

云南澳洲坚果苗木感染番茄斑萎病毒属病毒初报

方琦^{1,2}, 丁铭^{1,2}, 董家红^{1,2,*}, 尹跃艳², 张磊², 苏晓霞^{1,2}, 李婷婷^{1,2},
张丽珍^{1,2}, 彭潞波^{1,2}, 张仲凯^{1,2,*}

(¹ 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223; ² 云南省农业生物技术重点实验室, 昆明 650223)

摘要: 在云南省临沧市永德县海拔约 800 m 的澳洲坚果 (*Macadamia* sp.) 种苗繁育基地发现叶片褪绿、黄化、叶脉间呈现近似圆形或不规则褐色枯斑的植株。为了确认植株病因, 采集典型病株, 应用电子显微镜负染色法、超薄切片和 DAS-ELISA 进行检测, 在澳洲坚果苗木病叶分离物 Maca-LC 的粗汁液和病叶超薄切片中均观察到有类似番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 病毒粒体。该病毒粒子为球形, 直径 80 ~ 85 nm。进一步应用 DAS-ELISA 方法鉴定, 病叶与 *Tospovirus* 的西瓜银色斑驳病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) /花生芽坏死病毒 (*Groundnut bud necrosis virus*, GBNV) 复合抗血清呈阳性反应。通过病症典型症状、病毒形态学观察及血清学方法检测表明, 侵染云南澳洲坚果种苗的病毒分离物 Maca-LC 为番茄斑萎病毒属 *Tospovirus* 病毒。

关键词: 澳洲坚果; 番茄斑萎病毒属; 超薄切片; DAS-ELISA

中图分类号: S 667.9

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 02-0350-05

Preliminary Report of *Tospovirus* Infecting *Macadamia* Seedling in Yunnan, China

FANG Qi^{1,2}, DING Ming^{1,2}, DONG Jia-hong^{1,2,*}, YIN Yue-yan², ZHANG Lei², SU Xiao-xia^{1,2},
LI Ting-ting^{1,2}, ZHANG Li-zhen^{1,2}, PENG Lu-bo^{1,2}, and ZHANG Zhong-kai^{1,2,*}

(¹ Institute of Biotechnology and Genetic Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China;
² Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Yunnan Province, Kunming 650223, China)

Abstract: Infected plant seedlings of macadamia showing concentric chlorotic ring spot or brown lethal spot symptoms were found in a nursing base located at the altitude of about 800 meters in Lincang, Yunnan, China. In order to confirm the presence of virus, typically infected leaves of *Macadamia* sp. were detected by using electron microscopy and DAS-ELISA. Virions with a diameter of about 80–85 nm, similar in size to the *Tospovirus* particles, were both observed in the sap and ultrathin sections of diseased leaves of macadamia. The crude extracts of infected leaves had a positive reaction to the complex antibody of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) / *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV). These results above indicated that macadamia was infected by a *Tospovirus*. It is the first report of *Tospovirus* infecting macadamia.

收稿日期: 2012-10-30; 修回日期: 2013-01-21

基金项目: 云南省创新团队计划项目 (2011C1134); 云南省中青年学术技术带头人项目 (2008PY050); 国家自然科学基金项目 (31060237)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhongkai99@sina.com; dongjhn@126.com; Tel: 0871-5183204)

Key words: macadamia; *Tospovirus*; ultrathin section; DAS-ELISA

澳洲坚果 (*Macadamia* sp.) 属山龙眼科 (Proteaceae), 是多年生常绿乔木果树, 果仁营养价值较高 (郭凌飞 等, 2010)。澳洲坚果原产于澳大利亚, 1910 年引入中国, 近年来在广东、广西、云南、福建、四川、重庆及贵州均有分布 (云南澳洲坚果产业调研组, 2007)。云南是澳洲坚果种植大省, 至 2008 年末种植面积已达 8 000 hm², 年产鲜壳果约 1 200 t (贺熙勇 等, 2009)。

随着澳洲坚果产业迅速发展, 生产中病虫害发生逐年显现。现已报道有 330 多种害虫 (其中螨类 4 种)、30 多种病原菌可为害澳洲坚果, 严重影响其产量和质量 (詹儒林, 1998)。李加智和蔡志英 (2003) 报道了为害云南澳洲坚果的 15 种真菌病害, 4 种生理病害。目前尚未见病毒病为害澳洲坚果的报道。2010 年在云南省临沧市澳洲坚果种苗基地发现疑似番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 病毒感染为害的苗木。

为了解感染为害澳洲坚果苗木的病毒病原, 本研究中应用电子显微镜负染色法、超薄切片技术和 DAS-ELISA 对澳洲坚果病株感病叶片进行了检测。

1 材料与方法

1.1 材料

2010 年 10 月在云南省临沧市海拔约 800 m 的澳洲坚果苗木繁育基地采集病样 6 株。病株分离物命名为 Maca-LC, 病株采集后种植于防虫温室内盆栽保存。

番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、凤仙花坏死斑病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) 专一检测试剂盒, 以及花生环斑病毒 (*Groundnut ringspot virus*, GRSV) 和番茄褪绿斑病毒 (*Tomato chlorotic spot virus*, TCSV) 复合检测试剂盒、花生芽坏死病毒 (*Groundnut bud necrosis virus*, GBNV) 和西瓜银色斑驳病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) 复合检测试剂盒等购自美国 Agdia 公司。

1.2 负染色电镜观察

取具有典型感病症状的病健交界处的组织, 将少量感病组织加入等体积的 ddH₂O 后, 充分研磨、匀浆, 用 Formvar 膜覆盖的铜网蘸取粗汁液, 直接用 2% 钼酸铵负染色, 置于 JEM100CX-II 型透射电镜下观察病毒粒体形态特征 (张仲凯和李毅, 2001)。

1.3 超薄切片电镜观察

取少量感病植株叶片组织切成 1 mm² 大小, 浸入 3% 戊二醛固定液中固定 8 h, 取出后用 0.2 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 漂洗, 再用 1% 四氧化锇 (OsO₄) 固定 1.5 h, 取出后用 0.2 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 漂洗, 乙醇系列脱水, 环氧树脂 Epon812 包埋, 超薄切片机切片。样品经 1% 醋酸双氧铀和 5% 柠檬酸铅双染色, 在 JEM100CX-II 型透射电镜下观察细胞内病毒粒体形态及分布, 并与相关植物病毒属病毒粒子的特征 (方琦 等, 2011) 进行观察比较。

1.4 DAS-ELISA 检测

参照各病毒复合检测试剂盒 (美国 Agdia 公司) 说明书进行检测。

2 结果与分析

2.1 病害症状

调查发现, 典型发病植株表现为: 发病初期苗木上部叶片褪绿、黄化, 部分叶尖出现黄褐斑, 少数中下部叶片产生近似圆形或不规则褐色枯斑, 叶边缘出现坏死, 中期黄化蔓延至中下部叶, 病斑由外向内逐步扩展, 后期出现大部分叶片枯萎坏死 (图 1)。



图 1 澳洲坚果感染叶片症状

Fig. 1 Symptoms of the diseased leaves of macadamia

2.2 电镜负染色观察

感病植株病叶分离物 Maca-LC, 经负染色制样后电镜观察发现, 在样品中含有较典型的球形病毒粒体, 病毒粒子直径约 80 ~ 85 nm, 病样粗汁液中未检测到其他形态的病毒粒体 (图 2)。

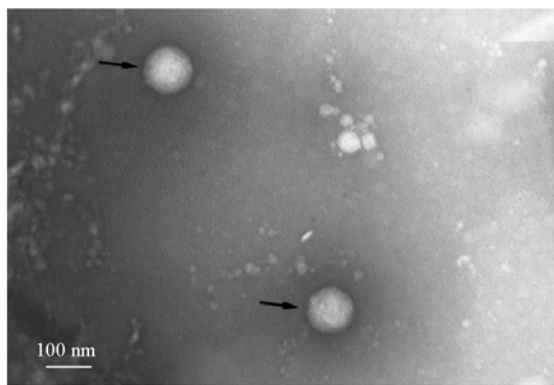


图 2 澳洲坚果分离物 Maca-LC 中的病毒粒子

Fig. 2 Virions of isolate Maca-LC in sap of the diseased leaves of macadamia

2.3 超薄切片电镜观察

澳洲坚果病叶超薄切片电镜观察发现含有典型球形病毒颗粒, 病毒粒子具包膜, 直径 80 ~ 85 nm, 其形态与报道的番茄斑萎病毒属 *Tospovirus* 病毒粒子相似, 病毒粒子聚集体散布于细胞质内或细胞壁内部, 病毒感染引起细胞膜增生, 出现较多的髓鞘样结构, 叶绿体和线粒体等细胞器结构消失 (图 3)。

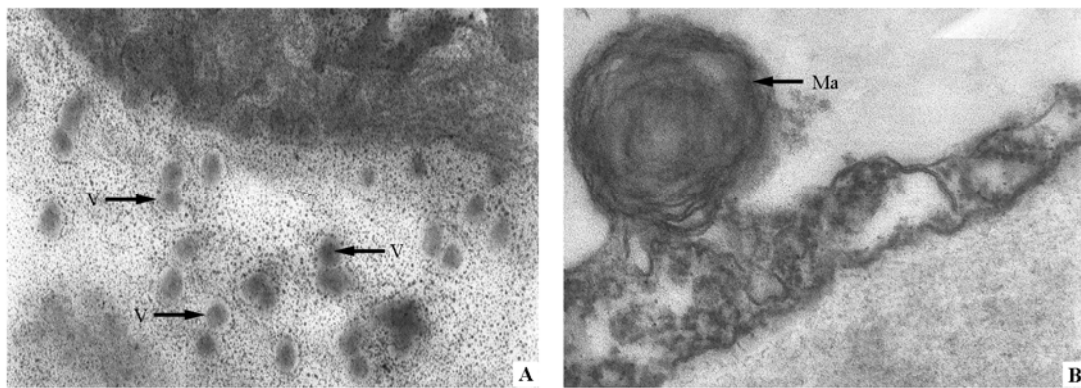


图3 澳洲坚果分离物 Maca-LC 细胞中的病毒粒子 (A) 和细胞膜增生产生的髓鞘样结构 (B)

V: 病毒粒子; Ma: 髓鞘样结构。

Fig. 3 Virions existed in cytoplasm (A) and structure like marrow sheath caused by membrane hyperplasia (B) from diseased leaf of macadamia

V: Virions; Ma: Marrow sheath.

2.4 DAS-ELISA 诊断

DAS-ELISA 测定结果表明, 云南澳洲坚果分离物 Maca-LC 与 WSMoV/GBNV 复合抗血清呈阳性反应, 与 TSWV、INSV、GRSV/TCSV 抗血清呈阴性反应, 因此从云南省临沧市苗木繁育基地采集到的澳洲坚果苗木中检测到的 Maca-LC 分离物, 可初步确定属于 WSMoV 血清组。

3 讨论

番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 病毒是布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 中唯一可以侵染植物的病毒, 目前已报道 24 个 *Tospovirus* 病毒种, 其中 8 个种为 ICTV 确定种 (de Oliveira et al., 2011; King et al., 2011)。番茄斑萎病毒属病毒寄生范围广, 已报道 TSWV 能侵染 84 个科 1 090 多种植物 (Parrella et al., 2003), 一般发生在温带和亚热带地区, 引起植物广泛的黄化环形坏死、褪绿、斑驳和局部枯斑等症状。

Tospovirus 病毒的病毒粒子具有包膜, 粒子直径 80 ~ 120 nm, 应用电镜技术能快速、准确地检测这类病毒 (张仲凯 等, 2000; King et al., 2011)。所采集的澳洲坚果病叶中应用电镜负染色及超薄切片方法仅观察到样品中有类似 *Tospovirus* 病毒粒子的球状病毒, 未检测到其它形状的病毒粒体存在。在病毒侵染的澳洲坚果感病叶片的超薄切片中, 观察到澳洲坚果中病毒粒子形成聚集体散布于寄主细胞的细胞质和细胞壁内, 受侵染的细胞膜明显增加, 出现较多的髓鞘样结构, 膜的增加是 *Tospovirus* 病毒区别于其他病毒侵染的显著特征 (张仲凯和李毅, 2001)。根据 *Tospovirus* 病毒的 N 蛋白单、多克隆抗血清关系, 主要有 TSWV、WSMoV 和鸢尾黄斑病毒 (*Iris yellow spot virus*, IYSV) 血清组, 同一血清组内的病毒具有血清学关系, 其余与其它 *Tospovirus* 病毒间没有血清学关系的病毒称为血清型 (Chen et al., 2010)。从澳洲坚果上分离得到的 *Tospovirus* 病毒分离物 Maca-LC 与 WSMoV 血清组的 WSMoV/GBNV 复合抗体呈阳性反应, 证明了 Maca-LC 病毒分离物属于 WSMoV 血清组成员, 病毒分离物的具体种类仍需要对病毒核壳体蛋白 (nucleocapsid protein) 基因进行测序等分析后才能确定, 对病害带来的危害也需要进一步做系统调查。从感病植株的病症、病毒粒体形态、细胞病理电镜观察及血清学检测都证明 *Tospovirus* 病毒感染了澳洲坚果苗木。通过查阅国内外

相关资料, 未见相关报道, 本文是澳洲坚果苗木感染 *Tospovirus* 病毒的首次报道。

在自然情况下 *Tospovirus* 病毒主要是靠传毒蓟马传播 (King et al., 2011)。据云南省盈江县林业局的调查, 危害澳洲坚果的主要害虫中包括蓟马, 说明云南澳洲坚果上已存在可被 *Tospovirus* 病毒侵染的介体, 随着种植时间的延长, 病毒经介体在植物之间逐步传播和积累, 病毒病有可能发展成为危害澳洲坚果的主要病害之一。因此有必要加强对 *Tospovirus* 病毒发生流行的动态监测和防治研究, 特别是加强对澳洲坚果等新兴特色产业发展中病毒病害及相关介体昆虫的监测工作, 研究相应的防控技术。

References

- Chen C C, Lu Y Y, Cheng Y H, Li J T, Yeh Y C, Kang Y C, Chang C P, Huang L H, Peng J C, Yeh S D. 2010. Serological relationship between *Melon yellow spot virus* and *Watermelon silver mottle virus* and differential detection of the two viruses in cucurbits. *Archives Virology*, 155: 1085 – 1095.
- de Oliveira A S, Bertran A G, Inoue-Nagata A K, Nagata T, Kitajima E W, Oliveira Resende R. 2011. An RNA-dependent RNA polymerase gene of a distinct *Brazilian tospovirus*. *Virus Genes*, DOI: 10.1007/s11262-011-0639-z.
- Fang Qi, Dong Jia-hong, Ding Ming, Yin Yue-yan, Zhang Li-zhen, Li Ting-ting, Su Xiao-xia, Li Zhan, Zhang Zhong-kai. 2011. DAS-ELISA and electron microscopic diagnosis of *Tospoviruses* infecting *Hymenocallis littoraris* and *Hippeastrum vittatum* in Kunming. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (10): 2005 – 2009. (in Chinese)
- 方 琦, 董家红, 丁 铭, 尹跃艳, 张丽珍, 李婷婷, 苏晓霞, 李 展, 张仲凯. 2011. 侵染水鬼蕉和花朱顶红的番茄斑萎病毒属病毒的电镜和 DAS-ELISA 诊断. *园艺学报*, 38 (10): 2005 – 2009.
- Guo Ling-fei, Peng Jing-ru, Tan Jian-feng, Wen Feng, Zeng Li-ming, Zhang Shi-ming, Liu Xiao-jing. 2010. Preliminary report of tissue culture on macadamia. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 26 (22): 385 – 388. (in Chinese)
- 郭凌飞, 彭靖茹, 覃剑峰, 文 峰, 曾黎明, 张世明, 刘晓静. 2010. 澳洲坚果组织培养研究初报. *中国农学通报*, 26 (22): 385 – 388.
- He Xi-yong, Tao Li, Ni Shu-bang, Chen Li-lan. 2009. Yield and nut quality of 15 macadamia (*Macadamia* spp.) cultivars in Yunnan. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 30 (10): 1399. (in Chinese)
- 贺熙勇, 陶 丽, 倪书邦, 陈丽兰. 2009. 15 个澳洲坚果品种在云南的产量及品质. *热带作物学报*, 30 (10): 1399.
- Investigation Team on *Macadamia integrifolia* Development in Yunnan. 2007. Current statuses, problems and suggestion on enterprising development of *Macadamia integrifolia* in Yunnan Province. *Tropical Agricultural Science & Technology*, 30 (1): 10 – 14. (in Chinese)
- 云南澳洲坚果产业调研组. 2007. 云南省澳洲坚果产业发展现状、存在问题及建议. *热带农业科技*, 30 (1): 10 – 14.
- King A M Q, Lefkowitz E, Adams M J, Carstens E B. 2011. *Virus taxonomy – 9th reports of the international committee on taxonomy of viruses*. New York: Academic Press, Elsevier: 737 – 739.
- Li Jia-zhi, Cai Zhi-ying. 2003. Macadamia disease in Yunnan. *Tropical Agricultural Science & Technology*, 26 (2): 11 – 14. (in Chinese)
- 李加智, 蔡志英. 2003. 云南澳洲坚果病害. *热带农业科技*, 26 (2): 11 – 14.
- Parrella G, Cognalons P, Gebre-selassie K, Vovlas C, Marchoux G. 2003. An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Plant Pathology*, 85: 227 – 264.
- Zhan Ru-lin. 1998. Controlling and occurring of diseases and pests in the main production zones of *Macadamia integrifolia* in the world. *South China Fruits*, 27 (5): 23 – 28. (in Chinese)
- 詹儒林. 1998. 国内外澳洲坚果主产区病虫害的发生与防治. *中国南方果树*, 27 (5): 23 – 28.
- Zhang Zhong-kai, Fang Qi, Ding Ming, Peng Lu-bo, Zhang Li-zhen. 2000. Detection of infection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) on tobacco by electro-microscopy. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 19 (3): 339 – 340. (in Chinese)
- 张仲凯, 方 琦, 丁 铭, 彭璐波, 张丽珍. 2000. 侵染烟草的番茄斑萎病毒 (TSWV) 电镜诊断鉴定. *电子显微学报*, 19 (3): 339 – 340.
- Zhang Zhong-kai, Li Yi. 2001. *Plant viruses in Yunnan*. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 张仲凯, 李 毅. 2001. *云南植物病毒*. 北京: 科学出版社.