

## 中国大陆水稻黄矮病与台湾省水稻暂 黄病的血清学鉴定

高东明 秦文胜 李爱民 陈声祥

(浙江省农业科学院病毒实验室, 杭州310021)

5435.111.4

### 提 要

以前的文献报道我国大陆水稻黄矮病和台湾省的水稻暂黄病的病状、传毒介体和病毒形状均相似或相同,被认为是同一病害,但没有做过血清学反应的鉴定比较。本试验采用琼脂扩散法和双抗体夹心法(PAS-ELISA),对上述两病原的抗血清与黄矮病株提取液和带毒黑尾叶蝉研磨液进行了琼脂双扩散和酶联免疫反应的比较研究。黄矮病毒提取液与暂黄病毒抗血清的琼脂双扩散产生清晰的沉淀带,在ELISA试验中均为典型的阳性反应;黄矮病毒抗血清和暂黄病毒抗血清对生物测定虫的同一头黑尾叶蝉研磨液的测定结果,阳性虫附合率98%,病原田捕捉虫的符合率为100%。根据以上结果可以认为两种抗血清同源,即中国大陆水稻黄矮病与台湾省水稻暂黄病为同一病害。

**关键词:** 水稻黄矮病 水稻暂黄病 血清学鉴定

六十年代中国大陆发生的水稻黄矮病(Rice Yellow Stunt Virus, RYSV)<sup>(1)</sup>,与台湾发生的水稻暂黄病(Rice Transitory Yellowing Virus, RTYV)<sup>(2,3)</sup>,流行期间对水稻生产造成严重为害,两病均由黑尾叶蝉(*Nephotettix cincticeps*)传播。

阮义理曾根据两病的症状、虫媒、寄主范围、病毒质粒的形态特征等的比较,基本认为是同一病害<sup>(4)</sup>,其后裘维蕃提出把中国大陆黄矮病和台湾暂黄病统一称为暂黄病(Transitory Yellowing Disease)<sup>(5)</sup>,只是至今尚未有人对两病进行过血清学测定。本文报道黄矮病抗血清和暂黄病抗血清与黄矮病株提取液和黄矮病带毒媒虫研磨液的免疫反应结果。

### 材 料 与 方 法

1. **抗血清** 黄矮病毒(RYSV)抗血清是本室制备的,琼脂扩散反应效价为1:64;暂黄病毒(RTYV)抗血清是台湾邱人璋先生提供的,琼脂扩散反应效价为1:8。

2. **抗原** 人工繁殖的黄矮病株提取液和经生物接种测定的人工饲毒黑尾叶蝉。

3. **试剂** 琼脂糖、氨基乙酸、葡萄球菌A蛋白(SPA)和酶联A蛋白购自卫生部上海生物制

本文于1992年8月20日收到,12月28日修回。

品研究所, ELISA的试剂参见文献<sup>[1]</sup>。

**4. 病毒提取液制备** 采集接种病毒后35—40天的病株, 切碎后加等体积的0.3mol/L 甘氨酸缓冲液(pH7.5)捣碎, 双层纱布过滤, 滤液经5000r/m低速离心15分钟, 上清液15000r/m高速离心60分钟, 沉淀用少量甘氨酸缓冲液悬浮, 再进行一轮同样的差速离心, 悬浮液用20—50%的蔗糖密度梯度离心(20000r/m, 45分), 分部收集, 合并含病毒的分部, 15000r/m离心60分钟回收病毒, 沉淀悬浮于少量甘氨酸缓冲液即得病毒提取液<sup>[1]</sup>。

**5. 供试虫的准备** 把1—2龄无毒黑尾叶蝉若虫置人工接种的水稻黄矮病株上饲毒48小时(28—30℃)后转移到健稻上饲养至成虫, 用真叶初展的稻苗单虫单苗置两端通的大玻璃管内编号饲食48小时, 取出稻苗植于防虫水泥槽。发病苗对应的虫子为生物测定带毒虫, 无病苗对应的虫子为无毒虫。传毒后的虫子按编号装入指形管, 加0.3mol/L pH7.5的甘氨酸缓冲液置-20℃冰箱保存备用。用时也从毒源田采集成虫装入指形管备用。

**6. 琼脂扩散法** 将培养皿(50×12毫米)放在水平面上, 注入融化的1%琼脂糖[用0.3mol/L pH7.5甘氨酸液(内含0.02%硫柳汞)配制]3毫升, 加完后立即轻轻转动培养皿, 使琼脂糖均匀展开后加盖在室温冷凝20分钟, 放入4℃冰箱, 使用时取出按所需要的模型打孔。试验时中央孔先加RYSV提液扩散两小时, 后在周围孔加入抗血清, 置湿盒内于4℃冰箱扩散, 扩散结果照像记录。

**7. 酶联反应方法** 试验在国产40孔聚苯乙烯微量滴定板上进行。测定方法为A蛋白双抗体夹心法(PAS-ELISA), 操作步骤如下: A蛋白包被(液度6μg/ml)→抗体(RYSV抗血清1:200, RTYV抗血清1:100)→抗原(介体叶蝉研磨液, 病株提取液1:40)→抗体(同前)标记A蛋白(1:100)→底物→终止反应→测OD<sub>412</sub>值。以阳性反应与阴性反应OD(P/N)≥2.1为检测样品的阳性判断标准<sup>[1]</sup>。

## 结果与讨论

### 1. 琼脂扩散试验



图1. RYSV抗血清、RTYV抗血清与RYSV的琼脂扩散

Fig 1. Agar diffusion of RYSV antiserum,

RTYV antiserum and RYSV

注: 中央孔为RYSV提取液

Note: Extraction of RYSV was put into the center

RYSV抗血清以0.3mol/L pH7.5甘氨酸液1:1稀释, RTYV抗血清未稀释, 黄矮病毒抗原提液浓度50g鲜病株/ml。抗原、抗体加入后, 置4℃冰箱扩散96小时, 两种抗血清与RYSV提液产生清晰而相同的沉淀带, 表明两种抗血清同源, 见图1。

**2. RTYV抗血清对RYSV提取液的ELISA测定**

10g鲜重/ml的RYSV病株提液以1:40、1:80、1:160、1:320、1:640系列稀释, 其OD<sub>412</sub>值分别为0.85、0.74、0.65、0.50、0.40, 对照孔为0.10和0.15, 其P/N值大于2.1, 均为阳性。

### 3. 两种抗血清对同一头媒介昆虫的测定

将RYSV和RTYV的抗血清稀释液分别加入板1和板2,待测媒介昆虫按号移入匀浆管内,加甘氨酸缓冲液0.1ml,研磨至糊状,再加入0.2ml缓冲液洗涤匀浆棒,400r/min离心5分钟,分别将每头虫上清液的一半加入板1和板2的对应孔,其它操作程序同上。经生物测定法测得的60头阳性虫和38头阴性虫(阳性率为61.2%)用两种抗血清进行ELISA测定,RYSV抗血清测出51头阳性虫和47头阴性虫(阳性率为52.0%);RTYV抗血清测出50头阳性虫和48头阴性虫(阳性率为51.0%)。由此得出两种抗血清测定的阳性虫符合率为98%,阳性虫的数目分别是生物测定阳性虫数目的1.34倍和1.32倍。两种抗血清测定44头毒源田捕捉虫均得30头阳性虫和14头阴性虫,阳性符合率为100%。

用带毒黑尾叶蝉进行传毒试验,每隔48小时换苗1次,连续测定7次。32头带毒虫每次的传毒头数为23、21、27、24、23、25、19,传毒百分率为71.87、65.62、84.37、75.00、71.87、78.13和59.37%,这是导致酶联测定阳性虫率高于生物测定的阳性虫率的原因。

### 参 考 文 献

- [1] 范怀忠等, 1965, 植物保护, 3(4): 143—145。
- [2] 陈脉纪, 四方英四郎, 1971, 稻作病害专题研讨会讲稿集, pp.179—198。
- [3] 中科院上海生化所病毒组等, 1978, 生物化学与生物物理学报, 10(4): 363。
- [4] 阮义理, 1980, 植物保护, 6(3): 6—7。
- [5] 裘维蕃, 1983, 植物保护, 9(1): 7—8。
- [6] 蒋成伦编著, 1984, 酶免疫测定法, 人民卫生出版社, 第178—185页。
- [7] 高东明, 1981, 浙江农业科学, (2): 82—85。
- [8] Chiu, R. J. et al., 1965, *Phytopathology* 58: 740—745。

## Characterization of Mainland China Rice Yellow Stunt Disease and Taiwan Rice Transitory Yellowing Disease by Serological Identification

Gao Dongming Qin Wensheng Li Aiming Cheng Shengxiang

(Institute of Virology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

The symptoms, virion morphologies and insect vectors of rice yellow stunt disease occurred in mainland China and rice transitory yellowing disease found in Taiwan are very similar or identical as described in the previous reports, therefore they are putatively regarded as the same. But

serological comparison between the causative viruses of two diseases has not been done so far. In this paper we report on the reactions of crude Rice Yellow Stunt Virus (RYSV) preparations extracted from diseased rice plants and Viruliferous leafhoppers to antisera against to RYSV and Rice Transitory Yellowing Virus (RTYV) with agarose-gel immunodiffusion test and Protein A indirect sandwich ELISA (PAS-ELISA). The extracts containing RYSV and the antiserum to RTYV produce clear sediment bands in agarose-gel diffusion tests and show typical positive reactions in ELISA tests. The positive reaction coincidence rates of two antisera to halves of the same leafhoppers are 98% to 100%. According to the above results, we conclude that two antisera are homologous and further confirm that rice yellow stunt disease and rice transitory yellowing disease are essentially the same.

**Key words,** Rice yellow stunt disease    Rice transitory yellowing disease    Serological identification