

大麦条纹花叶病毒的研究

王志民 李维琪 赵民安 冯贡泽 尼莎 秦伟

(中国科学院新疆化学研究所, 乌鲁木齐)

李国英

(新疆石河子农学院, 石河子)

谢浩

(新疆伍家渠农垦局农业科学研究所, 伍家渠)

在北疆奎屯、伍家渠小麦田中,发现一种经种子传毒的病毒病。其症状特点、传播途径、病毒形态和血清学特性均与国外报道的大麦条纹花叶病毒相似。经分离提纯后观察,病毒颗粒呈棒状,长度约 129 毫微米,宽约 30 毫微米。制备出效价为 1:1024 的抗血清。采用琼脂双扩散法检验种子是否带毒,经调节扩散介质的 pH 值、丁基萘磺酸钠的浓度可提高检出灵敏度。

1978 年,在北疆奎屯、伍家渠小麦田中,发现一种经种子传播的病毒病。病株在一叶期叶片上开始出现不规则退绿条纹或花叶,三叶期后大量显现症状,以后逐渐潜隐,但一些重病株一直表现症状。病株不孕小穗增加,穗粒数减少和千粒重降低。由于是种子带毒并有隐症现象,所以易被忽视。这一病害已列入国际检疫对象。

本文报道病原体的分离提纯方法、形态观察和用抗血清检验单粒种子带毒的方法。

材料与方 法

(一) 病株来源

将典型病株按常规方法在田间于防虫条件下摩擦接种到小麦叶片上,一般 6—7 天即出现病症,发病率 75—95%。

(二) 病毒的纯化^{[1][4]}

切碎病叶,加入 3 倍体积的 0.1 M 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 8.0, 内含 0.01 M 氯化镁、0.1% 叠氮钠),捣碎,双层纱布挤滤。滤汁加入 20% 氯仿后振荡 2 分钟,经 3000 rpm 离心 5 分钟。上清液经 3 毫米厚硅藻土抽滤,向滤液中加入

入 PEG (聚乙二醇,分子量 6000) 和 NaCl,使其浓度分别为 6% 和 3%。该溶液置冰箱内沉淀后经 5000 rpm 离心 10 分钟,沉淀再用 pH 7.0 的上述缓冲液抽提,经 3000 rpm 离心 5 分钟。上清液再重复一次 PEG 沉淀和抽提。所得上清液经 40,000 rpm 离心 60 分钟,沉淀用少许 pH 7.0 上述缓冲液抽提。所得上清液供电泳观察及免疫注射。如不用硅藻土抽滤,经二次 PEG 沉淀和抽提后,上清液经二次 40,000 rpm 离心沉淀和低速抽提,效果也很好。

(三) 抗血清的制备及其效价、专一性测定

将病毒液和等体积完全福氏佐剂一起研磨后,对两只白色公兔进行肌肉注射。每次每只 2 毫升,共 4 次,每次间隔一周。再做耳静脉注射一次,二周后收集抗血清。用二倍稀释法测定效价,用奥氏琼脂扩散法^[1]测定其专一性。

扩散介质含 1.2% 琼脂,3—4% 丁基萘磺酸钠,0.02% 叠氮钠。柠檬酸缓冲液用乙醇胺调为 pH 8.5。20℃ 保温 5—6 小时后即可观察结果。

(四) 种胚血清学检验

防虫条件下病株所得种子,经 20℃ 左右蒸馏水浸泡二天,每粒种胚置一个琼脂扩散孔,捣碎并

本文于 1980 年 5 月 10 日收到。

注满缓冲液,与抗血清反应,观察结果。

(五) 电镜观察

1. 形态观察: 病叶用 pH 7.0 磷钨酸染色,纯化病毒液用 2% 醋酸铀 (pH 3.5) 染色,带毒种子先用水浸胀,分离种胚,用磷钨酸染色。用国产 DXA4-10 型电镜观察。

2. 超薄切片: 取一叶期的病叶,将症状明显的部分剪成 1×6 毫米细条,经戊二醛锇酸固定,酒精脱水,1:9 丁甲脂浸透、包埋,切片,醋酸铀-柠檬酸铅双染。

结果和讨论

(一) 病毒形态观察

在自然发病和摩擦接种的小麦叶片中,均见到大量短棒状病毒颗粒。将 110 条病毒颗粒作长度分布曲线,可见多在 108—180 毫微米之间,常态长度约为 129 毫微米,直径约 20 毫微米,有明显中空结构 (图版 I-1)。对 480 个提纯病毒颗粒的长度进行统计,结果与浸出法相似。经醋酸铀染色的病毒颗粒,在放大 20 万倍左右的电镜照片上,可见清晰的蛋白质亚基,横纹间距约 25—27 埃。在带毒种子的种胚和萌发 1—2 天的胚芽、胚根浸出液中,均见到形态和前者相同的颗粒。上述观察与 Harrison^[1] 报道的大麦条纹花叶病毒极为相近。

在带毒种子培育的小麦叶肉细胞超薄切片中见到大量棒状病毒颗粒,未见明显包含体 (图版 I-2)。

(二) 抗血清效价

37℃ 反应 2 小时,置冰箱内 24 小时后观察结果,效价为 1:1024。

(三) 丁基萘磺酸钠浓度、缓冲液 pH 值对琼脂扩散带的影响

当缓冲液为 pH 6.5、琼脂介质中丁基萘磺酸钠浓度高于 0.05% 时,在抗原和抗血清孔周围均形成白色沉淀物,掩盖抗原与抗体形成的沉淀带。当浓度低于 0.01%

时,沉淀带不清晰。只有浓度为 0.03—0.04% 时,沉淀带清晰且无干扰。

实验还表明扩散介质的 pH 值对沉淀带有影响。以柠檬酸为缓冲液,用乙醇胺调介质至 pH 6.5、7.5、8.5、9.5、10.5、11.5,发现 pH 7.5 至 10.5 时,沉淀带更清晰。国外有关报道多使用 0.1% 或 0.5% 二丁基萘磺酸钠。我们使用 0.03—0.04% 丁基萘磺酸钠,并结合调介质 pH 至 8.5,第一条沉淀带更为清晰,提高了检出灵敏度 (图版 II-1—2)。

免疫试验还表明抗原和抗血清孔间形成二条沉淀带,第二条带靠近抗原孔,第一条带又分为两带。这些都与国外报道的大麦条纹花叶病毒血清学特性一致^{[2][6]}。

(四) 种子带毒的血清学检验

抗血清与纯化病毒、病叶汁液间形成两条沉淀带。第一条带是病毒降解后低分子抗原物与抗血清形成的,因此可用第一条带的出现表示试样中有该病毒的存在^[6]。带毒种胚汁液与抗血清反应后只能观察到第一条带,这可能与其病毒含量低有关。

第一条带在 20℃ 反应 5 小时后即可观察到,而第二条带要 9 小时后才出现。带的形成有特异性,只有纯化病毒液、病叶汁液和病种胚汁液与抗血清间才出现。健叶、健康种胚与抗血清不形成沉淀带 (图版 II-3)。因此用第一条带的出现来检验种子是否带毒是合适的。

根据本文所述方法,对隔离条件下培育的奇台黑芒小麦病株所得 80 粒种子进行带毒情况检验,血清反应阳性者为 61.3%,电镜检出带毒者为 65%,两者相关性为 94.3%。此外,播种欧柔病麦种子出苗 579 株,肉眼观察其发病率为 72.3%,用抗血清检验该批种子 100 粒,反应阳性者为 73%,两者结果很相近。

检验小麦种子是否带有大麦条纹花叶病毒, 历来使用播种法观察, 费时费事, 有时易与生理等原因引起的症状混淆^[9], 难于做出结论。利用抗血清(冻干品也可)是一种比较简便、准确的方法。

参 考 文 献

- [1] Harrison, B. D. et al.: *Virology*, 26(2): 284—289, 1965.
- [2] Hamilton, R. I.: *Phytopathology*, 54(10): 1290—1291, 1964.
- [3] Myron, K. B.: *Virology*, 17: 131—142,

1962.

- [4] 中国科学院新疆化学所病毒组; 生物化学与生物物理学报, 10(4): 409—410, 1978.
- [5] 坂口进著: 《植物免疫化学实验法》植物免疫化学实验法翻译小组译: 《植物免疫化学实验法》, 上海人民出版社, 1976年, 43页.
- [6] Hamilton, R. I. et al.: *Virology*, 30(4): 661—672, 1966.
- [7] Brakke, M. K.: *Virology*, 17: 131—142, 1962.
- [8] Wayne, S. G.: *Phytopathology*, 57(12): 1315—1316, 1967.
- [9] Hamilton, R. I.: *Phytopathology*, 55(7): 798—799, 1965.

STUDIES ON THE BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS

Wang Zhimin Li Weiqi Zhao Minan Feng Gongze
Ni Sha Qin Wei

(The Chemical Institute of Xinjiang, Academia Sinica, Ürümqi)

Li Guoying

(Agriculture College of Shin Ho Zhi)

Xie Hao

(The Agriculture Institute of Wuliyaq, Xinjiang Uygur Autonomons Region, Wuliyaq)

A kind of seed-borne virus disease of wheat was found in wheat fields in Kuitun and Wuliyaq of North-Xinjiang, China. Its symptom, shape, method of transmission and serological reaction are similar to those of barley mosaic virus reported in the literature. Differential centrifugation and PEG were used in the purification

of the virus. The virus particle is tubular, about 129 nm in length and 20 nm in width. When antisera 1:1024 was prepared, agar diffusion method was used in seed detection. Detection sensitivity can be raised by controlling the pH of agar and the quantity of sodium butyl naphthalene sulfate used.