

## 我国一些地区发生的小麦土传病毒病的病原研究\*

陈剑平 阮义理 董玛佳

(浙江省农业科学院病毒实验室, 杭州)

### 提 要

我国浙江、江苏、四川等省发生的小麦土传病毒病, 由禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)传播, 只感染小麦, 感病植株幼叶表现为退绿到黄化的条斑, 老叶表现为花叶和坏死。我们提纯各地分离物研究表明, 病毒粒子呈线状, 直径13~14nm, 长度为200~1800nm, 其中350~850nm的比例较高。病毒外壳由二种分子量分别约为30kd和27kd的结构蛋白组成。病毒粒子周围能均匀地“修饰”小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)抗血清和小麦黄花叶病毒(WYMV)抗血清, 反应均很强烈。鉴于上述特性, 认为本病害是由小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)引起的。

**关键词:** 小麦土传病毒病, 病原, 粒子长度, 外壳蛋白, 免疫电泳, 小麦梭条斑花叶病毒

自七十年代以来, 我国浙江、江苏、四川、河南、湖北等省陆续发生了一种由禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)传播的, 只感染小麦的病毒病。感病小麦幼叶表现为退绿到黄化的条状斑点, 老叶则表现为花叶或坏死, 病株不同程度矮化, 分蘖减少, 产量一般损失20~30%, 重者达70%, 甚至颗粒无收。播种后一个月土温5~13℃, 有利于发病。病毒粒子呈线状。以往对此病的病原说法不一, 有的说是小麦黄花叶病毒(WYMV), 有的说是小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)<sup>[1]</sup>, 也有的笼统说是土传小麦黄花叶病毒<sup>[2]</sup>, 因而迄今未能得到有效的控制。我们通过对本病的病毒粒子形态, 结构蛋白组成及血清学等三方面的研究, 结合有关生物学工作的结果<sup>[1,2,3]</sup>, 认为这种病害是由小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)引起的。

### 材 料 与 方 法

**一、毒源** 1985~1987年, 陆续从江苏、浙江、四川病区采集小麦病根, 托运至杭州本实验室无病水泥槽中, 种植各种感病小麦品种繁殖毒源, 建立病圃。1987年11月1日种植感病小麦品种, 1988年3月表现症状, 然后分别从各病圃中采集具有典型症状的病叶称重, -20℃冰冻贮存备用。

本文于1988年7月8日收到。

\*本工作得到浙江省自然科学基金委员会资助。

\*\*江苏省里下河地区农科所李志正, 浙江省安吉县农业技术推广中心陈亨康, 四川农业大学秦家忠帮助托运病根, 承蒙上海生化所龚祖焜教授热心指导, 我室陈声祥副研究员审定并修改文稿, 在此一并致谢!

**二、各病毒分离物的提纯** 取上述冰冻病叶, 绞碎, 加 3 倍量的 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液 pH7.0 (内含 0.1% 巯基乙醇, 0.01mol/L EDTA), 组织捣碎机匀浆, 尼龙纱布过滤后, 加 1/4 体积的四氯化碳, 振荡 5 分钟, 6,000r/m 离心 25 分钟, 弃沉淀, 上清加 6% 聚乙二醇 (分子量 6,000), 3% NaCl 和 1% Triton X-100, 冰浴中充分搅拌溶解后, 于 4℃ 冰箱中放置 6 小时, 10,000r/m 离心 20 分钟, 弃上清, 沉淀用 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液 pH7.0 (含 0.5mol/L 尿素, 0.1% 巯基乙醇, 0.01mol/L EDTA) 悬浮, 10,000r/m 离心 20 分钟, 沉淀用相同悬浮缓冲液以同样转速反复提取 3 次, 合并各次提取之上清液, 经 20% 蔗糖垫 (含 0.3% Triton X-100) 25,000r/m (Heraeus HF 45 转子) 离心 2 小时, 沉淀用同种悬浮缓冲液悬浮, 10,000r/m 离心 20 分钟, 重复 3 次, 合并上清, 上清再进行 10~40% 蔗糖密度梯度离心, 25,000r/m (Heraeus HS 60 转子) 离心 2.5 小时, 吸取离心管顶部 0.5~1.0cm 间的病毒层, 稀释后, 经 40,000r/m (Heraeus HF 75 转子) 浓缩离心 1 小时, 最后将沉淀悬浮于 2ml 0.1mol/L pH7.0 磷酸钾缓冲液, 获得病毒部分提纯制剂。用电镜和紫外分光光度计测定纯度。

**三、各病毒分离物电镜观察及粒子长度测定** 1. 病毒制剂: 用铺有 Formvar 膜的电镜铜网沾取病毒制剂, 吸干, 加 pH7.02% 磷钨酸 (PTA) 一滴, 负染 40 秒, 吸干, 待干燥后用 Opton EM-109 电镜观察, 并用图象分析仪随意测定 300 个病毒粒子的长度。

2. 浸出液: 取病叶一片, 剪碎, 加 0.5mol/L pH7.0 磷酸钾缓冲液 2ml, 在研钵中研磨, 滤去渣, 汁液加数滴四氯化碳, 摇动片刻, 5,000r/m 离心 2 分钟, 取上清液, 按上述方法电镜观察, 同样随意测定 300 个病毒粒子的长度。

**四、各病毒分离物的结构蛋白** 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定病毒结构蛋白及其分子量。浓缩胶 4.5%, 分离胶 12%, 电泳缓冲液 pH8.3 的甘氨酸-三羟甲基氨基甲烷缓冲液, 内含 0.1% SDS (W/V)。电流 20mA, 电泳时间 3 小时, 考马斯亮兰 R250 染色, 甲醇冰醋酸脱色。以上海东风试剂厂生产的低分子量标准蛋白为标样。

**五、免疫电镜 (ISEM)** 采用 Hill<sup>[5]</sup> 的方法, 稍经修改。WSSMV 抗血清和 WYMV 抗血清均由日本农林水产省九州农业试验站宇杉富雄博士赠送。

用具有 Formvar 膜的电镜铜网沾取经 0.06mol/L pH7.0 磷酸缓冲液 (ISEM 缓冲液) 稀释的病毒制剂, 用 20 滴 ISEM 缓冲液冲洗铜网, 吸干, 将铜网膜面朝下盖于一滴已稀释 25 倍的 WSSMV 抗血清上, 室温下孵育 15 分钟, 然后用 30 滴 ISEM 缓冲液冲洗, 6 滴 2% PTA 染色, 吸干, 待干燥后置电镜观察。

用 WYMV 抗血清代替 WSSMV 抗血清, 按同样步骤制备 ISEM 铜网, 并进行电镜观察。

## 结 果

### 一、各病毒分离物粒子长度分布

各病毒分离物粒子在电镜下, 外形相似, 呈线状 (图 1), 直径 13~14nm, 长度 200~1800nm, 不管是病毒制剂, 还是浸出液, 所测得的长度也均基本相同, 看不出前者因断裂而比后者短的趋势。在这个分布范围内, 各分离物均以 350~850nm 长度的粒子较多, 占供测总粒子数的 80% 以上, 没有观察到 2000nm 以上的粒子 (表 1, 图 2)。

### 二、各病毒分离物, 粒子结构蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

各分离物粒子聚丙烯酰胺凝胶电泳结果均显示二种结构蛋白, 6 次测验分子量各分离物分别约为 30Kd 和 27Kd (图 3)。由于这两种结构蛋白的分子量相近, 为了排除分



图 1 四川分离物病毒粒子电镜照片, 标尺500nm  
Fig 1 Electron microscopy photo of the virus isolate from Sechuan, Bar represents 500 nm

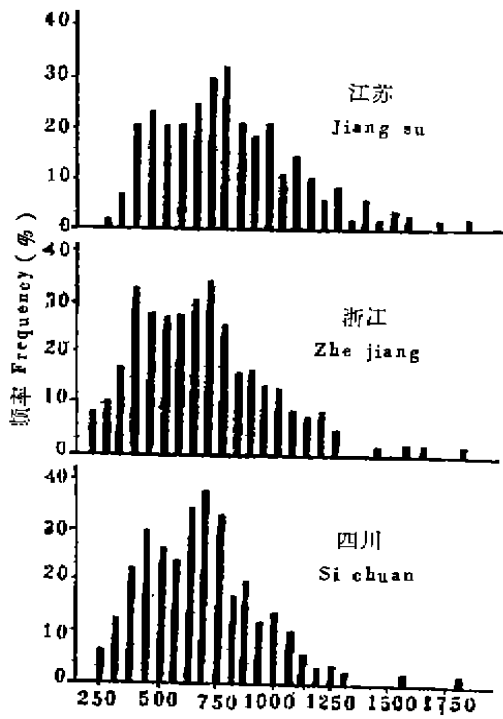


图 2 不同病区病毒粒子长度分布  
Fig.2 The particle length distributions of a wheat soil-borne virus isolates from different diseased areas in China

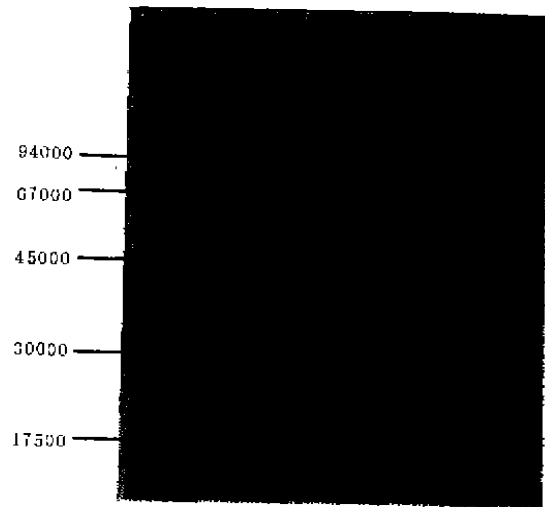


图 3 各病毒分离物结构蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳  
M: 标准蛋白; A: 江苏; B: 浙江; C: 四川病毒分离物。  
Fig.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified isolates of a wheat soil-borne viruses in China  
M: Protein standards; A: Jiangsu intact viron; B: Zhejiang intact viron; C: Sichuan intact viron

表 1 我国不同病区小麦土传病毒粒子长度  
Table 1 The particle lengths of a wheat soil-borne virus isolates from different diseased areas in China

	病毒分离物 Virus isolated from		
	江 苏 Jiangsu	浙 江 Zhejiang	四 川 Sichuan
病毒制剂 Virus preparations	250—1500*	200—1800	150—1750
病毒浸出液 Virus in leaf-dips	250—1700	250—1700	200—1500

\*单位: nm

子量较低结构蛋白是分子量较高结构蛋白的降解产物的可能性, 另在病毒样品进行 SDS 样品缓冲液处理前, 置于 37°C 温箱保温 1 小时以促使进一步降解, 然后再和未保温处理的同种样品一起电泳, 结果两者仍显示同样的结构蛋白和分子量, 表明各病毒分离物粒子的确均具有二种相同的结构蛋白。

### 三、各病毒分离物与 WSSMV 和 WYMV 抗血清的免疫电镜试验

用 WSSMV 和 WYMV 的抗血清分别与各病毒分离物进行“修饰”法免疫电镜试验, 在电镜视野中, 均可看到大量清晰的, 具有抗血清外套“修饰”的病毒粒子, 反应均很强烈, 说明各病毒分离物与 WSSMV 和 WYMV 均有着紧密的血清学关系。图 4 是此二种抗血清对病毒江苏分离物的“修饰”情况。

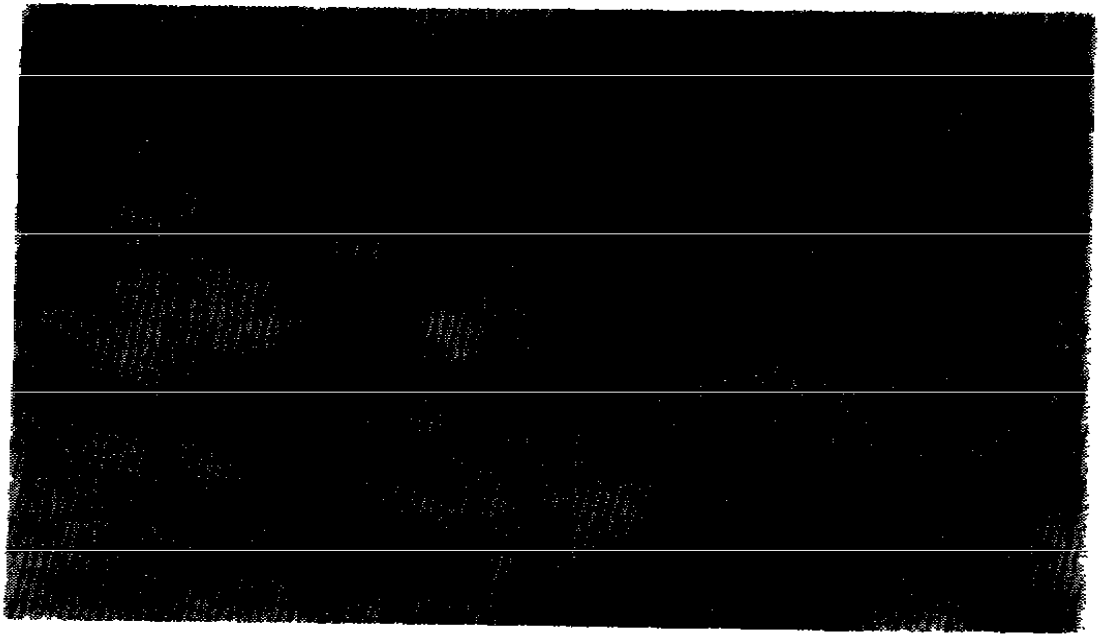


图 4 二种抗血清对病毒江苏分离物的“修饰”情况  
(a)WSSMV 抗血清; (b)WYMV 抗血清

Fig.4 Decorations of the virus isolate from Jiangsu with  
(a) antisera to WSSMV; (b) antisera to WYMV

## 讨 论

由禾谷多粘菌 (*Polymyxa graminis*) 传播的麦类病毒, 已知的大麦黄花叶病毒 (BaYMV), 小麦黄花叶病毒 (WYMV), 小麦梭条斑花叶病毒 (WSSMV), 燕麦花叶病毒 (OMV) 和土传小麦花叶病毒 (SBWMV) 5 种, 其中前 4 种为线状病毒, 暂定为马铃薯 Y 病毒组的可能成员, SBWMV 是一种杆状病毒, 属真菌传棒状病毒 (*Furovirus*) 组。BaYMV 只感染大麦, 不感染小麦; OMV 只感染燕麦, 也不感染小麦, 所以, 在上述 4 种线状病毒中, 只感染小麦的是 WYMV 和 WSSMV, 而这 2 种病毒无论在症状, 传播途径, 发病规律, 还是内含体, 血清学性质等均具有相似性, 迄今仅在病毒粒子长度分布和结构蛋白上有些差异。

WYMV 粒子长度主要分布在 200~300nm 和 500~600nm 范围内, 800nm 以上的粒子很少<sup>[6]</sup>, 病毒粒子只有一种结构蛋白, 分子量为 33kd<sup>[6]</sup>。WSSMV 粒子长度为 190~1975nm, 也检测过 2000nm 以上的粒子<sup>[7]</sup>, 病毒粒子有二种结构蛋白, 分子量分别为 33kd 和 26.5kd。<sup>[8]</sup>

对各地病毒分离物的电镜观察结果看, 无论是病毒制剂, 还是浸出液, 长度都在 200~1800nm 之间, 与 WSSMV 相近, 而与 WYMV 不同。再则, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明, 各地病毒分离物粒子的外壳蛋白均由分子量分别约为 30kd 和 27kd 的二种结构蛋白组成, 这点又与 WSSMV 相似, 差异在允许误差范围, 而与 WYMV 则明显不同。

免疫电镜试验表明, 各地病毒分离物都能与 WSSMV 和 WYMV 抗血清发生强烈的血清学反应, 在病毒粒子上都能观察到由抗血清“修饰”而成的外套, 这点也与 Usugi<sup>[8]</sup>报道的 WSSMV 性质类似。

上述的实验结果提示, 我国一些地区发生的小麦土传病毒病是由小麦梭条斑花叶病毒 (WSSMV) 引起的, 至于各地病毒分离物是否存在不同株系, 还需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- (1) 侯庆树等, 1985, 江苏农业学报, 1(3): 25-28
- (2) 侯明生等, 1986, 华中农业大学学报, 5(4): 332-338
- (3) 吴素琴等, 1985, 植物病理学报, 15(1): 58-59
- (4) Stephen A Hill, 1984, Methods in plant virology, Blackwell Scientific Publications, p150-153
- (5) Usugi T., 1976, Ann.Phytopath.Soc.Jpn., 42: 12-20
- (6) Usugi T., et al, 1987, Abstracts of papers given at a meeting on viruses with fungal vectors, p29
- (7) Slykuis J.T. et al., 1976, C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses, No.167
- (8) Usugi T., et al, 1979, Ann.Phytopath.Soc.Jpn., 45: 397-400

## Study on the Pathogen of a Wheat Soil-borne Virus Disease in China

Chen Jian-ping, Ruan Yi-li, Dong Ma-jia

(Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou)

A soil-borne virus disease on wheat occurred in Zhejiang, Jiangsu and Sichuan provinces in China was transmitted by *Polymyxa graminis*, and its only known host is wheat (*Triticum aestivum*), most wheat cultivars can be infected by growing in infective soil with chlorotic to necrosis spindle shaped streak in the leaves. Studies on virus isolates from different diseased areas showed that virus particles is filamentous, with measurements ranging from 200—1800×13—14 nm, mostly 350—850×13—14 nm, in leaf-dip or purified preparations. Coat proteins of all virus isolates electrophoresised in SDS-polyacrylamide gel migrated as two bands with molecular weight of 30 and 27 KD respectively. The virions decorated strongly with antiserum against to WSSMV isolate and to Japanese WYMV isolate were observed on screen by Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM). On the basis of these properties, we consider that the pathogen of the disease is wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV).

**Key words:** Wheat soil-borne virus disease, Pathogen, Particle length, Coat protein, Immunosorbent electron microscopy (ISEM), Wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV)