

③

大麦黄矮病毒(BYDV-GPV)的循环传播机理

吴云峰¹ 李毅² 魏宁生¹ 成卓敏³ 周广和³ 杜志强³

(1 西北农业大学植保系, 陕西杨凌 712100) (2 北京大学生命科学院, 北京 100871)

(3 中国农业科学院植保所, 北京 100094)

S435.123

S432.41

摘要 对植物组织中蚜虫口针分泌的胶状唾液染色观察发现, 蚜虫刺探时口针穿行在细胞间隙, 仅在吸食时下颚口针进入细胞内。禾谷缢管蚜饲毒 12 h 时 RT-PCR 方法在后肠、血淋巴液和附唾液腺中检测到 GPV; 而非介体麦长管蚜在 GPV 毒源上吸食 24 h 时, 仅在后肠组织中检测到 GPV; 当继续取食 48 h 时, 在后肠及血淋巴液中也发现了 GPV, 但仍无能力进入附唾液腺, 说明蚜虫后肠和附唾液腺对病毒均有专化选择作用。禾谷缢管蚜传播 BYDV-GPV 时存在吸食、获毒和传毒三个阶段。

关键词 大麦黄矮病毒, 麦蚜传播, RT-PCR 检测

中图分类号 S432.41, Q781, S435.121.9

大麦黄矮病毒(BYDV)为一种循环非增殖性病毒(Circulatively nonpropagative virus), 传毒规律与专化现象已有很多报道^[1,2]。自然条件下, 禾谷缢管蚜是不能传播 BYDV-MAV 的, 但当给 MAV 核酸包装上禾谷缢管蚜虫能够传播的 GPV 外壳后, 蚜虫也能传播 MAV, 表明外壳蛋白中存在蚜传决定簇(病毒附着蛋白)^[2,3]。现已发现 BYDV 的外壳蛋白基因与阅读框架(ORF)3 相连, BYDV 的传播专化性与这种通读蛋白(RTD)有关。但对蚜虫传毒途径与循环机制研究较少^[4,5]。本研究用聚合酶链式反应(PCR)对麦蚜体内病毒循环过程进行分析, 为植物抗病毒生物工程利用外壳蛋白和病毒受体基因, 以及通过介体途径防治病毒病, 为国内蚜、粉虱和真菌等介体识别传毒机理研究及“病毒-媒介-植物”间基因互作与植物抗病(虫)性机理研究提供科学依据。

1 材料与方法

植物组织中蚜虫唾液鞘的染色 禾谷缢管蚜(*Rhopalosiphum padi*)和麦长管蚜(*Sitobion avenae*)以及大麦黄矮病毒 GPV 株系(BYDV-GPV)均由中国农科院植保所的钱幼亭副研究员提供。蚜虫和病毒分别在大麦(*Hordeum vulgare*)上培养, 保持 24 h 光照和 20℃ 室温。蚜虫取食后, 对植物组织包埋切片, 用 $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的考马氏亮兰染色 5 min, 适当脱色后观察。或先用 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的藏红对胶状唾液染色 1.5~2.0 min, 在 1 L 体积分数为 95% 乙醇溶液中加 0.1 g 固绿, 复染植物组织 0.5 min 左右后观察。

蚜虫带毒组织的剥取 取单头饲毒的禾谷缢管蚜, 用蒸馏水冲洗 3 次, 在解剖镜下吸取 0.1~0.5 μL 淋巴液, 剥取前肠、中肠、后肠和唾液腺, 用 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 漂洗 2 次备用。

收稿日期 1997-04-11

课题来源 国家攀登计划与植物病虫害生物学国家重点实验室基金资助项目

作者简介 吴云峰, 男, 1960 年生, 副教授, 博士

病毒核酸样品准备 将单头蚜虫或器官组织在 10 μL Tris-HCl(pH 7.4)研磨,加入 10 μL 苯酚和 10 μL 氯仿,再研磨一次,12 000 r/min 离心 2 min,得到约 10 μL 上清液。

cDNA 合成 取 1 μL 上清液,加入 1 μL 50 pmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的 GPV 外壳蛋白基因引物,2 μL 5X MMLV 缓冲液(250 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Bicin-NaOH (1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ Bicine; 0.56 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, pH 8.3), 250 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl), 6 μL 双蒸水,再混匀,然后进行 80 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 和 50 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 处理,再加入 2 μL 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs,加入 1 μL RNase, 1 μL 100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 1.3 μL 50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1 μL (3.33 nmol $\cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) MMLV. R. Tase, 加蒸水至反应体系为 20 μL ,再分别进行 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 即反转录合成 cDNA。

PCR 扩增外壳蛋白基因 10 μL cDNA 中依次加入 5 μL 10X PCR 缓冲液(150 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ KCl), 2 μL 50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上游引物, 0.1 μL 下游引物, 2 μL 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 0.5 μL Tag 聚合酶,加水至总体积为 20 μL 。然后在 PCR 扩增仪中进行 35 个 94 $^{\circ}\text{C}$ (45 s)—50 $^{\circ}\text{C}$ (30 s)—72 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) 扩增循环,程序结束后,调至 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min,在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存扩增产物。

扩增产物的电泳分析 取 5~10 μL PCR 产物在 10 g $\cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖胶中电泳,1 g $\cdot \text{L}^{-1}$ EB 溶液染色 20 min,紫外灯下检测,拍照。

蚜虫组织的超微结构研究 见参考文献[6]。

2 结果与分析

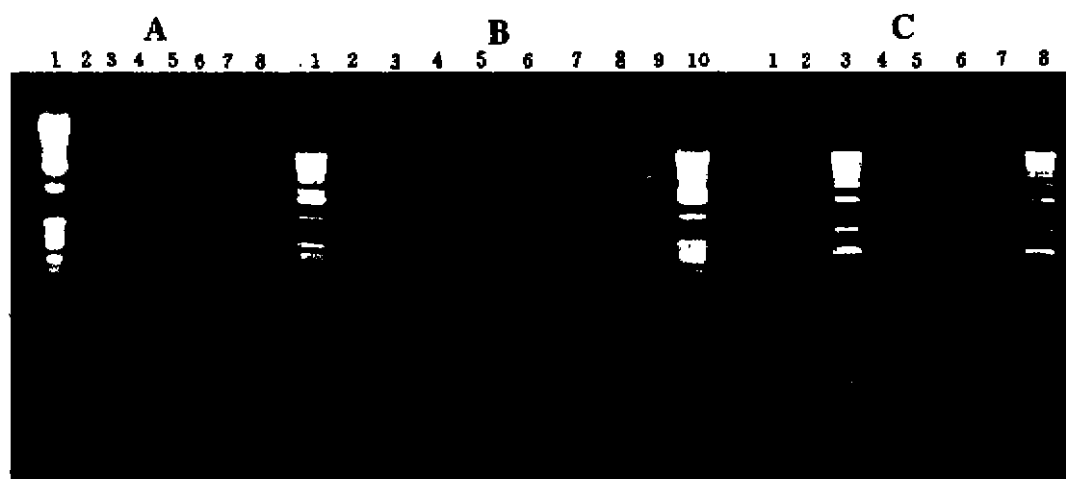
2.1 蚜虫吸食 GPV 过程

将禾谷缢管蚜和麦长管蚜转移到 GPV 侵染的岸黑燕麦叶片上取食,观察发现蚜虫经过 3~5 min 表面爬行和刺探,接着蚜虫口针刺入薄壁组织和维管束,口针主要在细胞间穿行。让禾谷缢管蚜和麦长管蚜分别在 GPV 毒源上饲毒 8~120 h,分别剥取蚜虫组织用 RT-PCR 方法进行检测,结果介体禾谷缢管蚜饲毒 8 h,在后肠和血淋巴液发现 GPV,饲毒 12~48 h 在附唾液腺组织检测到 GPV(附图 A)。吸食 48~120 h 时在后肠、血淋巴液和附唾液腺中检测到 GPV。而非介体麦长管蚜在 GPV 毒源上吸食 48 h 时,仅在后肠组织和血淋巴液中检测到 GPV,但仍无能力进入附唾液腺组织,没有完成获毒及其病毒在体内的循环过程,蚜虫也未能传毒(附图 B、C)。由此说明,蚜虫在吸食植物汁液时,后肠细胞和附唾液腺细胞成为蚜虫获毒的关键。

2.2 蚜虫的获毒机制

给禾谷缢管蚜和麦长管蚜分别饲食 GPV,结果发现禾谷缢管蚜取食 8 h 时,GPV 进入蚜虫后肠、血淋巴液、附唾液腺和唾液管中。这一研究表明介体禾谷缢管蚜吸食了病毒汁液后,GPV 并不能立即进入血淋巴和附唾液腺细胞完成获毒过程,要经过吸收和传导作用,GPV 在介体禾谷缢管蚜体内的循环期约为 12 h。非介体麦长管蚜取食 GPV 病株汁液 48 h 时,除在后肠肠腔和后肠细胞质中观察到病毒粒子外,在其他组织均未观察到 GPV。禾谷缢管蚜饲毒后,GPV 沿食道进入后肠肠腔,GPV 与肠内壁顶端细胞膜(apical plasmalemma-APL)接触,接触部位细胞膜逐步下陷,形成小穴,再进一步向内凹陷发育为管状泡束或内吞泡束(endocytotic vesicle)。有时由若干个小泡束融合形成大泡束或膜

通道。在后肠细胞质中,GPV 存在于大大小小的泡束中。GPV 经膜包被后向基部细胞质膜(basal plasmalemma-BPL)靠近,然后与外膜融合将 GPV 分泌出外膜。另外,在后肠 APL 处常与细胞外生管状物(extracellular tubules-ET)相连,这些管状物的组成和功能尚不清楚,是否参与运输病毒,有待进一步研究。而非介体麦长管蚜吸食 GPV 后,在后肠肠腔中观察到 GPV,GPV 无法或很难穿过后肠进入血淋巴及附唾液腺,而是大量 GPV 直接从后肠排出体外,蚜虫无能力获得 GPV。后肠是蚜虫获毒的关键部位,在介体蚜虫中,病毒是通过饮入(endocytosis)和外吐(exocytosis)运输到 BPL 和基质片层(basal lamina-BL)之间。因此,BL 成为病毒进入血淋巴的最后一道屏障。



附图 RT-PCR 检测蚜虫体内病毒循环途径与传毒结果

A. 1 为标准核酸分子量;2 和 3 为蚜虫后肠组织;5 和 7 分别为血淋巴液和附唾液腺;4、6 和 8 依次为蚜虫后肠、血淋巴液和附唾液腺的阴性对照。B. 1 和 10 为标准核酸分子量;2、3、4、5、6 和 7 依次为蚜虫口针、附唾液腺、前肠、前中肠、后中肠和后肠组织;8 和 9 为无毒蚜虫的阴性对照。C. 1 和 2 分别为麦长管蚜和禾谷缢管蚜的传毒结果;4 为无毒植物对照;5、6 和 7 为麦长管蚜后肠、附唾液腺和血淋巴液;3 和 8 为标准核酸分子量

2.3 蚜虫传毒过程

对禾谷缢管蚜和麦长管蚜的附唾液腺对病毒的专化性选择作用进行研究,结果发现在介体禾谷缢管蚜体内,GPV 进入血淋巴液后,病毒继续向附近唾液腺靠近,然后直接穿过附唾液腺外层的基质片层,进入附唾液腺细胞质中,病毒细胞膜包被后经内吞靠近唾液管外膜,然后经过膜融合将病毒释放进入唾液管中,将这两种蚜虫转接在试验植物上传毒,结果经禾谷缢管蚜接种后,发病率为 86.67%,而由麦长管蚜传播则无一株发病。用 RT-PCR 方法在蚜虫的附唾液腺组织中检测到 GPV,说明蚜虫传毒能力取决于病毒能否进入附唾液。

3 讨论

大麦黄矮病毒能够被蚜虫以循环非增殖方式传播,每一种 BYDV 株系都有特定的介体蚜虫,这种介体专化性(Vector-specificity)已经被广泛的生物学方法所证实^[3],但病毒在蚜虫体内如何循环并不完全清楚^[3,4]。蚜虫附唾液腺曾被认为是“病毒-蚜虫”相互识别

及控制 BYDV 专化传播的主要位点,但一直缺乏直接证据。笔者通过超微结构研究与 PCR 检测,证实蚜虫通过唾液腺细胞膜表面的病毒受体识别病毒,表现出高度传毒专化性这个观点。推测病毒受体为一种昆虫内源凝集素,在蚜虫传毒中起了重要作用。GPV 在禾谷缢管蚜体内循环过程为:蚜虫能通过病株韧皮部中取食而获毒,病毒穿过肠后进入血淋巴,血淋巴成为病毒的集散地。直到病毒粒子与附唾液腺中的病毒受体亲合,经受体介导病毒随后可以穿过附唾液腺进入唾液室,再通过蚜虫在植物上取食将病毒回吐进入植物体内而传毒。

参 考 文 献

- 1 Chay C A. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf virus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology*, 1996, 219: 57~65
- 2 吴云峰,魏宁生,周广和. 蚜虫与病毒间相互作用及循环传毒专化性的分子机制. *世界农业*, 1996, 10: 35~36
- 3 Johannes F J M, van den Heuvel, Verbeek M, et al. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by myzus persicae. *Journal of General Virology*, 1994, 75: 2559~2565
- 4 Gildow F E. Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology*, 1993, 83: 270~277
- 5 Van den Heuvel J F J M. Molecular basis of the interactions between luteoviruses and aphids. *Agronomie*, 1995, 15: 503~504
- 6 吴云峰. 蚜虫传毒机制研究[博士论文]. 陕西杨陵: 西北农业大学植保系, 1994, 22~24

Mechanism of the Circulative Transmission of Barley Yellow Dwarf Letuovirus

Wu Yunfeng¹ Li Yi² Wei Ningsheng¹ Cheng Zhuomin³
Zhou Guanghe³ DuZhijiang³

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

(2 College of Life Science, Beijing University, Beijing 100871)

(3 Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract When *Rhopalosiphum padi* and *sitobion avenae* feed on GPV-infected oats, stylet mainly passes through intercellular path of tissue. Then a pair of maxillar only inserts phloem cell to feed sap by observation of saliva sheath stained with 0.3% Coomassie brilliant blue. *R. padi* requires GPV and GPV virions present in hindgut and hemolymph by feeding on virus oats for 8h, and GPV virions exist in accessory salivary gland (ASG) after feeding 12 to 24h, but only in hindgut and hemolymph of nonvector *S. avenae* after feeding 48h by RT-PCR method.

Key words barley yellow dwarf letuovirus, aphid transmission, RT-PCR analysis