

# 黑龙江省分蘖洋葱病毒病原的初步鉴定<sup>\*</sup>

徐启江<sup>1</sup>, 丁国华<sup>1</sup>, 陈典<sup>2</sup>

(1 黑龙江农垦师范专科学校 生物系, 黑龙江 阿城 150301; 2 东北农业大学 园艺系, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**[摘要]** 黑龙江省分蘖洋葱病毒病发生普遍, 阿城、宾县、五常的发病率均为100%, 病情指数分别为62.13%, 71.07%和49.87%。典型症状为黄化条纹花叶, 叶片扭曲畸形、叶尖干枯, 植株矮缩, 鳞茎退化变小, 产量和品质大幅度下降。被分蘖洋葱病毒系统感染的有洋葱、大葱、大蒜和蚕豆, 局部感染的有千日红、苋色藜。电镜观察表明, 病体细胞中含有大量线状病毒粒体, 长度在300~1450 nm。通过叶片超薄切片, 在叶肉细胞质中观察到大量的风轮状、束状、涡轮状和环状内含体, 叶绿体被破坏。体外抗性测定结果表明, 致死温度为55~65℃, 稀释限点为 $10^{-4}$ , 体外保毒期为3 d。酶联免疫测试和洋葱黄矮病毒抗血清、韭葱黄条纹病毒抗血清、大蒜复合病毒抗血清呈阳性反应。以上特征证明, 黑龙江省分蘖洋葱病毒病为几种病毒复合侵染, 初步鉴定为洋葱黄矮病毒和韭葱黄条纹病毒。

**[关键词]** 分蘖洋葱; 病原鉴定; 洋葱黄矮病毒; 韭葱黄条纹病毒

**[中图分类号]** S436.33

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2003)02-0055-04

分蘖洋葱(*Allium. cepa* L. var *multiceps* Bailey syn. var *Agrogatum* Don)俗称毛葱, 极少抽薹开花结实。长期进行无性繁殖, 导致一种病毒单独侵染或几种病毒复合侵染所引发的病毒病严重, 造成种性退化。本研究对黑龙江省分蘖洋葱病毒病原进行了初步鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 分蘖洋葱病毒病危害程度的调查

1999年5月末至6月初, 调查黑龙江省分蘖洋葱主产区——阿城市阿什河乡、宾县宾安镇科技示范园和五常市兴隆乡新和村分蘖洋葱病毒病危害程度, 采取大五点取样法, 每个地区调查250株。严重程度分级参照周桂珍等<sup>[1]</sup>分级标准: 0级——无症状; 1级——条点花叶, 株高正常; 2级——条纹花叶, 株高基本正常; 3级——条纹花叶, 植株矮缩或畸形。记录病状类型, 计算发病率, 按严重程度计算病情指数, 其计算公式为<sup>[2]</sup>:

病情指数 =  $\frac{\sum [(\text{病级株数} \times \text{代表级值}) / (\text{株数总和} \times \text{发病最重级的代表值})]}{\times 100\%}$

### 1.2 病原鉴定

1.2.1 寄主范围及指示植物测定 毒源为采自调查地区明显症状的植株叶片, 用含体积分数0.1%

巯基乙醇的0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)稀释汁液。用常规汁液摩擦法接种藜科、苋科、百合科、豆科、茄科5科7种指示植物, 接种后置于防虫温室, 观察记载显症情况。

1.2.2 病毒粒体的电镜观察 用敷有Formar膜的铜网沾取供试毒源材料的叶片粗提液, 吸附5~7 min, 用体积分数2%磷钨酸(PTA, pH 6.7)负染2~3 min, 自然条件下干燥, 用透射电子显微镜观察病毒粒体的形态, 测量分蘖洋葱病叶汁中300个病毒粒体的长度, 绘制长度分布图。

1.2.3 病理超微结构的观察 用感染病毒病的分蘖洋葱的叶片、鳞茎切块。将叶片分别沿纵向、纵向切成1 mm × 3 mm的长方形小条; 鳞茎切成1 mm<sup>3</sup>的小块, 以体积分数2.5%戊二醛和体积分数1%锇酸双固定, 0.2 mol/L PBS冲洗, 酒精系列脱水, Epon812环氧树脂包埋, 超薄切片, 用体积分数2%~4%醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色, 于透射电子显微镜下观察病毒粒体及内含体的形态。

1.2.4 分蘖洋葱复合病毒提纯液的紫外吸收 分蘖洋葱复合病毒提纯参考张明厚等<sup>[3]</sup>的方法, 提纯后稀释10倍, 在紫外分光光度计上测紫外吸收值, 绘制紫外吸收曲线。

1.2.5 血清学试验 以提纯的分蘖洋葱复合病毒

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2002-03-25

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(10511004)

[作者简介] 徐启江(1969-), 男, 山东安丘人, 讲师, 硕士, 主要从事生物技术和设施园艺研究。

为抗原,以洋葱黄矮病毒(Onion yellow dwarf virus,OYDV)、韭葱黄条纹病毒(Leek yellow stripe virus,LYSV)和大蒜复合病毒抗血清为抗体,在酶联免疫检测仪上测定反应的OD<sub>450</sub>值。

1.2.6 体外抗性测定 以千日红为指示植物,采用常规方法测定失毒温度(TIP)、稀释限点(DEP)和体外保毒期(LIV)。

## 2 结果与分析

### 2.1 分蘖洋葱病毒病危害程度

阿城市阿什河乡、宾县宾安镇科技示范园和五

常市兴隆乡新和村种植的分蘖洋葱,病毒病发病率均为100%,病情指数分别为62.13%、71.07%和49.87%。不同地区发病的严重程度存在一定的差别(表1)。病毒病发生严重程度与炎热干燥的气候条件有很大的相关性,宾安镇科技示范园内,土壤干旱,气候炎热,蚜虫数量极多,植株发病严重,其病情指数最高,比阿城、五常分别高出8.94%和21.2%。症状初期以花叶为主,成株期产生黄色褪绿条斑,老叶比新叶明显,黄色条斑几乎覆盖整个叶面,只留下很少的绿色部分,且叶尖干枯,植株丛生矮缩,鳞茎变小,产量下降,品质变劣。

表 1 阿城、宾县、五常分蘖洋葱田间病毒病发生情况

Table 1 Occurrence of viral disease at A cheng, B inxian and W uchang

| 地点<br>Site  | 不同病级发病株数 Number of plant |     |    |     | 病情指数/%<br>Virus disease index | 发病率/%<br>Incidence of disease |
|-------------|--------------------------|-----|----|-----|-------------------------------|-------------------------------|
|             | 0                        | 1   | 2  | 3   |                               |                               |
| 阿城 A cheng  | 0                        | 103 | 78 | 69  | 62.13                         | 100                           |
| 宾县 B inxian | 0                        | 67  | 83 | 100 | 71.07                         | 100                           |
| 五常 W uchang | 0                        | 126 | 95 | 29  | 49.87                         | 100                           |

### 2.2 寄主范围及指示植物

本试验接种了5科7种指示植物,结果表明,分蘖洋葱病毒系统侵染洋葱、大蒜、大葱、蚕豆;局部侵染千日红、苋色藜。

### 2.3 病毒粒体

用分蘖洋葱叶片的粗提液或粗提纯病毒制剂负染,在电镜下可观察到线状病毒粒体(图1),直径约11~12 nm,长度宽达300~1450 nm,多集中在550~800 nm。统计300个病毒粒体的长度分布,其中550~650 nm的占32.67%,650~700 nm的占9%,其长度均在香石竹潜隐病毒属范围内;700~800 nm的占37.67%,其长度在马铃薯Y病毒属范围内;病毒粒体长度在900 nm以上的,只有甜菜黄花叶病毒组<sup>[4]</sup>。感染分蘖洋葱、长度在900 nm以上的病毒是否属于此类尚需进一步研究。在600和

750 nm 出现较明显的2个分布峰,见病毒粒体长度分布图(图2)。从指示植物千日红的局部枯斑汁液中也检测到数量较多、长度较为均一的线状病毒粒体,长度在750 nm 左右。

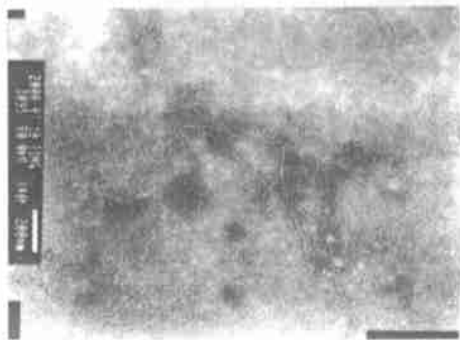


图 1 病毒粒体

Fig. 1 Electron micrograph of virus particles

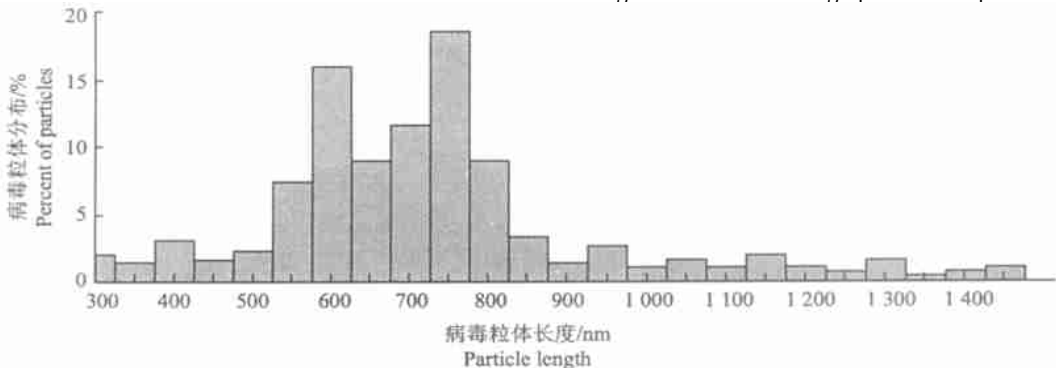


图 2 分蘖洋葱叶片中病毒粒体长度分布

Fig. 2 Histogram of the particle length distribution of Tillered-onion viruses

## 2.4 病组织超微结构

感病植株的叶片超薄切片, 在叶肉细胞的细胞质中镜检到大量典型的风轮状内含体(图3), 风轮状内含体正是PVY组特有的特征<sup>[5]</sup>。同时也观察到束状、涡轮状、环状和管状内含体以及薄片状集聚体。同时在镜检时观察到感病细胞变成显著的空泡化, 且核变形, 叶绿体产生空腔, 并逐渐分解破裂, 这与宏观上植株外观表现黄化褪绿斑症状是吻合的。



图3 叶肉细胞内的内含体

Fig 3 Inclusion bodies within the cytoplasm of a mesophyll cell

## 2.5 分蘖洋葱提纯制剂的紫外吸收及血清学试验

本试验采用PEG沉淀和超速离心相结合的方法, 得到了粗提病毒制剂, 镜检能见到许多线形或杆状病毒粒体。提纯液经紫外分光光度计测定, OD值最大吸收峰在257 nm处, 最小吸收峰在240 nm处, 其 $A_{260}/A_{280} = 1.39$ 。紫外吸收曲线见图4。利用大蒜复合病毒抗血清、洋葱黄矮病毒抗血清及韭葱黄条纹病毒抗血清进行间接-ELISA测定, 结果表明, 3个地区分蘖洋葱叶片中均存在洋葱黄矮病毒(OYDV)和韭葱黄条纹病毒(LYSV)。可能还感染有其他病毒, 有待于进一步鉴定。

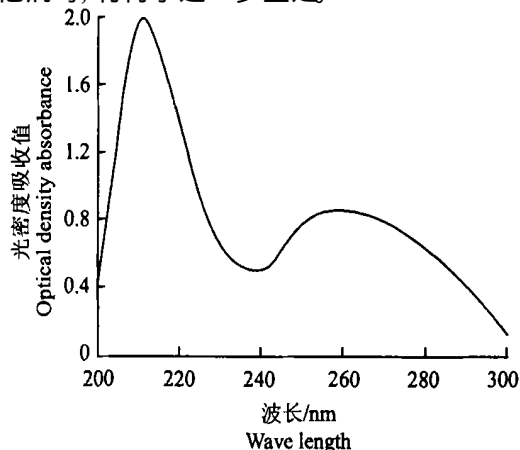


图4 分蘖洋葱病毒紫外吸收曲线

Fig 4 U. V. absorption spectrum of a partially

purified preparation of Tiller-onion virus

## 2.6 体外抗性测定结果

体外抗性测定结果为: T<sub>IP</sub> 55~65, DEP为 $10^{-4}$ , L<sub>IV</sub>为3 d。由于鳞茎茎尖的耐温阈值为50~55, 而病毒的耐温阈值在55以上, 两者没有重叠, 采用常规热处理方法不能达到热处理汰毒的目的, 本试验探讨了高温短时(80, 10 min)处理鳞茎对茎尖脱毒效果的影响, 获得了脱毒率为100%的试管苗(图5)。

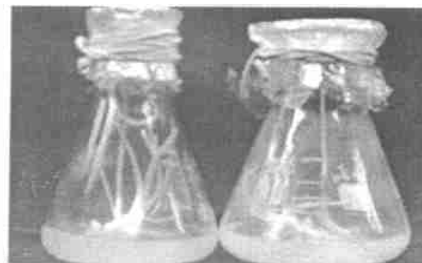


图5 茎尖外植体在MS+NAA 0.1 mg/L+BA 0.4 mg/L培养基上形成不定芽

Fig 5 Shoots formation from meristem tip on

MS medium containing 0.1 mg/L NAA and 0.4 mg/L BA

## 3 讨论

### 3.1 侵染分蘖洋葱的病原物

系统鉴定结果表明, 分蘖洋葱病毒病为复合感染, 已明确的病毒病原主要是洋葱黄矮病毒(OYDV)和韭葱黄条纹病毒(LYSV)。但在电镜下观察到的病毒粒体均为线状, 其长度在300~1450 nm, 其中以550~800 nm居多, 直径为11~12 nm。因此, 仅将这些病毒粒体归入这两个种是不合适的, 要最后确定分蘖洋葱病毒的种属地位, 尚需对发病株混合病原进一步分离并鉴定病毒属性, 以明确侵染分蘖洋葱的全部病毒种类。

### 3.2 传播途径

本试验证明分蘖洋葱复合病毒可以通过机械传染而引起健康植株发病。尚未做蚜虫传毒试验, 只是在宾县宾安镇科技示范园调查时, 分蘖洋葱地块异常干旱, 气候高温炎热, 田间蚜虫极多, 植株发病率为100%, 推测可以蚜虫传毒, 但有待于进一步试验证实。

葱属病毒的形态、生理性状(沉降系数、浮力密度、蛋白质和RNA分子量)、稳定性等非常相似, 血清学检测有一定程度相关, 寄主范围特别狭窄, 自然感染率高而且复合感染, 这就造成鉴定上有许多困难。目前, 利用PCR技术, 从分子水平进行葱属病毒

鉴定已有许多报道,解决了常规鉴定的缺陷。如 Takaichi M iyuki 等<sup>[6]</sup>利用 RT-PCR 技术鉴定了大蒜病毒 1 (Garlic virus 1, GV 1)、大蒜病毒 2 (Garlic virus 2, GV 2)、OYDV 和绿豆花叶病毒 (Mungbean mosaic virus, MBMV), Choi J N 等<sup>[7]</sup>利用 D IA 和 Northern 鉴定了大蒜潜隐病毒 (Garlic latent virus,

GLV), Fan Y 等<sup>[8]</sup>对大蒜花叶病毒 (Garlic mosaic virus, GMV) 的 CP 进行了分子克隆和核酸序列分析, Tsuneyoshi Y 等<sup>[9]</sup>对青葱潜隐病毒 (Shallot latent virus, SLV)、GLV、大蒜普通潜隐病毒 (Garlic common latent virus, GCLV) 的 CP 进行了区分鉴定。

### [参考文献]

- [1] 周桂珍, 曹鸣庆, 裘季燕, 等. 京郊大蒜病毒病的研究及其鳞茎中病毒的脱除[J]. 植物病理学报, 1989, 19(3): 145- 149
- [2] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998. 11.
- [3] 张明厚, 魏培文, 朱俊华, 等. 大蒜茎尖组培苗的检测[J]. 东北农业大学学报, 1999, 30(2): 105- 110
- [4] 赵顺庆, 范怀忠, 高乔婉, 等. 广东大蒜花叶病毒病原初步鉴定[J]. 病毒学杂志, 1987, (2): 75- 86
- [5] 王 卉, 阮义理. 植物病毒病的风轮状内含体[J]. 中国病毒学报, 1993, 8(2): 119- 123
- [6] Takaichi M iyuki, Yamamoto M ika, Naga Kubo Takayuki, et al. Four garlic viruses identified by reverse transcription polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan[J]. Plant Disease, 1998, 82(6): 694- 698
- [7] Choi J N, Song J T, Song S I, et al. Immunologic detection of garlic latent virus[J]. Agricultural chemistry and Biotechnology, 1995, 38(1): 49- 54
- [8] Fan Y, Wu S, Lu Z, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the coat protein gene from garlic mosaic virus[J]. Virologica Sinica, 1994, 9(4): 333- 340
- [9] Tsuneyoshi Y, Matsumi T, Deng T C, et al. Differentiation of Allium carlaciruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence[J]. Archives of virology, 1998, 143(16): 1093- 1107

## Identification of virus on tillered-onion virus disease in Heilongjiang Province

XU Qi-jian<sup>1</sup>, CHEN Dian<sup>2</sup>, DING Guo-hua<sup>1</sup>

(1 Department of Biology, Teachers College of Heilongjiang Normal University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

2 Department of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

**Abstract:** Almost all Tillered-onion being cultured in Heilongjiang province are infected by viruses. Hundred percent of tillered-onion plants in Acheng, Binxian and Wuchang county of Heilongjiang were infected by viruses, the index is 62.13%, 71.07% and 49.87% respectively. The infection induces typical mosaic symptoms of yellow streak as well as curling on leaves, withering of leaf-tips, dwarfism on the plants, and resulting in the degeneration and reduction of bulbs. Virus infection produces significant reductions of quality and yield in tillered-onion. This disease was demonstrated to be caused by several viruses which could be transmitted by the sap of the diseased plants. *Allium cepa* L., *Allium sativum*, *Allium fistulosum* L. and *Vicia faba* were infected systematically by sap inoculation. Local lesions were produced on the inoculated leaves of *Chenopodium amaranticolor* and *Gamphrena globosa*. The flexuous filamentous particles with length of 300- 1450 nm was observed. Typical pinwheel type, bundle, scroll and circular cytoplasmic inclusions are found in the cytoplasm of the mesophyll cell and could be observed by ultrathin section of leaves, the chlorophylls are destroyed. In sap, its properties were thermal inactivation point (TIP) between 55- 65 °C, dilution end point (DEP) was  $10^{-4}$ , longevity *in vitro* (LIV) of extract at room temperature was 3 d. Indirect-ELISA of leaf extracts of tillered-onion plants showed positive reaction with the antisera against onion yellow dwarf virus, leek yellow stripe virus, complex garlic viruses. Evidence from study shows that Heilongjiang tillered-onion is jointly infected by several kinds of viruses, but need to be identified continually.

**Key words:** tillered-onion; identification; onion yellow dwarf virus; leek yellow stripe virus