

桃蚜口针中病毒附着位点的免疫荧光标记定位*

吴云峰 魏宁生

(西北农业大学植保系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 桃蚜体内病毒附着位点(VAS)为 $65\sim 80\ \mu\text{m}$, 距下颚口针尖端约 $40\ \mu\text{m}$, 能亲和 CMV-T, 而无能力获得 CMV-NT。伴刀豆凝集素(ConA)仅能与口针表面的 VAS 发生亲和作用, 推测 VAS 是一种具有病毒受体属性的糖蛋白物质。

关键词 蚜传病毒, 桃蚜, 病毒附着位点, 定位, 细胞化学

中图分类号 S432.1, S432.23

蚜传病毒是植物病毒中一类重要病毒。据 Harris^[1]统计, 全世界有 193 种蚜虫可以传播 164 种植物病毒, 其中 109 种为非特性口针传病毒。基于非持久性病毒能够迅速被蚜虫获得和传播这一现象, 许多研究者认为, 蚜虫的取食和对寄主植物的选择习性在非持久性病毒的传播中起了重要作用, 并将非持久性病毒的传播归为简单的、被动的口针污染, 提出了“吸食-回吐传毒”假说^[2]。值得注意的是, 一些病毒可以通过口针传播, 另外一些病毒则不能。Kikumoto^[3]认为, 一些病毒不能通过口针传播是由于在刺吸时口针无能力获得这些病毒, 因而不能传毒。那么, 作为口针传毒的蚜虫, 是否口针上存在某些病毒附着位点(VAS)或病毒受体(VR)参与了获毒和传毒。在国外, 利用免疫乳胶^[4]和 ^{125}I ^[5]标记法对 VAS 有过探讨, 但尚无一致观点, 本研究选用桃蚜-CMV 组合, 利用免疫荧光抗体(Immunofluorescence antibody)标记病毒的方法^[6], 间接地确定了蚜虫口针中病毒附着位点, 为进一步开展 VAS 的分离、VAS 基因克隆和序列分析、体外表达及功能分析、传毒识别机制(理论)的完善和蚜传病毒病的综合防治提供了新的途径。

1 材料及方法

1.1 蚜虫的饲养及饲毒方法

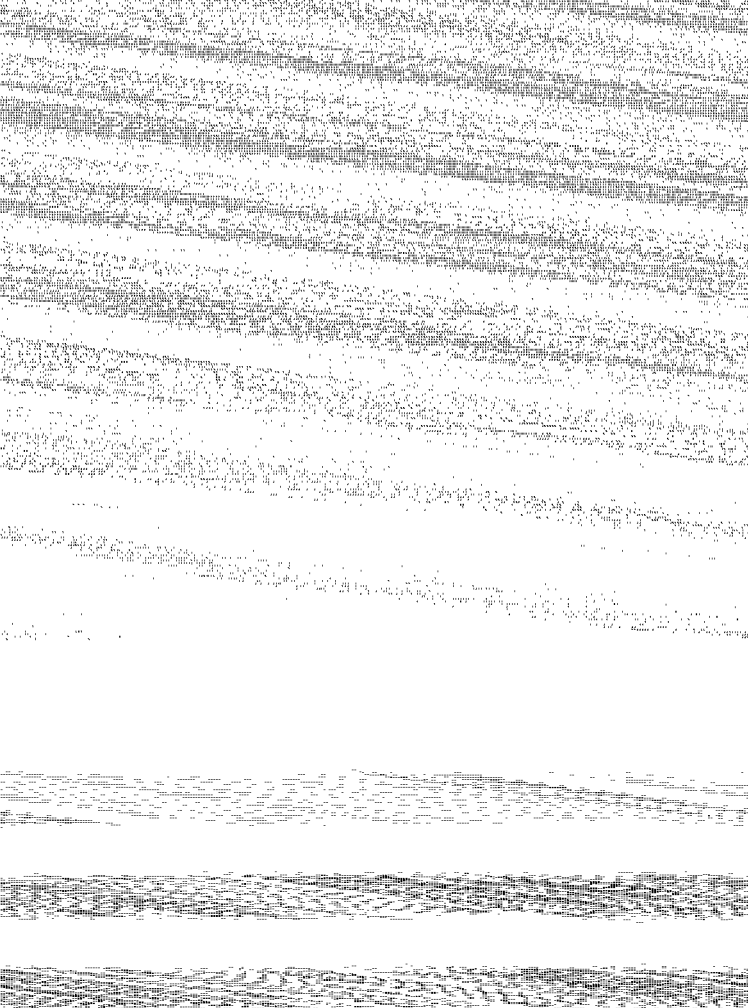
桃蚜(*Myzus persicae*)由西北农业大学昆虫生态室提供。饲养在防虫网室内的无毒普通烟草叶(*Nicotiana tabacum*)上, 经 3 次克隆后备用。按常规饲毒方法让蚜虫分别在 CMV-T 和 CMV-NT 毒源植物上稳定饲毒 5 min, 然后立即用液态氮杀死, 转移在 2.5% 戊二醛- $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 中固定。

1.2 IgG 及 FITC-IgG 的制备

取 1 mL CMV 抗血清(效价 512)加 9 mL 蒸馏水稀释, 再加 10 mL $80\%(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在室温下保持 1 h, 然后低速离心收集沉淀, 用 1 mL $0.85\%\text{NaCl}$ 溶液悬浮, 再经 DEAE-纤维素离子交换柱层析收集 IgG, 透析后备用。免疫荧光抗体的制备及纯化方法: 将 IgG 用 $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲液(pH9.5)稀释为 $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (或 $\text{OD}_{280}=1.45$), 再按

收稿日期: 1994-03-25

* 植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金资助项目



2.2 VAS 属性分析

用 Con A-FITC 对桃蚜下颚口针表面的 VAS 做亲和相关性分析,结果表明,Con A 能与 VAS 发生亲和,WGA 不能与 VAS 结合。ConA 和 WGA 仅与下颚口针中的 VAS 结合,与其他组织无反应(附图-4)。证明 VAS 含有 α -D-甘露糖基,具有特异性识别功能。

3 讨 论

自从 Doolittle 等^[8]用桃蚜将 CMV 传给健康植株首次完成了蚜虫传毒实验以来,人们就认识到蚜虫口针在非持久性病毒的传播中起了重要作用。1987 年 Pirone^[9]在总结了 Lim^[4]和 Berger^[5]等人的研究后,提出“蚜虫口针受体位点(Receptor sites in the aphid's mouthparts)”的观点,但迄今尚无直接的研究证据。

本文利用免疫荧光标记法成功地确定了桃蚜下颚口针表面 VAS 的位置;根据 VAS 能传带 CMV-T 而不能传带 CMV-NT,推测 VAS 与病毒之间存在识别亲和过程,而不是被动的口针污染。进一步用 Con A 对 VAS 做了亲和性分析,证实了在下颚口针表面, VAS 具有独特的分子组成。本研究在国内首次肯定了 VAS 的地位和作用^[10,11]。

参 考 文 献

- 1 Harris K F. Sternorrhynchous vector of plant viruses. *Advance in virus research*, 1985,28:113~137
- 2 Pirone T P, Harris K F. Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids. *Ann Rev Phytopathol*, 1977,15: 55~73
- 3 Kikumoto T, Matsui C. Electron microscopy of plant viruses in aphid midguts. *Virology*, 1962, 16:509~510
- 4 Lim W L, DE-zoeten G A, Hagedorn D J. Scanning electron microscopic evidence for attachment of a nonpersistently transmitted virus to its vector's stylets. *Virology*, 1977, 79:121~128
- 5 Berger P H, Pirone T P. The effect of helper component on the uptake and localization of potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology*, 1986, 153:256~261
- 6 Laubscher J M, Von Wechmar M B. Detection of aphid lethal paralysis virus by immunofluorescence. *Journal of invertebrate of pathology*, 1991, 58(1):52~56
- 7 Nicolau C. Virus-transformed cell membranes. London: Academic Press, 1978.149~159
- 8 Doolittle S P, Walker M N. Transmission of cucumber mosaic virus by aphids. *Phytopathol*, 1928,18:143
- 9 Pirone T P. Viral gene and gene products that determine insect transmissibility. *Seminar in virology*, 1991,2:81~87
- 10 Ammar E D. Electron microscopy of plant pathogens. Berlin: Springer-Verlag, 1991.133~146
- 11 Gildow F E. Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology*, 1993, 83:270~277

Location of Virus Attachment Sites (VAS) in the Stylets of *Myzus Persicae* by Immunofluorescence Label

Wu Yunfeng Wei Ningsheng

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract VAS, being 65~80 μ m as its size and located on the maxillae at about 40 μ m from the tip, can accommodate CMV-T, but not CMV-NT. And ConA can affinite only VAS on the stylet surface, which suggests that VAS be a glycoprotein substance with the property of virus receptor(VR).

Key words aphidborne virus, *Myzus persicae*, virus attachment sites, location, cytochemistry