

山东省葡萄几种主要病毒病调查及检测研究

王升吉¹, 赵玖华¹, 尚佑芬¹, 吕志华², 张加魁³

(1. 山东省农业科学院 植物保护研究所, 山东省植物病毒学重点实验室, 山东 济南 250100 2 济宁市林业局经济林站, 山东 济宁 272000

3. 山东省酿酒葡萄科学研究所, 山东 济南 250100)

摘 要: 对采自山东省不同葡萄园类别的葡萄样品, 采用 PTA-ELISA 法和 Dot-ELISA 法对葡萄茎痘相关病毒(GRSPaV)进行了检测, 采用 DAS-ELISA 法对葡萄卷叶病的 3 个毒原(GLRaV-1、-2、-3)进行了检测。GRSPaV 检测结果表明: 检测的 61 个品种 518 个样品, 阳性样品率 33.6%, 阳性品种率 73.8%, 其中资源圃样品阳性率 32.7%, 生产园样品阳性率 34.0%。对检测到阳性样品辅以 RT-PCR 法验证, 2 对引物均扩增出了预期片段, 分别为解旋酶基因 340 bp 片段、CP 基因 842 bp 片段。GLRaV-1、-2、-3 的检测结果表明: 鲜食品种 3 种病原的阳性样品率分别为 33.7%、7.1%、62.2%, 酿酒品种阳性样品率分别为 35.1%、16.2%、54.1%, 综合 3 种病毒的阳性样品率为 76.3%, 品种感染率 87.7%。通过该类研究对推动国内葡萄无毒化生产有重要意义。

关键词: 葡萄茎痘相关病毒(GRSPaV); 葡萄卷叶病毒-1、-2、-3(GLRaV-1、-2、-3); 检测; 山东
中图分类号: S 436.631.1⁺9(252) 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)07-0020-04

葡萄病毒病主要是通过插条和嫁接等营养繁殖传播。由于葡萄生长的特殊性, 葡萄病毒病的传播一直未得到有效的控制。随着葡萄种植业的日益繁荣, 苗木流通范围越来越大, 病毒的传播率也随之加快, 以往不易被发现的病毒病害日益加重。到目前为止, 在葡萄上共发现 20 个属 55 种病毒^[1], 而危害较重的病毒病害有葡萄卷叶病(Grapevine leafroll disease, GLRD)、葡萄扇叶病(Grapevine Fanleaf disease)、葡萄茎痘病(Grapevine stem pitting disease)以及由葡萄斑点病毒(GFKV)、葡萄茎沟病毒(GVA)、葡萄栓皮病毒(GVB)引起的病毒病^[2-3]。其中导致葡萄卷叶病的病原复杂, 由 11 种先后编号为 1~9 和 Pr、De 的葡萄卷叶病毒(GLRaV 1-9 Pr, De)侵染所致^[4-5]。据美国教授 Goheen 对我国 10 个葡萄品种的检测结果表明, 80% 的品种带有卷叶病毒, 70% 的葡萄品种有茎痘病毒, 29% 的葡萄品种有栓皮病毒^[6]。山东省是我国重要葡萄产区, 栽培面积较大, 关于该地区葡萄病毒种类情况调查, 2002 年有所报道^[7], 但随着时间的推移, 品种更新换代, 繁殖材料的交流频繁, 葡萄种植面积迅速扩大, 葡萄病毒病种类和分布感染率也发生着一些变化。因此, 近 3 a 该研究对山东省内葡萄主

要种植区进行了大范围的采样并进行病毒病种类、分布和感染频率的检测和调查工作, 以期对该地区主要葡萄病毒发生情况进行较系统研究。

1 材料与方法

1.1 田间普查与采样

分别于 2007、2008、2009 年春、秋二季赴山东省烟台、蓬莱、平度、济宁、新泰、济南、长清等地采集葡萄病毒病样品。这些采样点包括葡萄普通栽培园和葡萄科研院所的品种资源圃。有以酿酒葡萄为主的园区, 也有以鲜食葡萄为主的园区。2007 年采集样品 129 个, 2008 年采集样品 288 个, 涉及 24 个品种, 2009 年采集样品 223 个, 涉及 36 个品种。春天采集样品, 主要用于葡萄茎痘病毒(GRSPaV)的检测, 采样方法是选定品种随机选择单株新梢上接近生长点生长异常的叶片, 并置于塑料袋中, 注明采集地和日期, 冷藏保存备用; 秋天采集样品, 主要用于葡萄卷叶病毒-1、-2、-3(GLRaV-1、-2、-3)的检测, 采样方法是采集叶色变红、叶片反卷等显症植株的中、下部叶片。

1.2 检测病毒种类与主要试剂

检测的葡萄病毒种类和株系包括: 葡萄茎痘病毒(GRSPaV)、葡萄卷叶病毒-1(GLRaV-1)、葡萄卷叶病毒-2(GLRaV-2)、葡萄卷叶病毒-3(GLRaV-3)。检测中使用的 GRSPaV 多克隆抗体及阴、阳性对照由加拿大圭尔夫大学馈赠, GLRaV-1、-2、-3 检测用的抗血清及阴、阳性对照购自北京陆桥动植物检疫所。碱性磷酸酯酶(AP)标记山羊抗兔 IgG (H+L)、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG (H+L)均购自北京中杉金桥生物技术有限

第一作者简介: 王升吉(1963-), 男, 山东平度人, 研究员, 研究方向为植物病毒及生物技术。E-mail: shjiw@163.com.

责任作者: 尚佑芬(1951-), 女, 江苏宝应人, 研究员, 现主要从事植物病毒病及植物病理学研究工作。E-mail: shangyoufen@163.com.

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2006D32)。

收稿日期: 2011-02-14

公司, NBT、BICP 购自北京经科宏达生物技术有限公司。硝酸纤维素膜(NCM)、酶标板、RT-PCR 法所用第一链 cDNA 合成试剂盒(SK2030)及 PCR 扩增试剂盒(SK2492)均购自上海生工生物工程有限公司。植物总 RNA 提取 RN Aplant Reagent 试剂(DP407)购自 Tiangen 公司。其它化学试剂均为国产或进口优级纯或分析纯试剂。

1.3 检测方法

GRSPaV 的检测采用间接酶联免疫吸附检测法(PTA-ELISA)和斑点酶联免疫吸附检测法(Dot-ELISA), 并用 RT-PCR 法对试验结果进行验证; GL-RaV-1、-2、-3 检测应用双抗体夹心酶联免疫吸附检测法(DAS-ELISA)。

1.3.1 PTA-ELISA 法 参照 Agdia 的 ACP ELISA Kit 产品操作说明^[8]进行, 并做适当的改进, 大致步骤: ①样品前处理: 样品和常规提取液按 1:10 比例, 研磨成汁, 离心, 取上清。②点样: 按布局依序在酶标板上点样, 100 μ L/孔, 4℃冰箱过夜。③加第一抗体。④加酶标二抗。⑤显色。⑥中止与测定 加 2 mol/L 硫酸溶液 50 μ L/孔, 终止反应, 酶标仪测定 OD₄₉₂ 值。⑦结果判断: 以所有阴性 CK 孔的 OD₄₉₂ 平均数 D 为基数, 各样品 OD₄₉₂ 值与 D 比较, 判断其带毒及强弱。

1.3.2 Dot-ELISA 法 参照相关文献^[9]方法并加以改进。该法以硝酸纤维素膜(NCM)为样品载体, 在其上划 1.0 cm² 方格。大致步骤: ①样品前处理: 同前(1.3.1)②上样: 每样品每方格 7 μ L, 室温下干燥 30 min。③封闭: 膜泡在封闭液中, 室温振荡封闭 1 h, TTBS 缓冲液(TBS 液加 0.05% Tween-20)冲洗 2~3 遍, 凉干(下同)。④加抗体。⑤加酶标抗体。⑥显色: 用 NBT/BCIP 底物溶液。⑦结果判断: 根据样品是否显兰紫色, 与阴性 CK 和阳性 CK 比较, 目测结果的阴或阳性。

1.3.3 DAS-ELISA 法按中杉金桥公司的 DAS-ELISA 产品操作说明进行。主要步骤为: ①样品粗提液的制备: 将葡萄叶样品和提取缓冲液按 1:5(g/v)比例研磨, 4 000 r/min 离心, 取上清液。②包被抗体: 包被抗体稀释成工作浓度, 100 μ L/孔点样, 4℃孵育过夜, 甩干, PBST 洗涤液洗板 3 次(下同)。③加样品: 依序在酶标板上点样, 37℃(保湿)孵育 3 h。④加酶标抗体: 酶标抗体稀释成工作浓度, 点样, 37℃孵育。⑤加底物: 临用前避光下配对硝基苯磷酸钠(ρ NPP)底物溶液, 点样, 37℃避光反应 1 h。⑥酶标仪读数: 测定每孔的 OD₄₀₅ 值。待测样品 OD₄₀₅ 值/阴性 OD₄₀₅ 值 \geq 2, 即为阳性。

1.3.4 RT-PCR 法 选定嫩叶为样品试材。总 RNA 的提取按 Tiangen 公司产品操作说明。根据 NCBI 上已发表的该病毒 AF057136、AF026278、AY881626 等序列, 设计 2 对引物分别为: RSP1/RSP2 (5'-GATGAGGTC CAGTTGTTTCC-3'; 5'-AT CCAAAGGACCTTTTGAC-C-3', 扩增基因组 4 372~4 711 bp 处解旋酶基因片段, 340 bp)、RSP5/RSP6 (5'-GAGGATTATAGAGAATG-

CAC -3'; 5'-GCACTCTCATCTGTGACTCC-3', 扩增 7917~8358 bp 处 CP 基因片段, 842 bp), 均由上海生工合成。cDNA 合成及 PCR 扩增分别按上海生工产品操作说明。

2 结果与分析

2.1 检测 GRSPaV 的结果

结果如表 1 所示, 3 a 来共采集葡萄品种 61 个, 518 个样品, 通过 PTA-ELISA 和 Dot-ELISA 方法检测, 与 GRSPaV 抗血清呈阳性反应的样品 174 个, 阳性率 33.6%, 涉及 45 个品种, 品种被侵染率 73.8%。其中资源品种样品阳性率 32.7%。大田品种样品阳性率 34.0%。174 个阳性样品, 据种植者观察, 带毒样品多数植株病情症状不明显, 部分植株出现长势弱、发芽晚、果实少等病症。

不同品种样品受病毒侵染程度的统计, 资源圃中有 14 个品种的全部 49 个样品均未检出 GRSPaV 侵染, 如克里森、宝石等, 占资源圃品种的 35.9%, 28.2%品种带毒率为中低水平(1%~50%), 如红香蕉、无核白等, 其它 35.8%品种带毒率处于 51%~100%中高水平, 如白富尔、聂布盖等。生产园品种中红提等 2 个品种中全未检测到该病毒, 占生产园品种的 9.1%, 59.1%的品种带毒率中低水平(1%~50%), 如巨星、玫瑰香, 其它 31.8%品种带毒率处于高水平(50%~100%), 如六月紫、紫真香等(表 1, 品种名未列出)。从表 1 可看出, 生产园葡萄品种受病毒侵染程度(90.9%)明显较资源圃品种受侵染程度(64.1%)高。

2.2 ELISA 检测结果的 RT-PCR 法验证

经 ELISA 测定呈阳性的样品(葡萄品种贵妃玫瑰、红双味、白雷司令)依次编号为 1、2、3, 呈阴性的样品(克瑞森、宝石)为 4、5, 进行分子生物学试验验证。提取的总 RNA, 1.2%琼脂糖凝胶电泳观察到较清晰的 28S、18S 条带, 表明纯度好、得率高。用设计 2 对引物 RSP1/RSP2、RSP5/RSP6 对 5 个样品总 RNA 进行 cDNA 合成、PCR 扩增, 2%琼脂糖凝胶电泳, 获得电泳图谱见图 1 的 a、b, 看出 2 对引物在第 1、2、3 样品上分别扩增出了 340.842 bp 片段, 而第 4、5 样品上则无扩增片段, 与预期结果吻合。

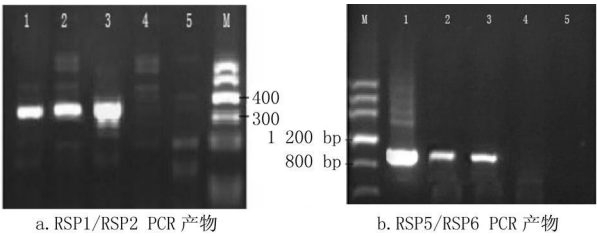


图 1 GRSPaV 3 对引物 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 The agarose gel electrophoresis of RT-PCR with 3 pair of primer sets of GRSPaV

注: M: 分子量标准; 1: 贵妃玫瑰; 2: 红双味; 3: 白雷司令; 4: 克瑞森; 5: 宝石。

表 1 GRSPaV 侵染葡萄样品的检测结果

Table 1 The detection results of grapevine samples infected by GRSPaV

葡萄园类别 Vineyards category	样品受病毒侵染程度 Incidence of virus-infected samples/ %	涉及葡萄品种数 Grapevine cultivars No. associated	占百分率 Percentage/ %	涉及葡萄品种的样品数 Sample No. of grapevine cultivars associated	占百分率 Percentage/ %
资源圃样品 Samples from grapevine germplasm	0(无)(none)	14	35.9	49	30.2
	1~50(中低)(mode rate-low)	11	28.2	66	40.7
	50~100(中高)(medium-high)	14	35.8	47	29.0
	未侵染数 Numbers not infected	-	-	109 *	67.3 *
	阳性数 Numbers infected by virus	25	64.1	53 *	32.7 *
	合计 total	39	100.0	162	100.0
生产园样品 Samples from Production Garden	0(无)(none)	2	9.1	12	3.4
	1~50(中低)(mode rate-low)	13	59.1	297	83.4
	5~90(中高)(very high)	7	31.8	47	13.2
	未侵染数 Numbers not infected	-	-	235	66.0
	阳性数 Positive numbers	20	90.9	121 *	34.0 *
	合计 total	22	100.0	356	100.0
	未侵染总数 Sum not infected	16	26.2	344 *	66.4 *
	阳性总数 Sum infected by virus	45	73.8	174 *	33.6 *
总合计 total		61		518	

注:表中带 * 号的数字为不受左列“涉及葡萄品种数”界定的数字。下同。

Note: In the table with * asterisk figure was not defined from the left column, involves the number of grape varieties. Below the same.

2.3 DAS-ELISA 检测 GLRaV 情况

引起葡萄卷叶病(GLRD)的病毒有多种。该试验对我国常发生的 GLRaV-1、-2、-3 进行了检测^[10 12], 检测结果见表 2。这些样品主要采自平度、烟台、蓬莱等山东半岛葡萄主产区, 其中青提、香悦、巨玫瑰、玫瑰香等 25 个鲜食品种主要采自平度大泽山葡萄产区, 样品总数为 98 个(表 2 鲜食品种一栏), 感染上述 3 种病毒的阳性样品率分别为 33.7%、7.1%、62.2%, 阳性品种率分别为 40.0%、8.0%、72.0%。赤霞珠、梅鹿杰等 7 个酿酒品种样品主要采自蓬莱、烟台的张裕公司、长城公司等几大葡萄酿酒企业生产基地, 共 37 个样品(表 2 酿酒品种栏), 感染上述 3 种病毒的阳性样品率分别为 35.1%、16.2%、54.1%, 阳性品种率分别为 71.4%、57.1%、71.4%。两类葡萄均对 3 种病毒感染率不同, GLRaV-2 侵染率最轻,

GLRaV-1 次之, GLRaV-3 最重。从整个 135 个样品看, 103 个样品受到 GLRaV-1 不同程度复合感染, 样品感染率 76.3%, 32 个品种中有 28 个品种受感染, 品种感染率为 87.7%。

不同品种样品受病毒侵染程度的统计, 鲜食品种中未受 GLRaV-1、-2、-3 侵染的品种数分别占鲜食品种的 60.0%、92.0%、28.0%, 如香悦、里扎马特等、青提、蜜指等、巨玫瑰、金手指等分别未受上述 3 种病毒侵染。其它品种均为 3 种病毒带毒率较高水平(51%~100%)的, 分别占鲜食品种的 40.0%、8.0%、72.0%, 如巨玫瑰、维多利亚、美人指等分别受上述 3 种病毒高度侵染。酿酒品种中未受侵染的品种数分别占酿酒品种的 28.6%、42.9%、28.6%, 如火焰、皇家秋天、里扎马特等分别未受 3 种病毒的侵染。

表 2 GLRaV-1、-2、-3 侵染葡萄样品的检测结果

Table 2 The detection results of grapevine samples infected by GLRaV-1, -2, -3

品种类别 Cultivars category	样品受病毒侵染程度 Incidence of virus-infected samples/ %	涉及葡萄品种数 Grapevine cultivars No. associated						涉及葡萄品种的样品数 Sample No. of grapevine cultivars associated					
		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
鲜食品种 Samples from table grapevine cultivars	0(无)(None)	15	60.0	23	92.0	7	28.0	55	56.1	91	92.9	27	27.6
	1~50(中低)(Moderate to low)												
	51~100(中高) (Moderate to high high)	10	40.0	2	8.0	18	72.0	43	43.9	7	7.2	71	72.4
	未侵染数 Numbers not infected	-	-	-	-	-	-	65 *	66.3 *	91 *	92.9 *	37 *	37.8 *
	阳性数 Positive numbers	10	40.0	2	8.0	18	72.0	33 *	33.7 *	7 *	7.1 *	61 *	62.2 *
	合计 Sum	25	100.0	25	100.0	25	100.0	98	100.0	98	100.0	98	100.0
酿酒品种 Samples from wine grapevine cultivars	0(无)(None)	2	28.6	3	42.9	2	28.6	8	21.6	15	40.5	9	24.3
	1~50(中低)(Moderate-low)	5	71.4	4	57.2			29	78.4	22	59.4		
	51~90(很高)(Very high)					5	71.4					28	75.7
	未侵染数 Numbers not infected	-	-	-	-	-	-	24 *	64.9 *	31 *	83.8 *	17 *	45.9 *
	阳性数 Positive numbers	5	71.4	4	57.2	5	71.4	13 *	35.1 *	6 *	16.2 *	20 *	54.1 *
	合计 Sum	7	100.0	7	100.0	7	100.0	37	100.0	37	100.0	37	100.0
	未侵染总数 Sum not infected	17	53.1	26	81.2	9	28.1	63 *	46.7 *	106 *	78.5 *	36 *	26.7 *
	阳性数 Positive numbers	15	46.9	6	18.8	23	71.9	72 *	53.3 *	29 *	21.5 *	99 *	73.3 *
总合计 Total sum				32						135			

3 结论与讨论

葡萄是一种受多种病毒侵染和威胁的植物,且树体一旦被病毒侵染,将终生带毒持久危害,目前还没有化学药剂可以控制,只有采取积极的预防措施才能奏效^[13-15]。葡萄病毒检测技术研究和应用是葡萄无毒化生产的重要环节和保障,该研究分别用 PAT-ELISA、Dot-ELISA 和 DAS-ELISA 法,对采自山东省不同葡萄产区的葡萄样品检测了 GRSPaV、GLRaV 多种病毒病原。检测结果表明,几种病毒的普遍存在,对葡萄优质高产潜在的危害是不容忽视的,尤其是葡萄茎痘相关病毒(GRSPaV),近些年国内才有调查和研究的报道,该研究是对山东省葡萄的首次采样检测,印证了该病毒的普遍存在,国内其它葡萄产区情况有待进一步验证。该病毒对葡萄生产的危害应引起重视。关于该病原与国外报道该病毒病原的缘源关系,有待后续的研究论证。GLRD 是国内研究较多的重要葡萄病毒病,从山东省各葡萄园的样品检测看,仍普遍存在,且 GLRaV 有多种病原(如-1、-2、-3 等)复合侵染的现象,较以往的调查结果并无降低的趋势^[7],该研究的目的在于进一步引起人们对葡萄病毒病害危害的重视。

我国是传统葡萄种植大国,新老葡萄园并存是各地普遍问题,老龄植株成为多年积累与传播多种病毒的根源和桥梁,在新老植株交替的葡萄园中,新植株极易受到侵害。葡萄病毒病危害的严重性、长期性和防治上的困难一直是国内外学者所关注的重要问题,最行之有效的措施是严格进行地区间引种和材料交换的检疫检测,

尤其是从国外引进新品种、新种质时,确保无外来病毒病原的侵入,适时更新和剔除带毒病株,培育无病毒母株,建立无病毒葡萄苗木繁育圃,保证苗木的优质化。

参考文献

[1] Martelli G P. Grapevine virology highlights 200~2003[C] . Extended Abstracts 14th ICVC Conference (12~17h September) Locorotondo, 2003: 1-10.

[2] Gambino G, Gribaudo I. Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control[J] . Phytopathology, 2006, 96(11): 1223-1229.

[3] 顾沛文, 张军翔. 葡萄卷叶病的研究进展[J] . 宁夏农学院学报, 2003, 24(1): 73-75, 87.

[4] Maliogka V I, Dova C I, Katis N I. Generic and species-specific detection of viruses belonging to an evolutionary distinct lineage within the Ampelovirus genus[J] . Journal of Virological Methods, 2008, 154: 41-47.

[5] 刘永清, 王国平. 葡萄病毒病研究进展[J] . 中国果树, 2002(4): 47-51.

[6] 潘志勇, 翟衡, 左方梅, 等. 山东葡萄产区主要病毒病发生危害调查[J] . 植物保护, 2002, 28(6): 40-41.

[7] (Author unknown). Instructions of ACP ELISA, alkaline phosphatase label, PathoScreen? Kit[R] . Agdia Incorporated Company, USA, (Publication date unknown). For details see websites: <http://orders.agdia.com/Documents/m21.pdf>.

[8] 马铃薯、甘薯病毒检测[G] . 国际马铃薯中心, 四川省农业科学院, 1998: 41-44, 50-53.

[9] 张玉满, 李云, 田砚亭, 等. 葡萄卷叶病毒外壳蛋白基因的克隆、序列分析及其在大肠杆菌中的表达[J] . 植物病理学报, 2000, 30(3): 232-236.

[10] 鲁晓燕, 牛建新, 赵英. 葡萄病毒病主要检测技术[J] . 中国南方果树, 2005, 34(2): 59-61.

(注:该文作者还有赵亚、戴争,单位同第一作者。)

Research on the Survey and Detection of Several Kinds of Main Grapevine Viruses in Shandong Province

WANG Sheng-ji¹, ZHAO Jiu-hua¹, SHANG You-fen¹, LV Zhi-hua², ZHANG Jia-kui³, ZHAO Ya¹, DAI Zheng¹

(1. Institute of Plant Protection, Academy of Agricultural Science of Shandong, Plant Virology Critical Laboratory of Shandong, Jinan, Shandong 250100; 2. Economic Forest Station of Forest Bureau of Jining, Jining, Shandong 272000; 3. Institute of Wine Grape Science of Shandong, Jinan, Shandong 250100)

Abstract: The study had detected grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) of grapevine samples collected from different vineyards category in Shandong province, with PAT-ELISA and Dot-ELISA. Meanwhile, 3 types of toxogenes of grapevine leafroll associated virus-1, -2, -3 (GLRaV-1, -2, -3) had also been detected with DAS-ELISA. The results of GRSPaV detection were, among 518 samples of 61 cultivars, 33.6% sample positive rate, 73.8% cultivar positive rate; the sample positive rate of grapevine germplasm, production garden accounted for 32.7%, 34.0%, respectively. With 2 pairs of designed primers, the samples showing positive reaction in ELISA tests were complemented by RT-PCR, anticipated fragments, 340 bp for the helicase gene, 842 bp for the CP gene having been amplified successfully. The results of GLRaV-1, -2, -3 detection of table grape had sample positive rates of 33.7%, 7.1%, 62.2%, respectively, those of wine grape 35.1%, 16.2%, 54.1%, respectively; the comprehensive positive samples, cultivars rate of the 3 kinds of viruses were, 76.3%, 87.7%, respectively. By the study, there will be of far reaching importance in propelling domestic grapevine virus-free production.

Key word: grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV); grapevine leafroll associated virus-1, -2, -3 (GLRaV-1, -2, -3); detection; Shandong province