

271-274

刺槐上分离的花生矮化病毒的研究*

2774

S43:41

张宗义 陈坤荣[✓] 许泽永 陈金香 方小平

(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062)

关键词 刺槐, 花叶病毒病, 花生矮化病毒, 鉴定

刺槐花叶病是我国北方刺槐(*Robinia pseudo-acacia*)常见病害。1987~1995年对河南、河北、山东和北京部分地区刺槐进行调查,刺槐花叶病发病率为4%~87.5%。该病害主要特征是:叶片出现浅绿与绿色相间带有疱疹的花叶症状,叶缘波状扭曲,叶片畸形,显著变窄、变小。现对该分离物作系统研究,简要报道如下:

材料和方法

1 材料

从北京密云刺槐花叶病树上获得的一个病毒分离物(取名PSV-R)保存在温室花生和昆诺藜上。

2 方法

- 2.1 病毒寄主范围和蚜传试验 采用人工汁液磨擦接种方法,幼苗期接种,每种植物接种6~10株,观察症状一个月;体外稳定性状试验采用常规方法,用昆诺藜做指示植物;蚜传试验,将蚜虫饥饿5~6h后吸毒2~3mm,然后转接到健康花生幼苗上,24h后杀死蚜虫,置网室内观察传毒情况。
- 2.2 病毒提纯 用杂交烟(*Nicotiana hybridum*)做繁殖寄主,采用改进的Francki黄瓜花叶病毒提纯方法。提纯病毒用2%醋酸双氧铀负染后在电镜下观察,并测量计算病毒颗粒直径。
- 2.3 病毒抗血清制备 病毒抗血清用家兔制备,采用肌肉注射,每次间隔一周。注射病毒量为2mg/mL,四周后开始采血测定效价;血清学性质试验采用琼脂双扩散和酶联免疫吸附试验方法(ELISA)。
- 2.4 病毒外壳蛋白分子量测定 将提纯病毒(1.5mg/mL)进行常规10%SDS-PAGE,与标准蛋白质的迁移率比较,求出外壳蛋白分子量。
- 2.5 病毒RNA分析 将提纯病毒先加入提取缓冲液(0.02mol/L Tris-HCl pH 7.8,含0.2mol/L NaCl 0.05mol/L EDTA和1% SDS)混合,再加入等体积酚、氯仿(1:1)抽提三次,取水相,经乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,充分干燥后,加入灭菌蒸馏水溶解,然后于1%琼脂糖凝胶(含0.5μg/mL 溴化乙锭)中电泳1h,在紫外灯下观察核酸带。

结果与讨论

- 1 病毒的寄主范围 在供试的豆科、茄科、藜科和苋科4科24种植物中,PSV-R侵染4科

收稿日期:1997-09-01,修回日期:1997-12-18

* 国家自然科学基金和“九五”农业部重点科研项目的部分内容

** 参加试验的还有本所罗莉霞、陈金香同志

14种植物。其中,系统侵染刺槐、花生(*Arachis hypogaea*)、大豆(*Glycine max*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、长豇豆(*Vigna sinensis*)、短豇豆(*Vigna unguiculata*)、田菁(*Sesbania cannabina*)、杂交烟(*Nicotiana hybridum*)、曼陀罗(*Datura stramonium*)、苋色藜(*Chenopodium amaranticola*)和昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)。局部侵染蚕豆(*Vicia faba*)、望江南(*Cassia occidentalis*)和千日红(*Gomphrena globosa*)。在寄主反应上,PSV-R与我国花生上分离的PSV轻型株系(PSV-Mi)相似,与美国PSV-E株系有差异。PSV-R和PSV-Mi均系统侵染苋色藜和昆诺藜,不侵染红三叶草,而美国PSV-E仅局部侵染苋色藜和昆诺藜,系统侵染红三叶草^[1,2]。

2 病毒的传播方式 PSV-R能被豆蚜(*Aphis craccivora* Koch)以非持久性方式传播。用豆蚜接种24株花生,有11株发病,传毒效率为45.8%。

3 病毒的体外稳定性状 PSV-R的致死温度55~60℃,稀释限点 10^{-4} ~ 10^{-5} ,在室温下,体外存活期10d。

4 病毒的提纯和电镜观察 提纯病毒用751型紫外分光光度计测定, $A_{260}/A_{280}=1.9$ 。病毒产量为6.5mg/100g感染的杂交烟组织。经电镜观察为球状颗粒,直径30nm左右,颗粒中心呈暗色,为黄瓜花叶病毒组病毒颗粒具有的特征(见图1)。



图1 病毒颗粒的电镜照片(×127000倍)

Fig 1 Electron micrograph of the virus particles (×127000)

图2 琼脂双扩散试验鉴定PSV-R。

注:中心孔:R为花生矮化病毒刺槐分离物抗血清。外圈孔:R为花生矮化病毒刺槐分离物
Mi、W和E分别为花生矮化病毒Mi、W和E株系,I为花生矮化病毒1号分离物

Fig 2 Identification of PSV-R by agar double diffusion test.

Notes: Central well: R = Antiserum to PSV-R

Outer wells: R, Mi, W, E, I = PSV-R, Mi, W, E, I

5 病毒的血清学性质 制备的PSV-R抗血清,在微量沉淀素和琼脂双扩散血清试验中滴定度分别为1:1024和1:256。在琼脂双扩散血清试验中,PSV-R抗血清除psv-w与供试的所有PSV株系或分离物均呈强阳性反应,形成清晰的沉淀线。PSV-R反应沉淀线与中国PSV-Mi和1号分离物反应沉淀线融合,与美国PSV-E株系反应沉淀线形成交叉(见图2)。

应用间接 ELISA 方法比较 PSV-R、Mi 和 E 株系血清学性质,也说明 PSV-R 与 PSV-Mi 之间血清学关系相近,与 PSV-E 有差异(见表)。

表 应用间接 ELISA 方法比较 PSV-R、PSV-Mi 和 PSV-E 血清学性质

Table Serological relationship of PSV-R, PSV-Mi and PSV-E detected by indirect ELISA

抗血清 Antisera	抗原 Antigens	抗原稀释倍数(O.D.值) Antigen titers (O.D. value)			
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
PSV-R	PSV-R	0.92	0.83	0.76	0.35
	PSV-Mi	0.86	0.74	0.63	0.25
	PSV-E	0.48	0.51	0.44	0.32
	CK	0.13	0.12	0.06	0.08
PSV-Mi	PSV-R	0.83	0.80	0.73	0.34
	PSV-Mi	1.03	1.02	0.98	0.49
	PSV-E	0.76	0.71	0.64	0.34
	CK	0.20	0.12	0.10	0.05

6 病毒外壳蛋白质亚基分子量和核糖核酸组分 用聚丙烯酰胺凝胶电泳试验方法多次测定 PSV-R 外壳蛋白质亚基分子量为 26000 道尔顿;核糖核酸除发现 4 个主要组分外,还发现有第 5 个小 RNA。

根据刺槐分离物的寄主范围、传播特性、颗粒形态、血清学性质和理化特性等系统研究,可以认为该分离物为花生矮化病毒(PSV),并暂称为 PSV 刺槐分离物,即 PSV *Robinia* Isolate,简称 PSV-R。国外早期报道刺槐花叶由刺槐花叶病毒引起,但近年文献中认为刺槐花叶病毒与花生矮化病毒为同一种病毒^[3]。据许泽永等人研究,刺槐花叶病树是我国花生 PSV 重要初侵染源,在花生 PSV 流行中起重要作用^[4]。因此,深入开展 PSV-R 流行病学研究,对花生矮化病毒病的防治具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 许泽永,张宗义 花生矮化病毒一个新株系-轻型株系的研究.中国油料,1985,(2),68-72
- 2 许泽永,张宗义,陈坤荣等.花生矮化病毒株系寄主反应及对花生致病力研究,中国油料,1992,(4):25-29
- 3 Mink G I, Guy P L. Peanut Stunt Cucumovirus In: Brant A *et al* ed. Viruses of Tropical Plant. 1990 398
- 4 许泽永,陈坤荣,陈国达等 刺槐-花生上流行花生矮化病毒一个初侵染源 植物病理学报,1994,24:(4):305-309

Identification and Characterization of an Isolate of Peanut Stunt Virus from Black Locust Mosaic Tree in China

Zhang Zongyi Chen Kunrong Xu Zeyong Chen Jinxiang Fang Xiaoping

(Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062)

Abstract A virus isolated from a diseased black locust tree (*Robinia pseudo-acacia*) in the suburb of Beijing was identified as peanut stunt virus (PSV), designated PSV *Robinia* isolate (PSV-R). PSV-R infected 14 of 24 species of plants in four families. The thermal inactivation point was 55–60 °C. The dilution end point was 10^{-4} – 10^{-5} and the longevity *in vitro* was 10 days. Aphid (*Aphis craccivora* Koch) transmitted the virus in a nonpersistent manner. Virus particles were spherical with 30 nm in diameter. An antiserum against PSV-R was produced with titers of 1:1 024 and 1:256 in microprecipitation and gel diffusion tests, respectively. Serologically PSV-R was closely related to PSV-Mi, distantly related to PSV-E. The molecular weight of PSV-R coat protein is about 26 000 D. PSV-R has four main components of RNAs with a small RNAs.

Key words Black locust, Mosaic disease, Peanut stunt virus, Identification