

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

蔡健和 洪益国* 黄福新 王小凤* 田波*

(广西农科院植保所, 南宁 530007)

* (中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

S432.41

A

提要 从广西南宁市的南瓜上分离到一株可经烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播的南瓜曲叶病毒, 它可侵染南瓜(*Cucurbita moschata*)和西葫芦(*C. pepo*)引致叶片卷曲和严重矮化的症状。ELISA 测定表明, 其病叶粗提液与非洲木薯花叶病毒(ACMV-K)单克隆抗体 SCR18 呈强阳性反应, 与 SCR11 呈较弱的阳性反应, 而与 SCR23 呈阴性反应; 与印度木薯花叶病毒(ICMV)单克隆抗体 SCR56 和 SCR66 呈强阳性反应, 与 SCR62 呈弱阳性反应, 但与 SCR52 呈阴性反应。分子杂交试验进一步证实中国南瓜曲叶病的病原是南瓜曲叶双生病毒。

关键词 南瓜曲叶双生病毒, 生物学和血清学特性, 分子杂交

生物学
南瓜曲叶病毒, 双生病毒

双生病毒组(Geminivirus)是含单链环状 DNA 侵染双子叶和单子叶植物的病毒组, 主要分布于热带和亚热带地区, 具有广泛的经济重要性和理论探索意义^[1], 是目前植物病毒学研究的热门课题之一, 但国内这方面的报道甚少。龚祖坝等通过电镜观察首次发现中国烟草曲叶双生病毒(TLCV)^[2], 蔡健和等进一步证实其可以通过烟粉虱传播, 并初步研究了 TLCV 广西分离物与 ACMV-K 的血清学关系^[3]。本文报道的是在中国发现的另一种烟粉虱传播的双生病毒——南瓜曲叶病毒的生物学和血清学特性及分子杂交的研究。

材料和方法

- 1 烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传染试验** 让无病的烟粉虱成虫在典型的南瓜曲叶病株上获毒饲养 24 小时, 然后, 将其转移到健康的南瓜幼苗(子叶期)上接种饲养 24 小时, 每株接种 10—20 头获毒的烟粉虱, 杀出后置防虫网室内观察其发病情况。
- 2 寄主范围测定** 供试植物包括南瓜(*Cucurbita moschata*)、西葫芦(*C. pepo*)、刺黄瓜(*Cucumis sativus*)、蒲瓜(*Lagenaria siceraria*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)。每株试验植物接种 10—20 头带毒的烟粉虱。
- 3 血清学测定** 对照 Thomas 等^[4]方法。采用了 3 种 ACMV-K 单克隆抗体和 4 种 ICMV 单克隆抗体对南瓜曲叶病毒进行 ELISA 测定。所用的单抗均由英国苏格兰作物研究所 B. D. Harrison 教授提供。
- 4 总核酸提取** 取 50mg 南瓜病叶, 匀浆后加 250 μ l 抽提液(50mmol/L Tris HCl pH8. 0, 5mmol/L EDTA, 1. 25 mol/L NaCl, 0. 1% BSA, 0. 1% β -巯基乙醇)和 25 μ l 10% SDS, 65 $^{\circ}$ C 保温十分钟, 以等体积苯酚/氯仿(V/V=4: 1), 氯仿各抽提一次, 于上清液中加入 1/10 体积 3mol/L NaAc(pH5. 2), 2 倍体积无水乙醇, 置-70 $^{\circ}$ C 20 分钟沉淀核酸, 总核酸溶于 200 μ l 水中。取等量南瓜健叶抽提总核酸, 用作对照。
- 5 缺口翻译制备探针** 50 μ l 反应液中含: 1 μ g 纯化的南瓜曲叶双生病毒外壳蛋白基因重组质粒 DNA, 50

• 本文于 1993 年 5 月 7 日收到, 10 月 8 日修回

mmol/L Tris HCl pH7.2), 10mmol/L MgCl₂; 0.1 mmol/L DTT, 50μg/ml BSA, 20μmol/L dNTP(不含 dATP), 20μCi α-³²P-dATP(Amersham 公司, ~3000Ci/mmol), 1μg/ml DNase I, 6 单位 E. coli DNA 聚合酶 I, 16℃ 2 小时, 加 2mmol/L EDTA 终止反应, Whatman DE-81 纸片法测定标记效率。

6 分子杂交 取适量总核酸样品, 经 0.5mol/L NaOH 变性和 3mol/L NaAc(pH5.2)中和后, 直接点样于经 6×SSC 洗涤过的硝酸纤维素膜上, 80℃真空干燥 2 小时, 68℃预杂交 4 小时(预杂交液: 6×SSC, 0.5% SDS, 5×Denhardt.s 溶液, 100μg/ml 变性的鲑鱼精 DNA), 68℃杂交过夜(杂交液: 6×SSC, 0.5% SDS, 5×Denhardt.s 溶液, 100μg/ml 变性的鲑鱼精 DNA, 10mmol/L EDTA 10⁶–10⁸cpm 探针), 在含 0.5%SDS 的 2×SSC 中 68℃洗膜 1 小时, 膜干燥后放射自显影。

结果与讨论

1 田间发病情况及危害

在广西, 南瓜多为零星种植。据 1992 年在广西农科院内初步观察, 南瓜曲叶病在春季少见, 多发生在夏、秋季, 到十月份调查时, 植保所附近的 12 株南瓜均已染病。感病南瓜叶片卷曲, 叶背面产生许多叶状增生物, 早期染病植株严重矮缩, 不能正常开花结瓜, 丧失其经济价值。

2 烟粉虱传染

接种二周后, 健康南瓜苗便开始发病, 观察至第 20 天, 接种的 24 株南瓜已有 18 株发病, 表现的症状为顶叶卷曲, 皱缩, 以后叶背面产生许多叶状增生物, 与自然病株症状相同。说明南瓜曲叶病病原可通过烟粉虱传染。

3 寄主范围

测定结果, 南瓜曲叶病毒仅可侵染南瓜和西葫芦产生卷叶和矮化症状, 二者的接种发病率分别是 6/6(100%)和 11/15(73.3%)。而接种的黄瓜、蒲瓜和烟草(各 6 株)观察至第 30 天, 均未见有任何曲叶症状出现。

4 血清学关系

ELISA 测定结果表明, 南瓜曲叶病病叶提取液与 ACMV 单抗 SCR₁₈和 ICMV 单抗 SCR₆₆、SCR₆₆均呈较强的阳性反应, 与其余单抗呈较弱阳性反应或阴性反应, 健康南瓜叶提取液与供试单抗均呈阴性反应(见表)。

5 分子杂交

用含有南瓜曲叶双生病毒外壳蛋白基因的 pUC19 重组质粒 DNA 作为模板, 通过缺口翻译可制备出高质量的 DNA 探针, 其³²P 标记效率可达 100%, 点杂交试验结果表明, 具有典型曲叶症状的南瓜病叶呈杂交阳性, 而健康南瓜对照呈阴性反应(见图)。由于 DNA 探针放射比活性高, 以及病叶中南瓜曲叶病毒特异核酸含量可能较高, 杂交后放射自显影仅需 15–30 分钟便获肯定结果。在 200μl 总核酸提取液样品中, 取 0.6μl, 相当于仅用 0.15mg 病叶材料, 其杂交反应便十分明显。可见, 分子杂交是一种极灵敏的检测植物病毒的方法。

表 中国南瓜曲叶病毒与 ACMV 和 ICMV 的血清学反应

Table Serological relationship between Chinese squash leaf curl virus and ACMV as well as ICMV

	ACMV 单克隆抗体			ICMV 单克隆抗体			
	ACMV			ICMV			
	Monoclonal	antibody		Monoclonal		antibody	
	SCR11	SCR18	SCR23	SCR52	SCR56	SCR62	SCR66
健康南瓜 Healthy squash	-	-	-	-	-	-	-
病毒侵染南瓜 Infected squash	+	+++	-	-	+++	+	+++
ACMV/ICMV 侵染烟草 ACMV/ICMV infected tobacco	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- , 阴性反应 Negative reaction + , 阳性反应 Positive reaction
+++ , 强阳性反应 Strong positive reaction

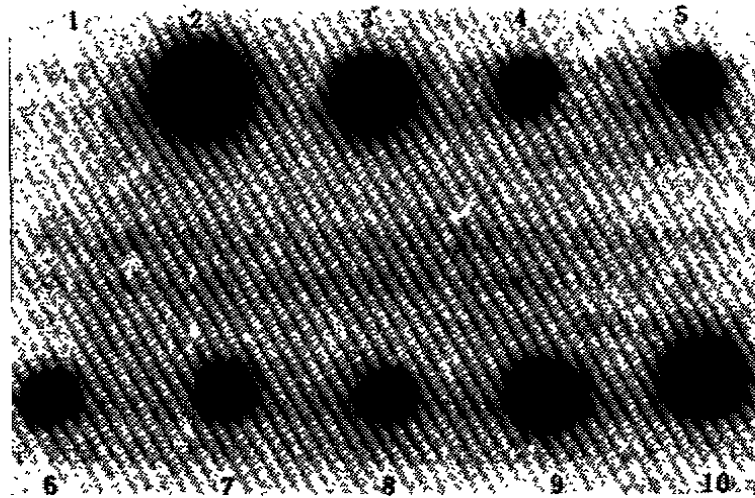


图 分子杂交

1. 阴性对照: 健康南瓜核酸样品
2. 阳性对照, 外壳蛋白基因克隆在 pUC19 中
3. 阳性对照: 外壳蛋白基因克隆在 pGEX-2T 中
- 4-10. 病叶样品: 200 μ l 总核酸提取液中, 分别取 0.6, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 8.0 μ l 经 NaOH 变性, 3mol/L NaAc(pH5.2) 中和后依次点样

Fig. Dot blotting

1. Negative control (5 μ l out of 200 μ l total DNA extracted from healthy squash)
2. Positive control—coat protein gene cloned into pUC19
3. Positive control—coat protein gene cloned into pGEX-2T
- 4-10. samples, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, and 8.0 μ l out of 200 μ l total DNA extracted from virus infected-squash were denatured with NaOH⁻, neutralized with NaAc and then spotted onto nitrocellular membrane respectively

分析测定中国南瓜曲叶病病原的生物学和血清学及分子杂交表明,从广西分离到的南瓜曲叶病毒是属于烟粉虱传播的双生病毒,与 ACMV-K 和 ICMV 均有一定的血清学关系;与 Cohen 等^[5]报道的南瓜曲叶病毒(Squash Leaf Curl Virus, SqLCV)的传播介体相同,且在南瓜和西葫芦上引致的症状也相似,推测二者可能存在一定的同源性。从广西烟草上分离到的烟草曲叶病毒与 ACMV-K 单抗 SCR₁₈ 也呈较强的阳性反应^[3],这亦间接表明南瓜曲叶病毒与烟草曲叶病毒之间可能存在某些类似的抗原决定簇。

南瓜曲叶病毒进一步的分离提纯和分子生物学研究正在深入进行中。

参 考 文 献

- 1 Harrison B D. Advances in geminivirus research. *Ann Rev Phytopathol*, 1985, 23, 55—58
- 2 龚祖坝,沈菊英,郑巧兮,等. 我国第一例双联病毒—烟草曲叶病毒的分离. *科学通报*, 1982, (22), 1393—1395
- 3 蔡健和,王小凤,黄福新,等. 烟草曲叶双生病毒的研究 I 广西分离物的生物学特性和血清学反应. *微生物学报*, 1993, 33 (3), 166—169
- 4 Thomas J E, Massalski P R, Harrison B D. Production of monoclonal antibodies to African cassava mosaic virus and differences in their reactivities with other whitefly-transmitted geminivirus. *J Gen Virol*, 1986, 67, 2739—2748
- 5 Cohen S, Duffus J L, Larsen R C, et al. Purification, serology and vector relationships of squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology*, 1983, 73, 1669—1673

Studies on Chinese Squash Leaf Curl Virus: Biological and Serological Properties and Molecular Hybridization

Cai Jianhe Hong Yiguo* Huang Fuxin Wang Xiaofeng* Tein Po*

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

* (Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

An isolate of Chinese squash leaf curl virus (SqLCV-C), which is transmitted by whitefly *Bemisia tabaci* and caused leaf curl and severe stunting symptoms on *Cucurbita moschata* and *C. pepo*, have been isolated and further confirmed by molecular hybridization using its coat protein gene probe in Nanning city, Guangxi Province. ELISA tests indicated that this isolate had strong positive reactions with ACMV MAb-SCR18 and ICMV MAb-SCR56, -SCR66; mild reactions with ACMV MAb-SCR11 and ICMV MAb-SCR62, but negative with ACMV MAb-SCR23 and ICMV MAb-SCR52.

Key words Chinese squash leaf curl geminivirus, Biological and serological properties, Molecular hybridization