

菸草花叶病毒危害十字花科蔬菜的研究初报^{*}

郑淑宜

(福州市蔬菜研究所)

柯 冲

(福建省农科院)

陈元忠 陈 辉^{**} 章连钧

(福州市工业科学技术研究所)

提 要

在福州地区十字花科蔬菜花叶病的病原病毒中,分离物26号是一个重要毒株,出现频率为26.4%。它的物理性质与TMV十分相似,失毒温度为98~100℃之间,寄主体外存活期限为778天以上,稀释终点为 10^{-12} ~ 10^{-13} 之间。本分离物的传病介体是菜粉蝶的幼虫菜青虫,并能通过土壤传染,但不能由萝卜蚜、种子传染。本分离物的寄主范围较广,在供试植物8科17属23个种或品种中,能侵染十字花科、菊科、茄科、藜科、苋科及车前草科植物等6科12属18个种或品种。分离物的病毒质粒形态,大小为300~400×18~19nm,具有中空及亚基的螺旋结构,在寄主细胞内,浓度很高,呈束状排列。本分离物与TMV普通株有一定的血清关系。所以我们认为本分离物是TMV中的一个株系。

福州地区十字花科蔬菜的品种丰富,是冬、春两季供应市场的主要蔬菜,但受花叶病危害甚大。主要危害菜心(*Brassica* sp.)、小白菜(*B. chinensis* Linn.)、芥菜(*B. juncea* Coss.)、芥兰(*B. alboglabra* Bailey)和花菜(*B. oleracea* var. *botrytis* Linn.)等。发病率一般为5~15%,严重时达70~90%。各品种感病后,表现的症状无明显差异,初期叶片的叶脉黄化而透明。继之,叶片出现深绿和淡绿斑块相间的花叶症状,但早期受害的植株明显矮化,造成严重减产。

从五十年代以来,我国在广州(1, 2, 3, 4)、北京(5, 6)、南京(7, 8)、杭州(9)、上海(10)、海宁(11)、苏州(12)、西安(13)、重庆(14)、天津(15)等地开展了十字花科蔬菜及油菜花叶病

^{*} 本研究是福州市蔬菜研究所的研究课题,参加本研究的还有丘琬同志,特此致谢。本文内容曾于1982年在重庆召开的全国蔬菜及果树病毒病学术讨论会上宣读过。

^{**} 陈辉同志现在福州市科技情报所。

本文于1987年7月15日收到。

的研究。结果表明其病原病毒至少有三大种群：芜菁花叶病毒群、黄瓜花叶病毒群和菸草花叶病毒群。由于福州地区十字花科蔬菜花叶病的病原病毒种群、特性及侵染途径等基本情况不明。所以，开展本病病原病毒的鉴定和侵染途径的研究，为今后培育抗病品种及制定防治措施提供理论依据，是有重要意义的。

1980年以来，我们从小白菜、菜心等品种上采集花叶病毒样本409个，其中108个样本的分离物（26.4%），致病力十分强，接种在多种十字花科蔬菜上均能引起花叶症状（图1），在心叶菸（*Nicotiana glutinosa* Linn.）上均表现局部性枯斑症状（图2）。它们的病毒颗粒均呈直杆状。我们以其中的一个分离物，即采自福州市岳峰村菜心病株上的分离物26号，作为对象进行研究。现将研究结果报道如下。

一、材料与方法

采自岳峰村菜心病株的分离物26号，经过在心叶菸上单个枯斑的反复纯化后，保存在菜心及小白菜上，作为研究的毒源。

供试植物均用种子播种，盆栽，一般供试植物的幼苗有4~5片嫩叶，豇豆第一对真叶及黄瓜的子叶充分成长时，采用叶汁涂抹法，于早晨或黄昏进行接种，观察期30~50天。

物理性质试验以心叶菸为指示植物。昆虫传毒试验以菜心或小白菜为指示植物。病毒的质粒形态及在寄主植物细胞内存在方式的研究，采用浸出负染法或聚乙二醇沉淀法⁽⁴⁾和使用LKB-V型超薄切片机切片，铅、铀盐双染色制样，在JEM—7型电子显微镜下进行观察。

二、试验结果

（一）寄主范围及其症状

试验于1980年8月至1983年7月进行。供试植物共8科17属23个种和品种，每次接种10株，重复3次。无症状植物在菜心或小白菜上进行回接试验，以测定有无隐症带毒现象。试验结果表明本病毒能侵染十字花科、茄科、菊科、藜科、苋科及车前草科等6科12属18个种和品种，产生下列四种类型的症状反应：

1. 局部性枯斑

心叶菸（*Nicotiana glutinosa* Linn.）发病株数为30/30（即发病株数/接种株数）。接种后2~5天内，接种叶出现许多圆形褐色小斑。后扩大直径为1~3毫米，周缘灰褐色，中央白色的枯斑。在高温情况下，接种后2天内，叶上便出现许多灰绿色小斑，随即整个叶片失水枯萎。

辣椒（*Capicum frutescens* Linn.）发病株数为27/30。在接种后3~6天内，接种叶出现2~8个，直径为1~3毫米的褐色枯斑。

千日红（*Gomphrena glabrosa* Linn.），发病株数为30/30。在接种后3~4天内，接种叶出现红色小斑，后斑中央渐转为灰白色，直径为1~3毫米。

车前草（*Plantago major* Linn.）发病株数为30/30。在接种后16~21天内，接种叶出现褐色圈斑，直径为3~6毫米。

2. 重型花叶

菜心 (*Brassica* sp.) 发病株数为28/30。在接种后8~15天内,新生嫩叶出现叶脉黄色透明,再过3~6天,出现黄色与绿色斑驳相同的花叶,病株矮化。

小白菜 (*B. chinensis* Linn.) 发病数为22/30、普通菸 (*Nicotiana tabacum* var. *conneticut harana* 38) 发病株数为23/30、三生菸 (*Nicotiana tabacum* var. *sansum*) 发病株数为26/30、茼蒿 (*Chrysanthemum spatiosum* Bailey) 发病株数为21/30、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 发病株数为21/30、洋酸酱 (*Physalis alkekengi* Linn.) 发病株数为28/30。在接种后7~18天内,新生嫩叶均表现与菜心相似的明显花叶症状。

3. 轻型花叶

花菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis* Linn.), 发病株数为15/30。在接种后8~20天内,新生嫩叶出现淡绿与绿色相同的轻微花叶,植株老化时,花叶症状自行消失。

芥兰 (*Brassica alboglabra* Bailey), 发病株数为13/30、菠菜 (*Spinacia oleracea* Mill), 发病株数为21/30。在接种后13~20天内,均表现与花菜相似的症状反应。

4. 隐症带病

甘兰 (*B. oleracea* var. *capitata* Linn.)、曼陀罗 (*Datura stramonium* Linn.)、萝卜 (*Raphanus sativus* Linn.) 及茄子 (*Solanum melongena* Linn.), 接种后不表现症状,分别用生长叶回接心叶菸,均出现本病毒典型的枯斑症状,说明它们是隐症带毒的寄主。

试验证明,不感染本病毒的有葫芦科的黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.)、南瓜 (*Cucurbita moschata* Duch. var. *melonaeformis* Mak.), 豆科的绿豆 (*Phaseolus mungo* Linn.)、豇豆 (*Vigna sillensis* (Lour.) Endl.) 及茄科的矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm.).

(二) 物理性质

物理性质的测定按常规方法,用毒源植物榨出的原液在心叶菸上进行试验,重复三次。失毒温度及稀释终点测定,每次接种三片叶,而体外存活期限测定,则每次接种一片叶。

试验结果表明,本病毒的失毒温度为98~100℃,体外保毒期为778天以上,稀释终点在 10^{-12} ~ 10^{-13} 之间。

(三) 侵染途径

1. 昆虫传毒试验 用福州地区十字花科蔬菜上常见的菜青虫 (菜粉蝶 *Pieris rapae* Linn. 的幼虫,1~2龄) 及萝卜蚜 (*Rhopalosiphum pseudobrassicae* Dav.) 为传病虫媒,进行试验。萝卜蚜反复用单蚜在健康菜心上转株饲养,证明为无毒蚜后,才繁殖在菜心上作为传毒的虫源。菜青虫是从田间捕回的菜粉蝶在健康菜心上产卵孵化的幼虫。

(1) 萝卜蚜:无翅蚜的饲毒及传毒时间均为24小时,每次传毒及对照各用菜心10株,重复三次,分别于1981年6月8、17、29日进行。试验结果,全部植株未发现病株,证明萝卜蚜不能传递本病毒。

(2) 菜青虫:用1~2龄幼虫进行试验,分三种处理,即每株供试植物分别放饲毒后的幼虫1条、5条和10条。对照每株放健康幼虫10头。每次饲毒和传毒时间各为24小时,重复三次。试验于1981年5~11月进行。试验结果(见表1)表明,菜青虫能传递本病毒,1条虫的传毒率为10~20%,5条虫为20~60%,10条虫为20~80%。

表 1

菜 青 虫 的 传 毒 试 验

每株接种虫数 (条)	发 病 株 数					
	I (1981.5.22)		II (1981.7.7)		III (1981.11.8)	
	处 理	对 照	处 理	对 照	处 理	对 照
1	2	0	1	0	2	0
5	6	0	4	0	2	0
10	8	0	3	0	2	0

注：每种处理和对照各用菜心或小白菜10株

2. 种子传毒试验 1980年10月至1981年5月三次在病株留种均失败，因病株仅开花而不结籽。1981年6月13日留病籽102粒，播种移植后成活72株。1982年8月12日留病粒123粒，播种移植后成活98株。二批共成活170株，分别观察70天后，均未发现病株，证明病毒不会通过种子传递。

3. 土壤传毒试验 按重量，取一份接种发病的菜心叶片（切碎）与20份土壤混匀，装盆，然后种上感病品种三月青菜心健苗10株。对照用10株三月青菜心的健苗种在无病染土里。3次重复，试验分别于1981年5月11、16日及6月3日进行，发病株数分别为6、5、4株；而3次对照均未发现病株，说明在病染的土壤里种菜，会感染本病毒。

此外，还进行了病毒在淹水的土壤环境中存活期限的测定。将病染土水并保持2~3厘米水层。每隔5天，取出部分“病”土装盆，种植三月青菜心健苗10株。对照则在不淹水的染病土里种上三月青菜心健苗10株。测定结果表明，三月青菜心种在经5~10天淹水的“病”土中，发病率为50~80%，与对照的发病率（60%）相似。但种在淹水15天以上“病”土的菜心，其发病率开始降低；种在淹水41天以上“病”土里的菜心则全部没有发病（表2）。试验结果证明，本病毒在淹水的土壤环境中存活期限为41~45天。

（四）病毒颗粒形态及其在寄主细胞内的状态

1. 浸出法负染 从毒源植物的叶肉细胞内，用针刺法引出病毒质粒，或用聚乙二醇及差速离心纯化病毒颗粒，并用2%磷钨酸染色^[4]，置于电镜下观察。观察结果，病毒的质粒为短直杆状，长为300~400nm，宽为18~19nm。具有中空为2nm，表面有横纹突起，间距为2.4~1.5nm，表示病毒质粒的蛋白质亚基呈螺旋结构（图3、4）。（图1~6见封2）

2. 超薄切片 病叶按常规操作，经戊二醛和锇酸双固定，脱水、渗透后，用Epon 812包埋，包埋块切成超薄切片并经铅盐及铀盐双染色后在电镜下观察。观察结果如图5、6所示。本病毒质粒在寄主细胞内成束状并排排列或交叉排列而寄主细胞内的细胞器多消失掉。

（五）本毒株与TMV抗血清的反应试验

本试验于1981年10月，及1982年6月，由华南农业大学植病教研组高乔婉副教授指导下进行。TMV普通株抗血清是来自北京植检所，免疫双扩散的效价为1:1024，作测定用的抗原是本病毒小白菜病株汁液及聚乙二醇和高速离心的纯化剂采用SDS琼脂双扩散法，按

表 2

分离物26号毒株在淹水的土壤中的存活期测定

种植日期(月.日)	“病”土淹水天数	发 病 株 数	发 病 率(%)
5.27	0	6	60
6.1	5	8	80
6.6	10	5	50
6.11	15	5	50
6.16	20	3	30
6.21	25	4	40
6.26	30	4	40
7.1	35	2	20
7.6	40	2	20
7.11	45	0	0
7.16	50	0	0
7.21	55	0	0
7.26	60	0	0

注：供试品种为感病的三月青菜心。

常规操作进行测定。二次测定结果完全相同，即反应后 5~6 小时就出现微弱沉淀带，12 小时后可见清晰的沉淀带。其中，本病毒的病株汁液和纯化剂与 TMV 广州 39 号的沉淀带互相融合，而对照健康菜汁液及正常血清均无沉淀带出现。本结果说明本病毒与 TMV 广州 39 号之间存在有密切的血清关系。

三、讨论与结论

我国十字花科蔬菜和油菜花叶病的病原病毒，已证明有三大种群，即芜菁花叶病毒群，黄瓜花叶病毒群和菸草花叶病毒群(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)。根据试验结果，分离物 26 号在物理性质，寄主范围及症状反应，侵染途径和病毒质粒形态的特征，均与芜菁花叶病毒和黄瓜花叶病毒明显不同，与国外报道的萝卜花叶病毒也不同(17, 18)。本分离物的病毒质粒形态呈直杆状，大小为 $300\sim 400\times 18\sim 19\text{nm}$ ，虽比菸草花叶病毒(TMV)质粒的长，但它的失毒温度为 100°C ，体外存活期限为 778 天以上，稀释终点为 $10^{-12}\sim 10^{-13}$ 之间，表明它的抗逆能力很强，比较稳定。它侵染心叶菸引起接种叶局部性枯斑。蚜虫不能传递本毒株，而含有感染本毒的病菜组织的土壤会传染本毒株。这些特性均与菸草花叶病毒十分相似(16, 19)。而且，根据血清测定的结果，本毒株与菸草花叶病毒普通株抗血清产生明显的沉淀带，证明二者在血清上有一定的关系。所以，把分离物 26 号列入菸草花叶病毒群中是合理的。

本分离物 26 号与我国已报道的属于菸草花叶病毒群，为害十字花科蔬菜和油菜引起花叶病的毒株，包括广州 39 号(3)、北京孤丁 3 号(6)、南京 YMV₃(7)、浙江 TMV 毒株(9)、上海 TMV 长叶车前草毒株(10)比较，在物理性质、寄主范围和症状反应及侵染途径上有很多相同之处(表 3)。根据血清学研究，指出分离物 26 号与广州 39 号毒株对菸草花叶病毒普通株系抗

福州TMV与广州TMV分离物30、南京TMV、北京孤丁3号、浙江TMV的

表 3

物理性质、虫媒及部分寄主反应的比较

		福州TMV	广州39号	南京YMV ₃	北京孤丁3号	浙江TMV	重庆TMV
物理性质	失毒温度(℃)	>98	86~90	>98	>90	>97	>93
	存活期限(天)	>778	<1000	>29	>32	>80	>150
	稀释终点	$10^{-12} - 10^{-13}$	$10^{-4} - 5 \times 10^{-4}$	$>5 \times 10^{-7}$	10^{-8}	10^{-8}	$<10^{-6}$
传病虫媒	蚜虫	O	O	O	O	—	O +
	菜青虫	+	+	—	—	—	—
	小白菜	M	M	M	M	M	O
寄主范围及反应	甘蓝	⊕	⊕	O	—	SR	O
	心叶菸	LN	LN	LN	LN	LN	LN
	普通菸	M	LN-SN(M)	M	LNR-SNP(M)	M	M
	蕃茄	M	O	M	M	O	M
	黄爪	O	O	O	O	O	O
	千日红	LN	LN→SN(M)	—	LN	LN	—
	菠菜	M	M	—	LM	M	M

注: S=系经侵染, M=花叶, N=枯斑, L=局部侵染, R=斑纹或环斑, LM=局部性斑纹, ⊕=无症状, +=阳性结果, —=没有进行试验。O=不感染或阴性结果。

血清作SDS琼脂双扩散方法测定时,产生完全吻合的沉淀带。因此,我们认为分离物26号与广州39号是菸草花叶病毒群中的一个相同株系。本分离物26号与上海市郊为害十字花科蔬菜的TMV毒株是不同株系,因后者是菸草花叶病毒群的长叶车前草株系。至于本分离物26号与北京孤丁3号,南京YMV₃,浙江TMV毒株,重庆TMV毒株是否是相同的株系,由于试验的资料不够完全,尚无法确定。因此,进一步收集各地十字花科蔬菜与油菜花叶病毒TMV毒株,研究鉴定它们间的株系水平的关系,对全面了解我国十字花科蔬菜与油菜花叶病的TMV株系及其分布,采用抗病育种以及综合防治均有深远意义的。

本分离物在福州地区十字花科蔬菜花叶病病原比例中占26.4%。这个比例比上海地区(7.6%)、重庆的(5.59%)、浙江的(2.31%)都高,是福州地区十字花科蔬菜花叶病的一个重要病原病毒。由于它在土壤中存活期较长,会通过土壤侵染移植的菜苗,以后所感病菜苗的移植又污染土壤以及随污染土壤的搬动,造成新的感染。这种情况与上海地区为害十字花科蔬菜的TMV长叶车前草株系侵染为害情况相似(10)。几年来本病有扩大为害的趋势,要重点防治工作。根据试验结果,本分离物26号在土壤的淹水条件下,只能存活41~45天。所以我们认为做好菜园的清洁工作,把病菜及其残余部分收集烧毁,和采用与水稻或其它水生作物(如莲藕等)轮作,对防治十字花科蔬菜花叶病具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 范怀忠等, 1957, 广州及其附近十字花科蔬菜花叶病毒的鉴定。植物病理学报 3 (2) : 155~158。
- [2] 柯冲等, 1963, 广州地区十字花科蔬菜花叶病的侵染途径和流行规律。植物保护学报 2 (1) : 13~22。
- [3] 柯冲等, 1964, 广州地区十字花科蔬菜花叶病第三类病原病毒的鉴定。植物保护学报 3 (2) : 173~180。
- [4] 柯冲等, 1983, 福州十字花科蔬菜病毒病的纯化研究。福建农业科技 6 : 18~20。
- [5] 裘维蕃等, 1957, 中国白菜的一种病毒病害——“孤丁”。植物病理学报 3 (1) : 31~43。
- [6] 裘维蕃等, 1962年, 关于引致大白菜孤丁病的环斑型菸草花叶病毒的研究。植物保护学报 3 (1) : 31~43。
- [7] 魏景超等, 1958, 华东地区油菜和十字花科蔬菜花叶病的初步研究。植物病理学报 4 (2) : 94~111。
- [8] 魏景超, 1959, 油菜花叶病。科学出版社, 北京。
- [9] 王拱辰, 1978, 浙江油菜花叶病毒类型研究。微生物学报 4 : 298~310。
- [10] 徐来升等, 1980, 蔬菜病毒病研究, I 侵染青菜的烟草花叶病毒(群)。上海农业科技 (3) : 28~31。
- [11] 姚文岳等, 1984, 海宁地区茎用芥等病毒病病毒种类鉴定。中国蔬菜 4 : 37~39。
- [12] 叶华才, 1985, 青菜病毒病的病毒种类鉴定。上海农业科技 5 : 21~23。
- [13] 李经略等, 1985, 西安地区十字花科蔬菜病毒种群鉴定及其动态分析。陕西农业科学 6 : 30~31。
- [14] 蔡岳松等, 1936, 重庆市甘蓝病毒病病原研究。西南农业大学学报 1 : 45~51。
- [15] 丁金城等, 1986, 天津地区十字花科蔬菜病毒类型及其消长规律的研究。华北农学报 1 (3) : 74~77。
- [16] CAB/AAB 1975. Tobacco mosaic virus (Type strain) Description of plant viruses October 1975 Sheets 141~155 Set 9.
- [17] Natsuaki, T. et al. 1979. Radish yellow edge virus, a seed borne small spherical virus newly recognized in Japanese radish (*Raphanus sativus* L.). Annals of the Phytopathological Society of Japan 45 (3) : 313~320.
- [18] Raychaudhuri, S.P. and Pathanian, P.S. 1955. A mosaic disease of radish (*Raphanus sativus* L.). Indian Phytopathology 8 : 99~104.
- [19] Smith, K.M. 1957. Textbook of plant virus diseases. Churchill Ltd. London.

STUDY ON THE MOSAIC DISEASE OF CRUCIFEROUS VEGETABLES CAUSED BY A STRAIN OF TMV AROUND FUZHOU

Zheng Shuyi

(*Fuzhou Institute of Vegetable Crops*)

Ke Chung

(*Fujian Academy of Agricultural Sciences*)

Chen Yuanzhong, Chen Hui, and Zhang Lianjun

(*Fuzhou Institute of Industrial Science & Technology*)

ABSTRACT

of the causal agents of cruciferous vegetable mosaic diseases around Fuzhou, isolate No. 26 (the virus isolated from diseased plants of *Brassica* sp.) was an important one, its frequency being 26.4%. This virus was identified as a strain of TMV on the basis of antiserum reaction, and physical and other properties.

The physical properties of this virus were similar to those of TMV, its thermal death point being 98-100°C, the aging period more than 778 days and the dilution end point 10^{-12} - 10^{-13} .

The virus was transmitted easily by sap inoculation and less easily by larvae of white flies (*Pieris rapae* Linn.) .It was not transmitted by false cabbage aphides (*Rhopalosiphum pseudobrassicae* Dav.) or by the seeds of diseased cruciferous plants. Soil mixed with flesh residues of diseased plants induced the infection of transplanted plants.

Host range tests were made on 20 plant species or varieties belonging to 13 genera of 8 families. Of them, 14 plant species or varieties belonging to 9 genera of 6 families, including Cruciferae, Solanaceae, Compositae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae and Plantaginaceae were found to be susceptible.

Antiserum reaction between ordinary TMV antiserum and this virus antigen produced a clear precipitative band, and indicated that two viruses are related. The particles of this virus were measured 300-400 nm. in Length and 18-19 nm. in diameter, With typical central cores and spiroid structure of protein subunits.

菸草花叶病毒危害十字花科蔬菜的研究初报插图

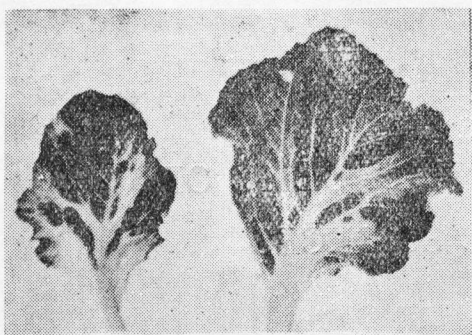


图 1.小白菜上花叶症状

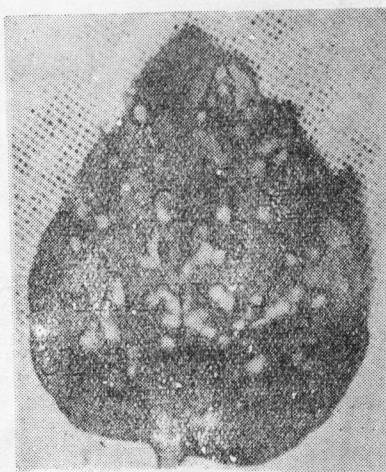


图 2.心叶蕹接种叶上枯斑症状



图 3.本病毒呈短杆状 (60000 \times)



图 4.本病毒颗粒具有中空及螺旋状蛋白质亚基结构 (150000 \times)

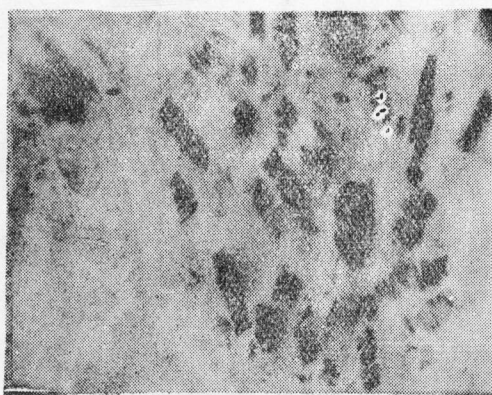


图 5.本病毒在寄主细胞内呈束状排列 (注意纵切部分) (7000 \times)

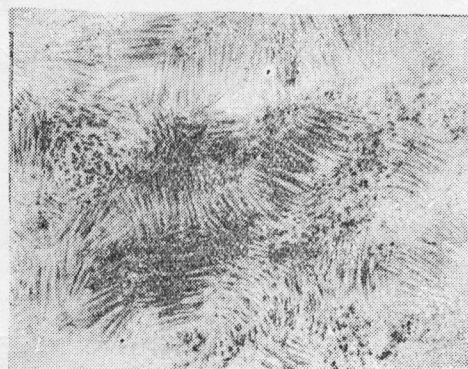


图 6.本病毒在寄主细胞内呈束状交叉排列 (注意纵切部分) (40000 \times)