

小麦黄花叶病毒人工侵染体系的研究

尚巧霞¹, 韩成贵¹, 于嘉林², 杨莉莉¹, 刘 仪²

(1 中国农业大学 植物病理系, 北京 100094; 2 中国农业大学 农业生物技术国家实验室, 北京 100094)

摘要: 通过大量的接种实验, 分析了影响病毒接种效率的各种因素, 经 ELISA 和 RT-PCR 方法进行检测, 确立了较为稳定有效的小麦黄花叶病毒机械传毒体系。采用新鲜病叶或用氯化钙干燥保存的病叶作为接种毒源, 在 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液中研磨后, 对低温下(11~13℃)培养的小麦幼苗(1~2 叶龄)进行叶面接种, 并将接种后的小麦低温培养可获得较高的接种效率(12.57%~13.43%)。对毒源类型、小麦苗龄和接种部位等其他可能影响接种效率的因素进行了测定。

关键词: 小麦黄花叶病毒; 机械接种; 病毒检测

中图分类号: S435 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2002)04-0054-05

小麦黄花叶病毒(Wheat yellow mosaic virus, WYMV)属于马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae), 大麦黄花叶病毒属(*Bymovirus*), 是由禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)传播的弯曲线状病毒。其寄主仅限于小麦, 在汁液中侵染性相当不稳定, 病毒粒体含双组分线状+ssRNA^[1]。WYMV RNA1 全长为 7 629 bp, 基因组中包含一个 ORF, 长度为 7 221 bp, 可编码产生一种分子量约为 270 kDa 的蛋白质。WYMV RNA2 共 3 639 bp, 包含一个由 2 709 nt 组成的 ORF, 可编码 99.8 kDa 的蛋白^[2]。近年来, 由该病毒引起的小麦黄花叶病在我国的危害范围和程度不断扩大和加重, 长江流域各省份及河南、陕西等地都有发生, 已成为一种严重危害小麦生产的重要病害, 其可造成小麦株型矮化, 穗小粒瘪甚至整株死亡^[3]。据统计, 一般减产 10%~30%, 严重时可达 70%, 甚至绝收。其危害程度受温度、湿度及土壤类型等多方面因素的影响。

小麦黄花叶病的自然发生和蔓延涉及植物-真菌-病毒三类生物体系, WYMV 在汁液中不稳定, 自然条件下难以通过机械接种传播, 对于这一病害的深入研究十分困难^[4]。目前的研究工作主要是在田间或温室内靠带毒真菌感染小麦进行的, 由机械接种小麦来开展的工作因效率低、受环境条件变化的影响极大, 而难以应用。为解决此问题, 本研究分析了包括毒源类型、小麦育苗及培养条件、接种时期、接种部位等可能影响该病毒接种效率的因素, 并用 ELISA^[5] 和 RT-PCR^[6] 方法对接种叶片中的 WYMV 进行检测, 确立了较为稳定有效的机械接种技术。

1 材料和方法

1.1 毒源

采自河南省潢川县重病田感染 WYMV 的小麦叶片。

收稿日期: 2001-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870489); 973 资助项目(G2000016201)

作者简介: 尚巧霞(1975-), 女, 农学硕士, 主要从事植物病理学教学与研究工作, 现在北京农学院园艺系工作。

1.2 接种寄主

WYMV 感病小麦品种鄂恩 1 号。

1.3 提纯病毒

以河南潢川重病田感染 WYMV 的小麦病叶为材料，参照文献方法^[7]，提纯病毒。

1.4 病毒保藏^[8]

新鲜病叶：将带毒小麦苗移栽于人工培养箱内，12℃~15℃下生长，活体保存。

直接冷冻：将采集的病叶放入-20℃冰箱。

氯化钙干燥保存：将颗粒状无水氯化钙装入试管底部，用量为叶片重量的两倍，其上放置双层纱布，将病叶切成细条后放入，加盖、密封，放入4℃冰箱内保存。

1.5 小麦培养与接种

1.5.1 育苗 低温育苗：将小麦种子播入灭菌砂中，在11~13℃人工培养箱内育苗至1~2叶或以上(光照时间为16 h/d)；室温育苗：10~30℃日光温室育苗至1~2叶或以上。

1.5.2 叶部接种 在待接种小麦叶面喷撒金刚砂，直接用病叶汁液或用0.2 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.0)稀释病叶汁液(1:10)，进行摩擦接种，随即用清水冲洗。

1.5.3 根部接种 将在灭菌砂中培养的麦苗拔出，洗去砂粒，在根部喷撒金刚砂后摩擦接种根部，冲洗后种入灭菌土中。

1.5.4 接种小麦的培养 接种后的小麦在黑暗中培养20 h，然后转入光照培养箱培养(光照时间为16 h/d)，每1~2 d浇一次营养液^[9]。培养箱内的温度分别设低温(白天12℃/夜间11℃)和高温(18℃恒温)两个处理。

1.6 ELISA 检测

小麦叶片加液氮研磨后，加入0.1 mol·L⁻¹柠檬酸铵包被缓冲液(pH 6.5)。用0.5倍体积的氯仿抽提后取上清液，并用上述缓冲液进行稀释(1:10)，37℃包被3 h，PBS-T缓冲液洗板3次。加入1:1 500稀释的WYMV-CP表达产物制备的抗血清，37℃温育3 h，洗板同前。然后加入1:1 500稀释的羊抗兔IgG-Ap，37℃温育3 h，洗板，最后加入新配制的底物溶液，室温反应60 min，加1滴2 mol·L⁻¹NaOH终止反应。Bio-Rad酶联读数仪测定OD₄₅₀值。

1.7 RT-PCR 检测

提取小麦叶片总RNA，利用反转录酶 SuperscriptII 以Oligo (dT)₁₂₋₁₅为引物进行反转录，得到病毒的cDNA。以此为模板，利用位于WYMV RNA2上的一对引物WY-9和WY-28(由上海生物工程公司合成)进行PCR扩增，以提纯病毒为对照，通过1%琼脂糖凝胶电泳进行分析。WY-28: 5'-TCTCTCAGCATGGTGGCAGG-3'，与RNA2的1581-1600 nt相对应，WY-9: 5'-ATGCGGATCCCTAATGGCCCGG-3'，与RNA2的2881-2859 nt互补。

2 结果与分析

2.1 病毒检测体系的建立

2.1.1 ELISA 检测 通过对采集的田间病样检测结果表明，ELISA 试验对于WYMV的检测具有较好的灵敏度和稳定性(表1)，可以用于对室内接种小麦的大量检测，初步确定WYMV接种后的感染情况。

表 1 小麦叶片中 WYMV 的 ELISA 检测

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
加样设置	空白	阴性对照		阳性对照		病叶		空白
A	0	0.013	0.004	0.184	0.150	0.082	0.092	0
B	0	0	0.004	0.173	0.198	0.066	0.083	0
C	0	0.013	0.017	0.205	0.187	0.076	0.078	0
D	0	0.005	0	0.170	0.216	0.063	0.070	0
平均值	0	0.007		0.169		0.076		0

注: 阴性对照—健康小麦; 阳性对照—提纯病毒

2.1.2 RT-PCR 检测 不同处理的接种小麦提取总 RNA 后, 进行 RT-PCR 扩增, 以能否扩增出目的条带来确定小麦的感染情况。结果表明, 接种 1 个月

后, 除在可以观察到症状(叶片上出现黄绿色条纹, 严重时新叶扭曲畸形)的小麦中能检测到 WYMV 以外, 而且在部分没有症状表现的接种小麦植株中也能检测出 WYMV 的存在(图 1)。因此 RT-PCR 方法可以用于对室内接种 WYMV 后的小麦感染情况进行精确分析。

2.2 温度条件对病毒接种效率的影响

采用新鲜的小麦发病叶片, 对不同温度下生长的小麦幼苗接种后, 分别在 12 ℃, 18 ℃, 25 ℃生长箱内培养1个月后, 在低温条件下生长的接种小麦叶片可以观察到黄绿色条纹, 严重时新叶呈扭曲畸形等症状, 而在 18 ℃以上生长的接种麦

苗均没有症状出现。表现发病症状的小麦和 18 ℃下培养的部分接种小麦植株能检测出 WYMV 的存在。由表 2 可以看出, 麦苗生长的温度条件不同对接种效率有很大的影响。育苗及接种后的低温条件(11~12 ℃)是提高病毒接种效率的关键因素。

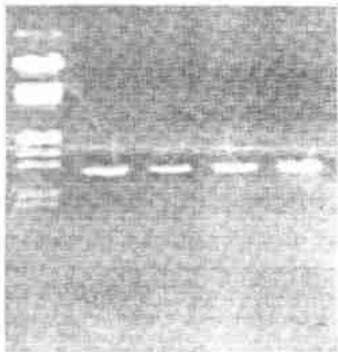
表 2 不同温度条件下的病毒接种结果

育苗温度	接种后生长温度(℃)	接种株数	显症株数	PCR 检测	接种效率(%)
11 ℃~13 ℃	25	160	0	0	0
	18	78	0	4	5.13
	12	175	22	22	12.57
10 ℃~30 ℃(温室)	25	128	0	0	0
	18	80	0	3	3.75
	12	120	10	10	8.33

注: 采用新鲜病叶汁液, 对 1~2 叶龄的小麦叶片进行接种

2.3 其他影响接种效率的因素

本研究还对其他影响接种效率的因素进行了比较, 在不同处理中, 接种后小麦的发病情况除进行症状表现的记载外, 还经 ELISA 和 RT-PCR 对小麦体内病毒进行检测, 作为病毒是否感染小麦的最终结论, 结果见表 3。



1 λDNA Marker; 2 接种发病小麦; 3. 田间采集小麦病叶; 4 高温隐症小麦病叶; 5. 提纯 WYMV

图 1 RT-PCR 检测 WYMV

表 3 不同因素对机械接种效率的影响

	不同接种因子 ^①	接种株数	发病株数	发病率(%)
毒源类型 ^②	新鲜病叶	175	22	12.57
	粗提纯病毒	106	2	1.85
	冰冻保存病叶	216	5	2.31
	CaCl ₂ 低温干燥	69	8	11.60
接种苗龄 ^③	1~2 叶	67	9	13.43
	3 叶以上	101	8	7.92
接种部位 ^{②③}	根部摩擦	96	5	5.21
	叶面摩擦	175	22	12.57

注: ①育苗及接种后的环境温度均为 12℃; ②1~2 叶龄小麦叶面接种; ③新鲜病叶汁液作为接种毒源

其中, 采用田间直接采集或在生长箱内活体保存的新鲜病叶, 和用干燥低温保存的病叶接种后的感染效率分别为 12.57%和 11.60%, 远远高于用提纯病毒和冰冻保存病叶接种的效率(1.85%和 2.31%)。

另外, 小麦的接种苗龄及接种部位对 WYMV 感染效率也有明显的影响, 采用 1~2 叶期小麦的接种效率(13.43%)大大高于 3 叶以上的小麦苗(7.92%), 而叶面接种效率(12.57%)显著高于根部接种效率(5.21%)。

3 讨论

WYMV 机械接种的效率极低, 在自然条件下难以发生。本研究经过大量的接种, 对接种条件进行了改进, 同时用 ELISA 及 RT-PCR 方法对接种小麦进行了大量和快速的鉴定, 建立了 WYMV 的高效人工感染体系。

在这一体系中育苗阶段及接种后的小麦生长环境温度是影响病毒感染效率的关键因素。试验中, 接种后在 18℃下生长的小麦均无症状表现, 但经过 PCR 检测仍有病毒的存在。由此表明 WYMV 感染的麦苗在较高的温度下会发生隐症现象, 从而难以判定接种效果, 这一点与该病毒在田间的表现也是一致的。

试验中我们还观察到, 即使使用新鲜的病叶直接研磨成汁液接种成功率几乎为零。只有在磷酸缓冲液中才能够接种成功。用提纯病毒接种的效率低, 可能是因为在提纯过程中的各种化学和物理因素造成部分病毒颗粒失活, 从而使侵染力降低。另外, 虽然 WYMV 在自然条件下是由根部侵染, 但由于在室内试验时根部接种过程容易对小麦根系造成伤害, 因而接种效率低于叶片接种。

以上结果表明, 用新鲜的病叶机械接种 WYMV 效率很高。在研究工作中, 可采用冷冻或低温干燥的方法保藏病毒, 虽然在保藏过程中病毒的侵染力与新鲜的病叶相比会有所降低, 但仍能保持较高的侵染力, 能够满足周年研究时对于毒源的需要, 为 WYMV 的深入研究提供了便利条件。

参考文献:

- [1] 于善谦, 陈仲宜, 徐来升, 等. 发生在我国的小麦黄花叶病[J]. 植物保护学报, 1986, 13(4): 217—219.
- [2] 于嘉林, 晏立英. 小麦黄花叶病毒(WYMV)基因组核苷酸序列分析[J]. 中国科学 C 辑, 1999, 42(5): 554—560.
- [3] 于嘉林, 晏立英, 冯继东. 一种中国发生的真菌传小麦花叶病毒 RNA1 3' 末端核苷酸序列分析[J]. 病毒学报, 1995, 11(3): 248—254.
- [4] Adams M J. Transmission of plant virus by fung[J]. Annals of Applied Biology, 1991, 118: 479—492.
- [5] 李大伟, 韩成贵, 邢怡明. 中国小麦黄花叶病毒(WYMV)分布的 RT-PCR 鉴定[J]. 植物病理学报, 1997, 27(4): 303—307.
- [6] 邢怡明. 一种真菌传小麦黄花叶病毒的提纯与血清学检测[J]. 农业生物技术学报, 1994, 2(1): 91—95.
- [7] 田 波. 植物病毒研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [8] Adams M J. The susceptibility of barley cultivars to barley yellow mosaic virus (Ba YMV) and its fungal vector[J]. Annals of Applied Biology, 1986, 109: 561—572.

Artificial Inoculation of Wheat Yellow Mosaic Virus to Wheat

SHANG Qiao-xia¹, HAN Cheng-gui¹, YU Jia-lin², YANG Li-li¹, LIU Yi²

(1. Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. State Key Lab for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Factors affecting artificial inoculation of WYMV on susceptible wheat variety were analyzed. The result indicated that the highest incidence could be gained by using the dried diseased-leaf or fresh wheat to inoculate wheat cultivated at low temperature. The diseased-leaf should be grounded in phosphate buffer. The effective inoculation method was developed and WYMV in wheat leaves was tested by ELISA and RT-PCR.

Key words: Wheat yellow mosaic virus; Mechanical inoculation; Virus detection