

# 唐菖蒲病毒病原鉴定的研究进展

张晶红<sup>1</sup>, 徐启江<sup>2</sup>, 陈 典<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; 2. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus* Hort.) 是无性繁殖植物。在长期的栽培过程中, 因植物病毒的侵染引起种性退化、品质下降, 造成经济损失严重。系统阐述了唐菖蒲典型病毒病的种类、基本特性、表现症状及目前国内外对该领域病毒检测技术的研究进展, 为进一步开展唐菖蒲病毒病的研究奠定基础。

**关键词:** 唐菖蒲; 病毒种类; 病毒鉴定

中图分类号: S682.4      文献标识码: A      文章编号: 1002-2767(2008)06-0159-04

## Advances on Identification of the Virus Pathogeny in Gladiolus

ZHANG Jing-hong<sup>1</sup>, XU Qi-jiang<sup>2</sup>, CHEN Dian<sup>1</sup>

(1. Horticultural College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Life Science College of Northeast Forestry University, Harbin 150040)

**Abstract:** Gladiolus is a kind of asexual reproduction plant. In the long-term cultivating process, the infection of virus in Gladiolus results in not only its quality decline and varieties degeneration but also economy loss. This text briefly declared gladiolus virus disease species, basic characteristic, symptom, identification methods and study evolvement. It established the foundation for the study on gladiolus virus disease.

**Key words:** *Gladiolus*; virus disease; virus identity

病毒是一类个体极其微小的专性寄生生物, 结构简单, 无细胞结构, 由核酸和外壳蛋白组成, 外壳蛋白亚基按一定的方式排列在核酸外, 两者共同构成病毒粒子(viron)。每种病毒只含一种核酸(RNA 或 DNA)。由病毒引起的植物病害称为植物病毒病(plant virus disease)。现已知的病毒病害大约有 100 多种, 是仅次于真菌的重要病原群体。病毒病不仅影响作物的产量和品质, 而且有的病毒可造成毁灭性损失。植物病毒可随种球、种薯或其他无性繁殖材料传播, 并且在植物病毒传播中, 以球茎、球根和接穗进行繁殖的作物尤为严重。目前唐菖蒲病毒病发生十分普遍, 侵染病毒的种类繁多, 黄瓜花叶病和菜豆黄花花叶病的侵染尤为严重, 并迅速蔓延。

### 1 唐菖蒲病毒病的种类及其基本特性

#### 1.1 黄瓜花叶病毒病(*Cucumber mosaic virus*, *CMV*)

黄瓜花叶病毒, 是世界上传播范围最广的植物病毒种类之一。病毒粒子等大, 无包膜; 直径为 29

nm; 圆形轮廓; 无明显衣壳粒。病毒粒子由 18% 的核酸和 82% 蛋白质组成。基因组由单链 RNA 组成, 线型, 大小约为 8.621 kb。有三个独立的 RNAs 链。RNAs1 和 RNAs2 翻译的蛋白质与滤过性毒菌染色体复制相关联, 生物顺反子 RNAs3 的 3a 蛋白质显示与病毒运动和滤过性毒菌衣壳蛋白有关。由 RNAs3 编译的 RNA4 翻译成衣壳蛋白(CP)。除了这四种主要的滤过性毒菌基因外, 还有由 RNAs2 编码的小重叠基因(2b), 这种基因很可能由 mRNA 表达<sup>[1]</sup>。RNA5' 端为甲基化核苷帽, 无 PolyA 区域, 基因组的活动性似 tRNA, 具有酪氨酸。CMV 基因核苷酸基本组成为 24%G, 23%A, 23%C 和 30%U。目前 CMV 的全部核苷酸基因序列已被报道, 并基于生物学、血清学和分子生物学的基础上, 将 CMV 分离物大致分为 I 和 II 两类。1948 年 Tasmania 首次鉴定出唐菖蒲叶片中含有 CMV 病毒。

黄瓜花叶病毒有极其广泛的寄主范围。病叶上可形成斑块状花叶; 叶片颜色失常, 由深绿到浅绿, 乃至变黄, 黄白或灰白; 叶缘成波浪状; 花朵变小; 花瓣皱缩; 着花量减少; 花被上出现白色斑块, 严重者植株不能开花。

#### 1.2 菜豆黄花花叶病毒病(*Bean yellow mosaic vi-*

收稿日期: 2008-03-27  
第一作者简介: 张晶红(1981-), 女, 黑龙江省方正县人, 硕士, 主要从事园林植物与观赏园艺研究。Tel: 13946035453, E-mail: jinghongzhang123@sina.com。

rus, BYMV)

属马铃薯Y病毒科,病毒粒子丝状,无包膜;弯曲,长约750 nm,宽为12~15 nm;轴线槽明显,螺旋状,倾斜度为3.4 nm;病毒粒子包含5%的核苷酸和95%蛋白质;RNA单链,线型。总基因组大小为10 kb。

菜豆黄花叶病毒在唐菖蒲叶片上形成花叶或褪绿斑点,斑点被叶脉包围成多角形;随着病情的发展,多个褪绿斑点可形成长条斑;病叶扭曲;植株矮小并黄化;花小;在某些品种上出现杂色花<sup>[2]</sup>。

### 1.3 烟草花叶病毒病(Tobacco mosaic virus, TMV)

烟草花叶病毒的出现对病毒学的研究具有举足轻重的作用。1886年Adolf Mayer发现烟草上出现深浅相间的绿色条带,将其命名为烟草花叶病,后经研究发现其病原体比以往的细菌小,因此产生了“病毒”。烟草花叶病毒基因组为RNA单链,直线型,长300 nm;直径18 nm;圆柱形结构,中心为一个约4 nm的沟槽。这种病毒由2130个相同的蛋白亚基组成,每个亚基包含158个氨基酸残基,病毒蛋白外壳围绕一个约6400个核苷酸的单股RNA形成。围绕单股RNA的蛋白亚基为螺旋形结构,螺距2.3 nm。病毒粒子由5%核苷酸和95%蛋白质组成。总大小为6.395 kb,不可分割。1968年Mandele和Bruening分离出TMV基因组核苷酸组成为25.3%G,29.8%A,18.5%C和26.3%U。RNA5'端为甲基核苷帽,3'端无Poly(A)。基因组活性似tRNA,具有组氨酸。

### 1.4 烟草环斑病毒病(Tobacco ring spotted virus, TobRSV)

烟草环斑病毒粒子由40%的核苷酸和60%蛋白质组成。基因组由线型单链RNA组成。总基因组大小为11.2 kb,由两部分组成,大小分别为6.8 kb和4.364 kb。1972年Murant等分离出TobRSV的核苷酸组成:24.7%G,23.1%A,22.4%C和29.8%U。RNA5'端为VPg。病株表现症状有局部出现坏死斑,色斑,萎黄环斑;叶脉出现系统条带,至叶畸形;植株矮化。

### 1.5 番茄斑萎病毒病(Tomato spotted wilt virus, TSWV)

病毒粒子等大,有包膜;直径85 nm;圆形轮廓;无明显衣壳粒排列。病毒粒子包括5%核苷酸,70%的蛋白质,20%脂肪和5%的碳水化合物。RNA单链,直线型。总基因组大小为17.2 kb, L-RNA长8.897 kb, S-RNA长2.916 kb。TSWV基因组核苷酸基本上由16.2%G,31.6%A,19.3%C和32.9%U组成。1919年Brittlebank在澳大利亚南部首次发现TSWV引起唐菖蒲叶片褪绿。

TSWV在1989年和1991年间被分成两种病毒分支:TSWV-L(Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)和TSWV-I(Impatiens necrotic spot virus, INSV)。TSWV-L主要侵染番茄和胡椒类植物;TSWV-I侵染凤仙花属植物和其他观赏型植物。1990年Haan,等描述了其核苷酸序列。

番茄斑萎病随植物年龄不同,表现症状大不相同。在幼年时,被感染的植株生长缓慢,表现症状不明显,在植物叶片上出现不规则坏死斑纹;成熟植株,叶片上会出现紫色纹理和变色交错组织,紫色环斑慢慢变成褐色,叶片边缘向上卷曲。

### 1.6 番茄环斑病毒病(Tomato ring spotted virus, TRSV)

病毒粒子等大,无包膜;直径为25 nm;多角形轮廓;无明显壳粒排列。病毒粒子在不同寄主中的核苷酸和蛋白质含量不同。基因组为线型RNA单链,总大小为15.8 kb,由大小分别为8.5 kb和7.3 kb的两部分组成。基因组核苷酸组成为26%G,23%A,22%C和29%U。番茄环斑病可引起唐菖蒲矮化、断头;叶片褪绿条斑及白斑等症状。

### 1.7 番茄黑斑病毒病(Tomato black ring virus, TBRV)

番茄黑斑病是单链RNA病毒。其染色体组被分为两种RNAs:RNA1和RNA2。RNA1主要包含病毒合成和核蛋白复制的重要基因。RNA2主要包括病毒在植物体内运动的基因<sup>[3]</sup>。总基因组大小为13 kb,由两部分组成,大小分别为8.2 kb和4.8 kb。RNA5'端为VPg,3'端为Poly(A)。病毒粒子等大,无包膜;直径为26 nm;多角形轮廓;无明显壳粒排列。病毒粒子含量有三种类型:44%核苷酸和56%的蛋白质(B);32%核苷酸和68%的蛋白质(M);0%核苷酸和100%的蛋白质(T)。感病唐菖蒲植株表现症状为叶片系统变色,出现坏死环斑。杂色,叶畸形,叶脉变黄,发育迟缓等症状。

### 1.8 烟草脆裂病毒病(Tobacco rattle virus, TRV)

烟草脆裂病毒为RNA病毒,病毒粒体杆状,长杆状粒体长度为190 nm,短杆状长约45~115 nm。唐菖蒲受病叶片边缘破裂。

### 1.9 南芥菜花叶病毒病(Arabis mosaic virus, ArMV)

病毒粒体球状,直径25~30 nm。单链RNA病毒。唐菖蒲受病病叶表现环斑、脉斑驳。

唐菖蒲病毒病种类繁多,除上述9种外,另有TVY、TroSV、SLRV等。

## 2 唐菖蒲病毒病检测方法的研究进展

### 2.1 枯斑和指示植物检测法

此法是美国病毒学家霍姆斯(Hohnes)在1929

年发现的。枯斑和指示植物检测法是利用受病毒侵染能产生枯斑的寄主植物进行病毒检测的一种方法。此方法虽然简单,但检测速度很慢,表现症状的时间最短需要 10~20 d,长的需要 1~3 个月;灵敏度较低;受季节限制,应用局限性大,存在不稳定性和工作量大等缺点<sup>[4]</sup>。此外,维护指示植物费用较高,有些唐菖蒲病毒,只能由蚜虫传播,不适用指示植物法。

## 2.2 电子显微镜检测法

### 2.2.1 电子显微镜检测法(electron microscopy)

电子显微镜技术是最直接的一种病毒检测手段。最初看到的病毒是一些几乎类似的微粒,但电子显微镜可以直接看到病毒的形态结构存在与否。1939 年, G. A. Karsche 在电镜下直接观察到 TMV 是一种直径为 18 nm, 长为 300 nm 的长杆状颗粒。因此,在进入了分子水平的今天它仍然有着不可替代的作用。

2.2.2 电镜负染检测法(electron microscopy negative stain) 20 世纪 60 年代 Brenner 和 Horne 将电镜负染技术首次成功应用于病毒结构的研究,人们发现一些重金属离子能绕核蛋白体四周沉淀下来,形成一个黑暗的背景,在核蛋白体内部不能沉积而形成一个清晰的亮区,其图像如同一张照相的底片,人们称为负染色。负染色法快速简便,可以直接观察病毒的形态、大小、表面结构、有无包膜等。

2.2.3 电镜超薄切片法(electron microscopy ultra-thin section) 超薄切片是观察病毒在寄主细胞内分布以及细胞病变的主要方法。1986 年,国际翔等成功的利用电镜超薄切片法从唐菖蒲植株中检测出 CMV 和 BYMV 两种病毒的复合侵染<sup>[5]</sup>。目前,电镜超薄切片法发展到了病毒的体内定位,体内复制及侵染过程的动态研究水平,并能直观病毒生物大分子的亚基单位,已经从细胞水平发展到了分子水平。尤其对一些未知病毒,难于提纯的病毒材料,负染技术不能解决的检测材料都可用此方法通过电镜对组织细胞的直接观察而得到解决,在病毒学检测和脱毒快繁的实际生产中均有着特殊的重要性和不可取代的作用<sup>[6]</sup>。

## 2.3 血清学检测法

应用血清学方法检测病毒主要是根据动物受其致病细菌、病毒侵染后,引起动物产生抗体的物质即抗血清,与同系的抗原在体外特异的结合形成抗原-抗体复合物,通过对复合物沉淀现象的观察或对结合抗体的进一步检测而对病毒进行鉴定。它具有快速、灵敏和操作简便等优点,是检测植物病毒最为常用和有效的手段之一。A vila 等应用血清学方法第一次证明了凤仙花坏死斑病毒是番茄斑萎病的一种。在我国,血清学检测法在病毒检测领域方面

的应用已达到了成熟阶段。目前此法已广泛应用于唐菖蒲病毒病检测。1987 年 3 月,农业部植物检疫实验所用国外提供的标准烟草环斑病毒作为抗原,选取从荷兰引进的 1 株表现斑驳症状的唐菖蒲病株,用血清学方法检测出其 Saxany 品种上有由烟草环斑病毒侵染引起的唐菖蒲病毒病<sup>[7]</sup>。早期应用较多的血清学检测法主要是沉淀反应,包括试管沉淀、玻片沉淀、毛细管沉淀和免疫双扩散等。2002 年云南农业大学对唐菖蒲花叶病进行调查和病样采集,通过鉴别寄主反应、电镜负染检测法、免疫双扩散检测法,用电镜观察到 28~30 nm 直径的病毒粒子,鉴定出此病原为 CMV<sup>[8]</sup>。但这些方法灵敏度较低,在园艺植物病毒检测中应用较少。

2.3.1 免疫电镜技术(immunity electron microscopy, IEM) 免疫电镜技术是将抗原与抗体的专化性免疫反应与电镜观察相结合的一种病毒检测方法。1973 年 Derrick 建立了免疫吸附电镜技术(ISEM)。ISEM 最少可检测出几个微升样品中 0.1~1.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的病毒。1990 年,国际翔等应用免疫电镜法,从唐菖蒲皱缩叶片提取物中分别观察到两种不同形态的杆状病毒,从病毒粒体大小及其在寄主细胞中的内含体的形态说明了直杆状病毒是属烟草花叶病毒组,另一种为 CMV 病毒<sup>[9]</sup>。免疫电镜技术的出现促进了电镜技术在唐菖蒲病毒检测上的应用,但由于电镜技术需用电子显微镜,而且样品的制备费用较高,所以电子显微镜技术应用受到一定的限制。

2.3.2 酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 酶联免疫吸附法最早用于动物病毒的检测,Clark 等首次将 ELISA 应用于植物病毒检测。很多病毒由于其浓度太低或受某种抑制剂的干扰,常规血清学方法检测不出的病毒可以用 ELISA 进行检测。此法可检测到 1~10 ng·mL<sup>-1</sup> 抗原浓度的病毒。其原理是把抗原抗体的免疫反应与酶的高效催化作用相结合,通过化学方法将酶与抗体结合,形成酶标抗体。酶与底物反应生成有色化合物,其强度与病毒浓度成正比。这种方法现已广泛应用于植物病毒的定性、定量分析。2003 年,Elkhart 使用 DAS-ELISA 方法从唐菖蒲病株上检测出烟草环斑病毒(TobRSV)<sup>[10]</sup>。免疫电镜技术和酶联免疫吸附技术是新近发展起来的血清学检测技术,具有灵敏度高的特点,在植物病毒的鉴定、定量和定位分析中已得到广泛的应用。

## 2.4 分子生物学检测技术

### 2.4.1 核酸杂交技术(Nucleic acid hybridization)

近年来,核酸杂交技术广泛用于植物病毒检测。其原理是根据互补的核酸单链可以相互结合的原理,将一段核酸单链以某种方式加以标记,制成探

针,与互补的待测病原核酸杂交,带探针的杂交物指示病原的存在。此法在检测大量样品时,探针的分离比较困难但比 ELISA 更灵敏,更可靠。核酸杂交技术检测病毒的灵敏度和特异性比反转录聚合酶链式反应检测法要差一些<sup>[11]</sup>。

2.4.2 反转录聚合酶链式反应检测法 (Reverse transcription - PCR, RT-PCR) RT-PCR 检测法的基本原理是以所需检测的病毒 RNA 为模板,反转录合成 cDNA,从而使极微量的病毒核酸扩增上万倍,以便于分析检测。RT-PCR 的基本步骤是:首先提取病毒 RNA,根据病毒基因序列设计合成引物,反转录合成 cDNA,进行 PCR 扩增。取出扩增产物,利用琼脂糖凝胶电泳进行检测。1980 年 Franck 等用此方法成功的检测出了第一种植物病毒—花椰菜花叶病毒(CaMV)的基因全序列。1990 年, Vunsh 等开始将 RT-PCR 技术应用于植物病毒检测<sup>[12]</sup>。在国外 RT-PCR 技术已广泛应用于唐菖蒲病毒病的检测中。1998 年, S. K. Raj 等用 RT-PCR 检测法检测出唐菖蒲中含有 CMV 病毒,并用 ISEM 检测法、WBA 检测法、ELISA 检测法, Southern 杂交技术和 RT-PCR 检测方法分别对侵染 CMV 病毒的 H5, H7, H12, H13 和 Kajal 型唐菖蒲栽培品种进行病毒检测对比,结果证明由于唐菖蒲球茎上存在着阻碍血清学反应的抑制剂,除 ELISA 方法外, ISEM 检测法和 WBA 检测法均检测不到唐菖蒲球茎上的 CMV 病毒;同时证明用 RT-PCR 技术可以对叶片汁液稀释浓度为 1/10000 的 CMV 病毒进行检测,而 ELISA 对稀释浓度低于 1/500 的感病叶片无法进行病毒检测<sup>[13]</sup>。目前,国外用 RT-PCR 技术已成功的检测出了唐菖蒲的 CMV、TMV、TBRV、TSWV、BYMV 等病毒。在我国,分子生物学技术在观赏植物病毒病检测中的应用也得到了初步发展。云南农业大学应用 DAS-ELISA 和 RT-PCR 技术检测百合无症病毒(LSV),结果表明:RT-PCR 检测法可从 2 ng 的百合叶片组织中检测出 LSV,是 DAS-ELISA 敏感度的 1 000 倍,证实了 RT-PCR 技术的高度灵敏性<sup>[14]</sup>。目前,RT-PCR 技术在我国唐菖蒲病毒病的检测方面已有所起步。2004 年,我国用 RT-PCR 方法对一种类似晚香玉温和花叶病(Tuberose mild mosaic virus)的病毒退化引物进行测序扩增,研究发现一种新型病毒-晚香玉温和斑点病毒(Tuberose mild mottle virus)<sup>[15]</sup>。此后,郑耘运用 RT-PCR 技术检测出了唐菖蒲鳞茎中带有菜豆黄花叶病毒<sup>[16]</sup>。

目前,国内唐菖蒲病毒病的检测方法仍主要采用酶联免疫吸附测定和电镜技术。然而,电镜技术

需要依赖大型精密仪器且操作要求严格。酶联免疫吸附法需要制备或购买抗血清;并且一次只能检测一种病毒,检测多种病毒时灵敏度低,ELISA 检测法只能检测到纳克水平的病毒难于检测更低浓度的病毒;此外,此法在病毒检测时还经常存在假阳性反应,给脱毒苗的检测带来困难。采用 RT-PCR 技术能检测到飞克水平的病毒,而且不需要制备抗血清以及放射性探针,操作简单。由于采用分子水平检测技术,具有灵敏、快速、特异性强等优点,分子生物学技术特别是 RT-PCR 技术在唐菖蒲病毒病的检测中将会有更广阔的应用前景。

参考文献:

[ 1 ] Chen Y K, Derks A F L M, Langeveld S et al. High sequence conservation among cucumber mosaic virus isolates from Lily [ J ] . Arch. Virolog., 2001, 146: 1631-1636.

[ 2 ] 孔宝华, 杨丽霞, 范云华, 等. 云南省唐菖蒲病毒病的发生及防治[ J ] . 云南农业大学学报, 2002, 17(3): 241-242.

[ 3 ] Magdalena Jończyk, Natasza Borodynko, Henryk Pospieszny. Restriction analysis of genetic variability of Polish isolates of Tomato black ring virus[ J ] . Acta Biochim. Pol., 2004, 51: 673-681.

[ 4 ] 洪艳华, 殷广峰, 张立军. 百合脱毒及病毒检测技术研究进展 [ J ] . 沈阳农业大学学报, 2003(3): 225-227.

[ 5 ] 国际翔, 毕庶春, 刘义国, 等. 唐菖蒲花叶病毒的电镜观察[ J ] . 电子显微学报, 1988(3): 63-63.

[ 6 ] 马筠. 植物病毒鉴定检测方法的研究进展[ J ] . 世界农业, 2003 (8): 50-51.

[ 7 ] 陈燕芳, 胡伟贞, 南景岳. 侵染唐菖蒲的烟草环斑病毒的研究 [ J ] . 植物病理学报, 1990, 20(4): 241-246.

[ 8 ] 孔宝华, 蔡红, 范云华, 等. 云南省唐菖蒲花叶病的鉴定研究 [ J ] . 云南农业大学学报, 2002, 17(2): 436-436

[ 9 ] 国际翔, 王丽霞, 李文清, 等. 侵染唐菖蒲的两种杆状病毒的电镜观察[ J ] . 电子显微学报, 1990, 9(3): 63-63.

[ 10 ] Katoch M, Ram R, Zaidi A. First report of Tobacco ring spot virus occurring in gladiolus in India[ J ] . Plant Pathology, 2003, 52(6): 789-789.

[ 11 ] 胡稳奇. 分子生物学技术在植物病毒鉴定与分类中的应用 [ J ] . 植物保护, 1994, 20(2): 31-33.

[ 12 ] Vunsh R, Rosner A, Stein A. The use of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of bean yellow mosaic virus in Gladiolus[ J ] . Ann Appl Biol, 1990, 117(3): 61-69.

[ 13 ] S. K. Raj, A. Srivastava, G. Chandra et al. Characterization of cucumber mosaic virus isolate infecting Gladiolus cultivars and comparative evaluation of serological and molecular methods for sensitive diagnosis[ J ] . Curr. Sci., 2002, 83: 1132-1137.

[ 14 ] 王继华, 瞿素萍, 孔宝华, 等. 百合无症病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测[ J ] . 云南农业大学学报, 2004, 19(2): 148-150

[ 15 ] Lin L, Zheng H Y, Chen J, et al. A new potyvirus from tuberose (Polianthes tuberosa) in China[ J ] . Arch Virolog., 2004, 149: 1107-1116.

[ 16 ] 郑耘, 陈富华, 洪崇高, 等. 从进境的唐菖蒲中检出菜豆黄花叶病毒[ J ] . 植物检疫, 2005, 19(6): 57-359.