

## 我国水稻条纹叶枯病病原性质的研究

刘力 陈声祥 陈光培

(浙江农科院病毒室, 杭州, 310021)

洪益国 王小凤 裴美云 田波

(中国科学院微生物所病毒室, 北京, 100080)

洪 健

(浙江农业大学电镜室, 杭州, 310029)

### 提 要

病样经提纯后, 在电镜下获得 3 nm 丝状和 8 nm 分枝丝状结构, 病毒样在蔗糖密度梯度离心后产生三条沉降带。经过电泳分析表明: 病毒外壳蛋白为单一组分, 分子量为  $3.69 \times 10^4$  dalton; 病毒核酸有三种大小不同的组分, 分子量为 0.9, 1.0,  $1.4 \times 10^6$  dalton (混合样)。用提纯的抗原制备抗血清。提纯病毒抗原与所制备抗血清、与我国过去研究制备的抗血清及与日本制备的条纹叶枯病单克隆抗体都有血清学反应。

**关键词:** 水稻条纹叶枯病毒 病毒核糖核酸 血清反应

条纹叶枯病是水稻上重要的病毒病。1975年前认为此病毒为球状病毒。小金沢 (1975, 1977) 研究提出本病毒为分枝丝状体<sup>[1,2]</sup>, 以后 Toriyama (1982a, 1982b) 研究了病毒的组分、蛋白质与核酸的组分、分子量等性质<sup>[3,4]</sup>以此病毒为基础, 陆续鉴定出另外几个过去认为是球状病毒的病原也是丝状体病毒, 由此建立了一个新的病毒类群——水稻条纹叶枯病毒组 (柔丝病毒组)<sup>[5]</sup>。

我国从60年代在江浙发现水稻条纹叶枯病<sup>[4]</sup>以来, 该病害陆续在浙江、江苏、云南、北京、辽宁及山东等地流行, 造成生产上严重损失。在研究此病害中, 过去重点放在病原的生物学鉴定、病害的流行及防治等方面, 对病原本身的形态研究不多, 理化性质更未涉及。虽然也制备了抗血清<sup>[7]</sup>, 但未与日本条纹叶枯病毒进行血清学比较。这些现象造成对我国条纹叶枯病的病原性质发生了争议, 进而认为我国不存在条纹叶枯病毒, 甚至我国的条纹叶枯病并不是由病毒为病原所致<sup>[8]</sup>。为了确证我国条纹叶枯病的性质, 1987—1988年对病原本身进行了系统的研究。现将结果报道如下。

### 材料与方 法

一、毒源: 采于山东省济宁市郊区重病田, 置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

二、病毒提纯: 参照 Toriyama (1982a) 的方法<sup>[3]</sup>稍作改变。病材料加 $0.1\text{mol/L}$  pH7.2磷酸钠

本文1989年8月4日收到。本研究得到农业部及浙江省科委经费资助。

钾缓冲液(内含0.01mol/L DIECA及0.5%巯基乙醇),捣碎后四层纱布过滤,滤液加1/3体积冷氯仿处理10分钟。水相经低速离心加8%PEG及0.1mol NaCl,置于冰浴中2小时后,以52000g离心1小时收集沉淀,加0.01mol/L pH7.5 磷酸钠钾缓冲液悬浮,经123000g离心2小时,悬浮后加30%饱和度硫酸铵,溶解后低速离心5分钟,上清液稀释4倍再离心2小时(123000g)得沉淀。悬浮沉淀,经10—40%蔗糖梯度离心4小时(68,900g),以密度梯度分离器(ISCO)检测病毒组分。病毒带混合或分别收集,经123,000g离心2小时后悬浮沉淀得混合样或分离样。

三、形态观察:提纯样品负染后作电镜观察,染液为钨酸铵、醋酸铀及磷钨酸。

四、外壳蛋白组分及分子量:采用SDS-PAGE(7.5%—13%)不连续系统。以牛血清白蛋白(Sigma, MW66,000)、卵清蛋白(Sigma, MW45,000)、溶菌酶(Sigma, MW14,300)、TMV外壳蛋白(自提, 17,500)为标准蛋白质。

五、核酸组分及分子量:采用复合胶系统,胶板浓度2.4%PAG+1%琼脂糖或2.0%PAG+0.5%琼脂糖<sup>[10]</sup>。病毒经SDS裂解后直接电泳或核酸提纯后电泳或再经乙二醛和二甲基亚砷变性后电泳。核酸提纯参照Brawerman等(1972)的方法<sup>[10]</sup>,核酸变性采用McMaster等(1977)的方法<sup>[10]</sup>。

六、血清学制备及比较:以提纯病毒作抗原。第一次完全佐剂处理后肌肉注射,一周后不完全佐剂处理肌肉注射,第三周耳静脉加强免疫注射2次,第4周采血。

以陈光培制备的浙江RSV普通抗体<sup>[7]</sup>及Omura制备的日本RSV单克隆抗体<sup>[11]</sup>检测比较。

## 结 果

### 一、病毒的纯化及组分。

经过提纯的病毒样具有典型的核蛋白吸收曲线,最大吸收峰260nm,最小吸收峰245—246nm, OD 260 : OD 280 = 1.38—1.42, 而健稻经过相同程序的提取液则没有吸收

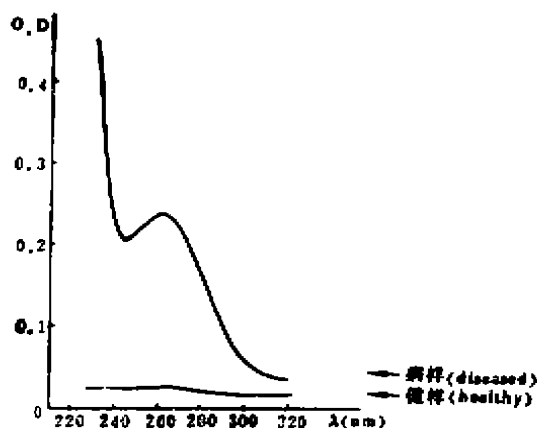


图 1 提纯病毒的紫外吸收曲线

Fig. 1 UV absorbance of purified virus

峰(图1)。经密度梯度分离器检测,病毒样在蔗糖梯度离心后产生三条沉降带。电镜观察各沉降带均为病毒粒体。

### 二、病毒的形态结构:

以钨酸铵、醋酸铀或磷钨酸负染, 结果用 2% 磷钨酸 (pH6.8) 染色效果较好。在电镜下病毒粒体呈 3nm 直径的丝状结构和 8nm 直径的分枝丝状结构。用同样方法得到的健康稻样则没有类似粒子出现 (图 2)。不同沉降带中病毒结构没有显著差异。

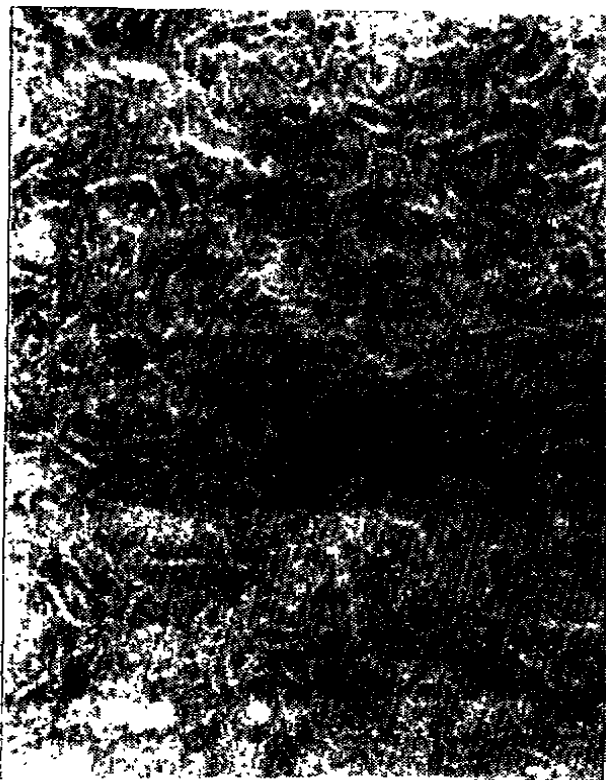


图 2 提纯病毒的电镜照片 ( $\times 146000$ )  
Fig. 2 Electron micrograph of purified virus ( $\times 146000$ )

### 三、病毒外壳蛋白:

提纯病毒经 SDS 裂解液处理后电泳, 得到单一电泳谱带, 其分子量为  $36,900 \pm 500$  dalton (图 3)。

### 四、病毒核酸组分及分子量:

病毒核酸提纯后, 最大紫外吸收峰 256nm, 最小吸收峰 227—228nm,  $OD_{260} : OD_{280} = 2.697 - 2.908$ ;  $OD_{280} : OD_{260} = 0.344 - 0.371$ ;  $OD_{230} : OD_{260} = 0.472 - 0.473$ 。

用提纯病毒混合样作核酸电泳分析, 不管是以裂解液处理病毒后直接电泳还是提纯的核酸电泳, 在乙二醛和二甲基亚砷处理变性后电泳或核酸不变性条件下电泳, 均得到三条稳定的核酸谱带, 分子量分别为  $0.9$ 、 $1.0$  和  $1.4 \times 10^6$  dalton (图 4)。

### 五、血清学制备及比较:

经过二次肌肉注射和二次静脉注射后, 得到了条纹叶枯病毒抗血清。此抗血清与病稻的提取液有血清学反应, 与健康稻提取液没有反应。试管沉淀效价  $80 \times$ 。

为比较现在所研究的山东发生的条纹叶枯病毒与我国过去研究的此病原的一致性

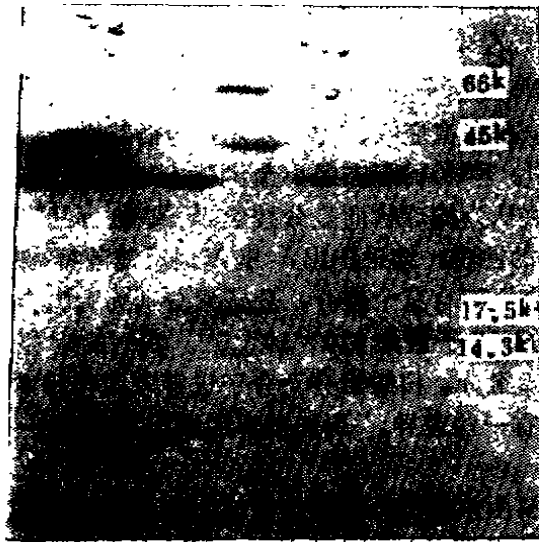


图 3 病毒蛋白质电泳图谱  
中间为标准蛋白质。

Fig. 3 Electrophoretic pattern of the virus protein  
Lane 4: markers

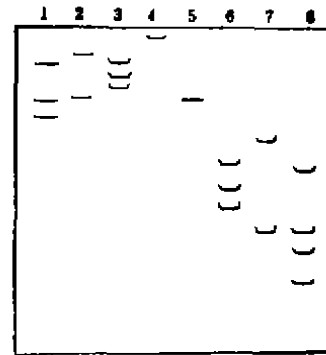


图 4 病毒核酸电泳图谱

Fig. 4 Electrophoretic patterns of the virus RNA

1—4, 乙二醛变性 Denatured with glyoxal and DMSO

5—8, 不变性 without denaturation  
3, 6, RSV

1, 8, 烟叶 RNA ( $\times 10^{-6}$ ), 1, 3, 1, 1, 0, 7, 0, 5

2, 7, 兔肝 rRNA ( $\times 10^{-8}$ ), 1, 74, 0, 68

4, 5, TMV RNA ( $\times 10^{-8}$ ), 3, 0

我国条纹叶枯病毒与日本条纹叶枯病毒的相关性，用提纯抗原与陈光培1984年发表的浙江 RSV 普通抗体和 Omura 等1986年发表的日本 RSV 单克隆抗体进行了血清学反应，结果证明我国长期流行的 RSV 与现在山东的 RSV 及与日本的 RSV 有相同的血清关系（表 1）。

表 1 提纯病毒与几种 RSV 抗血清（抗体）的试管沉淀反应

Table 1 Tube precipitation of purified virus and antiserum (antibody) of virus from different sources

抗体稀释倍数 Reciprocal dilution of antibody	10	20	40	80	160	320	640
与新制山东 RSV 抗血清反应 With Ab of RSV from Shandong province	+++	++	++	+	±	-	-
与浙江 RSV 抗血清反应 With Ab of RSV from Zhejiang province	+++	++	++	+	±	-	-
与日本 RSV 单抗反应 With McAb of RSV from Japan	+++	++	++	+	±	-	-

## 讨 论

我国自1964年报道发现条纹叶枯病以来,在病害症状、传播介体及传播特性等方面做了许多研究,结果均与日本的RSV性质相似。RSV的形态经小金沢等(1975-1977)的电镜观察及人工接种试验证实,并不是过去认为的球状而是分枝丝状或丝状<sup>[1,2]</sup>。Toriyama(1982a、b)深入研究了病毒粒体的性质,结果指出,病毒经反复蔗糖梯度离心后可以得到三个沉降带。病毒核酸在混合样下有三个组分,分子量分别为0.9、1.0和 $1.4 \times 10^6$  dalton。病毒外壳蛋白为单一组分,分子量为 $3.2 \times 10^4$ <sup>[3,4]</sup>。我们的结果表明,我国条纹叶枯病病毒在形态结构和蛋白质组分、核酸组分及分子量等方面与日本的RSV性质是一致的,只有外壳蛋白的分子量有一些差异。引起差异的原因有待进一步探讨。

血清学比较的结果显示,我们研究的材料山东条纹叶枯病毒与我国过去研究的浙江的RSV血清学性质相同,也与日本RSV具有共同的抗原决定簇,血清学性质一致。

从病原形态特征、外壳蛋白质与核酸组分及分子量、血清学关系上,我们进一步证实了我国条纹叶枯病的病原。邱德文等(1988)研究水稻“条纹叶枯病”时,既未发现分枝丝状体,病株汁液和提纯液也不与日本的RSV抗血清起反应,从而认为我国并不存在条纹叶枯病毒<sup>[5]</sup>。我们认为,二种结果的差异可能是取样或试验方法上的不一致造成的。

## 参 考 文 献

- [1] 小金沢硕城等, 1975, 日植病报41: 148.
- [2] Koganezawa, H., 1977, In Symposium on Virus Diseases of Tropical Crops, Tropical Agriculture Research Series No. 10: 151. Tropical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture and Forestry, Yatabe-cho, Tsukuba-gun, Ibaragi-Ken, Japan.
- [3] Toriyama, S., 1982a, *J. Gen. Virol.* 61: 187.
- [4] Toriyama, S., 1982b, *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 48: 482.
- [5] Toriyama, S., 1986, *Microbiol. Sci.* 3: 347.
- [6] 朱凤美等, 1964, 植物保护2: 100
- [7] 陈光培, 1984, 植物保护学报11: 73.
- [8] 邱德文等, 1988, 植物病理学报18: 93.
- [9] Jackson, A.O. et al., 1973, *Virology* 55: 483.
- [10] Maniatis, T. et al. (ed.), 1982, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 200, 458. Cold Spring Harbor Laboratory.
- [11] Omura, T. et al., 1986, *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52: 270

## Studies on the Virus of Rice Stripe Disease in China

Liu Li Chen Sheng-xiang Chen Guang-yu

(Inst. Virol., Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou. 310021)

Hong Yi-guo Wang Xiao-feng Pei Mei-yun Tien Po

(Dept. Virol., Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Hong Jian

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Rice stripe disease caused severe damage in China. In the past studies, the emphases were limited in the biological identification, epidemics and control methods, so it is still argued whether the disease is caused by RSV or even by a virus. In the present study, a virus with filamentous (3nm wide) or branched filamentous (8nm wide) particles were observed in purified preparations and three sedimentation components were founded with Isco fractionor after 10—40% sucrose density gradient centrifugation. There presented a single protein (mol. wt.  $3.69 \times 10^4$ ) and three species of RNA (mol. wt. 0.9, 1.0, and  $1.4 \times 10^6$ ) in preparations. With the monoclonal antibody of RSV from Japan, the virus showed a serological homology. These results certificated that the cause of rice stripe disease in China was the same RSV as that of Japan.

**Key words,** Rice stripe virus Virus RNA Serological reaction