

植物病毒与病毒病防治研究

第一次全国植物病毒与病毒病防治研究学术讨论会论文集

中国植物病理学会植物病毒专业委员会编

中国农业科技出版社

植物病毒与病毒病防治研究

第一次全国植物病毒与病毒病防治研究学术讨论会论文集

中国植物病理学会植物病毒专业委员会编

中国农业科技出版社

(京)新登字 061 号

图书在版编目(CIP)数据

植物病毒与病毒病防治研究/中国植物病理学会植物病毒专业委员会编.-北京:中国农业科技出版社,1997.3

ISBN 7-80119-412-8

I. 植… II. 中… III. ①植物病毒-研究-学术会议-文集②植物病毒病-防治-研究-学术会议-文集 IV. S432.4-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 04437 号

责任编辑	张 锋 胡 越
出版发行	中国农业科技出版社 (北京海淀区白石桥路 30 号)
经 销	新华书店北京发行所发行
印 刷	北京怀柔王史山胶印厂
开 本	787×1092 毫米 1/16 印张:23.75
印 数	1—500 册 字数:580 千字
版 次	1997 年 3 月第一版 1997 年 3 月第一次印刷
定 价	50.00 元

《植物病毒与病毒病防治研究》
编辑委员会

主 编:刘 仪

副主编:周广和 于嘉林

编 委:(按姓氏笔画为序)

于嘉林 王锡锋 成卓敏 刘 仪 李大伟 李怀方
杨莉莉 陈剑平 周广和 韩成贵 蔡祝南

序 言

植物病毒病害在十九世纪末期,俄国的 Ivanovsky 和荷兰的 Beijerinck 等发现病毒之前长久的农业历史中早已有过记载。虽然在科学研究上经过了 1935 年 Stanley 里程碑意义的研究和二十世纪中期分子生物学的兴起到今天生物技术的蓬勃发展,但病毒病害似乎越来越多,在农业生产上仍造成连续不断的损失。展望二十一世纪,我们植物病毒工作者可能面临的是一个持续发展的现代农业生产中由于病毒病害的不断发生所造成的“持续损失”。另一方面,中华民族做为一个世界大国对一直是生物学中前沿研究领域之一的病毒学的创新性研究也应该是我国植物病毒学者所面临的光荣和艰巨的任务。

中国植物病理学会曾于 1965 年在上海主持召开了全国植物病毒学术讨论会。“文革”后多半参加相关学科和学会所召开的与植物病毒有关的国内外学术会议。这次由中国植病学会病毒专业委员会筹备并主持召开的植物病毒学术讨论会,是在世纪交迭之际,全国各地工作在与植物病毒有关各领域的老、中、青专家们汇聚一堂,总结过去、展望未来、交流切磋,共同为我国植物病毒病害的防治和病毒学研究更上一个新高度的盛会。

我们高兴的是近年来成长起来的年轻植病和病毒工作者在我国植病界已经形成了一个群体,他们为这次会议带来了新成绩,并祝愿他们在下个世纪初召开的第八届国际植病大会(8th ICPP)上展示代表中国植病工作者水平的新成果。

谨代表中国植物病理学会理事会祝大会成功!

刘 仪

1997 年 3 月 20 日

目 录

病毒的分类鉴定及检测

- 桃树红叶病——一种新的桃树病毒病的初步研究…………… 周慧文 杨 立 贾克功等(1)
- 水稻瘤矮病毒的抗血清制备和室内检测…………… 郭 松 张曙光 范怀忠(7)
- 我国黄瓜花叶病毒及其病害研究进展 …………… 徐平东 李 梅 林奇英等(13)
- 小麦黄化型病毒病原的研究 …………… 苑森行 乔合心(23)
- 真菌传大小麦病毒病在我国的分布及影响分布的生态因素 …… 阮义理 邹皖和 王卉(28)
- 从旱金莲上分离到的黄瓜花叶病毒和芜菁花叶病毒 …… 韦石泉 吴元华 鞠振林等(32)
- 昆明香石竹病毒的研究 …………… 段永嘉 蔡 红 吴德喜等(38)
- 我国番茄花叶病毒番茄分离物的分离、鉴定…………… 周雪平 薛朝阳 李德葆(44)
- 蚕豆萎蔫病毒研究现状及展望 …………… 周雪平 余永杰 李德葆(51)
- 不同地理型麦蚜传播 BYDV 能力的生物学比较 …………… 杜志强 周广和(55)
- 河北省春麦区小麦黄矮病的主要介体种群和病毒流行株系的研究 ……………
…………… 陈巽祯 苗洪芹 吴和平等(59)
- 我国仙人掌类植物的主要病害——仙人掌 X 病毒与复合侵染的烟草花叶病毒的分离和鉴定
…………… 王树琴 沈淑琳 胡伟贞等(65)
- 南芥菜花叶病毒检验技术的研究 …………… 宋淑敏 胡伟贞 陈 京等(71)
- 烟草环斑病毒检验技术的研究 …………… 陈燕芳 胡伟贞 陈 京等(76)
- 花生矮化病毒株系寄主反应及血清学关系研究 …………… 陈坤荣 许泽永 张宗义等(80)
- 河南烟草病毒病原鉴定初报 …………… 李淑君 杜小普 陈玉国(86)
- 自然侵染甘薯的烟草花叶病毒的初步研究 …………… 辛相启 李长松 杨崇良等(92)
- 玉米种子携带 MDMV 的生物和免疫检测 …………… 马占鸿 李怀方 裘维蕃等(97)
- 一种新型检测蔬菜病毒免疫剂的研制…………… 冯兰香 李茂林(103)
- 甜菜黑色焦枯病原病毒的研究…………… 吴茂森 蔡祝南 于嘉林等(109)
- 唐菖蒲花叶病毒的分离鉴定及电镜研究…………… 马 筠 徐绍华 蔡文启等(115)
- 南方菜豆花叶病毒在大豆种子中的分布特点及检疫…………… 范晓红 谷建夫 陈建宏等(119)
- 南方菜豆花叶病毒抗血清制备及质量鉴定…………… 谷建夫 范晓红 陈建宏等(128)
- 植物病毒分类的历史、现状与展望 …………… 李尉民 张成良 谢联辉(131)
- 生物素标记 RNA 及其在香蕉黄化束顶病毒鉴定中的应用 ……………
…………… 范在丰 李怀方 王寿华等(138)
- 中国进境植物病毒检疫历史与现状…………… 张成良 张作芳 李明福等(142)
- 世界植物病毒最新分类系统…………… 张成良 李尉民 李明福等(148)

植物病毒分类信息管理系统的构建·····	李明福 张成良 史大卫(152)
进境主要花卉病毒检疫咨询系统·····	种 焱 李 春 杨洁磊等(157)

病毒病害与防治

我国香蕉束顶病的流行趋势与控制对策·····	周仲驹 谢联辉 林奇英等(161)
苎麻花叶病传播途径的研究·····	张继成 薛召东 黎修惕(168)
菠菜中病毒抑制物作用方式和主要特性研究·····	安德荣 雷娟利(174)
我国柑桔衰退病的发生概况与展望·····	周常勇(182)
水稻品种对水稻条纹病毒的抗性鉴定及其作用机制研究初报 ·····	····· 林含新 吴祖建 林奇英等(188)
玉米制繁种田病毒病发病规律的探讨·····	李桂珍 陈柏柱 刘瑞苍等(193)
桑品种对黄化型萎缩病抗性机理的研究·····	蒯元璋 朱凤平 夏志松(196)
小麦稷条花叶病致病性与品种抗病性的互作及仪宁小麦的选育 ·····	····· 侯庆树 周益军 程兆榜等(201)
玉米矮花叶病(MDMV)防治方法的商榷 ·····	李济宸 程 起 李建民等(206)
山西玉米病毒病流行原因分析·····	张 琦 石银鹿(210)
桑树抗病性的离体测定技术研究·····	陈培根(213)
三种外检植物病毒的灭活处理·····	陈 京 胡伟贞 陈燕芳(215)
安徽贡菊脱病毒研究简报·····	李彦勇 花日茂 胡蕙露(218)
蚜虫传播花生病毒病规律的研究·····	田文会 梁秋海 相军玉等(219)
苹果茎沟槽及茎痘病毒对梨树的生长及激素的影响·····	冷怀琼 龚国淑 张泳梅等(224)
川北地区玉米鼠耳病的发生和系统控制研究初报·····	邓先明 何庆国 李祥坤等(228)
玉米鼠耳病传毒媒介研究初报·····	李祥坤 邓先明 梁映鸿等(236)
辣椒病毒病发生与防治研究·····	张来振 马玉萍 潘长虹等(240)
应用茎尖培养技术防治甘薯病毒病的研究·····	尚佑芬 杨崇良 赵玖华等(244)
种子处理对玉米矮花叶病防治效果的观察·····	李桂珍 陈柏柱 李济宸等(250)
玉米鼠耳病系统控制技术研究和大面积示范·····	王风元 庞清明 刘鹏飞等(254)
玉米鼠耳病——发生与不同生态因素的关系·····	王开源 邓先明 谢明全(258)
地膜育苗预防玉米鼠耳病研究·····	庞清明 王风元 何庆国等(261)
临汾地区玉米病毒病流行原因及防治措施·····	徐萃文 李永昌(264)

病毒的生物化学及分子生物学

我国花生矮化病毒(PSV)两个株系壳蛋白基因核苷酸序列分析 ·····	····· 许泽永 张宗义 陈坤荣等(266)
玉米线条病毒 V1 基因产物的检测及其在大肠杆菌中的表达 ·····	周仲驹 谢联辉等(272)
小麦—中间偃麦草新种质对大麦黄矮病毒(BYDV)的抗性及其分子标记的研究 ·····	····· 钱幼亭 刘 艳 孙晓平等(278)
蚜虫传毒过程中 Y 病毒“助成份”的提纯及特性研究 ·····	裘季燕 周桂珍 元 平(285)

不同品种花生接种条纹病毒(PStV)后叶片内过氧化物酶和超氧化物歧化酶的变化	董炜博 严敦余(292)
黄瓜花叶病毒(CMV)缺失型复制酶基因转化烟草及其介导的抗病性	谢响明 于嘉林 张 力等(298)
甜菜黑色焦枯病毒宁夏分离物 RNA 3' 末端核苷酸序列分析	丁 群 蔡祝南 于嘉林等(305)
南方菜豆花叶病毒菜豆株系在非寄主植物豇豆中的运动	李尉民 张成良 谢联辉等(310)
甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)RNA4 菌传功能序列的定位	韩成贵 于嘉林 王东勇等(316)
反义核酶转基因水稻对矮化病毒的抗性及其复制抑制	W. Yang Z. Wu Y. Yie 等(320)
水稻条纹病毒 P21 蛋白编码区 vRNA2 ORF 的确定及其在水稻原生质体中的表达	X. Wang Y. Yie W. Yang 等(322)
中国桃坏死黄化及枣疯病类菌原体特性研究	S. F. Zhu I-M. Lee C. L. Zhang 等(324)
植物病毒与介体昆虫相互识别的分子机制	王锡锋 周广和(338)
甜菜黑色焦枯病毒及其 cDNA 探针检测	陈定虎 蔡祝南 丁 群等(343)
香石竹环斑病毒的分离、鉴定与 cDNA 合成	方守国 蔡祝南 于嘉林等(346)

文 摘

两种核酶对烟草花叶病毒 RNA 片段的体外剪切	于善谦 吴政宏 朱乃硕等(351)
我省西瓜病毒病发生情况与防治研究	刘顺卿 薛香云(352)
在芒果畸形病树中检测到两种环状小分子 RNA	朱水芳 张成良等(353)
竹节花黄斑驳病毒启动子的缺失分析及功能研究	吴 标 田颖川 潘瑞琴(355)
一株新的黄瓜花叶病毒卫星 RNA	张国华 罗宗礼 方荣祥(356)
水稻黄矮弹状病毒基因组的全序列	方荣祥 陈晓英 王 群等(357)
中国番茄黄化曲叶病毒——双生病毒的一个新种	刘玉乐 蔡健和 田 波等(358)
抗血清纸片在酶联免疫吸附实验中的应用	宋淑敏 胡伟贞 陈 京(359)
应用聚合酶链式反应方法快速检测番茄环斑病毒	陈 京 胡伟贞等(360)
表达 PVX+PVY、PVY+PLPY 两个双价外壳蛋白基因马铃薯的抗病性研究	彭学贤 宋艳茹 张鹤龄等(361)
中国烟草曲叶病毒 DNA A 的克隆与序列分析	宫倩红 洪益国 汤 健等(362)
应用基因工程创造抗黄矮病毒转基因小麦新种质	成卓敏 何小源 陈彩层等(362)
一种基于过敏性反应机制的抗植物病毒侵染策略	项 瑜 刘俊君 杨兰英等(364)
小麦品种对小麦梭条花叶病的抗性及其遗传	程兆榜 侯庆树 周益军等(365)
应用免疫 RT-PCR 技术研究蚜虫与大麦黄矮病毒(BYDVs)的互作	郭井泉等(366)
大麦黄花叶病毒的生化特性和分子生物学研究	吴淑华 范永坚 陆振晓等(367)
江苏省玉米病毒病种类及其病原鉴定	周益军 范永坚 程兆榜等(368)

桃树红叶病——一种新的桃树病毒病的初步研究*

周慧文 杨立 贾克功**

(中国农业大学, 北京 100094)

王汉中 罗经

(中国科学院病毒研究所 武汉 430071)

提要 桃树红叶病具有叶片季节性隐潜的红化症及花、果的综合症状, 常导致“芽枯枝死”, 树冠受抑, 减产, 缩短桃树的经济寿命。经土壤、叶片营养分析、病原分离培养、检测等试验已排除生理和真菌、细菌、类病毒、类菌原体病害。经 ds-RNA 检测、病毒粒子提纯、检测和致病性试验等, 证实为病毒侵染所致。病毒 (PhRLV) 提取液呈典型的蛋白质紫外吸收特点, $A_{260}/A_{280}=1.4$, 粒子具囊膜、近圆球形, 直径 67nm 左右, 病毒在体外不稳定, 可通过嫁接、菟丝子和汁液传染。进行了初步的血清学检测试验。该病毒定名为 PhRLV, 可能是布尼亚病毒科番茄斑萎病毒属的一个成员, 是国内外首先研究报导的一种新的桃树病毒病。

桃树红叶病是生产上多年未解决的未知疑难病害。据悉, 60 年代初, 在京郊个别桃树上已有发生, 在杭州也有发现。此病影响桃树树势, 降低抗逆性, 常导致“芽枯枝死”, 削弱树冠生长, 造成减产 (减产三成以上) 甚至绝产, 显著缩短桃树的经济寿命。由于病因不明, 防治不力, 致使该病蔓延加剧。本课题曾对我国主要桃产区九省 (市) 进行了该病病情考察, 在 50 个桃园、213 个品种中有 74.19% 的桃园、84.04% 的品种有此症状^[5]。可见, 桃树红叶病对我国桃树生产和科研已构成潜在的威胁。

经联机检索, 国内外未见类似病害的报导。鉴于此, 1982 年开始立题研究。1982~1984 年进行了病情调查、症状观察、土壤及叶片营养分析、交互嫁接等研究, 确定该病的侵染性。1985~1990 年经分离培养排除真菌和细菌病害的可能, 经核酸电泳检测排除类病毒侵染, 经四环素治疗试验、组织超薄切片电镜检测排除类菌原体病害, 继而进行了一系列病毒诊断鉴定研究。

1 材料与方 法

1.1 症状观察 (简略)

* 国家自然科学基金部分资助项目。

** 裴维蕃教授一贯过问本课题的研究, 曾得到沈雱、郑开文、杨士杰等教授及杨学楼研究员的指导和支持, 前后有蔡祝南、李港丽、石蕴莲、王惠敏、陈炜、姜春晓、周晓峰及学生王石忠、冯丹、白绿江、刘庆发、曾贤杰、罗美雨、赖宝红、傅振光、程荣徽、彭日荷、杨永智和刘万年、陈吉坦等参加了部分工作, 在此一并致谢。

定园、定树、定期观察田间症状演变过程,分析各类症状与该病的相关性;定期取芽、叶、枝等作解剖观察,研究组织细胞的病变特征和对器官发育的影响。壕沟法观察根系。

1.2 营养分析和营养补给(简略)

1.2.1 营养分析 定园、定品种、定树、定叶序,于5月显症期、7月隐症期分别取健、病树叶样和土样。按常规程序制叶样,N用开氏法、P用钒钼黄法、B用甲胺法、K用火焰光度法、Ca、Mg、Fe、Zn、Mn、Cu等用原子吸收分光光度法测定。土样按常规方法测定。

1.2.2 营养补给 用定位滴注法为局部枝条注入B、Fe、Zn、Mn、Mo等营养元素,用土施和叶面喷施法施硼。

1.3 侵染性试验

1.3.1 田间健、病树交互嫁接试验 用定位嫁接法(即选定寄主新梢上相同序位的两叶之间进行嫁接,随即在接口上1~2个芽处短截以诱发嫩芽供症状观察)接种。观察症状。

1.3.2 隔虫网室桃、山桃实生苗嫁接和定位注毒法接种试验 接种物为田间病树单株(3-2-4等)。方法同上。观察症状并回接于毛桃实生苗,以免疫双扩散法和ELISA法检测病毒。设空白对照,即仅剪砧不嫁接。

1.4 病原病毒诊断

1.4.1 ds-RNA提取和检测 取病树新梢、叶、枝皮等组织,按常规方法提取ds-RNA。琼脂糖凝胶电泳和丙烯酰胺凝胶电泳检测核酸谱带。设健株和CMV、TMV对照。

1.4.2 病原病毒提取 定园、定树、定期取梢叶-25℃冻藏待用。提取缓冲液选用磷酸缓冲液或磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,添加剂为2-ME、EDTA-Na、DIECA和NaN₃。提纯方法要点:液氮粉碎,冻融,离心,二次PEG沉降和超速离心。测定提纯病毒的紫外线吸收特点、电镜检测和回接毛桃和阿尔巴特桃。

1.4.3 病毒粒体观察 用JEM-100CX透射电镜检测、照像。提纯病毒和病叶汁液样品用UA或PTA负染。病组织叶、叶柄、芽及梢皮等材料按常规方法制作超薄切片,醋酸双氧钒铀和柠檬酸铅双染色。

1.4.4 体外稳定性检测 以PhRLV的枯斑寄主蕃杏为试材,按常规方法测热钝化温度、稀释限点和体外存活期。

1.4.5 抗血清制备和检测 以上述提纯病毒按常规方法制备抗血清,提纯抗血清LgG。以微量沉淀、免疫双扩散、免疫电镜及ELISA等方法进行血清学检测。

1.4.6 传染方式和寄主范围 用上述定位嫁接(用芽、梢皮或枝段)和定位滴注接种3科6种(品种)寄主,用常规摩擦接种8科20种(品种)寄主,用浸根法接种1种寄主,用菟丝子接种2种寄主。

2 结果与分析

2.1 桃树红叶病的主要症状特点

叶片 春季,红化是主要症状,其红色自叶尖向叶基递减,与正常树春季低温时的红化的颜色与分布不同,有的病叶伴有侧脉间失绿。上述症状有季节隐潜特性,随气温升高,红花叶褪红转绿,重症叶则脱落或枯萎。在北京5月下旬进入隐症期。后期的嫩梢症状轻微不

易识别。春季若连续低温或阴雨，重症红叶则全部枯死，导致“芽枯枝死”。这种现象常发生在树冠上部（如延长枝），严重扰乱树形，抑制了树冠扩大。除上述症状外，病树上还见到失绿、红斑和叶片扭曲、皱缩、纵卷以及质地硬脆等症状。

花 出现不同程度的病变，如花冠发育受抑而呈漏斗状小花、花蕾不开绽而萎蔫等。

果 圆桃品种常显现畸变似“鹰嘴”的“尖果”，口味淡，品质下降。

根系未见特异性病变。

可见，红叶病可引起各器官产生病变，表现系统性症状，对桃树生长发育有明显地影响和危害。

2.2 病因试验结果分析（1982~1986年）

2.2.1 营养诊断 在症状显、隐期，对健、病树的叶片和土壤的营养分析结果，经生物统计分析表明，健、病树的营养元素含量差异不显著。微量元素施肥试验也无明显效果。证明该病并非营养失调所致。

2.2.2 病害流行特点 1982~1984年对4500余株树逐株调查结果发现，发病株率逐年增加，病情逐年加剧，田间病株群体呈中心式分布，具侵染性病害群体分布特点。

2.2.3 传染性试验 通过田间健、病株的交互嫁接和毛桃实生苗定位嫁接和定位滴注接种试验，供试寄主均表现典型红化症，从而确诊该病为侵染性病害。

2.3 桃树红叶病病原病毒诊断研究

2.3.1 寄主范围测定（1984~1990年） 实验证明芽接、皮接和滴注等方法接种均使桃和山桃致病。曾用多种方式对8科20种（品种）草本植物接种红叶病。全部用摩擦接种，其中13种显局部症状，如蕃杏呈枯斑症；3种显系统性症状，如早金莲、千日红显侧脉间失绿症，千日红萎蔫症；4种未显症，如长春花等。长春花不易摩擦接种，但可通过嫁接、滴注、浸根及菟丝子传毒致病，并均显系统性侧脉间失绿症、幼叶黄化、失绿皱缩等症状，用这些方法接种可使千日红显现与摩擦接种相同症状。蕃杏、早金莲进行了血清学、电镜检测，初步确定蕃杏可作红叶病的鉴别寄主。多数显症寄主则有待进一步检测验证。花生、蕃茄未显症，其原因有待进一步研究。

2.3.2 ds-RNA提取与检测 1987~1992年对病树的花、叶、枝皮及根等组织进行ds-RNA的提取和检测的结果，它们均有稳定的三条核酸谱带，而健康对照没有相应谱带，因此认为桃红叶病株中可能有RNA病毒存在^[6]。

2.3.3 桃树红叶病病原病毒提纯 提纯病毒制样以UV-190型双光束分光光度计检测结果（如图2所示）具有典型的核蛋白的紫外线吸收特点，其吸收峰在258，A₂₆₀/A₂₈₀的比值为1.4，核酸约占9.5%^[2]。电镜检测提纯液和超薄切片样品均见到近球形病毒粒子（见图1，3）。以提纯病毒接种的毛桃和阿尔巴特桃实生苗，其红化症显症率分别达84.38%和66.67%，证实了提纯病毒的致病性。

免疫学反应：提纯病毒制备的抗血清用微量沉淀法与病株汁液反应成絮状沉淀；用免疫双扩散法则与病株汁液形成可见的沉淀线；提纯病毒用免疫电镜诱捕和修饰法观察到被修饰的病毒粒子。至此，通过以上试验检测可以证明提取的球形病毒为红叶病的病原，定名为桃红叶病毒（PhRLV）。

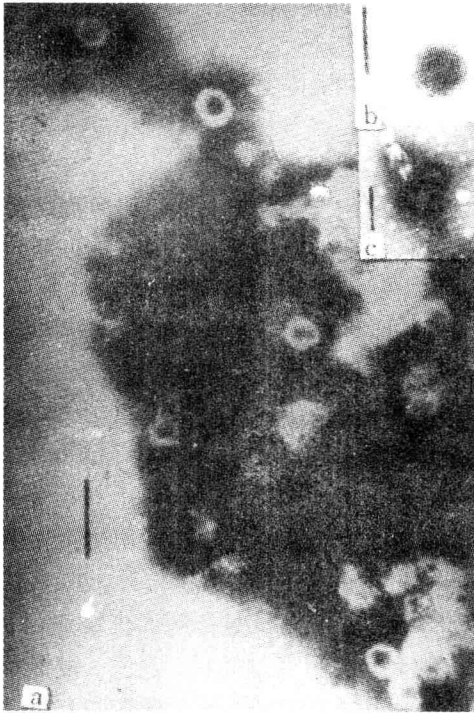


图1 提纯的 PhRLV 颗粒

- a PTA 染色 标尺为 200nm
- b UA 染色 标尺为 50nm
- c 免疫电镜 标尺为 100nm
UA 染色

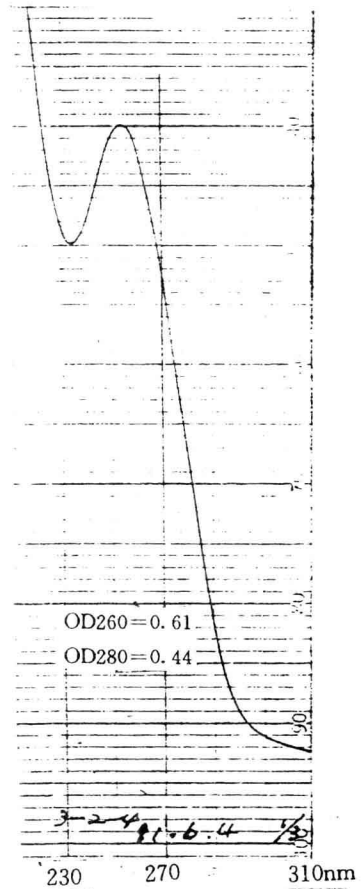


图2 提纯的 PhRLV
紫外吸收曲线

2.4 桃树红叶病病原病毒 (PhRLV) 的研究

2.4.1 PhRLV 形态特征 如图3所示, PhRLV 粒子呈近圆球形或圆球形, 具囊膜。粒子的大小: 提纯液中粒子的平均直径, PTA 负染的为 67nm ($n=49$), 用 UA 负染的为 56nm ($n=146$), 组织超薄切片用 UA 和柠檬酸铅染色的为 61nm ($n=84$)。有的粒子的囊膜不明显或观察不到, 可能与提纯或负染技术有关。

2.4.2 体外稳定性 PhRLV 在病叶粗汁液中温度高于 40°C 时, 其侵染力急剧下降 (40°C 时侵染率为 21.42%, 50°C 时为 4.65%), 其稀释限点为 $10^{-2} \sim 10^{-3}$, 体外保活期为 2~6 小时。可见该病毒稳定性差。

2.4.3 桃树红叶病的细胞病理研究 如图片2所示, PhRLV 粒子稀疏地分散在胞质的液泡里, 多数在其边缘。细胞发生多种病变: 部分细胞间隙离异, 细胞壁显著地膨胀 (约 2~5

倍)、疏松, 并出现空洞; 细胞液泡化, 致使胞质和细胞核紧贴于壁; 细胞质呈絮状; 细胞器如内质网、叶绿体、同化淀粉等发生变性; 细胞核也出现病变空洞, 甚至整个细胞变性。

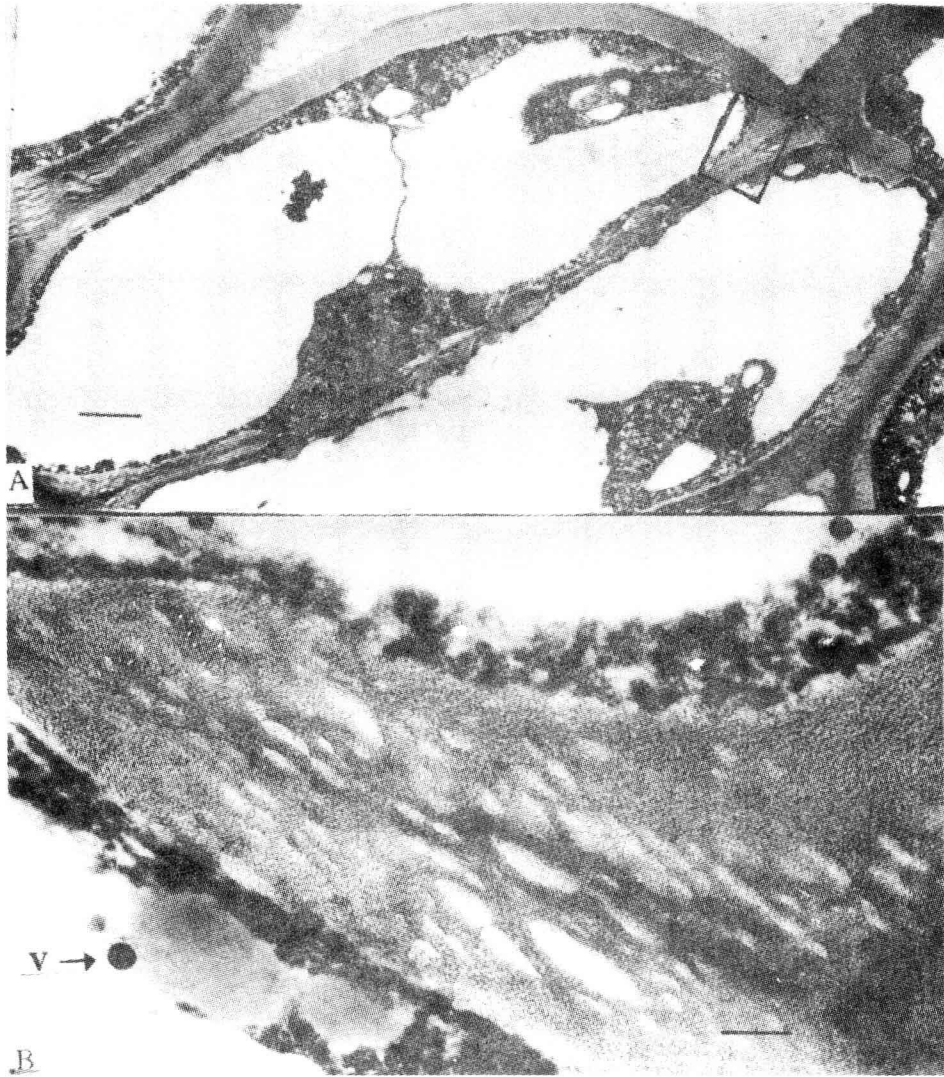


图 3 感染 PhRLV 的桃叶细胞

- A 细胞液胞化。PhRLV 粒子在液泡内, 多数在其边缘
 B 膨胀疏松的细胞壁和 PhRLV 粒子及絮状细胞质, 标尺为 200nm
 V—PhRLV

3 讨 论

通过一系列试验研究证实该病并非单纯的生理病害, 而是具有侵染性的一种新的桃树病毒病。PhRLV 是其致病病毒, 粒子尺度较大, 约 67nm, 近圆球形, 具囊膜, 在寄主体外稳定性差, 可以汁液、菟丝子传染。根据这些特性与已报导的 TSWV (50~85nm)^[3]相近, TSWV

基因组为三条 RNA，而 PhRLV 的 ds-RNA 也有三条谱带，但 PhRLV 粒子分布于液泡内，而 TSWV 是聚集在内质网之间^[3]。田间迹象表明 PhRLV 可能有传播介体。此外，试验中观察到实生桃幼苗即显现红化和侧脉间失绿症，不能排除种传可能。鉴于 TSWV 只由蓟马传染，并有广泛的寄主范围，因此，对 PhRLV 介体需深入研究。

由于该病毒稳定性差，难以提纯，免疫原性弱，血清反应不稳定，仍需继续研究实用的检测技术。

鉴于上述的特征特性初步认为 PhRLV 可能是一种新病毒，属于布尼亚病毒科蕃茄斑萎病病毒属。有关分子生物学特点、免疫特性等研究正在进行。

参考文献

- 1 裴维蕃主编. 1985,《植物病毒学》 科学出版社。
- 2 田波,裴美云编. 1987,《植物病毒研究法》(上册) 科学出版社。
- 3 库尔斯塔克主编;裴美云译,田波校. 1991,植物病毒比较诊断指南. 339~353 农业出版社。
- 4 周慧文 1985,山西果树(1)。
- 5 Zhou, H. W. et al. 1993, PHIRD INTERNATIONAL TEACH CONGRESS (Abstracts) 81 CHINA AGRICULTURAL SCIENTECH PRESS.

A NEW PEACH DISEASE CAUSED BY TOSPOVIRUS

Zhou Huiwen Yang Li Jia Kegong
(China Agricultural University, Beijing 100094)

Wang Hanzhong Luo Jing

(Virus Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

Abstract Peach red leaf disease has been observed and spreaded since 1980s. It showed complex symptoms including reddish colour on young leaves, sprout necrosis and seasonal masked symptom. The disease caused reduction of yield and shortening of economical life.

Detective tests have been done for fungi, bacteria, viroids, MIOs and viruses. Results of infectional experiments, ds-RNA detection suggested the pathogen of the disease might be virus. The purified virus from infected peach tissue showed typical ultraviolet absorption of nucleoprotein. Studies of electron microscopy for infected leave and purified preparation showed spherical particles with envelope were 67nm in average diameter. The preliminary study suggested the virus might be a member of Tospovirus, Bunyaviridae and named Peach red leaf virus (PhRLV).

水稻瘤矮病毒的抗血清制备和室内检测*

郭松 张曙光 范怀忠**

(华南农业大学植保系, 广州 510642)

提要 水稻瘤矮病是一种维管束性病毒病, 病组织里病毒含量极少, 提纯较为困难。本研究采用蔗糖垫层差速离心法成功地提纯了水稻瘤矮病毒 (RGDV), 制备了其专化性抗血清, 用小试管沉淀法测其效价为 1:512。利用提纯的病毒样品和水稻瘤矮病叶粗汁液样品进行了三种检测方法 (普通 ELISA、ELISA (所用的洗涤液 PBST 中加入 2%PVP, 简称 ELISA (+PVP)) 和 BA-ELISA) 的灵敏度比较, 结果以 ELISA (+PVP) 与 BA-ELISA 法灵敏度较高。而三种 ELISA 法的非特异性反应, 则以 ELISA (+PVP) 法最低。对病毒浓度在病株中的分布和时间变化的研究表明: 带外鞘的假茎部病毒含量较高, 以接种后 35 天左右的病毒浓度最高。首次用 ELISA (+PVP) 法和免疫电泳法检测传毒介体电光叶蝉的带毒率, 与生物测定相比较, 符合率分别为 81.48% 和 79.63%。这一结果为预报病害发生流行研究提供了较好和简便可行的方法。

关键词 水稻瘤矮病毒 抗血清制备 室内检测

水稻瘤矮病 (Rice Gall Dwarf Virus, RGDV) 在泰国、马来西亚和我国都有报道^[1,2,3]。在广东已研究了发生流行规律, 提出较为有效的综防措施^[4]。但由于未能制备其抗血清, 无法检测在病害发生前其介体昆虫电光叶蝉 (*Recilia dorsalis* Motsh) 的带毒率, 对病区发病流行趋势无法预测, 往往错过防治良机。

对昆虫介体带毒率的测定, 过去一般采用生物接种法, 但此法工作量大, 实验周期长, 测定的介体数量有一定限制。这就急需筛选出一种快速、简便、灵敏度高、取样测定量大的血清学方法。对于 RGDV 的虫媒介体及其病株的检测, 国外曾采用常规间接 ELISA 等方法^[5,6], 而国内至今未见应用血清学方法检测该病。

本研究以人工接种病株为材料, 进行了病原提纯、抗血清制备和昆虫介体带毒率的检测等探索性研究, 以为 RGDV 的检测、病害流行测报和综合防治等的深入研究提供理论和应用依据。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻瘤矮病典型病株采自广东茂名市病区, 介体电光叶蝉采自广州无病区, 人工饲养繁殖保存。

* 农业部和广东省农委八五资助项目。

** 华南农业大学王振中教授在数量统计方面给予指导, 林孔勋教授协助英文翻译, 谨此致谢。

供试病稻为人工接种，品种为珍桂矮（由广东省农科院植保所提供）。

免疫动物为新西兰长耳雄性白兔（由广东省农科院畜牧所提供）。

1.2 病毒提纯

采收接种后 35 天左右的病株 400g，液氮研磨粉碎，加 3 倍 pH7.0 的 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液（PBS），静置过夜，经 4000r/min 离心 30min，取上清液，加入 20%（CHCl₃-CCl₄）（v/v），搅拌，4000r/min 离心 20min 后弃沉淀，于上清液中加入 6%（W/V）聚乙二醇（PEG，MW6000）与 3%NaCl，充分搅拌，在 4℃下静置过夜，12000r/min 离心 20min，取沉淀，以 0.01mol/LPBS 悬浮抽提 3 次，合并上清液。取上清液加 20%蔗糖垫层，35000r/min 离心 90min，沉淀悬浮抽提 3 次，合并上清液，即为用作免疫抗原的 RGDV 提纯制剂。提纯的病毒制剂经紫外吸收光谱、电镜观察，以了解抗原的性质。按同样程序提纯健康组织汁液作为对照。

1.3 抗血清的制备

按常规方法，用上述提纯的病毒制剂为免疫原免疫 2.5kg 新西兰长耳白兔，制备血清，于 -20℃下储存备用，并以小试管沉淀法按倍比稀释，测定其效价。

1.4 血清学反应

1.4.1 三种间接 ELISA 法的灵敏度比较

（1）普通 ELISA 法 按常规方法进行，供试病毒分别为 RGDV 的病株粗汁液所含病毒和提纯的病毒制剂，以 1：20 为初始浓度，进行倍比稀释。抗血清为制备的 RGDV 抗血清。

（2）ELISA（+PVP）法 同（1）法，但洗涤液 PBST 中需另加入 2%PVP。供试病毒和抗血清同上。

（3）BA-ELISA 法 参考胡广淦方法^[7]。供试病毒和抗血清同上。

以上各法均以提纯的健株组织溶液为阴性对照。重复三次。

1.4.2 三种间接 ELISA 法的非特异性反应比较 以 10 倍健株汁液为初始浓度，用 0.05mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃（pH9.6）缓冲液作倍比稀释，分别采用上述三种 ELISA，测定其在 492nm 处的 OD 值。重复三次。

1.4.3 抗血清的吸附 按文献方法^[8]对 RGDV 抗血清进行吸附，采用普通 ELISA 法检测其吸附效果。

1.4.4 免疫琼脂双扩散反应 按常规方法制备琼脂平板，用经过吸附的抗血清，平板培养皿于 37℃下孵育，并以健株汁液作对照。

1.4.5 病株不同部位的病毒浓度的检测 用接种后 35 天的典型病株，按根、假茎（带外叶鞘）、叶片、假茎（不带外叶鞘）等部位各取 1g，分别匀浆离心，取上清液，用 ELISA（+PVP）法检测病株不同部位病毒的相对浓度，重复三次。

1.4.6 接种后的病株在不同时间的病毒浓度测定 保毒的电光叶蝉传毒饲育的稻株于出现症状后第 1、5、10、15、20、25 和 30 天各采 1g，分别匀浆离心，取上清液，用 ELISA（+PVP）法测其病毒浓度，并以健株汁液为对照，重复三次。

1.5 带毒昆虫介体的检测

1.5.1 供试虫的准备及生物测定 用人工饲养的无毒电光叶蝉 2~3 龄若虫，置于病株上获毒饲育 48h，转移于健苗上饲育 15 天，再用 3 叶龄稻苗 1 虫/苗置于编号试管中传毒饲育，每

48h 换苗一次, 连续三次。稻苗按编号置于植物防虫网室中, 发病稳定后记录病株号。虫子按编号回收贮于 -20°C 冰箱中备用。

1.5.2 ELISA (+PVP) 法 参照前人方法^[9], 将上述备用试验虫剪去翅、腿及第四节以下腹部, 每头置于一个消毒研钵中, 加 $200\mu\text{l}$ PBS-T 缓冲液 (含 2%PVP 的 0.02mol/L pH6.5) 匀浆, 2500r/min 离心 15min, 取上清液供试。按 ELISA (+PVP) 法流程检测, 反应终止后, 于酶标比色计 492nm 处测 OD 值。

1.5.3 免疫电镜法 免疫电镜铜网制作法采用胡伟卢等方法^[10]。并用以与上述 ELISA (+PVP) 法的灵敏度相比较。

2 结果与分析

2.1 病毒的提纯

病毒提纯制剂经负染后在透射电镜下观察可见样品较为纯净, 病毒粒体形态大小一致, 典型球状 (图 1), 直径约为 60nm。对照未见有病毒粒体。

提纯制剂的紫外吸收扫描图谱呈典型的核蛋白紫外吸收峰 (健株对照没有), 吸收峰最高为 260nm, 最低为 240nm, 其 $\text{OD}_{280/260} = 0.76$, $\text{OD}_{260/240} = 1.05$, 表明提纯制剂的纯度较高, 与电镜观察结果相符合。

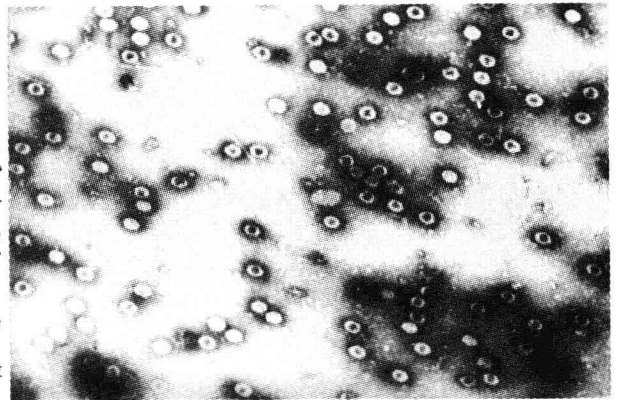


图 1 RGDV 提纯制剂电镜照片 (35000 \times)
Fig.1 The purified RGDV particles (35000 \times)

2.2 抗血清的制备及效价测定

以病毒提纯制剂为抗原所制成的抗血清, 其效价为 1:512。

2.3 血清反应

2.3.1 三种间接 ELISA 法的灵敏度比较 以病毒提纯制剂, 病稻粗汁液及其抗血清为试验材料, 对 3 种间接 ELISA 检测法进行了比较。结果以普通 ELISA 法灵敏度最低, 其检测的病株粗汁液的最大稀释倍数为 1:20, 提纯制剂的稀释倍数为 1:1280; 而 ELISA (+PVP) 法和 BA-ELISA 法的灵敏度相同, 其检测病株粗汁液最大稀释倍数均为 1:80, 提纯病毒制剂的最大稀释倍数均为 1:2560。三次重复结果相同。

2.3.2 三种间接 ELISA 法非特异性反应比较 用健株提纯液为材料, 对三种 ELISA 法的非特异性进行比较, 结果普通 ELISA 法的 OD 值最高, BA-ELISA 的次之, ELISA (+PVP) 的明显较低, 三次重复的数据经 t 检测, ELISA (+PVP) 法与普通 ELISA 法和 BA-ELISA 法间差异显著。

2.3.3 RGDV 抗血清的吸附试验 吸附效果经普通 ELISA 法测定的结果表明, 用未经吸附的抗血清, 其阳性反应呈明显深褐色, 可是健株对照虽是阴性但也显出一定程度的褐色; 用吸附过的抗血清, 则阳性反应的颜色变化不大, 而健株对照则基本上没有褐色。这说明: 用健株汁液来吸附抗血清可有效的消除非特异反应。因而以下实验均采用经过吸附的抗血清。

2.3.4 免疫琼脂双扩散反应 试验结果表明, 经吸附的 RGDV 抗血清分别与 RGDV 提纯制