

SMV对大豆花粉表面的污染及对花粉活力的影响

陶庭典* 濮祖芹

(南京农业大学植物病理教研室, 南京210014)

濮祖茂

(中国药科大学电镜室, 南京210007)

提 要

应用PALLAS将病毒粒体转化为乳胶颗粒通过扫描电镜直接观察,成功地检测到了大豆花粉表面污染的大豆花叶病毒(SMV)。田间春大豆宁镇1号的重花叶、轻花叶及无症状植株花粉所吸附的乳胶颗粒依次递减,而健株花粉上极少观测到乳胶颗粒,花粉数量测定及萌发试验表明,SMV的侵染对大豆花粉形成及活力都有明显的影响。

关键词:大豆花叶病毒 花粉 PALLAS 扫描电镜 花粉萌发

大豆花叶病毒是典型的种胚带毒^[6],然而其种传机制并不清楚。研究种传机制首先必须确定花粉在传毒中的作用。花粉是否带毒一般采用生物学方法^[3]、血清学方法(ELISA)^[4]、超薄切片^[5]以及直接杂交^[7]等方法加以验证。本文采用A蛋白包被的乳胶联抗血清法(PALLAS)^[8]对大豆花粉表面的SMV进行了直观检测,同时比较了病健大豆花内花粉的数量及花粉的活力。

材 料 与 方 法

一、花粉上病毒粒体的PALLAS检测

1. 花粉的收集与处理:花粉采自田间自然感染的大豆品种宁镇1号,开花的前一天或当天采花,解剖后收集花药,室温干燥48小时后存于冰箱(4℃)备用。使用时将花粉溶于0.1mol/L甘氨酸缓冲液中(pH8.2),以温室种植的无毒株花粉作对照。

2. 抗血清:由本实验室制备,微量沉淀的效价不低于1:1024,按Clark等^[1]的方法提取IgG。

3. 试剂:(1)0.9%NaCl。(2)0.81μmol/L乳胶。(3)0.1mol/L甘氨酸缓冲液(pH8.2)。(4)A蛋白液:A蛋白溶于甘氨酸缓冲液中使终浓度为0.05mg/ml。(5)悬浮液I:0.02%PVP的甘氨酸缓冲液。(6)悬浮液II:含0.05%NaN₃的甘氨酸缓冲液。(7)IgG:用甘氨酸缓冲液将IgG稀释为100μg/ml。

4. PALLAS检测大豆花粉表面的SMV:参照Querfurth等^[4]和Evans^[1]的方法。

(1)A蛋白乳胶复合体的形成。乳胶悬浮液用0.9%NaCl稀释14倍后1:1与A蛋白液混合,室温下

本文于1990年12月28日收到,1991年1月21日修回。

* 现在上海动植物检疫所,邮编201032

孵育2—4小时,其间间断搅拌。4℃过夜后6000g离心30分钟,沉淀用悬浮液Ⅰ悬浮,重复离心2—3次,最后将沉淀用悬浮液Ⅱ悬浮为2ml。

(2)IgG与A蛋白乳胶复合体的偶联。上述悬浮液以1:1与IgG混合,室温孵育2—4小时后离心,步骤如前所述。

(3)PALLAS反应。将得到的悬浮液以1:1与花粉液混合,室温孵育1小时,6000g离心5分钟,沉淀用甘氨酸缓冲液悬浮,重复离心4次,最后将沉淀用甘氨酸液悬浮为1ml左右进行制样。

(4)扫描电镜制样与观察。将得到的悬浮液滴一滴到样品台上,静置10分钟后用吸水纸吸干,自然干燥过夜后镀金进行扫描观察。

二、SMV对大豆花粉的影响

1. 对花粉数量的影响

开花的当天采花,解剖后镊取花药于小管内。每朵花加 H_2O 100 μ l,玻棒捣匀后显微镜下血细胞计数板计数,病健各至少检测20朵花。

2. SMV对大豆花粉活力的影响

开花的当天采花,20朵花为一组将花药全部解剖于小管内,加花粉培养基(30%蔗糖,含120ppm硼酸^[1])5ml,25℃培养过夜后显微镜下观察,计算发芽率(芽管超过花粉直径者均算发芽)并测量花粉管长度。

结 果

1. 不同感染度植株花粉对致敏乳胶颗粒吸附的扫描电镜观察见图版VI 1(a—d),结果表明重病株花粉(a)、轻病株花粉(b)及无症状植株花粉(c)所吸附的乳胶颗粒数依次减少,而健康对照花粉上(d)极少有乳胶颗粒存在。

2. 不同感染度植株花粉所吸附的致敏乳胶颗粒数量比较,列于表1。

表1 不同感染度植株花粉上致敏乳胶数量比较

Table 1. Comparison of the number of latex beads on the surface of different infected soybean pollen

花粉来源 Source of pollen	检测的花粉数 No. of pollen grains examined	平均致敏乳胶数 No. of latex beads per pollen surface
重病株 Severe mosaic soybean plants	85	1000±100
轻病株 Light mosaic soybean plants	80	200±50
无症状植株 Symptomless soybean plants	100	15±5
健康植株 Healthy soybean plants	90	0—5

观察结果表明,不同感染度植株上花粉所吸附的乳胶颗粒数存在明显差异,乳胶颗

粒数与植株感染程度呈显著正相关。

3. SMV对大豆花粉数量的影响

病株及健株花内花粉数目及次数分布见图2。健花23朵,花粉低于20000的2朵,20000—30000的6朵,30000—40000的12朵,大于40000的3朵;病花24朵,花粉数低于8000的3朵,8000—10000的6朵,10000—20000的11朵,超过20000的4朵。

花粉计数结果表明,大多数健康花的花粉数在30000—40000之间,而受SMV感染的花内花粉数多在10000—20000粒,病花内最多的花粉数才相当于健花内最少的花粉数。因此病花内的花粉明显少于健花的花粉。

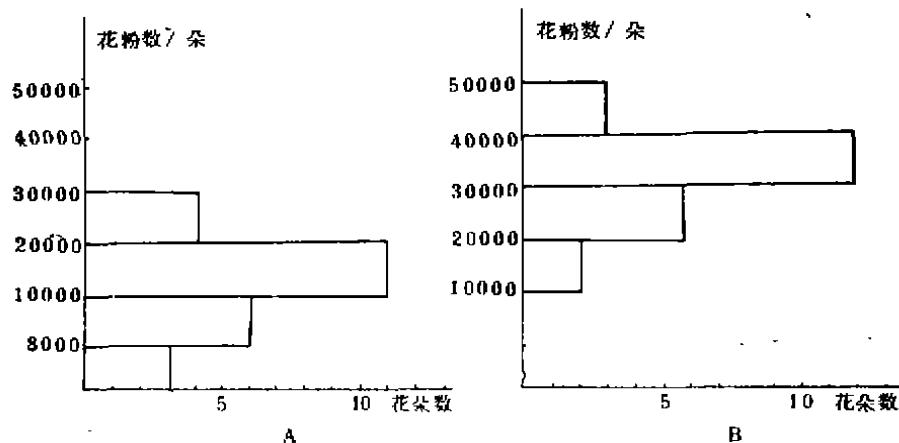


图2 病(A)健(B)花内花粉数目比较

Fig 2 Comparison of the number of pollen grains in sick(A) and healthy(B) flowers

4. SMV侵染对大豆花粉发芽率及花粉管长度的影响

病健花各检测三组(20朵花为一组)共观察100个视野,统计得到病株花粉的平均发芽率为37%。健株花粉的平均发芽率为71.5%,病株花粉的发芽率明显低于健株花粉。

病健株的花粉都随机地选择了100个视野内的500粒花粉测量花粉管长度,病株花粉管平均长度224.0 μ m,健株花粉管平均长度497.5 μ m,病株花粉管平均长度只有健株花粉管长度的一半。

讨 论

乳胶凝集反应常常用于病毒抗原的检测,而A蛋白包被的乳胶凝集反应(PAALLA)可大大提高血清反应的灵敏度^[6]。实验中健康对照花粉检测不到乳胶颗粒的存在,而田间无症状植株花粉可以检测到20个左右的乳胶颗粒,说明无症状的轻微感染也可以用PALLAS法检测出来,因此PALLAS方法作为一种病毒检测手段是灵敏可行的。当PALLAS结合扫描电镜进行观察时,可以为种传机制的研究特别是花粉带毒情况的研究提供直观的理论证据。

本实验的花粉计数及萌发结果表明,SMV的侵染不仅影响花粉的形成,而且使花粉

的活力大大降低,这无疑会影响到雌雄配子的受精作用。SMV侵染使花粉数量减少、发芽率降低且花粉管长度达不到受精要求,都使受精机率降低,因此田间病株空荚和单株荚多、产量低也就不难解释。

参 考 文 献

- [1] Cline, M.F. et al., 1977, *J. Gen. Virology*, 34: 475—483.
- [2] Evans, T.A. et al., 1988, *Plant Disease*, 72: 195—198.
- [3] Hamilton, R.I. et al., 1977, *Phytopathology*, 67: 395—399.
- [4] Pesic, Z. et al., 1988, *Can. J. Plant Pathology*, 1: 116—122.
- [5] Porto, M.D. et al., 1975, *Phytopathology*, 65: 713—716.
- [6] Quersfurth, G. et al., 1979, *Phytopathology*, Z., 94: 282—285.
- [7] Yang A.F. et al., 1974, *Virology*, 62: 26—37.

Surface Contamination of Soybean Pollen by SMV and Effect of Virus on Pollen Activity

Tao Ting-dian* Pu Zu-qin

(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University,
Nanjing 210014)

Pu Zu-mao

(Laboratory of Electron Microscope, Pharmaceutical University of China,
Nanjing 210007)

The particles of soybean mosaic virus on the surface of soybean pollen were detected by protein A-linked latex antiserum(PALLAS)with scanning microscope. When soybean variety of Ning Zhen -1 was used as material, the latex beads on pollen from severe mosaic, light mosaic and symptomless soybean plants were about 1000, 200 and 15 respectively, but no latex beads were observed on the surface of pollen from the healthy one. Pollen germination experiment shows that the pollen activity is obviously reduced because of the SMV infection.

Key words, Soybean mosaic virus Pollen PALLAS Scanning electron microscopy Pollen germination

*Work in Shanghai Animal and Plant Quarantine Service, Postcode, 200032