

## 小麦黄矮病毒(BYDV)主流 株系GPV的鉴定及其提纯研究

张秦风 赵玉侠 张 荣 金欣藻

(陕西省植物保护研究所, 杨陵 712100)

### 提 要

经测试结果, 小麦黄矮病毒(BYDV)主流株系为麦二岔蚜禾谷缢蚜株系(GPV), 普遍分布于我国北方中熟冬麦区、晚熟冬麦区和春麦区; 以麦二岔蚜的传播能力最强。由麦二岔蚜优势介体所传播的主流株系GPV, 曾导致该病多次大面积流行成灾。并对GPV株系毒源进行了提纯; 对其提纯方法有所改进和简化。

**关键词:** 小麦 株系 鉴定 提纯

由大麦黄矮病毒(BYDV)引起的小麦黄矮病, 是我国北方麦区的主要病毒病。罗桥和吉尔等对大麦黄矮病毒病的株系和提纯进行了研究<sup>[8,4,5]</sup>; 陈卓敏和张鹤龄报道了我国小麦黄矮病毒与侵染莠麦的大麦黄矮病的提纯研究<sup>[1,2]</sup>。了解小麦黄矮病毒的主要株系组成及其分布, 对于明确该病的发生流行规律和选用抗耐病品种具有重要意义。我们从1976年以来对小麦黄矮病毒株系进行了鉴定分析, 并对其主流株系麦二岔蚜禾谷缢蚜株系(GPV), 参考陈卓敏和张鹤龄报道的方法, 加以改进, 并进行了提纯研究。

本文报道小麦黄矮病毒主流株系GPV的鉴定及其提纯研究结果。

## 材料及方法

### 一、株系鉴定

1. **毒源标样** 采自陕西延安、榆林、富平、大荔、澄城、蒲城、渭南、长武、乾县、武功、杨陵、扶风、岐山、凤翔、陇县、眉县、周至、太白和汉中、甘肃甘谷、镇原, 山西临汾、太原和太原, 河南郑州和内蒙高原等26个县(市、区)的麦田, 共采集毒源标样119份, 移植于防虫室内, 隔离保纯备用。

2. **田间介体蚜虫种类** 麦二岔蚜、禾谷缢蚜、麦长管蚜和玉米缢蚜均采自杨陵麦田, 麦无网蚜采自太白或甘谷麦田。

3. **鉴定寄主** 莠麦坝选1号或华北2号。

4. **无毒蚜的分离繁殖** 在防虫无毒的室内, 挑取初产的若蚜转接到无病的麦苗上, 扩大繁殖成无毒的蚜群。

本文1980年5月22日收到。

本文承蒙田波研究员审阅, 特致谢意。

5. **鉴定方法** 以麦二岔蚜[*Schizaphis graminum*(Rondani)], 简称(SG), 麦长管蚜[*Macrosiphum avenae*(Fabricius)], 简称(MA), 禾谷缢蚜[*Rhopalosiphum padi*(Linnaeus)]简称(RP), 麦无网蚜[*Acyrtosiphum dirhodum*(Walker)]简称(AD), 玉米缢蚜[*Rhopalosiphum maidis*(Fitch)]简称(RM), 为一套甄别介体蚜虫种类, 于防虫室内对每份毒源标样进行初次接种传毒测试, 并对每种蚜虫传毒发病的毒源, 如此重复进行传毒测试, 直到重复发病达到一致为止。

根据不同种类介体蚜虫的传毒力专化性划分株系。

6. **传毒方式** 以无毒蚜取食毒源获毒2天, 转接取食鉴定寄主传毒2~5天。每苗于2叶期接种蚜虫2~10头。发病终止后调查发病株率。并用GPV株系的抗血清进行常规免疫电泳, 检测GPV株系。

## 二、病毒提纯

1. **毒源增殖** 于防虫温室培育感病寄主岸黑燕麦, 2叶期常规接种GPV株系毒源, 发病始期采集病株, 洗净剪碎装塑料袋, 置-30℃低温冰箱保藏备用。

2. **提纯程序** 病叶毒源片段按1:2(W/V)加0.5mol/L的PB(pH6.0), 内含0.25%菟基乙醇匀浆, 双层纱布过滤, 滤渣置-30℃冰箱冰冻过夜, 用石臼迅速充分捣烂, 再滤出滤汁; 两次过滤汁合并, 加0.8%(W/V)的崩潰酶, 搅拌机搅拌混匀作用2小时, 置-20℃低温冰箱过夜; 冰冻滤汁块快速解冻捣碎, 双层尼龙布滤出滤汁, 按2:1(V/V)加三氯甲烷、正丁醇(2:1)和0.2mol/L NaCl, 静置作用30分钟, 4000r/m离心30分钟; 取上清液加7%的PEG和0.2mol/L的NaCl, 搅拌1.5~2小时, 10,000r/m离心20分钟; 取沉淀用0.1mol/L的PB(pH6.0)液回溶, 置4℃冰箱过夜, 反复充分溶解的回溶液8,000r/m离心15分钟; 取上清液再加6%的PEG, 10,000r/m离心20分钟; 取沉淀加0.1mol/L PB液回溶后, 40,000r/m超速离心4小时; 取沉淀回溶后, 8,000r/m离心15分钟加以沉淀, 上清液为提纯病毒。

3. **紫外吸收光谱测定** 以日本UVIKON810型紫外分光光度计在200~320毫微米范围进行扫描。

4. **电镜观察** 以预先喷碳铺布火棉胶膜制备的铜网, 复粘病毒液滴, 稍干, 加2%的磷钨酸钠溶液(pH6.0)负染3~4分钟, 在JEM-100XII透射电镜下观测。

5. **薄膜饲毒回接测试** 用并口直径为2.5厘米的塑料瓶, 瓶壁等距开3个贴尼龙纱的气孔, 瓶口紧缠一层拉薄的“Parafilm”膜, 加病毒液少许, 于支撑架上再松缠一层此膜, 瓶内投入无毒蚜。取食获毒48小时后, 常规转接传毒。

## 结 果

### 一、GPV株系鉴定

1. **GPV株系甄别的特征** 禾谷缢蚜传播而麦无网蚜不传播, 为质量鉴别特征; 麦二岔蚜传播能力最强, 麦长管蚜亦能传播, 玉米缢蚜有时传播, 说明为非专化性株系。

2. **GPV株系所占比率** 根据1976~1980、1981和1988~1989年陆续于三个阶段鉴定结果(表1), 说明均以GPV株系在小麦黄矮病毒主要株系组成中占绝对优势, 为主流株系。

3. **GPV株系的分布** 列入表2, 由表2说明GPV株系广泛分布于陕西关中、陕北和陕南, 甘肃陇南、陇东、山西晋南、晋中和雁北, 河南予中, 宁夏河套和内蒙古高原等

表1 GPV占小麦黄矮病毒株系组成的比率  
Table 1 Rate of GPV in the total composition of the  
Wheat Yellow Dwarf Virus strains

鉴定年份	鉴定标样数	GPV标样数	%
1976~1980	66	51	77.30
1981	27	16	59.00
1988~1989	26	5	16.92

中熟冬麦区、晚熟冬麦区和春麦区。分布最广。

表2 GPV株系历年地理分布  
Table 2 Geographical distribution of GPV  
strain in the past years

鉴定年份	陕 西	甘 肃	山 西	河 南	内 蒙	夏 宁
1976~1980	关中 陕 北 陕 南	渭北	陇 南	晋 中 雁 北	予 中	
1981	关中 陕 南	渭北	陇 南	晋 南 晋 中 雁 北	高 原	河 套
1988~1989	关中 陕 北 郑 南	渭北	陇 东	晋 中 雁 北		

根据GPV株系的比率和分布属于主流株系。并经实际检验小麦黄矮病1978和1980年的两次大面积流行成灾，即由GPV株系所导致<sup>(6)</sup>。

4. 不同介体蚜虫的传毒力 1976~1980和1981年测试结果，对GPV株系均以麦二岔蚜的传毒力最强，而1988~1989年则以禾谷缢蚜的传播能力最强(表3)。后者则是由于禾谷缢蚜对小麦黄矮病传播能力提高的结果<sup>(7)</sup>。

说明麦二岔蚜为小麦黄矮病的优势传播介体，至于禾谷缢蚜的传毒力，有待于进一步研究。

表3 不同介体蚜虫传播GPV的能力  
Table 3 Potential of transmissibility of GPV  
for different vector aphids

鉴定年份	介体蚜虫种类				
	SG	RP	MA	AD	RM
1976~1980	55.3	18.5	4.1	0.0	0.0
1981	55.2	11.1	6.0	0.0	5.9
1988~1989	29.7	77.0	20.3	0.0	6.4

二、病毒提纯 1987~1989年对小麦黄矮病毒主流株系GPV毒源重复进行了3次提纯, 效果一致。

1. 紫外吸收光谱测定 将差速离心提纯的病毒悬浮液经紫外扫描(图1), 紫外最大吸收峰在260nm处, 最小吸收峰在240nm处,  $A_{260}/A_{280} = 1.40$ 。

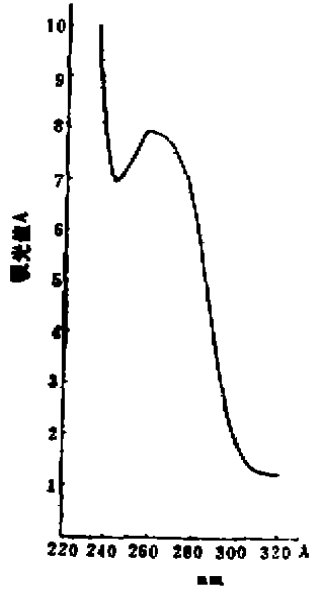


图1 小麦黄矮病毒GPV株系紫外吸收图谱  
Fig 1 Absorption spectrogram of 2 principal strains of BYDV infected wheat

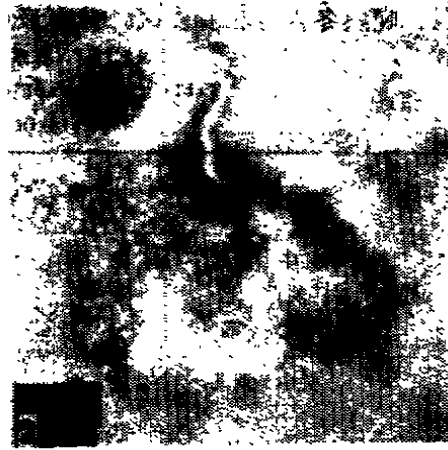


图2 BYDV粒体电镜照片  
Fig 2 Electron micrograph of BYDV particles

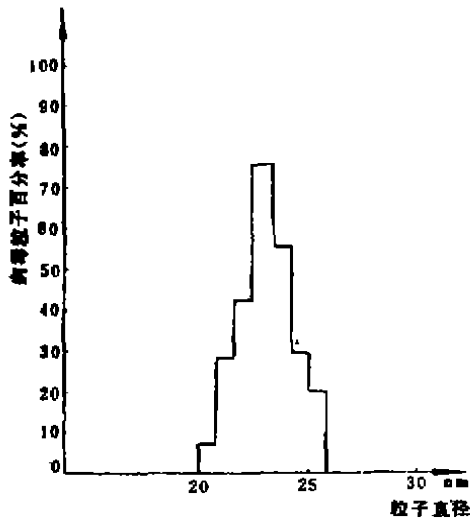


图3 小麦黄矮病毒粒体直径频率分布  
Fig 3 Particle diameter distribution of BYDV infected wheat

2. 电镜观察 电镜观察3次的提纯病毒, 均易见到很多病毒粒体, 一张照片约有120多个粒体(图2), 陈卓敏报道的仅50~60个粒体<sup>[1]</sup>, 而且大小一致, 测量260个病毒粒体, 直径范围在20.5~25.9nm之间, 其中以直径22.4nm的为主, 占75%(图3), 高倍电镜和病毒电镜照片光学放大镜下, 病毒粒体结构完整, 亚基清晰(图4)。

3. 回接发病 以无毒麦二岔蚜经薄膜饲毒获毒, 常规接种无病莜麦坝选1号幼苗20株, 15株发病, 发病率达75.0%, 接种无毒麦二岔蚜20株, 均不发病。

将其回接发病的病株毒源, 用GPV株系抗血清进行免疫电泳检测结果, 能形成强阳性沉淀线。



图4 病毒粒体形态(100nm)

Fig 4 Morphology of granular bodies of BYDV

## 讨 论

我国小麦黄矮病毒的主流株系为麦二叉蚜禾谷缢蚜株系(GPV),相应的优势传播介体蚜虫为麦二岔蚜,与国外报道的大麦黄矮病毒(BYDV)的主流株系及其优势介体蚜虫种类均不同<sup>[8]</sup>。这是由我国北方麦区小麦及其小麦黄矮病的生态系统特异性所决定的<sup>[8]</sup>。该病曾于1966、1970、1973、1978和1980年大面积流行危害,均在于麦二岔蚜的猖獗发生,主要传播GPV株系,并且远距离迁飞扩散的结果。

小麦黄矮病毒株系鉴定指标,采用质量差异。麦二岔蚜禾谷缢蚜株系(GPV)的甄别特征,为禾谷缢谷传播而麦无网蚜不传播,不仅易于鉴别,而且极其稳定。

对小麦黄矮病毒主流株系GPV,重复提纯效果良好。我们认为提纯的关键性改进技术是:以高感繁殖寄主岸黑燕麦幼苗增殖毒源,而且于发病始期采收病株,病毒含量提高;病株组织材料幼嫩,加之石臼人工彻底捣碎冰冻滤渣,使组织细胞裂解、释放病毒充分;陆续两次加PEG聚合病毒后,仅1次差速离心,即可达到病毒提纯。

## 参 考 文 献

- [1] 成卓敏, 1983, 植物保护学报 10: 241—244.
- [2] 张鹤龄等, 1985, 病毒学报 1: 60—63.
- [3] Rechow, W.F., 1969, *Phytopathology* 59: 1580—1589.
- [4] Gill, C.C., 1969, *Phytopathology* 57: 715—718.
- [5] Rechow, W.F., et al., 1971, *Virology* 46: 117—126.
- [6] 张素凤等, 1981, 陕西农业科学 6: 13—14.
- [7] 张素凤等, 1989, 麦类作物 2: 46—48.
- [8] 张素凤等, 1984, 植物保护 2: 6—7.

## Identification and Purification of a Principal Strain of Wheat Yellow Dwarf Virus(BYDV)

Zhang Qin-feng Zhao Yu-xia Zhang Yun Jin Xin-zao

(Institute of Plant Protection, Yanglin712100)

The principal strain of BYDV, as certified, is the *Schizaphis graminum* et *Rhopalosiphum padi* strain which is widely distributed at the northern mid-harvest, late harvest winter wheat and spring wheat growing areas in China. While it was specifically transmitted by the prominent vector insect *Schizaphis graminum*, several areawide prevalence and damage accidents have occurred during the previous years. We have purified the samples of GPV strain, and improved and simplified the procedure of purification.

**Key words,** wheat Strain Identification Purification