

检测大麦抗 BYDV 的蚜虫获毒 的酶联免疫吸附法

刘常宏

(陕西省植物保护研究所, 陕西 杨陵 712100)

S. Haber

Haber, S

S 512.3034:

(Agriculture Canada, Winnipeg Research Station, Canada)

~~S 435.123~~

关键词 酶联免疫吸附法, 大麦, 大麦黄矮病毒,

ELISA, 抗病性

大麦黄矮病毒(BYDV)是世界性的主要禾谷类作物病毒。其防治技术一是治蚜防病^[1], 二是种植抗病品种。由于治蚜防病效果不佳, 因此选育抗病品种是防治该病的有效途径。目前对大量育种材料的鉴定, 主要是根据蚜虫接种传毒试验的症状表现、产量损失及植株内的病毒含量。但因症状表现和产量损失受环境影响较大, 使鉴定结果年度间存在差异。本研究用间接酶联免疫吸附法检测介体蚜虫带毒的技术, 并将其应用于品种的抗病性鉴定。

材料与方法

- 1 介体蚜虫 无毒禾谷缢蚜(*Rhopalosiphum padi* Linnacus), 麦长管蚜(*Sitobion avenae* Fabricus), 麦二叉蚜(*Schizaphis graminum* Rondan)和玉米蚜(*Rhopalosiphum maidis* Fitch), 于生长箱中繁殖。
- 2 病毒株系 BYDV 的 PAV、RPV 和 MAV 株系, 分别保存在繁殖寄主燕麦(Coast black oats)上。
- 3 供试大麦 含 yd_2 基因的 877-16 品种和感病品种 Manley, 分别于 20℃ 生长箱中盆播培养。
- 4 间接酶联免疫吸附法 按 Clark 和 Adams (1977)^[2] 方法, 但略有改进。用碱性磷酸酶标记抗体, 底物为 P-硝基苯磷酸, 颜色出现后用 Titertek Multiskan 测定 405 nm 处的光吸收值(OD)。凡处理的 OD 值大于对照平均 OD 值 + 4、各处理的标准差时为阳性反应, 反之为阴性反应。并用 OD 值计算阳性反应指数, 阳性反应指数 = (阳性反应的 OD 值之和) / (阳性反应的个数)。

蚜虫标样的制备是每处理加 0.1 mol/L TBS-Tween 缓冲液 (pH9.6) 150 μ l, 于微型管中研磨, 4℃ 下 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液供 ELISA 测定。

5 蚜虫带毒测定 采集不同株系的典型病叶, 剪短后置于不同培养器中, 每一株系分别用不同蚜虫取食获毒 2 d, 采集大小一致的获毒蚜虫置 -73℃ 冰箱中, 以测定不同介体取食获毒各株系的能力及不同头数禾谷缢蚜带毒与 OD 值间的相关性。

6 蚜虫获毒酶联免疫吸附法 (AA-ELISA) 测定大麦品种的抗病性, 用人工接虫器接种获毒 PAV 株系 3 d 的禾谷缢蚜于供试品种的第一叶片(三叶期), 传毒 3 d 后去掉接虫器和蚜虫, 然后将无毒麦长管蚜和禾谷缢蚜分别放于第二叶片, 取食 2 d 后收集于微型管中, 每处理 5 头, 重复 4 次。对获毒蚜虫进行 ELISA 测定。

本文于 1995 年 6 月 26 日收到, 8 月 9 日修回

· 现为西北农业大学植保系博士生, 陕西杨陵, 邮编 712100

结果与讨论

1 不同头数禾谷缢蚜带毒(BYDV)的测定

试验结果表明,间接酶联免疫吸附法可测出 2 头以上的蚜虫带毒(BYDV),T 测验与对照达显著差异。且 ELISA 测定 OD 值与带毒蚜虫头数呈线性相关, $y=0.0552+0.1505x$,式中 y 为 OD 值, x 为带毒蚜虫头数(图 1)。相关系数 0.85。

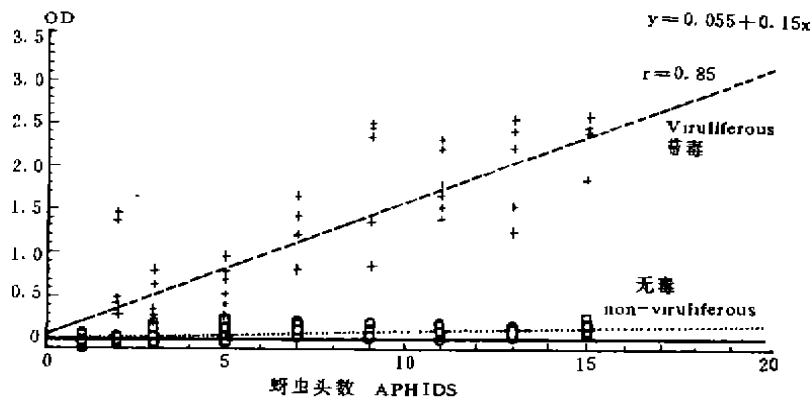


图 1 禾谷缢蚜带毒的 ELISA 测定

Fig 1 ELISA determination on viruliferous *R. padi*.

2 不同蚜虫对 BYDV 株系的获毒能力

对获毒蚜虫进行 ELISA 测定,麦长管蚜对 BYDV 的 PAV、RPV 和 MAV 株系的获毒能力均高于其它 3 种蚜虫,其平均 OD 值分别为 0.674、0.187 和 0.253,较禾谷缢蚜获毒分别高出 0.352、0.190 和 0.202,较玉米蚜高出 0.450、0.190 和 0.204,较二叉蚜高出 0.590、0.113 和

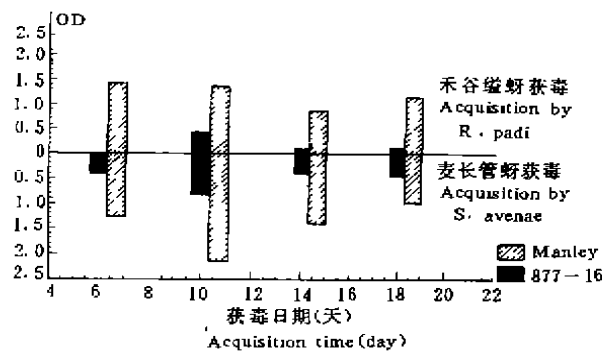


图 2 877-16 和 Manley 病株的 AA-ELISA 测定 OD 值

Fig 2 The OD value of AA-ELISA detection for infected 877-16 and Manley

0 176。表明蚜虫取食获毒 BYDV 与蚜虫传毒专化性无明显相关性。蚜虫传毒专化性可能与病毒释放时内质网膜的选择性有关^[4]。

3 AA-ELISA 测定大麦品种对 BYDV 的抗性

禾谷缢蚜与麦长管蚜从含 yd_2 基因的 877-16 品种上取食获毒的蚜虫 ELISA 测定 OD 值远低于同期从 Manley 品种上取食获毒(图 2)。接种后第 6 天,禾谷缢蚜从 Manley 品种上获毒的 OD 值为 1.435,而在 877-16 品种上获毒的 OD 值为 -0.004(阴性);接种后第 18 天,禾谷缢蚜与麦长管蚜从 Manley 上获毒的 OD 值较从 877-16 品种上分别高 1.012 和 0.530。表明含 yd_2 基因的 877-16 品种具有较好的抗 BYDV 性。

AA-ELISA 测定阳性反应指数的结果(图 3),接种后第 6 天和 14 天,麦长管蚜从 Manley 品种上获毒较从 877-16 品种上分别高 95.1% 和 98.7%。说明 ELISA 阳性反应指数更能显示品种间的抗病性。

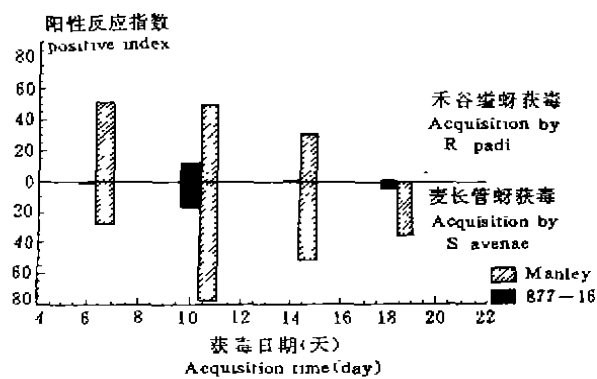


图 3 AA-ELISA 测定 877-16 和 Manley 病株的阳性反应指数

Fig 3 The positive index of AA-ELISA detection for infected 877-16 and Manley

对病株叶片直接进行 ELISA 测定,试验各期二品种的 OD 值与阳性反应指数无显著差异 ($P < 0.05$)。而同期用蚜虫获毒的 ELISA 测定结果,含 yd_2 基因 877-16 品种的 OD 值与阳性反应指数均极显著地低于感病品种 Manley(T 测验)。表明 AA-ELISA 可用于大麦品种的抗 BYDV 鉴定,而 ELISA 则不能。

4 产量损失

大田病圃观察,877-16 品种的亩穗数、株高、干粒重和产量较健株分别减少 6.8%、4.3%、1.8%、11.1%。而 Manley 品种病株较健株依次减少 52.8%、40.5%、4.5% 和 77.4%,亦说明 877-16 品种抗病性好。与 AA-ELISA 测定结果一致。

AA-ELISA 是通过测定获毒蚜虫而间接反映植株内病毒含量,有不破坏待测植株的优点,可对植株固定点进行多次测定。因此有望应用于 BYDV 抗病机制及遗传分析研究。

参 考 文 献

- 1 Plumb R T The epidemiology of barley yellow dwarf in Europe, In: Burnett P A. World Perspectives on Barley Yellow

Dwarf. DCAS/CIMMYT, 1987

- 2 钱幼亭, 周广和. 小麦种质资源抗耐黄矮病毒的田间鉴定技术研究. 植物保护学报, 1986; (3): 157~164
- 3 Clark M F, Adams A N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J Gen virol, 1977; 34: 475~483
- 4 Rochow W F. A strain of barley yellow dwarf virus transmitted specifically by the corn leaf aphid. Phytopathology, 1961; 51: 809~810

AA-ELISA for Detection of Barley Resistance to BYDV

Liu Changhong¹ S. Haber²

¹(Shaanxi Institute of Plant protection, Yangling, Shanxi 712100)

²(Agriculture Canada, Winnipeg Research Station, Canada)

Two viruliferous *Rhopalosiphum padi* (BYDV) can be detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Based on that result, a Aphid Acquisition-Enzyme-linked immunosorbent assay (AA-ELISA) has been established for identification of barley resistance to BYDV. The OD value of AA-ELISA showed that the barley variety 877-16 carrying YD2 gene was significantly different from that of susceptible variety Manley. No significant difference was found between 877-16 and Manley when they were detected directly by ELISA at the same leave.

Key words ELISA, Barley, BYDV