

小麦丛矮病毒的研究

田 波 张振勇 梁希娴 史春霖

杨希才 赵家英 张秀华

(中国科学院微生物研究所三室, 北京)

小麦丛矮病是我国北方麦区的一个重要病害。已报道^[1-4]它是由灰飞虱传染的, 在小麦病株和带毒灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallen 的超薄切片中都观察到弹状病毒颗粒。为了确定病原, 我们用微量注射器把从小麦病株中提取的病毒注入灰飞虱, 然后放在健康小麦上取食, 可使小麦产生典型的丛矮病状。证明小麦丛矮病的病原是一种弹状病毒, 称谓小麦丛矮病毒 (WRSV)。还用注射方法测定了 WRSV 的体外抗性。

用 10 种禾谷类作物和 17 种禾本科杂草测定了 WRSV 的寄主范围。试验证明 WRSV 可侵染属于 6 个族的 17 种植物。在免疫的植物中 *Aegilops ventricosa* 可与小麦杂交, 是抗病育种中有用的原始材料。

在温室条件下测定了 43 个小麦品种对 WRSV 的抗病性, 41 个严重感病, 两个春麦品种中 3 和中 4 是抗病的。

小麦丛矮病是我国北方麦区的一个重要病害, 已证明它是由灰飞虱传染的。在小麦病株和传病灰飞虱的超薄切片中都观察到弹状病毒颗粒。在抽提的样品中还存在类似病毒的线状和球状颗粒^[1-3]。为了确定小麦丛矮病的病原, 我们用显微注射器把小麦病株中提取的病毒注射到灰飞虱体内, 再放到小麦上取食, 能使小麦产生典型的丛矮症状, 证明小麦丛矮病的病原是一种弹状病毒。为了进一步鉴定这个病毒, 测定了它的体外抗性和寄主范围, 后者对了解病毒的越冬和侵染来源提供了依据。还测定了品种的感病性。

一、病原性的证明

由于新病原的不断发现, 病毒病原的证明也需要遵循 Koch 氏原则, 但病毒目前尚不能人工培养, 而是用纯系分离物(单斑或单虫多次分离纯化)的活体培养来代

替。虫传病毒的回接已广泛应用显微注射和薄膜饲毒两种方法。考虑到飞虱人工饲养的困难, 我们应用显微注射方法。

1. 病毒的分离和提取

1976 年将田间表现丛矮症状的病株移入温室, 用单个飞虱的若虫传病于农大 139 品种的小麦幼苗上, 经反复传病纯化后作为毒源, 传毒小麦后产生典型丛矮病状(图 1)。

超薄切片中有弹状病毒颗粒(图版 I-2)。取发病的病叶, 每克加入 1—2 毫升 0.1 克分子浓度的甘氨酸和 0.01 克分子浓度的氯化镁的混合液 (pH8.0)。用绞肉机或研钵磨碎, 以尼龙布挤出汁液。6,000 × g

本文于 1979 年 6 月 16 日收到。

承周家炽教授热心指导和鼓励; 徐浩、沈菊英同志在切片方面, 严绍颢、史瀛仙同志在显微注射方面给予指导; 河北植保土肥所, 中国农科院作物所、北京植保站提供实验材料, 特此一并致谢。

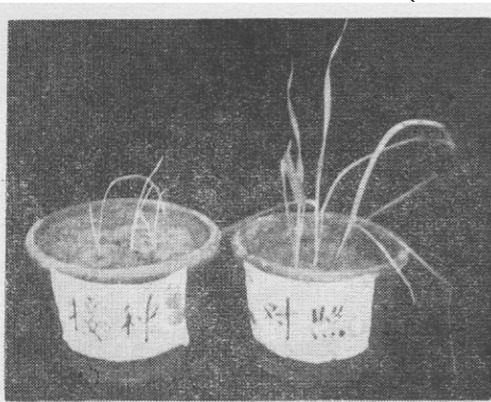


图 1 小麦丛矮病症状(左病株,右健株)

离心 15 分钟去沉淀,清液中加入 6% 聚乙二醇(分子量 6,000 或 12,000)和 3% 氯化钠,在冰箱内放置过夜, $4,000 \times g$ 离心 20 分钟,取沉淀,悬浮在原体积 1/10 量的上述甘氨酸氯化镁液中, $6,000 \times g$ 离心 15 分钟,取上清液, $105,000 \times g$ 离心 1 小时,沉淀悬浮在甘氨酸氯化镁液中。还可重复进行聚乙二醇沉淀和差速离心处理。有的样品还进行了蔗糖密度梯度离心。注射飞虱用的样品悬浮在生理盐水中。

2. 显微注射装置和注射方法

参照中国科学院动物研究所细胞室用于鱼类细胞核移植和卵注射用的设备^[5]。自制了微量注射装置,包括显微注射器和操纵台两部分。显微注射器由一个小型注射器,一个已去掉尺架的 25 毫米外径千分

尺,和一个将二者连接起来的金属半筒套所组成。注射用的微针通过一段导尿管和毛细塑料管与注射器连接。借助千分尺上微分筒的滚动,推动装在玻璃注射器筒心上的弹簧,作内吸或外注。操纵台是把普通显微镜所使用的载片移动台,固定在一块金属板左角的一根金属柱上。显微注射器固定在右角的金属柱上。把支持微针的玻璃管,斜向的夹在移动台的铁夹内,构成一套简易的显微注射装置(图 2)。旋动台的两个位移旋钮,就可使微针作上下、左右方向移动,在解剖显微镜下把微针对准所要注射的飞虱。微针是用直径 2 毫米,壁厚 0.05 毫米的硬质玻璃管,在电热式拉针器或微型酒精灯上控制的。微针的尖约为 2—4 微米。

注射时先把 4 龄左右的无毒若虫在乙醚气中休克。微针内吸入病毒悬液,小心的注入若虫腹部,待若虫复苏后在健康的植株上饲养 10—15 天,再放到小麦幼苗上取食测定侵染性。

3. 提纯的病毒引起典型的小麦丛矮病

用聚乙二醇沉淀、差速离心和蔗糖密度梯度离心提取的病毒样品,其中所含病毒颗粒,宽 30 毫微米,平均长度 110 毫微米(图版 I-1),相当于脱去外膜的核衣壳^[2]。很少得到 $50-54 \times 320-400$ 毫微米的完整弹状病毒颗粒(图版 I-2),将此样品注射飞虱,进行传毒试验,并以病株和健株汁液作对照,结果见表 1。

表 1 小麦丛矮病毒注射飞虱传毒实验

注射样品	注射头数	10 天后存活头数	传毒小麦幼苗株数	发病小麦株数
提纯病毒*	24	12	10	7
病叶汁液	12	6	5	3
健叶汁液	10	4	5	0

* 病毒悬浮在生理盐水中。

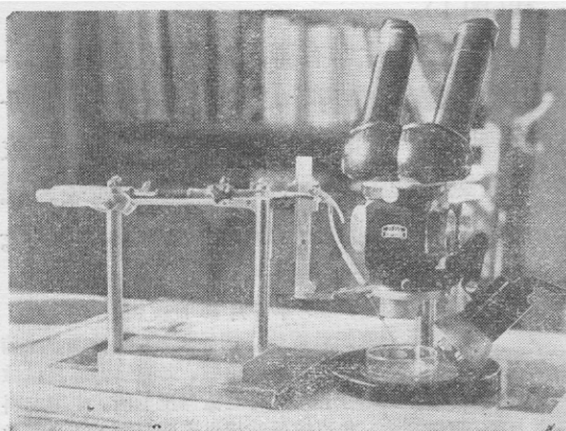


图 2 显微注射装置

结果证明提纯的病毒和病叶汁液一样可引起小麦丛矮病(图3)。在发病的植株中经沾取法观察证明存在典型的弹状病毒颗粒。WRSV 属于负链 RNA 病毒,其 RNA 必须有病毒颗粒中转录酶的存在才有侵染性。实验结果说明,所提取的核衣壳中,即存在 RNA 的侵染性单位,也存在转录酶。这与其他弹状病毒的侵染性研究结果是一致的。我们所提取的核衣壳的平均长度,约为弹状病毒颗粒的一半,可能在每个完整弹状病毒颗粒中含有两个侵染性单位。用提纯的 WRSV 免疫家兔可制得效价为 512 的抗血清,抗血清经健康小麦叶汁液吸收后,对 WRSV 具有专一性反应。取人工注射的飞虱传毒发病的小麦叶片汁液,与上述抗血清进行血清反应,产生专一性的沉淀,从而进一步证明所注射的病毒就是引起丛矮病的病原。

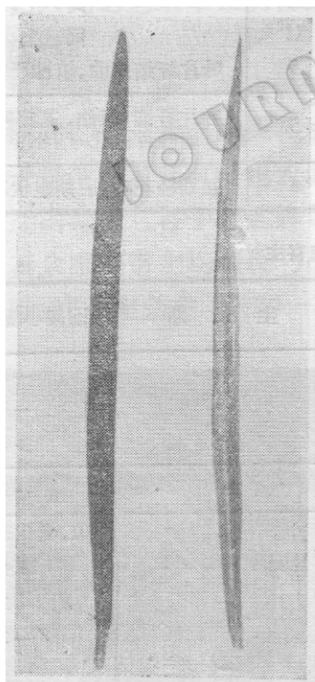


图3 用提纯的丛矮病毒注射的飞虱在小麦上取食后引起的条纹花叶症状(左健叶,右病叶)

二、WRSV 的体外抗性

1. 体外保毒期

将在含有保护剂的磷酸缓冲液中制备的病株汁液放于 4℃ 的冰箱内。经 1、2、3 和 4 天后,注射飞虱测定侵染性,结果列入表 2。

表 2 小麦丛矮病毒的体外保毒期

体外存放 天数	注射头数	15 天后存 活头数	传毒小麦 幼苗株数	发病小麦 株数
1	10	3	5	2
2	9	2	5	1
3	10	3	5	0
4	10	2	5	0

初步试验结果说明,丛矮病毒的体外保毒期为 2—3 天。含有保护剂的磷酸缓冲液易引起飞虱的死亡,不如生理盐水的存活率高。

2. 稀释限度

把榨取的病株汁液,用生理盐水稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 四个稀释度,分别注射飞虱测定侵染性,结果见表 3。

表 3 小麦丛矮病毒的稀释限度(用生理盐水稀释)

稀释限度	注射头数	15 天后存 活头数	传毒小麦 幼苗株数	发病小麦 株数
10^{-1}	20	14	11	3
10^{-2}	20	6	6	0
10^{-3}	20	15	11	0
10^{-4}	20	10	10	0

小麦丛矮病毒的稀释限度为 10^{-1} — 10^{-2} 。与日本北方禾谷花叶病毒相比^[6-7],其体外抗性较低,前者的体外保毒期为 4—5 天,稀释限度为 10^{-2} — 10^{-3} 。这种差别可能是因实验条件不同引起的,日本用的是大麦病株,我们用的是小麦病株。

三、寄主范围

用 10 种禾谷类作物和 17 种禾本科杂草测定 WRSV 寄主范围。无毒灰飞虱若虫在上述 WRSV 分离物的病株上饲毒 2 天,再移到健康植株上度过循环期,或一直在

病株上饲养。15 天后采用群体传毒方法,每盆幼苗 5 株,用 5 头带毒若虫传毒。一般每种植物传毒 10 株以上幼苗,以同样数目的幼苗作不传毒的对照,开始实验时并用无毒若虫传毒作为对照。飞虱在被测植物上取食两天后,将虫除去,在无虫条件下

表 4 小麦丛矮病毒的感病寄主

族 名	种 名	生长期	潜伏期(天)	症 状
大麦族 <i>Hordeae</i>	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	一年生	5—6	初期叶片呈黄绿相间的条纹花叶后期植株矮缩,呈羊胡子状,早死
	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	一年生	6—7	症状与小麦相似,但品种间有差异
	黑麦 <i>Secale cereale</i>	一年生	7	症状与小麦相似
	乌麦	一年生	6	同 上
	<i>Aegilops squarrosa</i>	一年生	6—7	同 上
	<i>Aegilops kotschgi</i>	一年生	6—7	同 上
	<i>Aegilops variabilis</i>	一年生	6—7	同 上
	<i>Aegilops triuncialis</i>	一年生	6—7	同 上
燕麦族 <i>Aveneae</i>	燕麦 <i>Avena sativa</i>	一年生	7—10	症状与小麦相似,但品种间有差异
虎尾草族 <i>Chlorideae</i>	虎尾草 <i>Chloris virgata</i>	一年生	5	症状与小麦相似
狐茅族 <i>Pestuceae</i>	大画眉草 <i>Eragrostis cilianensis</i>	一年生	15	同 上
	小画眉草 <i>Eragrostis pectinacea</i>	一年生	11	同 上
	野雀麦 <i>Bromus arvensis</i>	一年生	5	叶片纤细扭曲,植株严重矮化,早死
藎草族 <i>Phalarideae</i>	金丝雀藎草 <i>Phalaris cahariae</i>	多年生	5	叶片纤细,扭曲,基部叶片变红,顶端叶片白化
黍族 <i>Panicaceae</i>	青狗尾草 <i>Setaria viridis</i>	一年生	6	初期轻花叶,后期症状不明显

表 5 小麦丛矮病毒的免疫和带病寄主

族 名	种 名	生 长 期	回接小麦发病情况
玉蜀黍族 <i>Maydeae</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	—	一年生
	高粱 <i>Sorghum vulgare</i>	—	一年生
	大油芒 <i>Spodiopogon sibiricus</i>	—	多年生
稻族 <i>Oryzeae</i>	水稻 <i>Oryza sativa</i>	—	一年生
黍族 <i>Panicaceae</i>	谷子 <i>Setaria italica</i>	+	一年生带病寄主
	稷 <i>Panicum miliaceum</i>	—	一年生
	稗 <i>Echinochloa crusgalli</i>	—	一年生
	马唐 <i>Digitaria sanguinalis</i>	—	一年生
	荩草 <i>Arthraxon hispidus</i>	—	一年生
虎尾草族 <i>Chlorideae</i>	牛筋草 <i>Eleusine indica</i>	+	一年生带病寄主
大麦族 <i>Hordeae</i>	<i>Aegilops ventricosa</i>	—	一年生
燕麦族 <i>Aveneae</i>	燕麦草 <i>Arrchenatherum</i> sp.	—	多年生

观察植株发病情况,如植物不发病则需要进行重复实验。传毒后 15—20 天不表现任何症状的植物,将无毒若虫在其上饲养 15 天,然后接回到健康的农大 139 品种的幼苗上去,作是否带毒的回接实验。则根据小麦上的症状,以区分未表现症状的植物是带毒寄主,还是免疫植物。

根据各种植物对病毒的反应和分类系统,将感病寄主列入表 4; 不发病的带病和免疫植物列入表 5。

传毒实验说明, WRSV 能侵染属于 6 个族的 17 种植物。在所测定的 8 个族的禾本科植物中,属于玉蜀黍族和稻族的植物是免疫的;属于黍族的植物中,有感病的(青狗尾草)、带毒的(谷子)和免疫的(马唐草等)。

在对丛矮病毒感病的杂草中,大画眉、小画眉草、狗尾草、蟋蟀草等都是灰飞虱喜食的植物,因此这些杂草在病害流行上的作用值得注意。

在栽培作物中,所有测定过的麦类作物都是感病的;而玉米、高粱和水稻是免疫的;谷子是带毒者(有时也表现轻微花叶)。丛矮病毒除对谷子和蟋蟀草不表现症状外,其余感病寄主均表现与小麦相似的丛矮花叶,在温室条件下(20—25℃)的

潜育期为 5—15 天,其中多年生的金丝雀藨草除丛矮花叶症状外,基部叶片还变成红色,是比较特殊的表现(图 4)。

可与小麦进行杂交的山羊草属 *Aegilops* 植物中,四种是感病的;而 *Aegilops ventricosa* 接种后不表现症状。在回接小麦的实验中证明不带有病毒,是免疫的植物,对小麦抗丛矮病育种是有用的原始材料。

四、小麦品种对 WRSV 的感病性

根据田间观察,一般认为小麦品种对丛矮病的感病性没有显著差异,但我们在寄主范围测定中观察到大麦和燕麦的症状,因品种而有很大不同。例如皮大麦严重感病,植株矮缩丛生,提前死亡;而矮秆齐品种的大麦只表现轻微花叶,后期症状极不明显。燕麦 1 号比 3 号品种易于感病。因此于 1977 年在温室条件下对 41 个小麦品种的幼苗进行了人工传毒实验,测定的品种和品系有:北京 8 号、北京 10 号、北京 15 号、北京 17 号、北京 160 号、北京 166 号、北京 183 号、农大 139、农大 311、农大 139 选系、京双 1 号、京作 348、东方红 3 号、有芒红 7 号、有芒白 2 号、有芒白 4 号、72-088、974-1253、5819、6068、5238、中高秆选系 256、红良 4 号、泰山一号、白蚰包、山西 65-848、忻冬矮 2 号、山东 71-5017、矮丰 3 号、延安 6 号、晋中 849、高抗 2 号、抗引 655、阿芙乐尔、山前、洛夫林 13 号、F49-70、2422/464、鹅冠。包括国内的一些优良品种和国外引进品种,均未发现在感病性上有明显差异,都表现典型的丛矮症状。根据天津市农科所对 1,000 多个品种的田间感病性观察,发现黑龙江通过种间杂交得到的春小麦中 3 和中 4 表现抗病。我们进行了温室传毒试

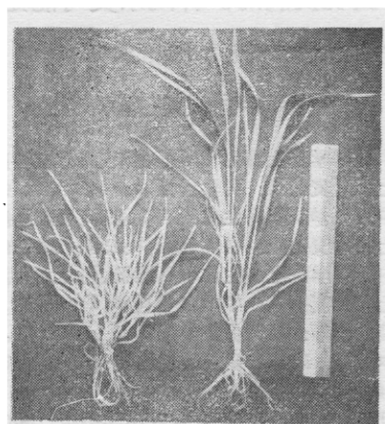


图 4 小麦丛矮病毒在金丝雀藨草上的症状 (左病株、右健株)

验,证明这两个品系确有一定抗病能力,传毒植株不表现症状或只有轻微症状。

五、讨 论

在灰飞虱传染的弹状禾本科植物病毒中,与我国小麦丛矮病毒相近的、有日本的

北方禾谷花叶病毒 (NCMV)^[6,7], 苏联的燕麦伪丛簇病毒 (OPRV)^[8,11] 和意大利的大麦黄色条点花叶病毒 (BYSMV)^[9]。史密斯^[10]把 NCMV 归入 OPRV, 由于对这些病毒的性质了解的还很少, 因此很难说这种归属是否合适。从已有的资料看 (表 6),

表 6 灰飞虱传染的几种杆状禾本科病毒性状的比较

病 毒	主要传毒媒介	寄 主 范 围	病毒大小(毫微米)
小麦丛矮病毒	灰飞虱	麦类、谷子、狗尾草、雀麦草等, 不侵染玉米、高粱、水稻等	320—400×50.54
北方禾谷花叶病毒	灰飞虱	麦类、谷子、狗尾草、雀麦草等, 不侵染玉米、高粱、水稻、有时侵染稗	350(330—380)×68
燕麦伪丛簇病毒	灰飞虱	麦类、玉米、水稻、狗尾草	150×20
大麦黄色条点花叶病毒	灰飞虱	麦类, 不侵染玉米	260—270×55—60

NCMV 和 OPRV 在病毒颗粒大小上有很大差别。前者为 350 × 68 毫微米, 后者只有 150 × 20 毫微米。此外, 两种病毒在寄主范围和寄主反应上也有明显的不同。OPRV 可侵染玉米和水稻, 而这两种植物对 NCMV 是免疫的。NCMV 侵染麦类后分蘖增多, 呈现丛矮症状, 而 OPRV 只引起花叶症状, 无分蘖增多现象, 可见, 这两种病毒很不相同。

根据已积累的资料, 我国的小麦丛矮病毒, 除体外抗性稍低外, 在病状、寄主范围、传毒媒介、病毒形态和大小等方面都与日本的北方禾谷花叶病毒很相似, 它们可能是同一病毒。体外抗性的差别, 很可能是实验条件不同所引起的。

关于丛矮病的防治途径, 根据寄主范围测定结果, WRSV 的杂草寄主很多, 有一年生的, 也有多年生的, 它们是 WRSV 的越冬寄主, 也是侵染秋季麦苗的来源。实践证明清除麦田及其周围的杂草是防治丛矮病的重要措施。此外, 秋苗晚播也有避病作用, 但有些措施往往与增产要求(间作

套种、提前播种等)不一致。用药剂治虫防病虽有一定效果, 但大面积应用仍有困难。从长远看, 仍应以抗病育种为主要途径。本文提供了一个能与小麦杂交的, 对 WRSV 免疫的原始材料——*Aegilops ventricosa*, 可在远缘杂交育种中应用。在品种抗病性测定中, 具有抗病性的两个小麦品系是种间杂交后代。春小麦中 3 和中 4 是黑龙江农科院用远缘杂交 (东农 101 × 天兰偃麦草) 得到的。品种间杂交得到的品种和品系没有发现抗病的。种间杂交可能是获得对 WRSV 抗性的有效途径。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海生化所病毒组、河北农科院植保土肥所麦病组: 科学通报, 3:140—141, 1977。
- [2] 中国科学院上海生化所病毒组、河北农科院植保土肥所麦病组: 科学通报, 8:138—139, 1977。
- [3] 中国科学院上海生化所病毒组、河北农科院植保土肥所麦病组: 中国农业科学, 1:78—81, 1978。
- [4] 裴维蕃等: 植物保护学报, 6:9—15, 1979。
- [5] 中国科学院动物研究所细胞室: 动物学杂志, 2:44—47, 1975。
- [6] 伊藤诚、福土贞吉: 札幌农林学会报, 36(3):62—89, 1944。
- [7] Murayama, D. and Y. T. Lu: J. Fac. Agr.,

- Hokkaido Univ., 55: 182—190, 1967.
- [8] Сухов, К. С. и Г. М. Развязкина: Биология вирусов и вирусные болезни растений, Советская наука, Москва, 103—120, 1955.
- [9] Conti, M.: *Phytopath. Z.* 66(3): 275—299, 1969.
- [10] Smith, K. M.: *A Textbook of Plant Virus Diseases*, 3rd ed., Little, Brown and Company, Boston, 1972.
- [11] Проценко, А. Е.: Вопросы вирусологии, 5:481—483, 1959.

STUDIES ON THE WHEAT ROSETTE STUNT VIRUS

Tian Bo Zhang Zhen-yong

Liang Xi-xian Shi Chun-lin

Yang Xi-cai Zhao Jia-ying Zhang Xiu-hua

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

Wheat is seriously attacked with rosette stunt disease in North China. Some reports have indicated that the disease was transmissible by plant hopper (*Laodelpha striatellus* Fallen) and numerous bullet virus particles have been observed in the cell of the diseased plants and its vectors. We purified the virus from the diseased plant and injected it into the nonviruliferous nymphs of *L. striatellus* Fallen. After inoculation, the insects were transferred onto the healthy wheat plants which then produced typical rosette stunt symptom, thus demonstrating the infectivity of this bullet virus,

i.e. wheat rosette stunt virus (WRSV).

In order to investigate the host range of the WRSV, 27 gramineous plant species, including both the cultivated and wild species were tested. The results of the inoculation studies demonstrated that 17 species, representing 6 tribes of the gramineae were proved to be the hosts. Of which, 15 species exhibited symptoms, 2 species with no symptoms although carrying the virus.

Among 43 varieties of wheat tested, 2 of them were proved to be resistant to the disease.