

大豆病毒的提纯鉴定和电镜观察*

林建兴 张性坦 柏慧霞 张帆 赵存

(中国科学院遗传研究所)

摘 要

危害我国大豆的主要病毒病有三种,即花叶病、芽枯病和矮化病。应用差速离心法成功地从京黄3号、科黄2号和铁丰18号分离出花叶病的病毒;从丹东青豆的杂种中分离出芽枯病毒。花叶病毒颗粒为长而弯曲的线形,平均长度为661.2nm,宽度为13.9nm。芽枯病的病原为球形的烟草环斑病毒,平均直径为29.5nm。花叶病与籽粒褐斑的关系的研究结果证明,种子产生斑驳是由大豆花叶病毒引起的。抗病品种的褐斑率明显低于敏感品种。根据病毒病的鉴定结果,京黄3号等感染的花叶病,植株矮化不明显,种子容易生褐斑,称之为典型的普通花叶病(SMV-G);而铁丰18号感染的花叶病,植株矮化明显,籽粒不生褐斑,称之为矮缩型花叶病(SMV-D)。供试品种中抗花叶病最强的品种是科黄3号。丹东青豆的杂种以及日本的宫城白眉和大青豆则是烟草环斑病毒(TRSV)感染的芽枯病。这些品种严重染病,颗粒无收,利用价值不大。

前 言

危害我国大豆的病毒病有花叶病,黄花叶病、芽枯病和矮化病等。花叶病是最普遍的病毒病,可使大豆减产10—70%,品质变劣,籽粒产生褐斑。芽枯病和矮化病是毁灭性的病毒病,染病植株几乎颗粒无收,但籽粒不产生斑驳。前人对大豆花叶病和芽枯病的病症,寄主范围和传毒途径进行过许多研究^[1,4-8]。对花叶病毒的分离、提纯和电镜观察则研究得不多^[5,9]感染大豆的芽枯病的病毒分离成功的报道更少^[10]。

大豆种子产生斑驳的原因是个长期争论的问题,有些作者认为籽粒褐斑是由花叶病毒感染引起的^[1,2,12],另一些人则认为与病毒病无关^[11]。针对以上问题我们于1973—1974和1979年研究了病毒的提纯、鉴定和电镜观察;1976至1977年在尼龙网内隔离条件下研究了花叶病与籽粒斑驳关系。试验结果报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 材料

分离和提纯大豆花叶病毒和芽枯病毒的品种有京黄3号、科黄2号、铁丰18号和丹东青豆的杂种后代。京黄3号作为研究花叶病和籽粒褐斑关系的毒源。供试品种中敏感

* 牛德水、丁家炳等同志参加部分工作。

电镜观察与照相得到中国科学院北京生物实验室技术中心电镜室和遗传所电镜室的帮助,深表感谢。

品种(系)有丰收14号、延7001—24, 群选75—4和京黄3号。抗病品种有科黄3号、徐州424和齐黄1号。接种方法主要利用带毒蚜虫传毒。

(二) 方法

1. 病毒的提纯——综合前人提纯大豆花叶病毒和烟草环斑病毒的方法^[5,9,10,13], 制定如下提取病毒的程序。

A. 提纯大豆花叶病毒的程序

- (1)、收集染病新鲜叶100—200克, 在 -20°C 下冷冻直至叶片变硬;
- (2)、把病叶放入含有1% 噻基乙醇的 pH7.0的0.5M磷酸缓冲液(等量或二倍于病叶重)在匀浆器内匀浆;
- (3)、用两层纱布过滤粗液汁, 除去残渣;
- (4)、100毫升提取液加入7毫升正丁醇(边加边搅动)直至出现明显的乳凝现象为止, 在 4°C 冰箱中放置30分钟以上或放置过夜;
- (5)、在高速离心机 2°C 条件下用每分钟4千转离心15分钟, 倒出上清液;
- (6)、上清液再于25型高速离心机 2°C 条件下用每分钟8千转离心10分钟, 以除去细胞残余和其它大分子的植物组分, 倒出上清液;
- (7)、上述上清液通过4号(G_4)细菌漏斗抽滤得到一种琥珀色的清晰液体然后在50TC型超速冰冻离心机上, 在 -4°C 下用每分钟3万转离心90分钟, 病毒颗粒沉降为丸球物附于管壁, 把上清液倒掉;
- (8)、每个离心管加入0.01M 磷酸缓冲液2.5—5毫升(pH8.0—8.2), 离心管放在每分104次的摇床上振荡30分钟;
- (9)、将上述各离心管的悬浮液混合起来在冰冻离心机上离心10分钟(8000转/分), 得到一种双折射很强的上清液, 供制片用。

B. 提纯烟草环斑病毒的程序

- 1)、采集100—200克新鲜病叶冰冻后加入两倍或等量病叶重的0.01M磷酸缓冲液(pH7.0)在匀浆器中匀浆, 匀浆后用两层纱布过滤, 弃残渣得粗液汁;
- 2)、两个体积的 4°C 的正丁醇和氯仿混合液(1:1v/v)慢慢地加入一体积的粗液中, 搅动15分钟使之乳化, 然后用每分钟3千转离心30分钟, 结果形成三层液相;
- 3)、把每个离心管的上面液相取出混合之, 盖上盖放在 $20-22^{\circ}\text{C}$ 室温下12—16小时, 这时非病毒的蛋白质变性, 并沉至管底;
- 4)、悬浮液在冰冻离心机上用每分钟6—8千转离心30分钟得到琥珀色上清液, 用 G_4 细菌漏斗抽滤;
- 5) 上述上清液在50TC型超速离心机上用每分钟3万转离心1.5—2.0小时, 病毒丸球附于管壁;
- 6)、用0.01M磷酸缓冲液(pH7.0)溶解病毒丸球, 每个离心管加入1.5—3.0毫升, 在 4°C 冰箱内放置过夜;
- 7)、上述病毒悬浮液用每分钟3千转离心15分钟, 得到澄清的病毒溶液, 供制片用。

2. 制片和电镜观察——上述两种病毒溶液分别用细滴管滴到已制备好的铜载网上, 干燥后用铬投影。病毒制片在HV-11A型的电子显微镜下观察并照相。

3. 研究花叶病与籽粒斑驳的关系的方法: 将无毒种子分成两半, 一半种在尼龙网内隔离条件下(无毒源的条件), 另一半种在尼龙网边的大田, 利用带毒大豆蚜传毒。生育期内逐株记载叶部发病的症状。收获时单收单株脱粒, 考察其褐斑率和百粒量。

研 究 结 果

(一) 病毒病症状的观察研究

1. 大豆花叶病——供试品种中的多数品种感染的是普通花叶病, 它们是由种子带毒的。调查结果表明, 京黄3号和科黄2号种子带毒率分别为5.6%和6.5%。幼苗期由于蚜虫传毒, 在两星期内几乎所有植株都感病。以带毒种子长出的幼苗在初生叶的叶脉两侧呈现透亮, 逐渐形成浓淡不同的绿色镶嵌症状(花叶)。随后第一个复叶出现叶片皱缩、退绿、沿着叶脉两侧有水泡状的隆起。老叶明脉也是常见的, 叶片边缘通常两边向下, 顶端向上卷曲(图1)。接近成熟的叶子变成粗糙的, 容易破碎。严重染病的植株矮化, 叶柄和节间变短。感病植株着生豆荚少, 有些豆荚侧面弯曲或卷曲, 豆荚上茸毛也显著减少。重病植株豆荚不结籽, 或者豆粒明显变小或畸形。籽粒上产生斑驳。大豆的产量和质量明显受影响。

2. 大豆芽枯病——大豆芽枯病也是种子带毒, 以带毒液汁摩擦之, 极易传染病毒。芽枯病最明显的特征是染病幼苗的顶芽扭曲形成弯曲状植株。顶芽及侧芽的嫩叶出现很小褐色枯斑, 这些病叶轻轻一触极易脱落。重病植株的叶子和幼芽全部脱落形成枯株或者在植株底部留下少数几个老叶, 叶片粗糙似革状(图2)。大豆整个生育期都能感病; 如果开花后感病, 通常豆荚发育不好, 甚至败育。结荚后染病, 豆荚产生大的枯斑和块斑(图3)。这些豆荚不会结籽, 提前脱落。上述观察结果表明, 芽枯病是毁灭性病毒病, 严重染病品种(如宫城白眉等)颗粒无收。

3. 大豆矮化——染病植株严重矮化, 叶柄和节间明显缩短。植株非常矮小, 只有10厘米或10多厘米高, 通常在开花前死亡。矮化病也是毁灭性病毒病, 严重感染植株颗粒无收。

(二) 大豆病毒的分离提纯和电镜观察

1. 大豆花叶病毒的分离提纯和电镜观察——应用差速离心法成功地从京黄3号和科黄2号分离出花叶病毒的颗粒。电镜观察结果表明, 病毒颗粒为长而变曲的线形, 平均宽度为13.9毫微米, 长为661.2毫微米(图5)。

1979年铁丰18号严重感染病毒病, 植株明显矮化, 叶柄和节间变短, 顶部嫩叶产生花叶(图4), 单产只有76斤。应用差速离心法成功地从病叶分离出病毒颗粒。电镜观察结果表明, 病毒颗粒是长而变曲的线形, 与花叶病毒颗粒相似。根据发病症状, 我们怀疑它是花叶病与矮化病双重感染的结果, 但从病叶的提取液中未能分离出矮化病毒的颗粒。

2. 芽枯病毒的提纯与电镜观察——应用差速离心法成功地从丹东青豆杂种病叶组织的提取液中分离出病毒颗粒。电镜观察结果表明, 芽枯病的病毒颗粒为球形病毒, 平均直径为29.5毫微米(图6)。此结果证明, 感染大豆的芽枯病的病原与前人报道的在烟草上分离的烟草环斑病毒相似^[14]。

(三) 大豆花叶病与籽粒斑驳的关系

1969年在安徽省涡阳县用徐州302、吉林1号、大茧壳和北京黄豆等20多个品种作试验材料,观察结果表明,在同一品种只有染病植株生成褐斑病粒,而未染病的植株则没有。同一染病植株中染病枝条的豆粒产生褐斑,而健康的枝条则没有。以上结果初步证明褐斑病粒来源于感染花叶病的植株和枝条。为了进一步弄清产生斑驳豆粒的原因,于1976—1977年连续两年在尼龙网的隔离条件下研究花叶病与籽粒斑驳的关系。第一年在幼苗期把种子带毒的病株拔除,收获后的无病种子(脱毒)于第二年分成两半,一半种在尼龙网内,另一半种在大田。两年的试验结果都证明,用蚜虫或人工接种病毒的种子产生褐斑,相反在尼龙网内隔离条件下未接毒的敏感品种都不产生褐斑。1977年(第二年)的试验结果列入表1。

根据表1的资料可得如下结论:第一、在供试品种中没有对花叶病免疫的品种;第二、抗病品种齐黄1号和徐州424已开始丧失抗病能力;第三、籽粒斑驳是由花叶病毒引起的,无论是敏感品种或抗病品种,凡是蚜虫接毒的种子都产生褐斑,前者比后者严重;而不接毒的种子都不产生褐斑;第四、叶部染病(花叶)植株数与籽粒染病(褐斑)植株数是密切相关的,后者明显高于前者,这可能是叶部轻微症状不易为肉眼所觉察,实际上病毒已侵入叶片组织;第五、染病植株种子的百粒重明显下降,下降幅度为14.4—36.8%;第六,科黄3号的染病株数和褐斑率明显低于敏感品种,由此可见,抗病育种是十分重要的。

表1. 大豆花叶病与籽粒斑驳的关系 1977年北京

品 种 (系)	处理 方法	叶部染病 植 株 数 (%)	感病程度	籽粒染病 植 株 数 (%)	褐 斑 率 (%)	百粒重(克)		
						无病	轻病	重病
敏 感 品 种	延7001—24	1	100.0	++++	100.0	97.5	16.0	12
		2	0	0	0	0	17.0	
	群选75—4	1	71.8	++++	100.0	96.4	20.0	15
		2	0	0	0	0	22.0	
	丰 收 14 号	1	36.4	+++	100.0	96.3	15.0	13
		2	0	0	0	0	18.0	
	京 黄 8 号	1	60.0	+++	100.0	39.3	19.0	17.5
		2	0	0	0	0	20.2	
抗 病 品 种	齐 黄 1 号	1	31.2	++	100.0	23.3	17.0	17.0
		2	0	0	0	0	18.0	
	徐 州 424 号	1	23.6	++	64.7	10.9	12.0	11.0
		2	0	0	0	0	13.0	
	科 黄 8 号	1	11.2	+	9.1	3.2	12.5	12.0
		2	0	0	0	0	13.0	

※ 处理方法1 = 蚜虫接毒,方法2 = 尼龙网内隔离条件.(无毒)

(四) 大豆病毒病的鉴定结果

1. 大豆花叶病——根据染病植株的症状,病毒颗粒的形态特征以及籽粒产生斑驳的

原因,京黄3号、科黄2号、丰收14号、群选75-4、齐黄1号和徐州424等感染的病毒病是普通花叶病,染病植株矮化不明显,种子易生斑驳。铁丰18号感染病毒病后也产生花叶、病毒颗粒也是长而变曲的线形,但植株严重矮化,豆粒不生褐斑或极轻,可能是大豆花叶病毒不同生理小种感染的结果,故暂定名为矮缩型花叶病。此病与日本报道的萎缩病不同^[4]。

2、抗病品种的鉴定结果——60年代末70年代初期的抗病品种(齐黄1号和徐州424)到1977年已开始丧失其抗病毒的能力(表1)。染病最重的是齐黄1号,其次是徐州424。在这些品种中科黄3号的抗病性最强。

3、大豆芽枯病——根据染病植株的病症以及病毒颗粒的研究结果,丹东青豆的杂种后代感染的病毒病是由烟草环斑病毒引起的大豆芽枯病。从日本引入我国的品种,如宫城白眉、大白眉、大青豆以及我国丹东的大青豆感染的病毒病也是大豆芽枯病。北京多点试验结果表明,这些品种极易染病。严重的年份颗粒无收。在大田自然条件下我国多数品种对芽枯病的抵抗能力都较强,严重染病的品种极少。

问 题 讨 论

大豆花叶病前人已作过许多报道。Brandes 和 wettes 指出,在病毒的鉴定中病毒颗粒的形态学乃是有用的工具。他们列出花叶病毒的颗粒的长度为750nm^[15]。Quantz 记载了花叶病毒为线形颗粒,长748nm,宽12-13nm^[17]。Galvez 指出,由于凝聚作用使大豆病毒很难提纯,病毒浓度也是低的,因而在单一视野内观察到若干线形体仍然是低的。他记载了病毒的长度为625-725nm,宽15-18nm^[5]。我们利用锰基乙醇作为病毒颗粒的分散剂,通过差速离心法得到较满意的结果,在单一视野内看到较多的线形病毒,平均长度为661.2nm,宽为13.9nm。根据病毒颗粒的形态和病株的形态特征,京黄3号等感染的病毒病是典型的普通花叶病。许多作者指出,大豆芽枯病是由烟草环斑病毒所引起的^[6-8],但从染病大豆植株分离成功的报道则不多,据报道,烟草环斑病毒为球形病毒,通常直径为29nm,也有22nm或25nm^[14]。Fagbenle 记载了烟草条斑病毒引起的巴西芽枯病,病毒颗粒的直径为28-32nm。我们应用差速离心法成功地从芽枯病的病叶中分离出烟草环斑病毒,平均直径为29.5nm。根据发病症状和电镜观察结果,感染丹东青豆杂种等的芽枯病是由烟草环斑病毒引起的,而不是烟草条斑病毒。

豆粒产生斑驳的原因一直是个争论问题。上面已提到许多学者认为褐斑是由花叶病毒引起的,但也有人认为与病毒病无关。研究结论不一致可能与取材和试验条件有关。由于在栽培大豆中尚未发现免疫品种,只有抗病和敏感品种,它们极易由蚜虫和液汁接触传毒,如果种子不经过脱毒或隔离条件不严格都会给试验结果带来不利影响。日本人用不脱毒种子在尼龙网隔离条件下做试验得出如下结果:豆粒褐斑是花叶病毒引起的^[9]。我们第一年用不脱毒种子,第二年用脱毒种子在尼龙网内作试验得出了相同的结论(表1)。此外,病斑是否出现与外界环境条件也有关系。例如,徐豆4号和跃进5号在北京条件下花叶病严重,籽粒产生褐斑;但是黄淮地区的高温条件下花叶病和褐斑都很轻。值得注意的是,我们发现铁丰18号虽感染花叶病,植株严重矮化,比抗病品种减产2-3倍,但籽粒不生褐斑或极轻。由此可见,豆粒斑驳能否出现可能与花叶病不同株

系也有关系。Eui-Kyoo Cho 等提到花叶病病原的多样性。在98个分离物中归类为7个株系^[18]。张明厚等指出,花叶病中的黄斑型(SMV-Y),顶枯型(SMV-T)和皱缩型(SMV-C)都能引起籽粒褐斑^[1]。根据植株的病症,病毒颗粒的形态和花叶病与籽粒褐斑的关系,我们把发病出现花叶,叶片皱缩,卷曲,植株矮化不明显;病毒颗粒为长而弯曲的线形,长625—750nm,宽13—15nm;豆粒易生褐斑,如京黄3号等,称之为典型的普通花叶病(SMV-G)。凡是植物矮化明显,豆粒不生褐斑,其它性状如上所述的花叶病,如铁丰18号,称为矮缩型花叶病(SMV-D)。为了严格区分花叶病的不同株系,今后应进行血清学研究。

参 考 文 献

1. 张明厚 吕文清 钟兆西 1980, 植物病理学报10(2): 113—118.
2. 李 莹 1978, 油料作物科技, 1978(4): 46—52.
3. 林建兴 张性坦 赵 存 柏慧霞 江玉忠, 1979, 中国科学院遗传所研究年报: 163—165.
4. Koshimizu, Y., and N. Iizuka. 1963. Tohoku (Japan) Natl. Agr. Sta. Bull. 27: 1—103.
5. Galvez, G. E. 1963. Phytopathology 53: 388—393.
6. Althow, K. L. and J. B. Bancroft. 1959. Phytopathology 49: 697—701.
7. Kahn, R. P. and F. M. Latterell. 1955. Phytopathology 45: 500—502.
8. Crittenden, H. W. et al. Plant Dis. Rep. 50: 910—913.
9. Ross, J. P. 1967. Phytopathology 57: 465—467.
10. Steere, R. L. 1956. Phytopathology 46: 60—69.
11. Owen, F. V. 1927 J. Agr. Res. 34: 559—587.
12. Kennedy, B. W. and R. L. Cooper, 1967. Phytopathology 57: 35—37.
13. Fagbenle, H. H. and R. E. Ford, 1970. Phytopathology 60: 814—820.
14. Dunleavy, J. M. 1973. In B. E. Caldwell (ed) In Soybean: Improvement, Production and Uses, P. 505—519.
15. Brandes, J. and C. Wetters, 1959. Virology 8: 99—110.
16. Ross, J. P. 1969. Phytopathology 59: 829—832.
17. Quantz L. 1961. Phytopathology Z. 43: 79—101.
18. Eui-Kyoo Cho and R. M. Goodman. 1979. Phytopathology 69: 467—470.

PURIFICATION IDENTIFICATION AND ELECTRON MICROSCOPE OF VIRUSES INFECTING SOYBEAN PLANT.

Lin Jianxing, Zhang Xingtian, Bai Huixia, Zhang Fan, Zhao Cun
(Institute of Genetica, Academia Sinica, Beijing)

Abstract

Soybean mosaic, bud blight and dwarf are the three major viral diseases occurred in China. Soybean mosaic is caused by the soybean mosaic virus (SMV). This virus, classified as a flexuous rod, was isolated from varieties Jinghuang No.3, Kehuang No.2 and Tiefeng No.18. The virus particles were measured 661.2nm in average length and 13.9nm in width (Fig.5). The mosaic disease reduced seed yield from 10% to 70%, and the seeds from SMV-infected soybean plant, in general, were mottled. The percentage of mottled seeds of resistant varieties to SMV is markedly lower than that of the susceptible (Table 1). On the basis of symptomatology and the analytical results of relationship of seed coat mottling with SMV-infected plant, it was demonstrated that the mosaic disease may be caused by different strains of SMV, namely SMV-G and SMV-D. The SMV-G strain isolated from Jinghuang No.3 may affect the seed coat mottling and plant height which varies from normal height to slightly stunted plants with shorter internodes. The SMV-D strain isolated from Tiefeng No.18 can not affect the seed coat mottling, but the diseased plants become markedly stunted.

Soybean bud blight is a dangerous viral disease and is caused by the tobacco ringspot virus (TRSV). This virus was successfully isolated from the hybrids of Dandong Qingdou. The virus particle is a polyhedron 29.5nm in diameter (Fig.6). The bud blight significantly reduced the seed yield of soybean from 50% to 100%.



图1 花叶病

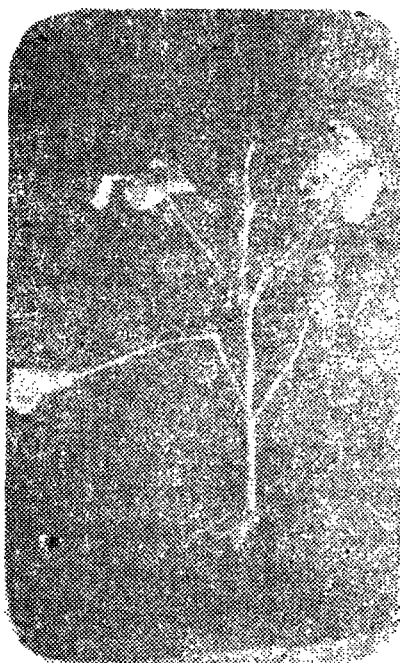


图2 芽枯病



图3 芽枯病
上病荚 下无病荚

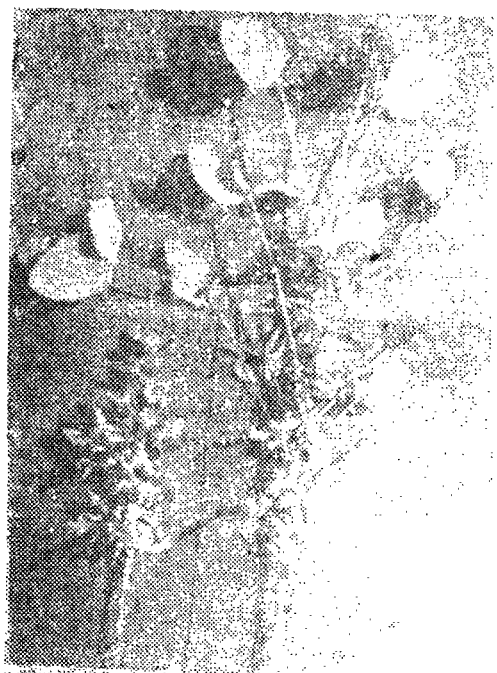


图4 花叶病

病株(1975年)
健康株(1975年)

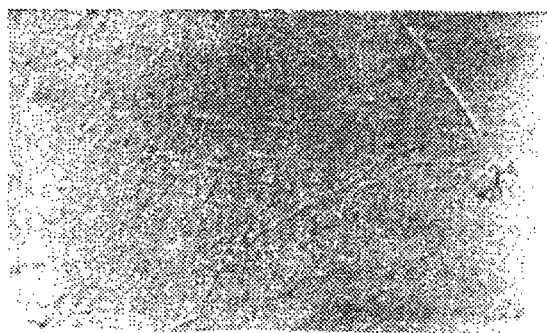


图5 花叶病毒($\times 56,000$)

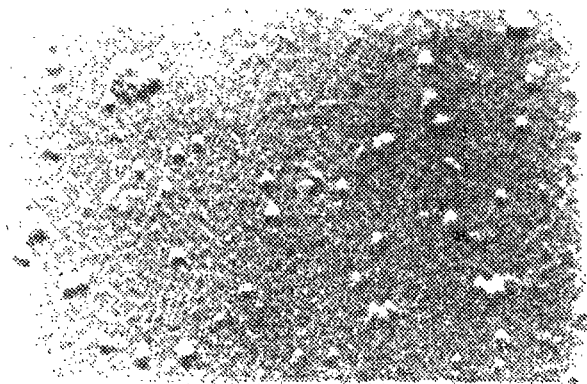


图6 芽枯病毒($\times 36,000$)