

苹果病毒病害与无病毒苗繁殖

于绍夫

(山东省烟台市经济植物研究所)

(上接 1995 年第 1 期 50 页)

三、病毒的脱除与检测

(一)病毒脱除技术

苹果病毒的脱除,通常采用热处理脱毒和茎尖培养脱毒等两种方法。

1. 热处理脱毒:据研究,苹果树在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的温度下,生长 1 个月左右的时间,生产出的新梢,其顶端一般是无毒的。所以用热处理方法,可获得无病毒材料。

供作热处理的材料,在前一年生长季中养好。即 4 月底至 5 月初,将苹果实生砧的 1 年生苗,栽植于上径 15 厘米、下径 13 厘米、高 20 厘米的花盆中。使生长到 8 月中下旬,从果园中(从未发生过锈果病、花叶病、绿皱果病的园片)剪除 1 年生枝条,作为热处理的接穗,芽接在花盆中的实生砧上,每株接 3~4 芽,成活后,于 11 月中旬置于温度为 $5\sim 7^{\circ}\text{C}$ 条件下越冬。翌年 2 月中下旬转移至温室,剪砧促使接芽萌发。温室内的温度,昼间宜维持在 $19\sim 30^{\circ}\text{C}$,夜间 $12\sim 16^{\circ}\text{C}$ 。当每个接芽生长有 3~5 张叶片时,即可将花盆移入恒温器中,在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的温度下处理 28 天左右。供作热处理的苹果材料,也可以先将 1 年生实生砧苗栽植在花盆内,翌年 2 月中下旬移入温室后,再劈接上带有 3~4 个饱满的接穗,然后,进行热处理脱毒。应用热处理的方法,可以使大部分苹果病毒钝化,从而获得无病毒苗木。但苹果茎沟病毒和司派 227 衰弱病毒,却难用热处理钝化,可以借助茎尖培养的方法,进一步脱毒。

2. 茎尖培养脱毒,感染病毒的植株,其不同部位的病毒浓度有相当大的差异。种子、根尖和茎尖生长点附近的分生组织,一般不含有病毒。这些不含病毒的部位,对获得无病毒材料具有重要的意义。但是,茎生长点附

近不含病毒的部分是极小的,一般不超过 0.1~1 毫米,难于用常规方法繁殖、利用。这就需要借助茎尖培养的方法,来获得无病毒材料。茎尖培养的具体方法,可参第九章的有关内容。

(二)病毒检测方法

检测,是研究和确认苹果病毒病害,尤其潜隐性病毒病害,确认和获得无病毒材料的主要技术环节。常用检测方法,包括指示植物检测法、酶联吸附免疫法(Elisa)、免疫扩散法,和特异性核酸(dsRNA)分析法等。

1. 木本指示植物芽接法:国际上用于检测苹果病毒的本木指示植物,主要有维琴尼亚小苹果(Virginia crab k-6)、苏俄苹果($R_{12740-7A}$)、司派 227(Spy227)、兰蓬王(Lorad Lambourne)、大果海棠(M. platycarpa)、杂种(Pyrionia vitchii)、伏花皮(Gravenstein)、红鲍斯考普(Red Boskoop),以及金冠等。各种木本指示植物适宜检测的苹果病毒病害,如表 13 所示。应用木本指示植物检测苹果潜隐性病毒时,可以采取以下 3 种嫁接方法:直接在指示植物上芽接:先将指示植物扦插,或嫁接在实生砧木上,大量繁殖幼苗以备使用。然后,在指示植物茎部,距地面 10 厘米处,嫁接 1 个被检测树的芽子,或一块树皮。成活后,剪除指示植物的茎干,仅留 2~3 个芽子,使其重新长出旺盛枝叶,以观察症状反应。每株被检测树,应嫁接 3~5 株苗木。二重芽接:先将指示植物的芽子,嫁接到实生砧基部,距地面 10 厘米处,然后,将被检测树的芽子,嫁接在指示植物芽的下方,两芽相距 2~3 厘米。成活后,将指示植物接芽以上的砧干剪除,控制被检芽的生长(图 2)。在嫁接后第二年的生长季节,观察指示植物的症状反应。二重切接:萌芽前,将各有 2 个芽子的指示植物接穗和被检测树的接穗,同时切接在实

北方园艺 (总 101) 43

生苗上。指示植物嫁接部位在上,被检测树接穗在下(图3)。为提高嫁接成活率,可将接芽套上1个塑料管,以利保温、保湿。采用以上3种嫁接方法,通过木本指示植物,可以把当前已知的苹果潜隐性病毒,全部检测出来。但是,应用这种方法检测,历时较长,一般需经5年左右的时间。

2. 酶联吸附免疫法(Elisa):这是一种应用抗体与抗原(病毒)相互作用,快速测定病毒颜色的定量方法。这种方法灵敏度很高,非常便于对大批待检测材料的检测。

表 13 检测苹果潜隐性病毒的本木指示植物及寄生症状

木本指示植物	病毒种类	主要症状	检测方法*
雀巢尼亚小苹果	茎痘病毒 茎沟病毒	芽凹陷斑 茎沟,芽苞扁平	1或2
苏俄苹果	褪绿叶斑病毒	褪绿叶斑, 茎凹陷	1或2
司派 227	司派 227 衰退病毒	内皮坏死, 叶卷曲,衰弱、茎凹陷斑	2
大苹果海棠	大苹果海棠 鳞皮病毒 大苹果海棠 萎缩病毒 褪绿叶斑病毒	鳞皮 萎缩 线纹斑	2
杂种苹果	褪绿叶斑病毒	褪绿叶斑, 线纹斑,矮化	2
兰蓬王**	软枝病毒 扁枝病毒	软枝 扁枝	3
伏花皮	扁枝病毒	扁枝	3

* 检测方法:1 在温室内芽接或汁液接种,需历时2个月;
2. 二重芽接或二重切接。需历时2~3年;3. 在结果树上高接,需历时3~5年。

* * 兰蓬王也能检测苹果小果病毒

应用酶联吸附免疫法检测苹果病时,首先必须获得大量提纯的病毒,才能够制作出抗血清。为此,要选择供增殖病毒用的草本植物。苹果病毒分布于树体的各个部位,与草本植物相比,其病毒粒体的浓度是较低的。当将苹果叶片磨碎以大量提取病毒时,常常含有使病毒粒体不活化的物质。因此,用苹果叶片提纯病毒是非常困难的。如将苹果病毒移植到草本植物上,就可以从草本植物直接提取病毒。通常,用作增殖苹果褪绿叶斑病毒的草本植物是昆诺藜,供增殖苹果茎沟病毒的草本植物是心叶烟。当这些接种后的草本植物体内,病毒粒体达到最高浓度时,即可采集病叶在磷酸缓冲液中磨碎。为了防止病毒粒体钝化,要除去未破损的叶绿体;并加用多种化学药品,使汁液澄清。然后,将获得的草本植物研磨汁液,先在低速离心机中离心,使细胞壁和纤维素等大

的细胞成分沉淀。将含有病毒粒体的上清液,在30000转/分以上的超高速离心机中分离,使病毒粒体沉淀。将含有病毒粒体的悬浊液,再在低速离心机中分离,将杂质除去。获得的上清液,再一次在超高速离心机中分离。如此反复进行多次。就可以得到纯化的病毒粒体聚集物(图4)。把纯化后的病毒粒体(抗原),少量多次地注射到兔子的血管中(图5)。这时,兔子的血液中就会产生相应的抗体。最后,采集兔子血液,将血清与血浆分开,抗体即存在于血清之中。再采取一些化学处理。就可以精制出抗体的主要成分— γ -球蛋白(蛋白质的一种)。因为苹果病毒具有专化性,所以,不同种类的病毒只能制备专有的抗血清;而该种抗血清,也只能检测这种特定的病毒。目前,荷兰可以应用酶联免疫法检测5种苹果病毒,即苹果褪绿叶斑病毒、苹果花叶病毒、苹果茎沟病毒、阿拉伯花叶病毒(AMV),以及番茄环斑病毒(TRSV)等。中国农业科学院果树研究所已经成功地采用这项技术,应用于苹果褪绿叶斑病毒和苹果茎沟病毒的检测。酶联免疫法检测病毒的基本原理是,将抗体注入平底凹穴内,就会被吸附在穴壁上。冲洗后,向其内注入待检测的病毒液。若待检测液中含有能与抗体反应的病毒粒体,就会发生肉眼看不到的反应。再冲洗后,注入酶标记抗体,使与抗体结合的病毒粒体,再与酶标记抗体结合。两个抗体就象夹心面包一样,把病毒粒体夹在当中。最后,注入能因标记酶的存在,而呈现黄色的酶基质,即可检测病毒的存在与否(图6)。荷兰应用酶联免疫法检测苹果病毒的具体过程的方法,图示于图7。据日本的经验,应用酶联免疫法检测果树病毒,抗血清和待检测液的用量均少,一般1克叶片足够使用,凹径5毫米,深3毫米的平底凹穴皿,可同时检测几十种病毒。

3. 免疫扩散法:这种方法,是基于抗原与抗体相互作用,会产生复合物沉淀的特性,利用琼脂凝胶使抗原、抗体相互扩散,即会出现明显的沉淀线,也是一种快速检测病毒的新技术。抗体的制作方法,与酶联免疫法相同。应用免疫扩散法检测苹果病毒时,常用以下3种方法:一是,试管重叠法。具体方法是,用毛细管将抗血清注入直径小于2毫米的毛细试管中,再将待检测液(抗原)缓慢注入毛细管上部。因为抗血清的粘性比待检测液高,当将待检测液缓缓注入时,二者不会相互掺杂,从而形成一层层状物。静置些时,如果待检测液中含有病毒粒体,就会在界面线处出现白色沉淀物(图8)。如将抗血清稀释为若干不同的倍数,到稀释到不能与抗原发生凝聚反应时,还可以判断出病毒的浓度。二是,凝胶凝聚反应法。具体方法是:将凝胶放在塑料盘中,厚约0.5厘米,其中打上几个洞。盘中央放入抗血清A,其周围的几

病毒	圆叶斑病	三叶斑病	融化砧木	实生砧木
烟草花叶病毒 (TMV)				
苹果褪绿叶斑病毒 (CLSV)				
苹果褪绿叶斑病毒 (SPV)				

接穗 中间砧 实生砧
 表现出坏死和凹陷症状 不表现症状,但病毒能增殖,潜伏感染

图1 苹果褪绿叶斑病发生与砧木的关系

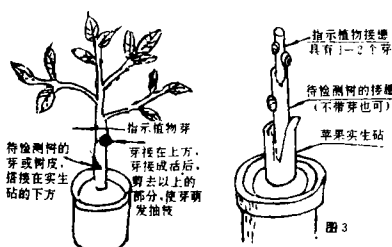


图2 二重芽接检测苹果病毒

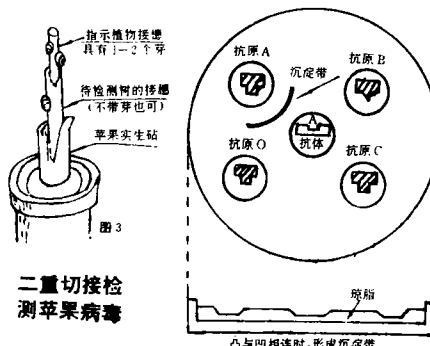


图3 二重切接检测苹果病毒

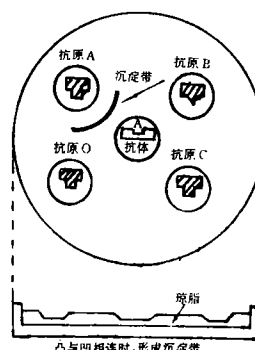


图9 免疫扩散法检测苹果病毒(凝胶凝集反应法)

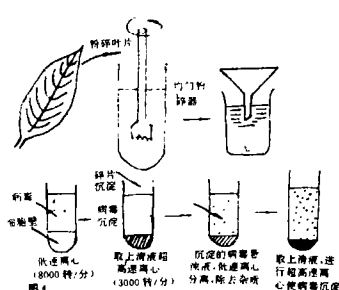


图4 病毒纯化的步骤

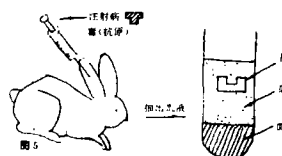
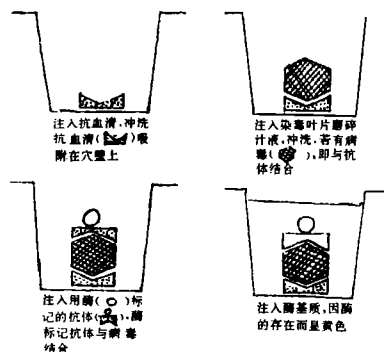


图5 抗体的制作

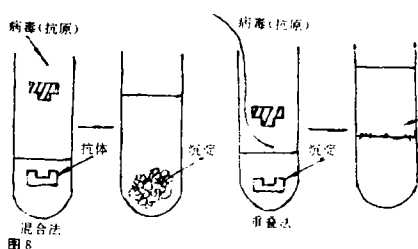


图8 免疫扩散法检测苹果病毒(混合法与重叠法)

图6 酶联免疫法(Elisa)检测病毒的原理

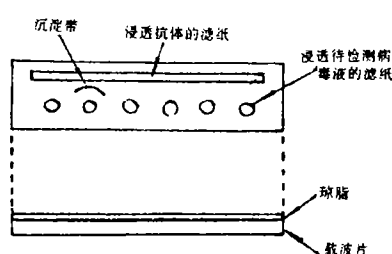


图10 免疫扩散法检测苹果病毒(载液片法)

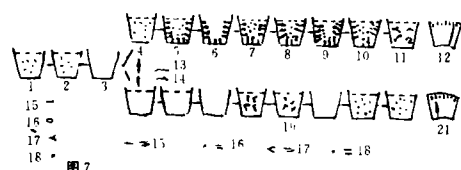
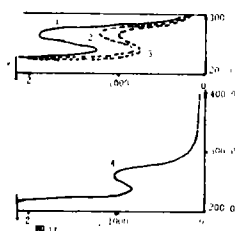


图7 酶联免疫法检测过程图示

图11 APMY 寄主与核酸混合物的UV吸收曲线
1. 烟草无毒株;
2. 烟草感毒株;
3. 苹果无毒株;
4. 苹果感毒株。



个洞内,注入待检测液。若待检测液内含有病毒粒体,其汁液通过凝胶扩散与A接触,就会出现白线(图9)。应用这种方法时,抗血清与待检测液间的距离,依病毒的浓度而定:病毒浓度高,距离可远;病毒浓度低,距离要近。三是,载玻片法。具体方法是,将琼脂涂布在载玻片上,一侧放置浸透抗血清的滤纸,另一侧放置待检测的圆形滤纸(图10)。然后,以白色沉淀线的有无,来确定检测结果。

4. 特异性核酸(dsRNA)检测法:前已述及,病毒粒体是由病毒核酸(DNA或RNA)和结构蛋白质亚单位的整齐复合物所组成。而类病毒在寄主细胞中,则是以裸露的RNA形态存在的。病毒复制过程是以单链RNA(ssRNA)为模板,合成双链RNA(dsRNA)的。dsRNA也叫作复制型RNA,简称RF。dsRNA对RNA氧化酶具有抗性,大小是RNA的2倍。因此,只要果树感染病毒和类病毒,树体内就会有dsRNA存在。未受病毒或类病毒侵染的植株,体内就没有这种高分子量dsRNA的同源片断。藉此,可以通过凝胶电泳分析,检测dsRNA的数目和大小,确定待检测病毒的类群。dsRNA检测法,具有快速、灵敏、简便等优点,既可有效地检测已知和未知的病毒,又不受寄主和组织的影响,同样可以检测类病毒。一个操作熟练的技术人员,48小时内就可以完成整个检测过程。每周可检测约100个样品。dsRNA检测法自1976年首次应用于检测植物病毒以来,已对20余种果树病毒进行了检测。dsRNA检测法,主要有以下3个步骤:一是,提取dsRNA。先选取新鲜组织样品10~40克(柱分析法),或0.1~0.5克(微量法),研成粉末后,分别转移到已冷冻的50~250毫升离心瓶中(柱分析法),或3毫升离心瓶中(微量法)。然后,立即加入1~5倍体积的双强STE(单强=0.1NaCl,0.05MTrisHCL,1MEDTA,PH7.0),0.1~0.5%的2-巯基乙醇,0.5毫克/毫升胍皂土(或1%PVP)进行提取。俟组织一融解,即加入等体积的STE饱和苯酚(用NH₄OH调整PH至7.0),和0.5倍体积的氯仿-异戊醇混合液(24/1=V/V),进行泥浆提取。在冰块上振荡半小时,悬浮液采用离心澄清,将水相调整后,使含乙醇15~18%(V/V)。二是,分离和浓缩dsRNA。即可采用标准柱法,也可应用微量法。采用标准柱法时,可取提取液的上清液,在CF-11纤维柱上纯化。层析柱含CF-11纤维素2.5克,载有溶于含15~18%乙醇的单强STE20~40毫升样品。用80~120毫升含15~18%乙醇的单强STE冲洗该柱。用14毫升单强STE,从柱上洗脱dsRNA。在样品中加入乙醇和醋酸钠,使其浓度分别达到67%和50mM,从而使dsRNA浓缩沉淀,最后在-20℃贮存4

小时以上。应用微量法时,要将含15~18%乙醇的单强STE平衡的50毫克CF-11纤维素,转移到1.5毫升微离心管中。然后,向管中加入由0.1~0.5克组织制成的上清液。将微离心管在冰块上振荡3次,每次振荡5分钟。使dsRNA更好地吸附到纤维素上。然后,离心集结纤维素-dsRNA复合物,分次向离心管中加入含15~18%乙醇的STE,每次0.1毫升,振荡离心,移至上清液,如此反复冲洗3~4次。最后一次冲洗后,加入0.5毫升单强STE,到纤维素吸移管中冲洗dsRNA,使dsRNA与纤维素分离。振荡,离心和转移含有dsRNA的上清液,至第二个微离心管中,dsRNA在乙醇中沉淀浓缩方法,与标准柱法相同。三是,检测dsRNA(凝胶电泳分析)。用含10%甘油的电泳缓冲液(40mMTris,20mM醋酸钠,10mMEDTA,PH7.8),再次悬浮已离心的乙醇沉淀。然后,将样品用于电泳。dsRNA在6~8%的聚丙烯酰胺凝胶板(0.8毫米×8厘米×10厘米)上分析。在常温下,30毫安(mA)、100伏(V)电泳2~4小时。凝胶用10~50毫克/升的溴化乙啶溶液染色10分钟(也可用AgHO₃染色),在水中脱色。

电泳前,要注意以下3个问题:第一,用已知RNA分子量的病毒,作为检测分子量的标记;第二,用健壮植株材料作对照;第三,将样品用10微克/毫升脱氧核糖核酸酶工,或核糖核酸酶处理,降解RNA和ssRNA等污染物。我国应用这种方法,在苹果花叶病毒的检测方面,取得了初步结果。张洪胜等(1989)以感染苹果花叶病毒的金冠叶片为试材,对APMV的dsRNA进行提取,经冰冻高速离心,E.M.K纤维素柱层析及核酸链酶降解,获得纯净的病毒特异性双链核糖核酸液。经紫外分光检测看出,病株在260nm处有一明显吸收峰,而无毒对照未出现吸收峰(图11)。(待续)

小 资 料

安徽涌现 147 个亿元镇 安徽省农村集镇目前已发展到2498个,建制镇754个,其中年国民生产总值超过1亿元的镇达147个。3000多个农村集贸市场和各类专业市场也在小城镇中诞生。

贵州有 17 个亿元乡镇 贵州省农村亿元乡镇从无到有,如今已“冒”出了17个亿元乡镇。农业产值比重小,非农业产值比重大,是贵州这17个亿元乡镇的显著特点。目前贵州省正在加紧建设100个亿元乡镇企业小区。

温州有 72 个亿元镇 浙江省温州市已有72个镇的总产值超亿元,其中工农业总产值超10亿元的镇达11个。