

罗汉果花叶病病原病毒鉴定*

Virus Identification of Luohanguo Mosaic Diseases

蔡健和 秦碧霞 余玉冰 刘志明
Cai Jianhe Qin Bixia Yu Yubing Liu Zhiming

(广西农业科学院植物保护研究所 南宁市西乡塘路44号 530007)

(Guangxi Academy of Agricultural Sciences,
Institute of Plant Protection, 44 Xixiangtanglu, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要 从典型病株上分离到1种大小为 $12\text{ nm} \times (600\sim 800)\text{ nm}$ 的线状病毒;该病毒可通过汁液摩擦和棉蚜(*Aphis gossypii*)传播,人工接种可侵染罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*)、南瓜(*C. moschata*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、西瓜(*Citrullus vulgaris*)、毛节瓜(*Citrullus vulgaris*)和瓠瓜(*Lagenaria siceraria*)等葫芦科植物引起花叶症状,侵染苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)引起局部褪绿斑点,接种番木瓜(*Carica papaya*)、普通烟草(*Nicotiana tabacum*)、心叶烟(*N. glutinosa*)、曼陀罗(*Datura stramonium*)、洋酸浆(*Physalis floridana*)、番杏(*Tetragonia tetragonoides*)、豇豆(*Vigna sinensis*)未见有任何症状;病毒的致死温度为 $55^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$,稀释终点为 $10^{-3}\sim 10^{-4}$,在 $17^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 下放置10 d还有侵染活力;ELISA测定结果表明,该病毒与西瓜花叶病毒-2(WMV-2)有密切的血清学关系。上述结果表明,引起广西罗汉果花叶病的病原病毒是WMV-2的一个株系。本研究还表明,罗汉果花叶病毒与番木瓜环斑病毒(PRSV)、马铃薯Y病毒(PVY)、烟草蚀纹病毒(TEV)、大豆花叶病毒(SMV)及莴苣花叶病毒(LMV)均有较密切的血清学关系。

关键词 罗汉果 罗汉果花叶病 病毒鉴定 西瓜花叶病毒-2

中图法分类号 S 668.9 S 432.41

Abstract A kind of flexuous virus was isolated from the mosaic symptoms leaves of Luohanguo (*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C Jeffery) which grows in Guangxi, southern China. The virus particles measured $12\text{ nm} \times (600\sim 800)\text{ nm}$. It caused mosaic symptoms in some plants of Cucurbitaceae such as *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *Cucumis sativus*, *Citrullus vulgaris*, *C. vulgaris* and *Lagenaria siceraria*, and caused local chlorotic spot in *Chenopodium amaranticolor* by mechanical inoculation, but did not cause any symptoms in *Carica papaya*, *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Datura stramonium*, *Physalis floridana*, *Tetragonia tetragonoides* and *Vigna sinensis*. The lethal temperature of the virus was 55°C to 60°C . The dilution end-point was 10^{-3} to 10^{-4} . ELISA test indicated that the virus isolates had a close serological relationship with Watermelon mosaic virus-2 (WMV-2), Papaya ring spot virus (PRSV), Potato Y-virus (PVY), Tobacco etch virus (TEV), Soybean mosaic virus (SMV), and Lettuce mosaic virus (LMV), and especially closer to WMV-2. The above results show that the virus that causes Luohanguo mosaic disease is a strain of WMV-2.

Key words *Siraitia grosvenorii*, mosaic disease, virus identification, watermelon mosaic virus-2

罗汉果 [*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffery] 属葫芦科 (Cucurbitaceae) 罗汉果属 (*Siraitia* Merr) 多年生名贵药用植物, 在国内外享有盛名。据查, 在罗汉果主产区广西永福县等地花叶病普遍发生, 病株率高达100%。染病植株叶片褪绿、斑驳、畸形, 并产生疱叶症状, 所结果实较小且质量下降。苗期染病的植株长势较弱, 生长缓慢, 对生产影响很大。本病早年已引起有关方面注意, 林国光等^[1~3] 1984年报道的罗汉果疱叶丛枝病包含有花叶斑驳的症状, 组

织超薄切片发现风轮状的病毒内含体, 并发现此病可通过棉蚜和汁液摩擦传染, 侵染葫芦科等多种植物; 陈振光等^[4,5] 1995年发现该病的病原是一种线状病毒, 大小为 $12\text{ nm} \times 800\text{ nm}$, 摩擦接种可侵染黄瓜引起花叶症状, 并提出本病可通过茎尖脱毒培养无毒苗进行防治。作者则在病毒的生物学和血清学特性等方面做进一步的鉴定研究。

1 材料与方法

1.1 罗汉果花叶病毒 (Luohanguo Mosaic Virus, 简称 LuoMV) 标样采集

1998年到罗汉果种植面积最大的广西永福县龙

2000-09-11收稿, 2000-12-01修回。

* 广西青年科学基金资助项目 (9721012)。

江乡采集表现典型花叶症状的罗汉果病叶,放塑料袋保鲜,带回实验室摩擦接种到健康的西葫芦和罗汉果上,经纯化后在上述植物上保毒,并以此作为进一步研究的毒源

1.2 寄主范围及症状反应

用汁液摩擦接种法测定了以下植物: 罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*), 西葫芦 (*Cucurbita pepo*), 南瓜 (*C. moschata*), 黄瓜 (*Cucumis sativus*), 西瓜 (*Citrullus vulgaris*), 苦瓜 (*Momordica charantia*), 瓠瓜 (*Lagenaria siceraria*), 毛节瓜 (*Citrullus vulgaris*), 番木瓜 (*Carica papaya*), 普通烟 (*Nicotiana tabacum*), 心叶烟 (*N. glutinosa*), 曼陀罗 (*Datura stramonium*), 苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*), 豇豆 (*Vigna sinensis*), 番杏 (*Tetragonia tetragonioides*), 洋酸浆 (*Physalis floridana*) 等

1.3 蚜虫传染试验

用无毒的棉蚜 (*Aphis gossypii*) 在病株上取食 15 min, 然后转移到健康的罗汉果和西葫芦上饲养 2 h, 杀死蚜虫后, 放至防虫笼观察 20 d-30 d

1.4 体外性质测定

病毒的致死温度、体外保毒期和稀释终点测定按常规方法进行。

1.5 病毒提纯

采用双 PEG 沉淀法。

1.6 病毒的电子显微镜观察

按常规方法进行。

1.7 病毒的血清学关系测定

用 A 蛋白间接 ELISA 方法测定罗汉果花叶病毒与 WMV-2 (西瓜花叶病毒-2), PRSV (番木瓜环斑病毒), TEV (烟草蚀纹病毒), PVY (马铃薯 Y 病毒), SMV (大豆花叶病毒), LMV (莴苣花叶病毒), CMV (黄瓜花叶病毒) 及 TMV (烟草花叶病毒) 等病毒的血清学关系。罗汉果花叶病毒抗血清由本实验室制备。WMV-2 抗血清由 Dr. Piero Roggero (Istituto Fitovirologia Applicata, CNR, Italy) 提供。TEV 抗血清由西北农林科技大学魏宁生教授提供。LMV 抗血清和 SMV 抗血清由浙江大学生物技术研究所周雪平博士提供。TMV 抗血清由中国农科院油料所李丽丽研究员提供。CMV 抗血清由华南农业大学植物病毒研究室提供。

2 试验结果

2.1 罗汉果花叶病毒的寄主范围及症状反应

试验结果,除罗汉果外,该病毒还可以侵染西葫芦、南瓜、黄瓜、西瓜、毛节瓜、瓠瓜等葫芦科植物

引起花叶症状 (图 1-3); 侵染藜科的苋色藜引起局部褪绿斑点, 潜育期为 7 d-10 d 接种番木瓜、普通



图 1 罗汉果感染花叶病毒引起的花叶、畸叶和疱斑症状

Fig. 1 Symptoms of Luohanguo infected by LuoMV



图 2 罗汉果花叶病毒粒子 (LuoMV)

Fig. 2 Virus particles of LuoMV

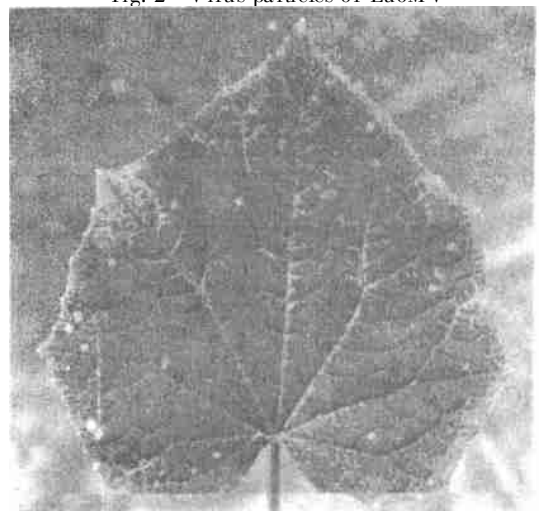


图 3 黄瓜感染 LuoMV 表现的症状

Fig. 3 Symptoms of cucumber infected by LuoMV

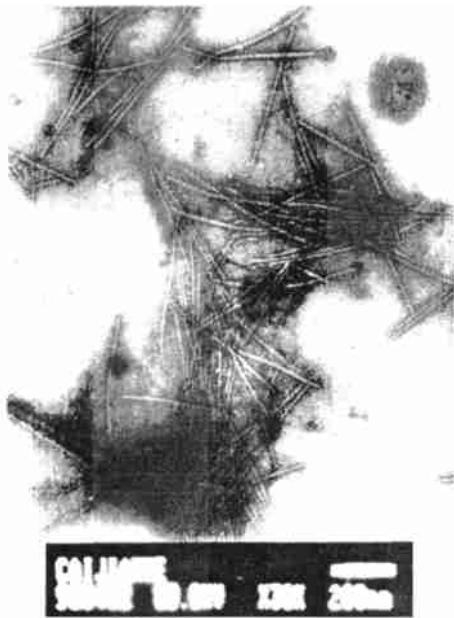


图4 南瓜感染 LuoMV 表现的症状

Fig. 4 Symptoms of squash infected by LuoMV

烟、心叶烟、曼陀罗、洋酸浆、番杏和豇豆等未见有任何症状反应。

2.2 蚜虫传染试验

试验结果表明,罗汉果花叶病毒可以通过棉蚜传染,接种10株罗汉果幼苗,结果3株发病,接种西葫芦幼苗8株,结果4株发病

2.3 病毒体外性质测定

用西葫芦病叶测定结果,该病毒的致死温度为 $55^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$,稀释终点为 $10^3 \sim 10^4$,在 $17^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 条件下病毒粗汁液放置10d仍然具有侵染活力。

2.4 病毒提纯和电子显微镜观察

用双PEG沉淀法提纯获得的病毒粗提物经负染后,通过电子显微镜观察,可见到许多线状的病毒粒子(图4),多数大小在 $12 \text{ nm} \times (600 \sim 800) \text{ nm}$

2.5 血清学关系测定

ELISA测定结果见表1 罗汉果花叶病毒多克隆抗血清与西瓜花叶病毒-2(WMV-2),番木瓜环斑病毒(PRSV),马铃薯Y病毒(PVY),大豆花叶病毒(SMV),烟草蚀纹病毒(TEV)等呈阳性反应;西瓜花叶病毒(WMV-2)抗血清、莴苣花叶病毒(LMV)抗血清和大豆花叶病毒(SMV)抗血清与罗汉果花叶病毒呈阳性反应;而黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草花叶病毒(TMV)抗血清与罗汉果花叶病毒呈阴性反应 可见罗汉果花叶病毒与WMV-2 PRSV、PVY、SMV、TEV、LMV等马铃薯Y病毒组成员有较近的亲缘关系,而与CMV和TMV没有亲缘关系。

表1 ELISA方法测定罗汉果花叶病毒与其他相关病毒的血清学关系

Table 1 The serological relationship between LuoMV and some other related plant viruses by ELISA

病毒 Virus	血清反应 Serological reaction									
	LuoMV	WMV-2	PVY	PRSV	TEV	SMV	LMV	CMV	TMV	
LuoMV	+++	+++	+	+	+	+	+	-	-	

+++ : 强阳性反应 Strong positive reaction; + : 阳性反应 Positive reaction; - : 阴性反应 Negative reaction.

3 讨论

根据上述试验结果,罗汉果花叶病毒(LuoMV)仅能侵染供试植物中葫芦科的罗汉果、西葫芦、南瓜、黄瓜、西瓜、瓠瓜、毛节瓜和藜科的苋色藜,可以通过棉蚜和汁液摩擦传染。LuoMV与PVY组病毒成员WMV-2、PVY、PRSV、TEV、SMV、LMV等有较密切的血清学关系。林国光^[3]1984年通过组织超薄切片发现LuoMV有风轮状病毒内含体,由此可见罗汉果花叶病毒(LuoMV)应是PVY病毒组的一个成员。对侵染葫芦科的一些病毒的特性进行比较^[6-9]可见, TMV、CMV、SqMV(南瓜花叶病毒)和SqLCV(南瓜曲叶病毒)的病毒粒子为杆状或球状;WMV-1(西瓜花叶病毒-1)仅能侵染葫芦科植物,与WMV-2血清学反应不同;LuoMV不侵染番木瓜而区别于PRSV,罗汉果花叶病毒(LuoMV)与西瓜花叶病毒-2(WMV-2)的病毒形态大小、病毒体外性质、传染方式和寄主反应等方面特性基本相同,而且,两者之间存在较密切的血清学亲缘关系(表1),但LuoMV在苋色藜上仅引起轻微的褪绿斑点,而WMV-2在苋色藜上可产生较严重的局部坏死斑点,可见这两者在侵染力等方面还存在一定差异,因此,我们初步认为罗汉果花叶病毒是西瓜花叶病毒-2的一个株系,暂定为WMV-2-罗汉果株系(WMV-2-Luo)。

本文报道的罗汉果花叶病毒与陈振光等^[4,5]1995年报道的情况基本相同,病毒粒子线状,摩擦接种黄瓜产生花叶症状。据了解,福建的罗汉果是早年从广西引进的,而罗汉果主要是通过无性繁殖的,因此,福建的罗汉果花叶病可能是从广西带过去的。

本文的研究结果与林国光等^[1-3]报道的罗汉果胞叶丛枝病在传染方式、传播媒介及在罗汉果等葫芦科植物上的症状反应等方面存在相同之处,林国光等^[2]用罗汉果胞叶丛枝病病叶超薄切片观察到风轮状的病毒内含体,而这正是WMV-2等马铃薯Y组病毒在细胞内所形成的特征性结构^[10]。因此,我们认为,过去报道的罗汉果胞叶病实际上就是罗汉果花叶

病。令人奇怪的是，过去认为是普遍发生的罗汉果疱叶丛枝病，在不足 20 年后的今天却难以找到丛枝症状，普遍见到的是罗汉果花叶病的症状，我们对丛枝病是否曾经在广西罗汉果产区普遍发生表示怀疑

致谢

广西农科院植保所孙恢鸿研究员对本研究提出许多宝贵意见，永福县科技局陈作胜先生等协助调查和采集罗汉果花叶病样品，广西大学电镜室文忠振老师帮助观察病毒粒子，特此致谢。

参考文献

- 1 林国光，周广泉．罗汉果疱叶丛枝病的病原鉴定．广西植物，1982，2 (4): 191- 193.
- 2 林国光，周广泉．罗汉果疱叶丛枝病的病原及其在某些寄主上的症状反应．广西植物，1984，4 (3): 257- 260.
- 3 周广泉等．罗汉果疱叶丛枝病的媒介昆虫和防治途径的研

究．广西植物，1984，4 (3): 261- 264.

- 4 陈振光，林治良．罗汉果花叶病病原的电镜观察．福建农业大学学报，1995，24 (2): 247.
- 5 林治良，陈振光．罗汉果无花叶病苗的培育．福建农业大学学报，1995，24 (2): 162- 166
- 6 联邦真菌研究所应用生物学家 (英) 汇编．植物病毒志，复旦大学生物系植物病毒研究室译．上海：上海科学技术出版社，1986，5- 7.
- 7 蔡健和等．中国南瓜曲叶双生病毒的生物学、血清学和分子杂交的研究．中国病毒学，1994，9 (3): 222- 225.
- 8 蔡健和，范怀忠．华南番木瓜病毒病及环斑病毒株系的调查鉴定．华南农业大学学报，1994，15 (4): 13- 17.
- 9 李向东等．侵染西瓜的烟草花叶病毒的鉴定．山东农业大学学报，1996，27 (2): 181- 184.
- 10 E 库尔斯塔克．植物病毒比较诊断学．裴美云译．北京：农业出版社，1981，526- 537.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 60 页 Continue from page 60)

而且个体数在样方单元中的数量变化一般较大，用一个的数值来描述种群在空间分布中的拥挤程度有一定的模糊性，而用刀切法来估计种群的平均拥挤度，不仅得到了一个合理的估计值，还具有一定可靠性的估计区间，因此在某种意义上克服了单独给出一个平均拥挤度值的缺点。刀切法是将同一数据资料经过刀切处理后，求得其估计区间。这样增加了计算上困难，但是经过刀切处理可以减少偏差^[6,7]。另外，通过对平均拥挤度虚拟值进行正态性检验，间接地验证了 Tukey 猜想的适用性，使合理地应用刀切法估计种群的平均拥挤度有了理论依据。本文的研究表明用刀切法来估计种群的平均拥挤度是有效和适用的。

参考文献

- 1 梁士楚．广西红树林群落的数量分类．广西科学院学报，

1993，9 (2): 8- 12.

- 2 梁士楚，范航清，何斌源．广西海岸白骨壤群落的数量分析．广西科学院学报，1993，9 (2): 94- 97.
- 3 梁士楚，莫竹承，葛文标．广西曲湾红树植物种群分布格局的研究．见：范航清，梁士楚主编．中国红树林研究与管理．北京：科学出版社，1995．85- 93.
- 4 郑松发，郑德璋，廖宝文．海莲群落和木榄群落主要种群分布格局的研究．见：郑德璋，郑松发，廖宝文．海南岛清澜港红树林发展动态．广州：广东科学技术出版社，1995．53- 62.
- 5 王伯荪，余世孝，彭少麟．植物群落学实验手册．广州：广东高等教育出版社，1996．100- 102.
- 6 洪伟，林思祖．计量林学研究．成都：电子科技大学出版社，1993．50- 55.
- 7 陈华豪．用刀切法估计多样性指数．东北林学院学报，1982，(4): 87- 97.

(责任编辑: 邓大玉)