

杨树上发生的两种病毒*

向玉英

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 从河南、湖南和北京采集到的具明显系统性紫红色坏死变形[PV-1]和叶褪绿皱缩[PV-2]杨树病株,经病害症状观察、病毒提纯和电镜观察、病毒回接、生化性状等试验,证明两种分离物是球状病毒粒子和杆状病毒粒子,是杨树上发生的两种病毒的病原。用杨树毒汁接种能感染多种草本植物。从病毒粒子的形状大小、理化性质、生物测定和血清反应,认为[PV-1]和[PV-2]分别属CMV和TMV。抗病品种鉴定看出,国内乡土种和北方型的品种抗病力较强,南方型的美洲黑杨和欧美杨易感病。

关键词 杨树; 病毒; 黄瓜花叶病毒; 烟草花叶病毒

杨树在我国分布广泛,栽培历史悠久。近年来杨树花叶病毒病发生在欧洲的许多国家,在意大利北部,对美洲黑杨的危害十分严重;加拿大、美国均有报道;亚洲的日本、印度也有报道。但我国对发生在杨树上的病毒还缺乏了解,为此作者从1980~1988年,先后对湖北、湖南、河南、河北、江苏、山东、北京等省市主要杨树栽培区的病毒发生情况进行了调查,并采集和分离到线状、球状、杆状病毒粒子,从症状到性状进行了初步研究。线状病毒引起的花叶病已发表^[1,2]。现将球状、杆状病毒的研究结果报道于后。

一、材料与 方法

(一) 材料来源

病毒1号[PV-1]:1980年夏在北京市引种的欧美杨上采得;1982年6月中旬又在湖南省汉寿县63杨上采得。

病毒2号[PV-2]:1986年在北京市引种的欧美杨病株上分离到2次。1985年又在河南鄢陵县69×63杨上发现病株。

(二) 病毒提纯

[PV-1]:以普通烟为杨树病毒的繁殖寄主,接种2周后采收病叶,冰冻后在0.5M Na₂HPO₄,含0.1%巯基乙醇,pH8.0溶液中匀浆,过滤后加等体积氯仿搅拌,用每分钟

本文于1989年5月10日收到。

* 本研究承蒙裘维善教授热情指导和审阅文稿;工作中得到微生物所奚中兴和徐绍华同志热情帮助;参加工作的还有张丽华、侯艳同志;林科院电镜室协助观察,特此一并致谢。

4 800转速离心30 min, 上清液加入10%聚乙二醇, 沉淀悬浮在1M EDTA Na_2 、pH7.5的缓冲液中, 低速离心取上清液, 再行2次高低交叉离心, 即得提纯病毒制剂。

[PV-2]: 将接种在普通烟上的病叶加入1%羟基乙醇的0.5M磷酸缓冲液(1:1), 过滤上清液加入8%正丁醇, 在沉淀取上清液离心10 000 g, 30 min, 取上清液加4%氯化钠和4%聚乙二醇, 离心10 000 g, 20 min, 沉淀用0.01M磷酸缓冲液悬浮, 离心10 000 g, 20 min, 上清液即为提纯病毒。

以上提纯病毒稀释后, 点样于铜网, 用1%中性磷钨酸负染, 在菲利普EM-4007电镜下观察。

(三) 寄主反应试验

供试寄主有豆科、藜科、苋科、美国石竹等9科13种草本植物, 种子由中科院微生物所、中国农科院蔬菜所、农业部植检所、复旦大学生物系供给。按2:1的病叶和磷酸缓冲液研磨毒汁接种在温室无病健苗上, 豆科接种于两片子叶, 其他植物接种于4~5片叶期的平展叶上。10~20天后检查感染症状。

(四) 稳定性测定

用普通烟作繁殖寄主, 采病叶研磨测定稳定性。致死温度采用在试管内放入10滴病汁, 在55~100℃之间, 间隔为5℃, 处理10 min, 接种后5~15天观察结果。稀释终点用无菌水10倍间隔, 稀释成 10^{-1} ~ 10^{-7} 。体外存活期在室温下进行。以上各处理重复3次。用常规接种法, 接于心叶烟、菜豆、豇豆上。

(五) 血清测定

由农业部植检所提供的黄瓜花叶病毒抗血清(CMV AS)和烟草花叶病毒抗血清(TMV AS)作血清亲缘对照。[PV-1]用琼脂双扩散法, [PV-2]用免疫电镜法^[3,4]。

(六) 杨树品种对两种病毒的抗性测定

取田间杨树病毒叶片, 以1:1的磷酸缓冲液制成糊状毒液, 用常规法接于温室水培各杨树品种的嫩枝和幼叶上, 1~2月后检查发病情况。

二、试验结果

(一) 两种病毒在杨树上引起的症状

[PV-1]: 病株全部叶片及叶柄呈紫红色, 叶缘皱缩、发焦、变形(图版I-1), 随植株长大, 气温升高, 症状隐潜, 此种症状在湖南省汉寿县的63杨上6月中旬是发病高峰。

[PV-2]: 病叶有紫褐色斑点(图版I-4), 主脉呈褐色、发皱, 叶背更明显; 叶肉失绿, 皱缩明显。在苗圃病叶从春到秋均能发生, 8~9月在嫩梢顶部增多, 是发病高峰。

(二) 病毒鉴定

1. 病毒形态观察 采典型的杨树病毒叶片, 用聚乙二醇提取法作电镜观察, 重复3~5次, 随机取样测量, 观察结果: [PV-1]球状颗粒, 有清晰的核心, 直径约28.5 nm(图版I-2)。[PV-2]为杆状颗粒, 大小为337nm×15 nm, 髓心明显, 质地均匀(图版I-5)。对照健康杨叶未观察到类似颗粒。

2. 病毒回接 将杨树病叶接种于普通烟叶, 在表现典型症状时作电镜观察, 发现具有相同的病毒颗粒, 这表明为接种所致。

将[PV-1]和[PV-2]症状明显的杨树病叶，用磷酸缓冲液(加0.1%EDTA)制成浓缩毒汁，接种于水培健康美洲黑杨的幼枝、叶上，2个月后新生叶发病，长出与自然病叶相似症状，作电镜检查，发现两者病毒粒子相同，见图版1-3。

3. 病毒浓度测定 用554-紫外分光光度计，测定提纯病毒液 OD 260 nm 及 OD280 nm 的紫外吸收光谱比值，其结果[PV-1]每公斤接种烟叶病毒浓度含量为4.8 mg/ml，紫外吸收1.65。[PV-2]每公斤接种烟叶病毒浓度含量为2.7 mg/ml，紫外吸收1.20。

表1 两种杨树病毒在草本植物上的症状反应

病 毒 寄主植物	[PV-1]	[PV-2]
普通烟	系统花叶及蕨叶	系统花叶褪绿斑
心叶烟	系统花叶及蕨叶	枯斑，褐色边缘清晰
三生烟	系统花叶，叶有变形	无 症 状
菜 豆	局部坏死斑	局部坏死斑或无症状
蔓陀萝	褪绿坏死斑	枯 斑
苋色藜	局部红褐坏死斑	局部坏死斑或无症状
昆诺藜	局部浅褐坏死斑	无 症 状
辣 椒	坏死和花叶	花 叶
千日红	系统花叶	红褐色晕状枯斑
蕃 茄	系统花叶和蕨叶	系统花叶
黄 瓜	系统花叶	无 症 状
豇 豆	局部枯斑，茎坏死	无 症 状

表2 热处理病毒汁液在鉴别寄主上的反应

温 度 (°C)	[PV-1] (豇豆、菜豆)	[PV-2] (心叶烟)
55~60	枯 斑	枯 斑
65~70	枯 斑	枯 斑
75~80	无 反 应	枯 斑
85~90	无 反 应	无 反 应
95~100	无 反 应	无 反 应

反应，血清学相同。[PV-2]与 TMV_{As} 之间有较多的共同抗原，血清反应呈阳性，在亲缘上是相近的。

2. 性状比较 由表3、4看出，[PV-1]与CMV有类似的寄主反应，并且性状趋于一致，说明它们是类似的病毒；[PV-2]与TMV具有类似的形态，寄主反应也趋于一致，说明它们是类似的病毒。CMV是国内首次在杨树上分离到，TMV 1962年裴美云在北京的毛白杨上分离到^[8]，这次是从欧美杨上再次分离到。

(六) 杨树品种对两种病毒抗性的测定

从表5看出，63杨较易感染[PV-1]，发病较轻的有69杨、72杨、I-154杨等，其他品

(三) 病毒在寄主植物上的反应

表1说明[PV-1]的鉴别寄主黄瓜、蕃茄，7~10天呈系统花叶，菜豆、豇豆、苋色藜，5天后叶片枯斑；繁殖寄主是普通烟和心叶烟，7天后新叶系统花叶和蕨叶。[PV-2]鉴别寄主是心叶烟、苋色藜，5~7天呈局部坏死斑，繁殖寄主是普通烟，7~10天新叶为系统花叶。

(四) 病毒稳定性测定

致死温度见表2，经10 min热处理，[PV-1]在65~70°C，[PV-2]在75~80°C时仍有致病力，超过时就失去了感染作用。

稀释终点：将两种毒汁分别接种在菜豆、豇豆和心叶烟上，试验表明[PV-1]稀释 10^{-3} ，[PV-2]稀释 10^{-5} 有毒力，浓度再稀时，毒力失去致病作用。

体外存活期：将两种毒汁置于室温，以不同时间接种寄主，发现[PV-1]保持3天，[PV-2]保持10天，超过此时间病毒完全失去毒力。

(五) 两种杨树病毒的组(群)归属

1. 血缘关系 用血清反应测定两种病毒的亲缘关系，结果表明[PV-1]与CMV_{As}产生明显的沉淀线，互相融合相接，呈阳性

表3 两种杨树病毒与标准寄主的反应比较

寄主	普通烟	三生烟	心叶烟	蔓陀萝	蕃茄	苋色藜	黄瓜	菜豆	豇豆
[PV-1]	系统花叶	—	系统花叶	褪绿坏死斑	蕨叶畸形	局部坏死斑	系统花叶	局部坏死	局部坏死
CMV ^[5]	系统花叶	—	系统花叶	—	系统花叶	—	系统花叶	局部坏死	局部坏死
CMV ^[6]	系统花叶	—	系统花叶	—	蕨叶畸形	局部坏死斑	系统花叶	—	—
CMV ^[7]	系统花叶	—	系统花叶	褪绿坏死斑	蕨叶畸形	局部坏死斑	系统花叶	局部坏死	局部坏死
[PV-2]	系统花叶	枯斑	枯斑	局部坏死斑	系统花叶	局部坏死斑	局部坏死斑	枯斑	—
TMV ^[5]	系统花叶	—	枯斑	局部坏死斑	系统花叶	—	局部坏死斑	—	—
TMV ^[6]	系统花叶	—	枯斑	局部坏死斑	—	局部坏死斑	无反应	—	—
TMV ^[7]	系统花叶	枯斑	枯斑	局部坏死斑	系统花叶	局部坏死斑	无反应	枯斑	—

表4 两种杨树病毒与标准病毒的性状比较

性状	粒子大小 (nm)	形状	致死温度 (°C)	稀释限点	保存期 (d)	传播方式
[PV-1]	28.5	等轴球状	65~70	10 ⁻³	3	汁液
CMV ^[6]	30	等径球状	60	10 ⁻⁴	3~4	
CMV ^[7]	28	等径球状	79	10 ⁻⁴	3~4	
CMV ^[5]	30	等轴球状	60~65	10 ⁻³	3~7	汁液
[PV-2]	337×15	直杆状	80	10 ⁻⁵	10	汁液
TMV ^[5]	330×15	直杆状	90	10 ⁻⁶	稳定	汁液

种不发病。易感染[PV-2]的为63杨、69杨，轻发病的为72杨、I-154杨等，其它品种不发病。表5还表明两种病毒侵染的趋势较一致，这可能和种源有关，即南方型的欧美杨都较易感病，多起源于美洲黑杨类型，北方型的品种都较抗病，多是乡土树种。

三、结论与建议

1. 从北京、湖南、河南等地采集的两种病毒，经研究证明是球状病毒粒子和杆状病毒粒子，分别属于黄瓜花叶病毒组和烟草花叶病毒组，是发生在杨树上的两种病毒病的病原。用病汁摩擦接种能感染多种草本植物，其中有鉴别意义和用于繁殖的草本植物分别为普通烟、黄瓜、菜豆、蕃茄、豇豆、苋色藜和心叶烟。

2. 这两种病毒对杨树所造成的危害性还不清楚，有待进一步研究。但从杨树抗病品种比较上看出，国内乡土品种的抗病力强，宜于造林。对感染较轻的品种和易感的美洲黑杨和欧美杨应精选无病种条繁殖，及时清除田间病株，以控制病毒传播。今后要用血清学原理鉴别感染材料，用组培苗和试管苗，获得大量无毒苗木，用遗传育种培育出优质抗病良种。

表5 杨树品种抗两种病毒的鉴定结果

品种	[PV-1]		[PV-2]	
	发病株数	抗病类型	发病株数	抗病类型
63	11	S	14	S
69	5	NS	11	S
72	3	NS	4	NS
I-154	3	NS	5	NS
I-214	0	R	0	R
露伊莎	0	R	0	R
西玛	0	R	0	R
沙兰杨	2	NS	0	R
波兰15号	2	NS	3	NS
欧洲黑杨	0	R	0	R
毛白杨	0	R	0	R
美杨	3	NS	2	NS
加杨	2	NS	3	NS
辽杨	0	R	0	R
合作杨	0	R	0	R
小美早	0	R	0	R
北京杨8000号	0	R	0	R
小叶杨	0	R	0	R
青杨	0	R	0	R
山海关杨	0	R	0	R

注：① 供试品种各20株；② S：感病，R：抗病，NS：稍抗病。

参 考 文 献

- [1] 向玉英, 1984, 杨树花叶病毒的危害及特性研究, 林业科学, 20(4):442~446。
- [2] 向玉英, 1982, 杨树花叶病毒的调查研究, 林业科技通讯, (9):27~29。
- [3] Smith, K. M., 1982(韦石泉译, 1986), 植物病毒学, 科学出版社, 92~105。
- [4] 裘维蕃, 1985, 植物病毒学, 科学出版社, 30~42。
- [5] Francki, R. I. B. et al., 1979, Cucumber mosaic virus, CMI/AAB Descriptions of plant viruses. No. 213. Common-wealth Agricultural Bureau, Kew, Surrey, England.
- [6] Zaitlin, M. et al., 1975, Tobacco mosaic virus (type strain), CMI/AAB Descriptions of plant viruses. No. 151. Common-wealth Agricultural Bureau, Kew, Surrey, England.
- [7] 梁训生, 1979, 百种植物病毒性状, 北京农业大学出版社, 68~92。
- [8] 裴美云, 1962, 从不同植物上来的几个烟草花叶病毒分离物的初步比较研究, 微生物学报, 8(4):420~427。

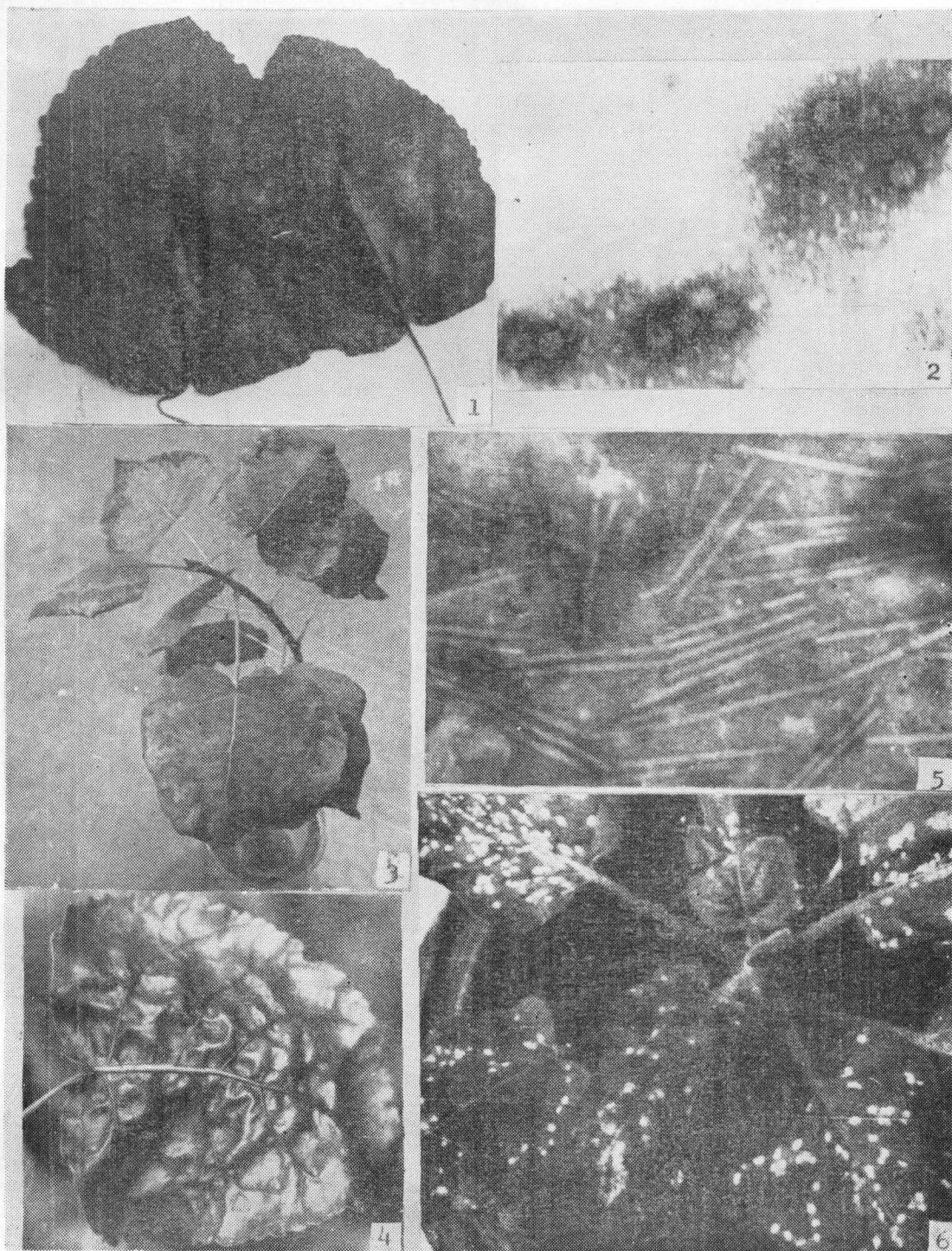
STUDY ON TWO VIRUSES ISOLATED FROM POPLAR

Xiang Yuying

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract Leaves with systemic symptoms of ring or irregular spots or leaf scorch and deformation (PV-1) and rolling leaves with chlorosis deformation (PV-2), were collected from Beijing, Hunan and Henan province. The poplar viral sap can infect *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa* and other herbaceous plants. The observation on the morphology of the particles, serological reaction and symptom expressions of various hosts, (PV-1) and (PV-2) were considered to be CMV and TMV. The results of artificial inoculation of the two viruses to the poplar leaves showed that 12 clones of poplar were resistant; 6 clones were susceptible and 2 clones were moderately susceptible.

Key words poplar; virus; cucumoviruse; tobamoviruse



杨树上发生的两种病毒 1~3. [PV-1]: 1. 63杨自然病株紫红皱缩叶片; 2. 球状病毒粒子, 46 000 \times ; 3. 人工接种63杨症状。4~6. [PV-2]: 4. 69杨自然病株皱缩失绿叶片; 5. 杆状病毒粒子, 46 000 \times ; 6. 在心叶烟上产生的枯斑。