

来源不同V-C组不同的小麦全蚀病菌病毒的特性

梁平彦 周淑敏 陈开英

(中国科学院微生物研究所, 北京)

提 要

从地理位置不同, V-C 组不同的13株小麦全蚀病菌中分离到直径23—36纳米的病毒。聚丙烯酰胺凝胶电泳表明这些菌株中的病毒 dsRNA 的组分及分子量不同。泰安株病毒有分子量为3.45, 2.95, 1.60, 1.52, 1.30, 1.25, 1.15, 1.00, $<1.00 \times 10^6$ 的9个 dsRNA, 而浙江、湖北菌株仅有一个组分、分子量为 3×10^6 。多数病毒衣壳多肽的分子量为 $66 \times 10^3 - 73 \times 10^3$ 。

泰安菌株与烟台菌株病毒抗血清清除与张家口菌株、青海菌株无反应外与其它菌株病毒均有反应, 但在免疫双扩散中抗血清的滴定度不同。

关键词: 小麦全蚀病菌病毒, 病毒 dsRNA 组分, 衣壳多肽

小麦全蚀病 (Take all disease) 由子囊菌 (*Gaeumannomyces graminis*) 引起, 七十年代前后在我国烟台等地流行, 并在小麦主要产区发生, 危害严重。Lapierre 等 (1970) [1,2] 曾在法国观察到病害的消长与病毒感染造成小麦全蚀菌的低毒力 (Hypo-Virulence) 有关, 首次提出利用病毒防治真菌病害。但英国 Rawlinson (1973) [3] 等研究结果不同, 随着在植物病原菌中发现 dsRNA 病毒和 dsRNA 的数量逐年增加, dsRNA 的存在是否参与真菌毒力 (Virulence) 的调控, dsRNA 的传递是否与毒力的变化相关引起了普遍的关注 [4,5,6]。在考虑病毒对寄主的生物学作用时, 有关病毒的 dsRNA, 衣壳多肽及其血清学特性是基础工作, 而影响全蚀菌病毒传递的寄主的营养上可亲和性 (Vegetative compatible group, V-C group) 的研究国内未见报道。本文报告了来源不同的, V-C 组不同的小麦全蚀菌病毒的特性。

材 料 与 方 法

1. 菌种来源 来自国内小麦主要产区的小麦全蚀菌的分离, 培养及菌丝体的收集方法见前报 [7]。
2. 病毒的提取, 蔗糖密度梯度离心, 电镜观察 见文献 [7]。
3. 菌丝体中 dsRNA 的直接提取及病毒核酸的制备 见文献 [8]。
4. SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳测定病毒衣壳多肽分子量 方法同 King 和 Laemmli (1971) [9]。浓缩胶为3%, 分离胶为13%或10%, 电压100伏, 电泳5—6时, 考马斯亮

本文于1988年3月22日收到。

国家自然科学基金资助课题。

蓝R 250染色, 脱色方法同^[7]。分子量参照物: 磷酸化酶b, 94K; 牛血清蛋白67K; 卵蛋白43K; 碳酸酐酶30K; 胰蛋白酶抑制剂20K。

5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测病毒的 dsRNA 谱带及测定分子量 4% 或 5% 凝胶, 电压 100 伏, 电泳 9 小时, 以黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 病毒 dsRNA (分子量为 2.76, 2.31, 2.24, 1.87, 1.70 和 1.44×10^6) 和黄瓜花叶病毒核酸及卫星 dsRNA (分子量为 2.54, 2.26, 1.64, 0.72, 0.22×10^6) 作分子量参照物。硝酸银染色技术见文献^[10]。

6. 病毒抗血清制备及奥氏免疫双扩散测抗血清滴度 经蔗糖密度梯度离心纯化的病毒, 弗氏完全佐剂乳化, 肌肉注射家兔 3 次。0.8% 琼脂进行免疫双扩散。产黄青霉病毒 (*Penicillium Chrysogenum virus*), 黑曲霉病毒 (*Penicillium niger virus*), 米曲霉病毒 (*Aspergillus ryzae virus*), 美味侧耳病毒 (*Pleurotus sapidus virus*), 糙皮侧耳病毒 (*P. ostreatus virus*) 及其抗血清为本实验室所制备及保存。

7. Poly (I) : Poly (C) 抗血清制备 见文献^[11]。

8. 小麦全蚀病菌各菌株的不同 V-C 组的确定 将各菌株的菌丝块成对地接种到盛有马铃薯蔗糖琼脂培养基的培养皿两边, 25°C 温育至菌落相互接触。同一 V-C 组内的菌落之间相遇而无外表上的区别, 不同 V-C 组之间相邻处有明显的抗衡区, 表现为清晰的色素带。

结 果

1. 不同地理位置小麦全蚀病菌病毒的 dsRNA 基因组及多肽的组分及分子量

表1 来源不同的小麦全蚀病菌病毒的特性

Table 1 Properties of virus in *G. graminis* isolated from different area in China

菌株来源	V-C组	颗粒直径	dsRNA组分	病毒 dsRNA 分子量	多肽分子量	
source of strains	V-C group	Particles diameter (nm)	Components of dsRNA	Molecular weight of virus dsRNA ($\times 10^{-6}$)	Molecular weight of polypeptides ($\times 10^{-3}$)	
江苏 Jiangsu	A	33-38	3	1.62 1.54 1.40	73 43 70 67 20	
烟台 Yantai	A	27-32	5	1.62 1.54 1.50 1.20	115 95 73 67 63	
泰安 Tainan	B	23-32	9	3.45 2.95 1.60 1.52 1.30 1.25	65 53	
烟台 3 Yantai 3	B	25-34	3	3.0	1.45 1.19	70 43
黑龙江 Heilongjiang	C	24-35	6	1.60 1.50 1.30 1.25 1.20 1.13	115 66	
青海 Qinghai	C	23-36	3	1.20 1.15 1.00	67	
张家口 Zhangjiakou	D	27-31	2	2.62	1.20	73
雁北 Yanbei	E	28-36	5	2.76	1.60 1.54 1.20 1.00	
内蒙古 Neimouggu	F	25-29	3	1.62 1.20 1.13	45 18	
湖北 Hubei	G	27-36	1	3.00	73	
山西 Shanxi	H	25-31	8	3.45 2.76 1.62 1.54 1.50 1.20 1.13 1.00	72	
烟台 2 Yantai 2	I	25-40	2	1.45 1.19	70 43	
浙江 Zhejiang	J	25-32	1	3.0	73 43	

一, 主要衣壳多肽

Major capsid polypeptide

电镜检验来源不同的小麦全蚀病菌中感染等轴对称病毒颗粒,多数直径为23—36纳米(表1),病毒核酸与 poly(I):poly(C) 抗血清有反应^[11]。核酸经4%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,银染色显示各菌株的 dsRNA 带谱不同。最多的如泰安菌株病毒有9个片段,分子量为3.45, 2.95, 1.60, 1.52, 1.30, 1.25, 1.15, 1.00, $>1.00 \times 10^6$ (图1), 最少的只有一个片段,如浙江菌株,分子量为 3.0×10^6 。根据 dsRNA 的大小基本上可分为两类,分子量较小的在 $1.0 \times 10^6 - 1.62 \times 10^6$ 之间,分子量较大的在 $2.62 \times 10^6 - 3.45 \times 10^6$ 之间。多数菌株的病毒具有 $1.0 \times 10^6 - 1.62 \times 10^6$ 的 dsRNA。自泰安及烟台菌株的菌丝体中直接提取 dsRNA 获得与病毒中提取的 dsRNA 相同的带谱。

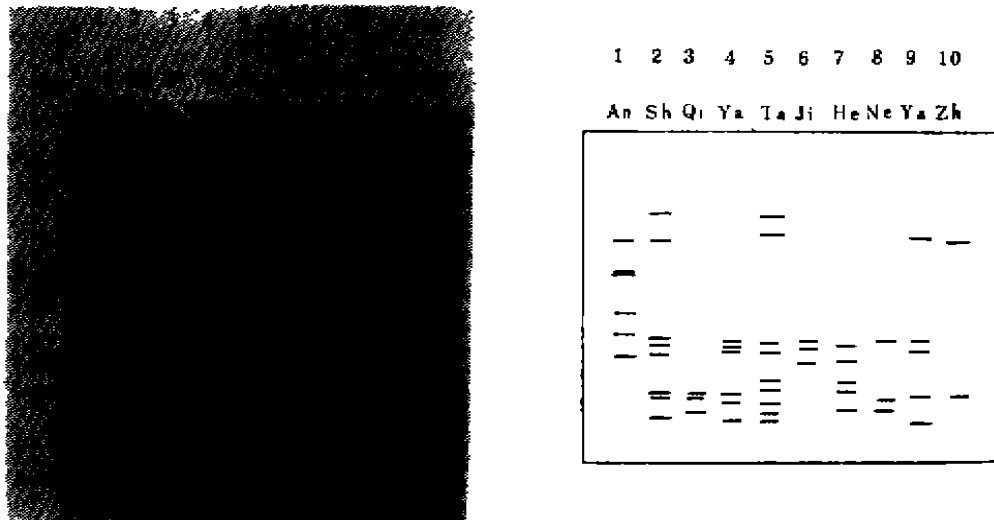


图1, 左, 不同地区小麦全蚀病菌病毒的 dsRNA PAGE带谱。

1. 分子量参照物, 黑曲霉病毒 dsRNA ($\times 10^6$); 2. 山西菌株病毒 dsRNA;
3. 青海; 4. 烟台; 5. 泰安; 6. 江苏; 7. 黑龙江; 8. 内蒙古; 9. 雁北株 3;
10. 张家口 4%凝胶, 100伏, 电泳9小时。
右, dsRNA 片段的示意图。

Fig. 1, Left, PAGE patterns of viral dsRNA from 9 strains of *Gaeumannomyces graminis* collected from different areas in China. Line 1, Markers, *Aspergillus niger* viral dsRNA, Mol. Wt. 2.76, 2.31, 2.24, 1.87, 1.70, 1.44×10^6 ; L2, Shanxi; L3, Qinghai; L4, Yantai; L5, Taian; L6, Jiangsu; L7 Heilongjiang; L8, Neimenggu; L9, Yanbei; L10, Zangjiakou Electrophoresis at 100 volts, for 9 hr in 4% gel.

Right, Schematic representation of dsRNA fragments of 9 strains of GgV.

病毒颗粒解离后经10%或13% SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳显示各菌株病毒都有一条到两条主要衣壳多肽和次要的多肽。多数病毒的衣壳多肽分子量为 $66 \times 10^3 - 73 \times 10^3$ (见表1)。烟台株病毒共有9个多肽片段,主要衣壳多肽为 67×10^3 , 72×10^3 (图2, L₁, L₁)。黑龙江菌株病毒除有分子量为 66×10^3 的衣壳多肽外,还有分子量为 115×10^3 的多肽(图2, L₆, L₁₁)。内蒙古菌株病毒有 18×10^3 的小的多肽(图2, L₈, L₉)。与 Mc Fadden(1983)等^[12]报告的欧州菌株病毒有 55, 68, 73, 78, 83, 88×10^3 的衣壳多肽有区别。

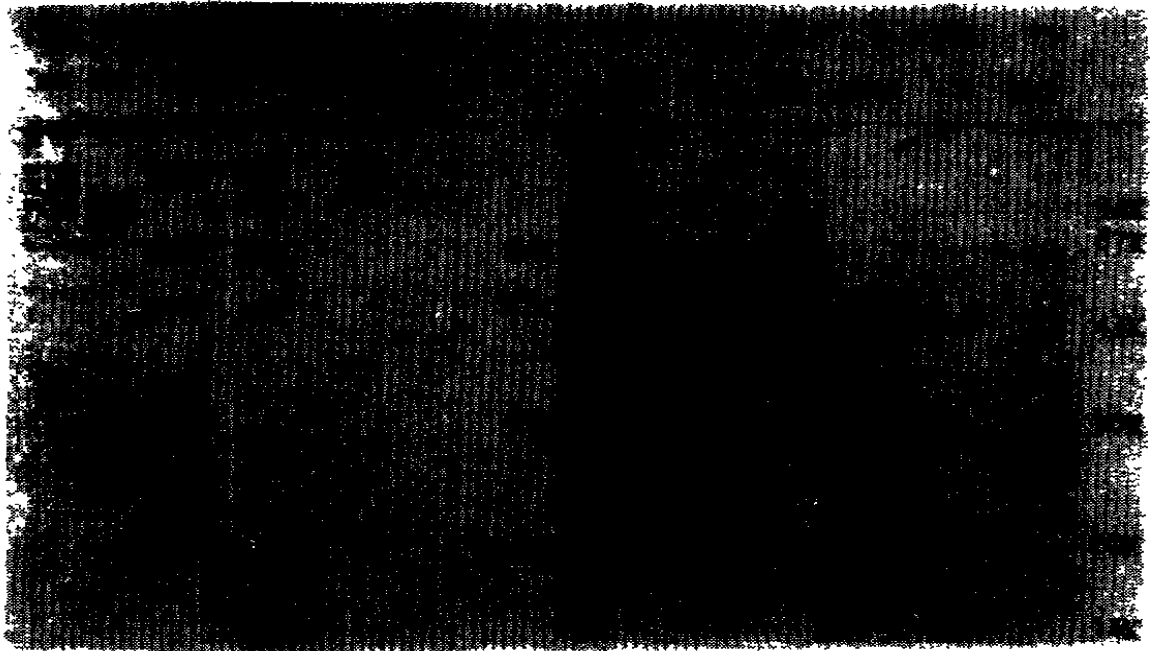


图2 不同地区小麦全蚀菌病毒多肽的PAGE带谱, SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶经可马亮蓝染色。1—5, 9—11为13%胶, 6—8为10%胶。1和4为烟台菌株多肽; 2和5为泰安菌株; 6和11为黑龙江菌株; 8和9为内蒙古菌株; 3, 7, 和10为分子量参照物。

Fig. 2. SDS-PAGE of viral capsid polypeptides from several strains of *G. graminis*. Electrophoresis ran at 100v in 13% gel (lanes 1—5, 9—11) and 10% gel (lanes 6—8). The gels were stained with coomassie Brilliant Blue. Lanes 1 and 4, polypeptides from GgV-Yantai; Lanes 2 and 5, polypeptides from GgV-Taian; Lanes 3, 7 and 10, markers; Lanes 6 and 11, polypeptides from GgV-Heilongjiang; Lanes 8 and 9, polypeptides from GgV-Neimonggu. The numbers are mol. Wt. of Markers.

2. 病毒抗血清与全蚀菌菌株间病毒的滴定度与其它真菌病毒的血清反应

选择病毒多肽带谱不同的泰安菌株和烟台菌株病毒分别制备抗血清, 以琼脂免疫双扩散技术测定了两菌株病毒抗血清与各菌株病毒的免疫反应及抗血清的滴定度。表2可见多数病毒与上述两菌株病毒的抗血清有反应, 但滴定度有差别, 只有张家口和青海菌株的病毒无反应。

以烟台菌株病毒抗血清和烟台与湖北两菌株的病毒作用时可见融合的免疫沉淀带和马刺, 其它如烟台和内蒙古两菌株病毒间, 也有此现象。

以烟台株病毒抗血清与黑曲霉病毒, 产黄青霉病毒, 美味侧耳病毒, 米曲霉病毒, 槲皮侧耳病毒作用无反应, 而泰安株病毒抗血清与美味侧耳病毒有弱反应, 与米曲霉病毒有反应(表2), 反之, 以上述真菌病毒如产黄青霉病毒, 黑曲霉病毒的抗血清与烟

表2 抗血清对不同来源的G₅V在免疫扩散中的滴定度
Table 2 Antiserum titres in gel diffusion tests with viruses of
C.graminis from different areas in China

抗血清 Antisera to	抗原 Antigen(Virus)	抗血清滴定度 Antiserum titre						
		1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
小麦全蚀病菌泰安菌株病毒								
<i>Gaeumannomyces graminis</i> Taian virus	<i>G.graminis</i> Taian	+	+	+	+	+	-	-
	<i>G.graminis</i> Yantai	+	+	+	+	+	+	+
	<i>G.graminis</i> Hebei	+	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Heilongjiang	+	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Neimenggu	+	-	-	-	-	-	-
	<i>G.Zhejiang graminis</i>	+	+	+	+	+	-	-
	<i>G.graminis</i> Zhangjiakou	-	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Yantai 3	+	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Qinghai	-	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Jiangsu	+	+	+	+	+	-	-
	<i>G.graminis</i> Yanbei	+	+	+	+	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Shanxi	+	+	+	+	-	-	-
	<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+	+	+	+	-	-
	<i>A.niger</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pleurotus sapidus</i>	+	-	-	-	-	-	-	
烟台菌株病毒								
<i>G.graminis</i> Yantai virus	<i>G.graminis</i> Yantai	+	+	+	+	+	-	-
	<i>G.graminis</i> Taian	+	+	+	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Hebei	+	+	+	+	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Heilongjiang	+	+	+	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Neimenggu	+	+	+	+	+	-	-
	<i>G.graminis</i> Zhejiang	+	+	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Zhangjiakou	-	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Yantai 3	+	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Qinghai	-	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Jiangsu	+	+	+	+	+	-	-
	<i>G.graminis</i> Yanbei	+	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Shanxi	+	+	+	+	-	-	-
	<i>A.oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A.niger</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Penicillium Chrysogenum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pleurotus sapidus</i>	-	-	-	-	-	-	-	
产黄青霉病毒								
<i>penicillium chrysogenum</i> virus	<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>G.graminis</i> Taian	-	-	-	-	-	-	-

抗血清 Antiserum to	抗原 Antigen (Virus)	抗血清滴定度 Antiserum titre							
米曲霉病毒 <i>Aspergillus oryzae</i> virus	<i>G.graminis</i> Yantai	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A.oryzae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>G.graminis</i> Taian	-	-	-	-	-	-	-	-
黑曲霉病毒 <i>Aspergillus niger</i> virus	<i>G.graminis</i> Yantai	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>A.niger</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Taian	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>G.graminis</i> Yantai	-	-	-	-	-	-	-	-

台、泰安等菌株的病毒反应时亦获得同样的结果。

3. 不同地理位置的小麦全蚀病菌 V-C 组的研究

不同地理位置的十三株小麦全蚀病菌的 V-C 组比较实验中出现三种情况：(一)相邻两菌落的菌丝间相互融合而无明显的界限(图3—4)。(二)相邻两菌落的菌丝细胞间可见一条狭窄的带。(三)相邻两菌落的菌丝细胞间出现一条或宽或窄的带围以黑色色素(图3—1,2)。V-C组测定结果13个菌株可分为10个V-C组(见表1)。

比较不同 V-C 组的病毒基因组和血清型时可见：(一)两菌株的病毒 dsRNA 都有分子量较大($2.76 \times 10^6 - 3.45 \times 10^6$)和分子量较小($1.0 \times 10^6 - 1.62 \times 10^6$)的片段，如泰安菌株和山西菌株病毒之间，泰安菌株和雁北菌株病毒之间，抗血清滴定度也较高(表1,表2)。(二)两菌株的病毒 dsRNA 都有分子量较小($1.0 \times 10^6 - 1.62 \times 10^6$)的片段，但一方缺少分子量较大的片段，如泰安菌株和黑龙江菌株病毒之间，抗血清滴定度较低，而山西菌株与烟台菌株病毒之间抗血清滴定度高。

比较同 V-C 组的病毒基因组如烟台菌株和江苏菌株病毒之间都有分子量较小的 dsRNA 片段($1.0 \times 10^6 - 1.62 \times 10^6$)，抗血清滴定度高，有分子量相同的衣壳多肽。



图3 小麦全蚀菌菌株在马铃薯蔗糖琼脂培养基上配对的反应类型。1—3，营养上不可亲和性菌落间形成的抗衡线，两菌落间有一条清晰带，两边有宽(1)或窄(2)的深色色素。4. 营养上可亲和菌落间无抗衡线，菌丝相互交融生长，无明显反应。

Fig 3 Types of reaction between paired strains observed on PDA (1—3). The formation of barriers between vegetative in compatible colonies. A clear zone containing few living hyphae bounded on each side by broad (1) or narrow (2) zone of intense black pigmentation; (4) no barrier occurred between vegetative compatible colonies, the hyphae of these two colonies grew among each other without any apparent interaction.

讨 论

小麦全蚀菌病毒和已知的其它真菌病毒相比, dsRNA 的片段, 数目和大小在不同菌株间有明显的差别(表1)。Buck^[13]曾将全蚀菌dsRNA病毒分为两个基本类型。第一类型为不分体的多顺反子 dsRNA 基因组, 分子量在 $3.0 \times 10^6 - 6.5 \times 10^6$ 之间, 其单片段 dsRNA 足以复制, 第二类型为分体基因组, 至少包含两个单顺反子的 dsRNA 片段, 各有分子量 $1.10 \times 10^6 - 2 \times 10^6$, 一个编码衣壳多肽, 另一个编码病毒RNA-依赖于RNA聚合酶。其它的 dsRNA 片段可能是卫星 dsRNA^[14], 缺陷病毒突变体的 dsRNA, 或类似动物病毒中所发现的缺陷干扰 RNA^[15], 泰安菌株中存在的 9 个 dsRNA 片段, 可能是两个或两个以上的病毒或分体基因组病毒感染所致, 其中 $< 1.0 \times 10^6$ 的 dsRNA 是否卫星 dsRNA 也需证明。存在的困难是病毒的沉降系数, 浮力密度很接近, 难以分开, 而且目前尚无可以信赖的侵染技术足以确定病毒复制所需要的基本组分数目。前景之一可否通过 PAGE 分离单一的 dsRNA 片段, 变性后释放正链 RNA 进行侵染, 如此体系得以建立将获得直接的证据。

经过研究的真菌病毒的多数并无共同的血清关系, 免疫双扩散常用于确定真菌病毒的抗血清滴定度和亲缘关系^[13]。小麦全蚀菌病毒与其它真菌病毒之间除个别外并无亲缘关系(表2)^[16]地理位置不同, V-C 组不同的小麦全蚀菌病毒之间有血清反应但抗血清滴定度不同, 沉淀线有马刺都表明有不同的抗原成份。其差别除存在混合病毒外, 是否还因病毒的抗原决定簇是由基因组的一小部分所编码, 少量基因的改变反应出抗原性的变化, 如存在病毒突变体或缺陷的病毒, 尚待研究。

Jami^[17]等利用分子杂交证明同一田间不同 V-C 组菌株间病毒基因组的同源性, 即分子量相近的 dsRNA 之间关系密切可能是相同的片段, 从而认为田间不同 V-C 组菌株间的病毒可以传递。我们从地理位置不同, V-C 组不同的菌株的病毒之间血清关系, dsRNA 片段大小的研究也得到类似结果, 如泰安和山西菌株之间, 泰安和雁北菌株之间都属不同 V-C 组, 但有相同的 dsRNA 和共同血清关系, 单从田间传递难以解释。不同地区的不同 V-C 组菌株间有共同 dsRNA 可能是全蚀病菌在长期进化过程中和病毒建立了紧密的关系的结果。

参 考 文 献

- (1) Lapiere, H. et al., 1970, *CR. Acade. Sci. Ser. D*, 271: 1833-1836
- (2) Lemaire, J. M. et al., 1970, *CR. Heb. Seances Acad. Agr. Fr.* 56: 1134-1136
- (3) Rawlinson, J. M. et al., 1973, *Ann. Appl. Biol.* 74: 197-209
- (4) Brigitte, L. et al., 1985, *J. Gen. Virol.* 66: 351-355
- (5) Nuss, D. L., 1987, Abstracts from VII International Congress of Virology August 9-14, 1987, Canada, R19, 5
- (6) Hunst, P. L. et al., 1986, *Phytopathology* 76(7): 674-678
- (7) 梁平彦 陈开英 1984, 植物病理学报 14(3): 159-164
- (8) 梁平彦等, 1987, 病毒学报 3(4): 360-375

- [9] King, J., Laemmli, U.K. 1971, *J. Mol. Biol.* **62**: 465—473
- [10] Hicks, R.G.T. and Hanghtoo, K.L. 1986, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **88** (4): 579—584
- [11] 马志亮等, 1984, *真菌学报* **3** (4): 249—250
- [12] Mc Fadden, J.J.P. et al., 1983, *J. Gen. Virol.* **54**: 927—937
- [13] Buck, K.W. et al., 1981, *J. Gen. Virol.* **53**: 235—245
- [14] Romanos, M.A. et al., 1981, *J. Gen. Virol.* **57**: 375
- [15] Buck, K.W. et al., Current problems in fungal virus taxonomy in: A critical appraisal of viral taxonomy, P. 140—171
- [16] 梁平彦, 陈开英 1986, *病毒学报* **2** (4): 351—359
- [17] Jimal N et al., 1984, *J. Gen. Virol.* **65**: 1741—1749

Properties of DsRNA Viruses from Different Strains of *Gaeumannomyces Graminis* in Different Vegetative Compatible Groups

Liang Ping-yan Chou Shu-min Chen Kai-ying

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

13 strains of *Gaeumannomyces graminis* in 10 different vegetative compatible groups (V-C group) had been collected from different areas in China and the virus particles ranging from 23—36 nm in diameter were obtained. Double stranded RNA from virus particles were detected by polyacrylamide gel electrophoresis and varied in components and molecular weight. The viral dsRNA from Taian strain consisted of nine components with molecular weight of 3.45, 2.95, 1.60, 1.52, 1.30, 1.25, 1.15, 1.00, $>1.00 \times 10^6$, while dsRNA from Zhejiang or Hubei strain contained only one component with mol. wt. of 3×10^6 . The major capsid polypeptide from these strains had mol. wt. of $63 \times 10^3 - 73 \times 10^3$.

Antiserum to GgV-Taian or Yantai strains reacted with *G. graminis* virus of all strains except Zhangjiakou or Yantai 3. The antiserum titres in gel diffusion test were determined.

Key Words: *Gaeumannomyces graminis* virus, Viral dsRNA component, Capsid polypeptide