

30-34

第24卷 第2期
1996年4月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 24 No. 2
Apr. 1996

大麦抗 BYDV 的蚜虫获毒酶联免疫吸附法*

刘常宏**

Haber, S. S. Haber

(陕西省植物保护研究所, 陕西杨陵 712100) (Agriculture Canada, Winnipeg Research Station,
Wpg, Mb, R3T 2M9)

摘要 蚜虫获毒酶联免疫吸附法(AA-ELISA)是指用 ELISA 测定从染病植株上获毒蚜虫以反映品种抗 BYDV 的方法。经对带 Yd₂ 基因大麦品种 877-16 与感病品种 Manley 对比测定, 按其方法接种 3 叶期第 1 叶片, 传毒 3 d 后用无毒禾谷类蚜虫从第 2 叶片上取食获毒 1 d, 采集 5 头作 ELISA 测定。AA-ELISA 法测定 OD 值, Manley 显著高于 877-16, 用 ELISA 直接测定无显著差异。用 AA-ELISA 法具有不破坏植株, 可对同一部位重复测定, 且蚜虫体软, 易研碎抽提病毒, 测定抗感品种差异明显等优点, 具有适用性。

关键词 蚜虫获毒酶联免疫吸附法, 大麦, BYDV

中图分类号 S432.41, S432.21 S435.103

目前, 对大量禾谷类育种材料和高代品系的抗 BYDV 鉴定, 主要根据蚜虫接种传毒试验的症状表现、产量损失和植株体内的病毒含量^[1]。但症状及产量损失受环境影响较大, 使鉴定结果年度间存在一定差异。对于大麦病毒(BYDV)的测报, 国际上普遍采用单头蚜虫传毒试验^[2]或 ELISA 技术测定蚜虫带毒率^[3,4], 以预测 BYDV 的发生情况。我国主要根据对气象资料的综合分析, 估计介体蚜虫发生数量来预测黄矮病的流行^[5]。本文采用 ELISA 测定带毒蚜虫法, 以测定品种的抗病性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

介体蚜虫系无毒禾谷缢蚜(*Rhopalosiphum padi* L.)、麦长管蚜(*Sitobion avenae* F.)、麦二叉蚜(*Schizaphis graminum* R.)和玉米蚜(*Ropalosiphum maidis* F.), 于生长箱中繁殖。病毒为 BYDV 的 PAV、RPV 和 MAV 株系, 分别保存于高感岸黑燕麦寄主上。供试大麦品种为含 Yd₂ 基因的 877-16 和感病品种 Manley, 于 20℃ 生长箱中盆播培养。

1.2 ELISA 法

根据 Clark 等^[6]的方法略有改进, 缓冲液为 0.1 mol/L TBS-Tween (pH9.6)。蚜虫样品的制备为每处理加缓冲液 150 μL, 于微型试管中研碎, 每克植株叶片加 9 mL 缓冲液, 液氮冷冻研磨, 4℃ 下离心(1200 r/min) 10 min, 取其上清液供 ELISA 测定。酶标抗体的酶是碱性磷酸酶, 底物为 P-硝基苯磷酸, 反应 18 h 至颜色出现, 用 Titertek Multiskan 测定 405 nm 处的光吸收值(OD)。当 OD 值大于对照的平均值 + 4 × 各处理的标准差时为阳性反应, 反之则为阴性反应(阳性反应指数 = 阳性反应 OD 值之和 × 阳性反应的个数)。ELISA 板每孔加试剂或样液为 100 μL。

收稿日期: 1995-07-11

* UNDP(CPR/91/135)“小麦育种及改良”项目资助, 本研究在加拿大温尼泊试验站完成。

** 现在西北农业大学植保系工作, 陕西杨陵 712100

1.3 蚜虫带毒的测定

将剪成6 cm 长的 PAV、RPV 和 MAV 株系典型病叶置于不同的培养皿中,以大小相近的无毒禾谷缢蚜、麦长管蚜、麦二叉蚜和玉米蚜,分别以每处理30头饲毒不同株系病叶。2 d 后各处理采集5头获毒蚜虫,放于微型试管中,重复3次,置-73℃超低温冰箱中10 min,用于测定不同介体蚜虫取食获毒各株系的能力。

另将介体大小一致的无毒禾谷缢蚜约500头,接种于培养皿中的 BYDV-PAV 株系病叶,取食2 d,以等量无毒禾谷缢蚜放于培养皿中的健叶上为对照,分别将获毒与对照蚜按1,2,3,5,7,9,11,13,15头进行 ELISA 测定。重复5~6次,以确定不同头数禾谷缢蚜带毒与测定 OD 值间的相关性。

1.4 AA-ELISA 测定大麦抗病性

供试大麦877-16与 Manley 经禾谷缢蚜接种传毒后,每品种2盆供禾谷缢蚜获毒,2盆供麦长管蚜获毒,4盆分别供两种蚜虫取食健康叶片,2盆供 ELISA 直接测定用。

在人工接虫器内将取食 PAV 株系3 d 的禾谷缢蚜,接种于3叶期供试品种的第1叶片,传毒3 d 后移去接虫器和蚜虫,并使植株干净。然后将无毒蚜虫10头放于第2叶片,以取食健株为对照,2 d 后收集获毒蚜虫于微型管中,每处理5头,于-73℃低温冰箱中保存备用,重复4次。对获毒蚜虫作 ELISA 测定。另外按常规品比试验,对大麦品种的亩穗数、株高、千粒重和产量进行了调查。

2 试验结果

2.1 蚜虫带毒(BYDV)ELISA 测定

2.1.1 不同头数禾谷缢蚜带毒 ELISA 测定 表1表明,ELISA 可测出2头以上蚜虫带毒(BYDV)。对 ELISA 测定 OD 值进行 *T* 测验,与对照相比,1头蚜虫差异不显著,2头蚜虫差异显著,3头以上各处理均差异极显著。

表1 不同头数禾谷缢蚜带毒 ELISA 测定

测定头数	带毒蚜虫	无毒蚜虫	测定头数	带毒蚜虫	无毒蚜虫
1	0.038	-0.009	9	1.611**	0.081
2	0.776*	-0.027	11	1.638**	0.075
3	0.402*	0.005	13	1.919**	0.059
5	0.530**	0.055	15	2.248*	0.082
7	1.047**	0.078			

* 和 **, *T* 测验,带毒蚜虫与无毒蚜虫分别在5%和1%水平上差异显著。

对 ELISA 测定 OD 值与带毒蚜虫数做相关分析,得回归方程 $Y=0.0552+0.1505 X$, *T* 测验方程极显著($T=11.49 \gg T_{0.01}=2.678$),误差范围为 $0.1505 \pm T_{(48)} \times 0.0131$ 。相关系数0.85,说明 ELISA 测定 OD 值与带毒蚜虫头数呈线性相关。

2.1.2 不同蚜虫获取 BYDV 不同株系能力比较 经 ELISA 测定(表2),麦长管蚜获取 PAV、RPV 和 MAV 株系的平均 OD 值分别为0.674,0.187和0.253,较禾谷缢蚜分别高出0.352,0.190和0.202,比玉米蚜分别高出0.450,0.190和0.204,较麦二叉蚜高出0.590,0.113和0.176。

根据对 ELISA 测定 OD 值的分析,麦二叉蚜获取 PAV 和 RPV,禾谷缢蚜获取 PAV 和 MAV 的平均 OD 值均小于 $\bar{CK} + 4 \times SD$,即呈阳性反应,而麦长管蚜获取 PAV,RPV 和 MAV 株系均呈阳性反应。表明麦长管蚜具有很强的获取 BYDV 的能力。

表2 蚜虫获毒 BYDV 不同株系的 ELISA 测定*

株系	禾谷缢蚜		玉米蚜		麦长管蚜		麦二叉蚜	
	带毒	不带毒	带毒	不带毒	带毒	不带毒	带毒	不带毒
PAV	0.322	0.013	0.224	-0.047	0.674	0.008	0.084	0.001
RPV	-0.003	-0.023	-0.003	0.004	0.187	0.003	0.074	0.029
MAV	0.051	-0.001	0.049	-0.014	0.253	-0.064	0.077	0.026

* 每处理5头蚜头。

2.2 蚜虫获毒酶联免疫吸附法测定

ELISA 测定结果(附图)表明,带 Yd₂基因的877-16品种上取食获毒蚜虫的 OD 值远低于从感病品种 Manley。从 Manley 品种上获毒,禾谷缢蚜与麦长管蚜的 OD 值分别为1.435和1.292,而同期从877-16品种上获毒,禾谷缢蚜与麦长管蚜的 OD 值分别为-0.004(阴性)和0.410。表明抗病品种877-16中的 BYDV 含量很低。接种后18 d 无毒禾谷缢蚜与麦长管蚜从 Manley 品种上获毒的 OD 值较从877-16品种上分别高1.012和0.530。

计算 ELISA 阳性反应指数结果,传毒后6 d 用麦长管蚜从877-16和 Manley 上取食获毒,其阳性反应指数为1.347和27.524,后者较前者高95.1%;传毒后14 d 的阳性反应指数分别为0.651和51.480,后者较前者高98.7%。以禾谷缢蚜取食获毒测定结果与麦长管蚜类似,传毒6 d 和14 d 从 Manley 品种上获毒的阳性反应指数较从877-16上获毒高100%和96.0%。表明利用 ELISA 阳性反应指数更能显示品种间的抗性差异。

对试验数据进行 T 测验,各期蚜虫从877-16与 Manley 品种上获毒的 ELISA 测定 OD 值均达极显著差异水平。

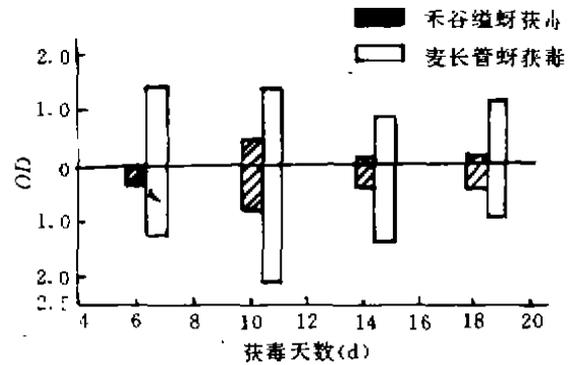
病株标样直接进行 ELISA 测定,结果表明877-16与 Manley 品种的 OD 值或阳性反应指数差异不显著(见表3)。说明 AA-ELISA 可以测定大麦品种的抗病性,而 ELISA 则不能。

表3 ELISA 测定病株标样结果

品种	OD 平均值			阳性反应指数		
	12 d	14 d	16 d	12 d	14 d	16 d
877-16	0.548	2.502	2.348	4.932	22.518	21.132
Manley	0.769	2.425	2.421	6.921	21.825	22.239

2.3 产量损失

1993年在鉴定病圃中观察,抗病品种877-16病株的亩穗数、株高、千粒重和产量较健



附图 AA-ELISA 测定两品种的 OD 值

康植株分别减少6.8%、4.3%、1.8%和11.1%,感病品种 Manley 病株的相应值依次减少52.8%、40.5%、4.5%和77.4%,亦说明带 Yd₂基因的877-16品种具有显著的抗病性,而 Manley 则为高感品种。与 AA-ELISA 测定结果一致。

利用 AA-ELISA 技术对大麦品种 Elmira 和 Conquest;燕麦品种 Robert 和 Coast black 以及黑麦品种 Fall Rye 测定,其 OD 值与产量损失一致。岸黑燕麦与 Conquest 为感病品种,Elmira 和 Robert 相对抗病,黑麦为隐症带毒体。

3 讨 论

利用蚜虫在供试品种上取食获毒,再用间接酶联免疫吸附法测定获毒蚜虫来反映品种抗病性的方法,称为蚜虫获毒酶联免疫吸附法(Aphid-Acquisition-ELISA)。该方法的理论基础是:(1)BYDV 在蚜虫体内不增殖^[7];(2)ELISA 测定 OD 值与带毒蚜虫头数呈线性相关;(3)个体一致的同一种蚜虫,在一定时间内从同一叶位上取食植物汁液量无显著差异。本文利用该方法鉴定了大麦品种的抗 BYDV 性,结果表明,AA-ELISA 法较 ELISA 直接测定病株叶片病毒含量法更灵敏,而且重复性好。其原因可能是植物组织不易研碎,病毒粒子从韧皮部中释放不彻底而造成 ELISA 直接测定病叶病毒的灵敏度降低。

AA-ELISA 法具有不破坏待测植株和蚜虫体软易研碎等优点,可对同一植株的不同位点进行多次测定。因此,有望应用于 BYDV 抗病机制的研究,并使抗黄矮病毒基因的遗传分析更简单、经济。根据作者初步对 877-16 与 Manley 品种杂交 F₁代抗病性分析,其 AA-ELISA 测定 OD 值较 877-16 高,较 Manley 低。预示 Yd₂基因可能为不完全显性遗传,这与前人的报道一致^[8]。若再通过对 F₂代单株抗病性测定,既可测知抗病基因表达的遗传规律,又可保留下单株,便于育种者利用。

不同种类的禾谷类蚜虫取食获毒 BYDV 不同株系的能力差异显著,蚜虫获毒能力与传毒专业化性间无明显相关,是否意味着蚜虫获毒只是个抽吸过程,即病毒是随着蚜虫吸食植物汁液进入蚜虫体内。如确实如此,AA-ELISA 法可用于其他蚜传病毒的抗病性鉴定,这一问题有待研究。

以 AA-ELISA 测定 OD 值计算的阳性反应指数更能直观反映蚜虫带毒量,从而间接反映植株体内的病毒含量。且以对照平均值+4×处理标准差为阳性反应鉴定指标较以处理的 OD 值大于对照平均值^[9]或方差^[10]的3倍为标准更严格,更实用。

参 考 文 献

- 1 钱幼亭,周广和.小麦种质资源抗耐黄矮病毒的田间鉴定技术研究.植物保护学报,1986(3):157~164
- 2 Plumb R T, Lennon Elisabeth A. Barley yellow dwarf virus. Annual report of rothamsted experiment station for 1980. London, Harpenden Herts, 1981
- 3 Torrance L, Jones P A C. Increased sensitivity of detection of plant viruses obtained by using a fluorogenic substrate in enzyme-linked immunosorbent assay. Annals of Applied Biology, 1982, 101: 501~509
- 4 Barker I. The relationship between barley yellow dwarf virus content in aphids and their ability to transmit. In: Burnett P A, ed. World perspectives on barley yellow dwarf. Mexico, DCAS/CIMMYT, 1990
- 5 冯崇川,朱象三.气象因子综合分析法预测小麦黄矮病研究.植物保护,1980(1):1~5

- 6 Clark M F, Admas A N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 1977, 34: 475~483
- 7 Torrance L. Use of enzyme amplification in an ELISA to increase sensitivity of detection of barley yellow dwarf virus in oats and individual vector aphids. *Journal of Virological Methods*, 1987, 15: 131~138
- 8 Paliwal Y C. Detection of barley yellow dwarf virus in aphids by serologically specific microscopy. *Canadian Journal of Botany*, 1982, 60: 179~185
- 9 Burnett P A, Mezzalama M. In: Comeau A, Makkouk K M. ed. Barley yellow dwarf in West Asia and North Africa. Rabat; ICARDA, 1992
- 10 El Yamani M J. In: Comeau A, Makkouk K M. ed. Barley yellow dwarf in West Asia and North Africa. Rabat; ICARDA, 1992

Detection of Barley Resistance to BYDV with AA-ELISA

Liu Changhong

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

S. Haber

(Agriculture Canada, Winnipeg Research Station, Wpg, Mb, R3T 2 M9)

Abstract A new method of Aphid Acquisition Enzyme-linked Immunosorbent Assay (AA-ELISA) was established for the distinguish of barley resistance to BYDV according the following procedures; 1. to transmit BYDV by the common inoculation method to the first appearance of seeding at the 3-leaf stage; 2. to make the infected seedlings clearly after 3 days transmission; 3. to put non-virus aphids into an artificial cage and then fixed them on the second leaf for 1 day acquisition; 4. to collect 5 viruliferous aphids per seeding.

The OD value of AA-ELISA was significantly different between 877-16 carrying the Yd₂ for BYDV resistance and the susceptible Manley. The virus titre of Manley was much higher than that of 877-16. In parallel experiments where leaf tissue was sacrificed for analysis of virus titre by ELISA, 877-16 could not be distinguished from Manley beyond 6 days after inoculation. The results indicated that the AA-ELISA was reliable for detecting barley for resistance to BYDV. Advantages of AA-ELISA are; it can not destroy the test tissue and enable the repeat virus titre detections on a fixed position of plant; soft aphid tissue is easier to grind and extract than leaf ones; clearer distinctions can obtain between resistant and susceptible varieties.

Key words AA-ELISA, barley, BYDV