 个 PRV 株系从西葫芦植株接种叶上运转出的速度<sup>(1)</sup>

株 系	接种后摘叶的时间/h											
	6		12		24		36		53.8		68.6	
	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E
Sm	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Vb	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
HA <sub>5-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

(1) 把 4 个株系的提纯物(浓度都为 100 mg/L 病毒)分别接种在西葫芦子叶期植株的子叶上,间隔不同时间把每处理各 4 株植株的接种叶摘除掉,接种 20 天后,记录各处理的症状表现:S——症状表现;E——用 DAC-ELISA 进行检测,“+”——阳性结果,“-”——阴性结果。

2.2.2 PRV 株系在西葫芦植株上的增殖情况 试验结果(图 1)表明:Sm 增殖最快,Vb 次

之, Ys 再次之, HA<sub>5-1</sub> 最慢。在系统叶中, Sm、Vb 和 Ys 分别在接种后第 6, 12 和 9 天, 也就是它们表现症状的时候达到最高浓度, 其 OD 值分别为 1.03, 0.98 和 0.92。此后, Sm 和 Vb 一直维持这个浓度到最后一次采样 (接种后第 22 天), 而 Ys 的则很快下降, 至接种后第 22 天的 OD 值为 0.72。HA<sub>5-1</sub> 要在接种后第 17 天才达到最高浓度, 此时的 OD 值为 0.67, 但还远远低于 Sm 和 Vb, 也低于 Ys 株系。

### 2.3 PRV 株系在 DAC-ELISA 中的反应

应用 DAC-ELISA 法 (肖火根, 1992) 测定 4 个株系之间的血清学关系。试验结果 (图 2) 表明, 4 个 PRV 株系的病叶粗汁液抗原与所测定的 3 种 PRV 抗血清都起阳性反应, 而且它们的病叶粗汁液的稀释度与 OD 值的线性关系不因抗血清的改变而改变, 即在 3 种抗血清的间接 ELISA 测定图中, 从上到下的曲线分别是 Sm、Vb、Ys 和 HA<sub>5-1</sub> 株系。这表明这 4 个 PRV 株系不但血清学密切相关, 而且其抗原结构也是很相似的。

### 2.4 PRV 株系病毒外壳蛋白的氨基酸组份分析

按照高文通 (1989) 的提纯程序提纯 4 个 PRV 株系, 用 LiCl 法 (Moghal & Francki, 1976) 从 4 个株系的精提纯制剂中抽提外壳蛋白。经处理后上机进行氨基酸组份分析。

各株系病毒外壳蛋白的氨基酸组份分析 (表 2) 表明: Sm、Vb 和 Ys 株系的氨基酸组份是很相似的, 而 HA<sub>5-1</sub> 株系的则与它们的有一定的差异。

### 2.5 PRV 株系病毒外壳蛋白之间的相关系数 (SAQ)

外壳蛋白的相关系数 (SAQ) 是由氨基酸组份决定的, 根据 Marchalonis & Weltmar (1971) 的公式 —  $SAQ = \frac{\sum (x_{ij} - x_{kj})^2}{n}$  可计算出来, 其中的  $x_{ij}$  和  $x_{kj}$  分别表示  $i$  和  $k$  蛋白质的某一种氨基酸的摩尔百分比。Marchalonis & Weltmar (1971) 由免疫蛋白计算出, 相关蛋白的 SAQ 值总是小于 100, SAQ 值越小, 这

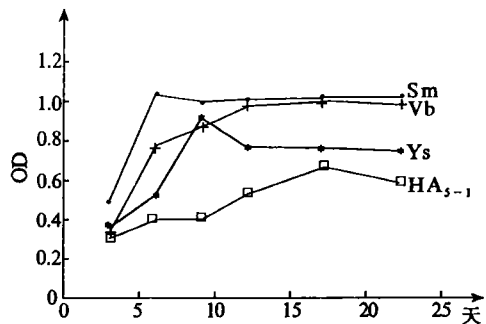
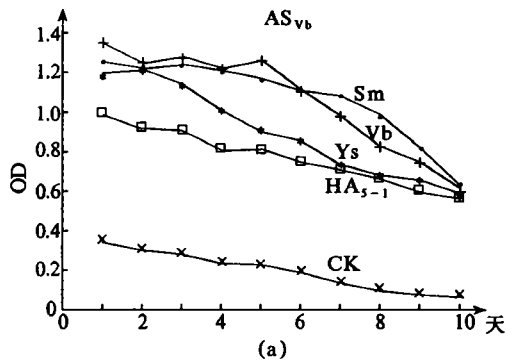
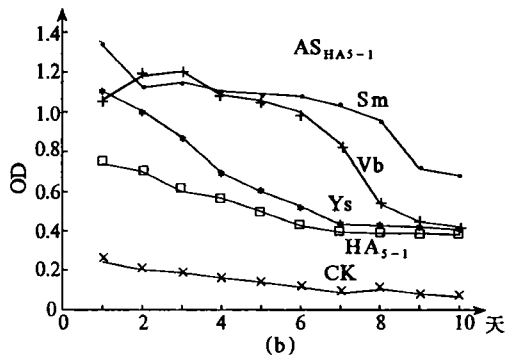


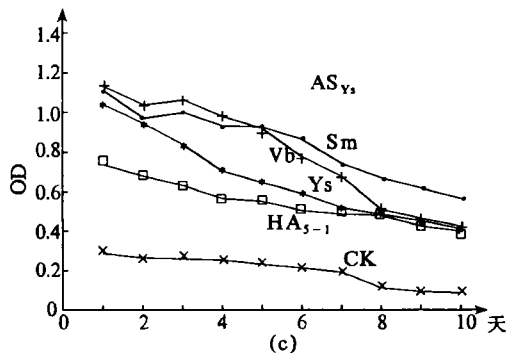
图 1 4 个 PRV 株系在西葫芦植株上的增殖曲线



(a)



(b)



(c)

图 2 4 个 PRV 株系病叶粗汁液和不同 PRV 株系抗血清在 DAC-ELISA 中的关系

Sm、Vb、Ys 和 HA<sub>5-1</sub> 株系病叶粗汁液作梯度稀释后, 用 HA<sub>5-1</sub>、Vb 和 Ys 株系抗血清分别进行测定, CK 为健康西葫芦粗汁液, 1, 2, …, 10 分别代表稀释度 1/2, 1/4, …, 1/1 024。

两种蛋白质就越相关。

根据表2的结果计算得:  $HA_{5-1}$  与华南的 Ys、Vb 和 Sm 之间, 其病毒外壳蛋白的相关系数(SAQ)分别为 42.2、43.9 和 39.7, 而 Ys 与 Vb 和 Sm 之间的则分别为 3.8 和 4.3, Vb 与 Sm 间的为 5.3。这表明  $HA_{5-1}$  与华南各株系间的亲缘关系较疏远, 而华南各株系之间的则很密切。

### 3 讨论

关于华南地区番木瓜病毒的毒原种类, 骆学海等(1988)认为除 PRV 外, 还存有一种番木瓜畸叶病毒(PMaLV), 其主要依据, 一是两者没有血清学关系; 二是两者的病毒粒子大小不同; 三是两者在番木瓜上引致的症状不同。但蔡建和(1989)则发现 PRV 和 PMaLV 的血清学关系密切, 病毒粒子的差异不明显(多数均为  $500 \sim 800 \text{ nm} \times 12 \text{ nm}$ ), 在番木瓜上的症状差异不大显著, 在其它性状

上两者基本相同。因此, 他认为把 PMaLV 作为 PRV 的一个株系(即 Vb 株系)应更为恰当。本研究结果: Vb 株系抗原不但与 Ys 株系的抗血清有阳性反应, 与夏威夷 HA 株系的抗血清也有阳性反应; Ys 和  $HA_{5-1}$  株系抗原与 Vb 株系的抗血清也起阳性反应(图2)。这说明 Ys、Vb 和  $HA_{5-1}$  株系是血清学密切相关的。而且, 在外壳蛋白氨基酸组份方面也未发现它们间有明显差异。至于在番木瓜上的症状, Ys 和 Vb 之间的差异也不显著。在温度较低( $10 \sim 20^\circ\text{C}$ )时, Ys 也能引致叶片畸形。而且, 国外不少报道 PRV 也引致叶片畸形。综上所述, 本研究也认为 PMaLV 应当是 PRV 的一个株系(即蔡建和(1989)的 Vb 株系)。

虽然这4个株系在血清学反应和病毒粒子大小方面基本相同, 但它们在寄主植物上的症状反应和潜育期, 在西葫芦上的增殖和运转速度, 以及它们的外壳蛋白的氨基酸组份等方面有一定的差异, 这表明它们确属 PRV 的4个不同株系。

本研究的外壳蛋白氨基酸组份分析结果表明:  $HA_{5-1}$  株系与华南株系的亲缘关系较远, 而华南株系间的亲缘关系较为密切。这个结论已得到外壳蛋白氨基酸序列分析结果的支持: 即  $HA_{5-1}$  与 Ys 和 Sm 间的外壳蛋白氨基酸序列同源率分别为 95.1% 和 94.4%, 而 Ys 与 Sm 的为 96.9%(叶长明等, 1991; 刘俊君等, 1991; Quemada H. et al., 1990)。

本研究结果还表明, 在西葫芦植株体内, Sm 株系病毒增殖最快, 浓度最高, 运转也最快; 依次为 Vb、Ys 和  $HA_{5-1}$ 。又根据症状反应, 致病力最强的为 Sm; 依次也一样是 Vb、Ys 和  $HA_{5-1}$ 。因此, PRV 株系病毒增殖速度和浓度, 以及在植株体内的运转速度与它们的致病力呈正相关。这种情况在进一步研究弱株系交互保护作用 and 基因工程交互保护作用上看来有较重要的指导作用。

表2 4个PRV株系病毒外壳蛋白的氨基酸组份<sup>(1)</sup>

氨基酸	株系			
	Sm	Vb	Ys	$HA_{5-1}$
Asp	9.55	10.55	9.57	8.37
Thr	5.41	5.67	5.31	8.37
Ser	4.06	4.81	4.84	4.60
Glu	9.14	9.28	8.63	7.41
Gly	7.40	6.82	7.43	10.02
Ala	6.74	6.45	6.58	4.77
Cys	2.61	2.68	2.38	4.40
Val	7.58	7.11	7.18	8.82
Met	6.04	6.47	5.53	9.34
Ile	6.76	6.38	6.42	7.02
Leu	8.99	8.31	8.91	8.18
Tyr	4.77	4.54	4.88	4.75
Phe	4.24	3.96	4.43	3.84
Lys	5.06	4.98	5.22	4.20
His	1.54	1.84	1.84	1.68
Arg	6.19	5.84	5.45	3.57
Pro	3.95	5.30	5.41	3.97

(1) Try 未测定

## 参 考 文 献

- 叶长明, 叶寅, 骆学海, 等. 1991. 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的构建. 植物病理学报, 21(3): 161~164
- 刘俊君, 彭学贤, 莽克强, 等. 1991. 番木瓜环斑病毒分离物(Sm)外壳蛋白基因克隆即序列分析. 微生物学报, 18(6): 350~351
- 肖火根. 1992. 番木瓜环斑病毒株系间的交互保护作用及其机理研究: [学位论文], 广州: 华南农业大学
- 骆学海, 范怀忠. 1988. 番木瓜畸叶病毒——一种新发现的番木瓜病毒(简报). 华南农业大学学报, 9(3): 79~80
- 高文通. 1989. 番木瓜环斑病毒的提纯研究: [学位论文], 广州: 华南农业大学
- 蔡建和. 1989. 中国南方番木瓜病毒病种类调查鉴定: [学位论文], 广州: 华南农业大学
- Marchalonis J J, Weltman J K. 1971. Relatedness among proteins: A new method estimation and its application to immunoglobulins. *Comp Biochem Physiol*, 3813: 609~625
- Moghal S M, Francki R I B. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. *Virology*, 73: 350~362
- Quemada H, L'Hostis B, Gonsalves D, et al. 1990. The nucleotide sequences of the 3' terminal regions of papaya ringspot virus strains W and P. *J Gen Virology*, 71: 203~210
- Yeh S D, Gonsalves D. 1984. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology*, 74: 1088~1091

## COMPARATIVE STUDIES ON THE BIOLOGY AND SEROLOGY OF THE STRAINS OF PAPAYA RINGSPOT VIRUS

Xiao Huogen      Fan Huaizhong\*

(Lab. of Plant Virology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

### Abstract

The detailed comparative studies were conducted on the biology, serology, physical and chemical properties of Ys, Vb and Sm strains of papaya ringspot virus (PRV) in South China and HA<sub>5-1</sub> mild strain in Hawaii. Three PRV strains found in South China were reported in this paper. The results indicated that the relationships among the South China strains of PRV were more closed, while the relationships between HA<sub>5-1</sub> strain and South China strains were less closed. It was also demonstrated that the Sm strain multiplied and spread more rapidly and had higher concentration in Zucchini Squash plants, and subsequently followed by Vb, Ys and HA<sub>5-1</sub> strain.

**Key words** papaya ringspot virus (PRV); strain

\* Faan Hwaichung