

张
洪
胜

介绍几种果树病毒检测技术

果树病毒检测技术是果树病毒研究中的重要环节。长期以来,由于多年生木本果树病毒的提取、纯化比较困难,因此果树病毒检测一直沿用鉴别寄主检测法。该法需时长、占地多,且管理较麻烦。随着近代生物化学、遗传工程及电镜技术的不断发展、新颖、快速、灵敏的检测技术大量涌现。其中,酶联免疫吸附分析(ELISA)、免疫电镜(IEM)及病毒特异性核糖核酸(dsRNA)分析。等技术国外均已在果树上开始应用。这些方法依据的原理不同,检测程序各异、适用场合也各有其特点。本文拟综合有关资料。在侧重果树病毒应用的前提下,对以上各方法作一简略评述。

一、鉴别寄主法

该法是目前国内用于果树病毒检测的主要手段。它依据有侵染活性的病毒粒子侵入鉴别寄主后,大量繁殖,干扰寄主细胞的正常生理代谢,导致发病并显示特定症状。依据鉴别寄主和传播方式的不同此法又分两种:

(一) 木本鉴别寄主嫁接传播。

以苹果为例,用于此法的鉴别寄主有如下四种:弗吉尼亚小苹果(鉴定苹果茎痘和茎沟槽病毒)、苏俄苹果(鉴定苹果褪绿叶斑病毒)、大果海棠(鉴定苹果褪绿叶斑和大果海棠鳞皮病毒等)司派227(检定司派22衰弱病毒)。Posnette gro-piey(1954)首先采用了“二重芽接”法。即于每年的3月下旬定植无毒根砧,七月份采集被检芽,芽接于砧木基部,后削取鉴别寄主的芽接于其上2厘米处。塑料带扎好,每种植示植物嫁接3株(每个品种接12株)。于次年春萌芽后在鉴别寄主芽上1厘米处剪砧,控制被检芽的长势(摘心)。待显示症状后观察记录发病情况。

(二) 草本鉴别寄主机械传播法

此法所用鉴别寄主主要有昆诺葵,莧色紫,新叶烟及黄瓜等。一般认为木本果树病毒向草本寄主上传播较困难,但如用幼嫩感病叶或花办,并加入一些佐剂常可成功。下面推荐 H.E. Waterworth 的一个程序:在1至6月,用田间或温室内的感病株未成熟叶或花办在 Kirkpatrick—Linder 缓冲液(3%尼古丁J—0.05M磷酸氢二钾—0.05M半胱氨酸盐酸)中研磨,粗提液(经纱布过滤)在撒有400目金钢砂的成熟昆诺葵叶上轻轻摩擦,后立即用自来水冲洗。接种株在25℃下培育,7—10天调查发病情况。

鉴别寄主检测法操作简便,不需贵重仪器设备,但它费时,费力,检测范围窄并常常受肥水管理,病虫危害、寄主年龄、嫁接方式等的影响,对温和性株系也无能为力。

二、酶联免疫吸附分析(Enzyme-linked Immunosorbent Assay:ELISA)

ELISA 是在普通血清学基础上发展起来的一种更灵敏的快速检测方法。它的基本依据是,在聚

苯乙烯塑料板中的小穴内,首先加入第一抗体(又称诱捕抗体),经冲洗后,加入病株提取液,并培育一段时间,最后加入经酶标记的第二抗体经酶解后可产生有色水解物的无色基质。由于抗体抗原发生凝集反应,释放出酶与基质作用而产生有色物质。即可通过光谱比色或直接肉眼观察而验证反应的进行情况。

ELSA中所用的免疫球蛋白(1gG)需经过纯化。一般以饱和硫酸铵沉淀和DEAE纤维素柱层析较为常用。标记抗体的酶多用碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶,前者通常以对一硝基苯磷酸酯为底物,浓度为0.5—1.0mg/ml,后者底物为邻苯二胺。

Caroline L.ELegg (1979)利用此法检测了苹果褪绿叶斑病毒。其简略程序为:0.2—0.3克病组织在提取缓冲液(PBS Tween含20g/L pvp,2g/L 卵清蛋白及2g/L 二乙基二硫氨基甲酸酯,1.0NH₄调PH到9.6)中研磨制得粗提液;30℃温度下,聚苯乙烯塑板在包被缓冲液(0.05M Na₂CO₃ PH9.6)中用2—4μg/mL球蛋白包被4小时;塑板用PBS—Tween冲洗;加入稀释1:20的提取液,每穴200(μl)微升;加入酶标记的r玻旦白,用量50μe/穴;加入作用基质;混合后6℃下培育过夜,观察结果或用光谱仪在405nm处测定。

ELSA是最近才发展起来的快速灵敏检测办法。其最大优点是需抗血清量少,且可用于大批量样品的检测,故现国外使用极为广泛,但该方法对抗血清的纯度要求高,植株材料的污染会减少抗血清的产量,另外此法还受抗血清的差异性影响,被注射的不同个体对同一抗原会产生不完全相同的反应,甚至同一抗原注射到同一动物个体中,不同的采血时间所获得的抗血清也有差异。

三、免疫电泳技术(Immune Electron Microscopy IEM)

IEM是利用载于电泳铜网上的特异性抗血清诱捕病毒粒子并发生凝集反应,有时还在另一抗体(羊抗兔免疫球蛋白)中进行装饰,使病毒粒子的体积增大,然后在电泳下观察。因此,IEM是血清学的特异性和电泳的直观性的综合运用。该技术对病组织的悬液或超薄切片均适用。果树上已有报道。

利用这一技术,C.Kerlan (1981)等对苹果褪绿叶斑病毒(CLSV)和洋李痘疱病毒(plum pox virus)进行了检测。其方法为,病叶在加有2.5%尼古丁和Ippv等试剂下研磨,为保证CLSV粒子的完整还需加0.05Mtris,5mM MgCl₂,将稀释1:100的抗血清加到封口膜(parafilm)上,用镊子将电泳载网与抗血清接触,并培育5分钟;磷酸缓冲液冲洗;载网浮载于待测液滴上,并培育15分钟

冲洗载网;载网浮于1:100倍羊抗兔1gG装饰并培育片刻;冲洗;载网经2%醋酸铀负染;镜检。该法检出极限可达5—10ng/ml病组织。

IEM技术检出速度快,灵敏度高。但它对病毒株系的特异性较差,也不适于大批量样品的检测,同时要有电泳设备。应用范围不太广。国内尚已报道。

四、病毒特异性双链核糖核酸法

(Double-Stranded RNA,ds RNA)

ds-RNA分析作为病毒的检测手段是基于如下理论:ds-RNA只存在于受病毒侵染的细胞内,健康株中未发现。因此,根据ds-RNA特有的性质将其与寄主体内的核酸分离,通过电泳技术检测其存在与否及种类。这一技术已在国外有了广泛的应用。

不同感病株的前处理过程基本相似。首先,鲜样或冰冻样在提取缓冲液中、蛋白变性剂、酚、氯仿等佐剂中抽提总核酸,冰冻超离心,上清液过纤维素柱,最后电泳。

本法的最大特点是对所研究的病毒不需预先了解。适于发现新的病毒种类且对类病毒同样有效。提纯的特异性dsRNA还可制血清或作成分子探针。但此法也有许多不足,它也不适于大批量样品的检测,且需特殊仪器设备,提取程序也很复杂,因而影响了它的推广。(山东省农业大学园艺系)

秋白菜高产防腐耐贮措施

1. 叶面喷施磷酸二氢钾:在白菜定棵后开始喷施,每隔10天喷施一次,共喷二至三次,浓度为1%,通过喷施磷酸二氢钾,可为白菜提供大量的磷钾元素,促进心叶形成和包心,提高净菜率。每亩可增产净菜600公斤。

2. 叶面喷施糖氮液防治霜霉病。在植物体内,氮糖比值低于二的情况下,易发此病。因此在大白菜定棵后喷施糖氮液效果最佳。将100克尿素,100克白糖加入15公斤清水,间隔10天喷施一次连喷三次。喷后可使叶片黑绿而厚,没喷施的叶片黄薄,喷施的病情指数为0未喷施的是12%。

3. 叶面喷施植宝素,6000~8000倍可使大白菜增强抱心,增产15.6%。

4. 叶面喷施链霉素能防止软腐病(水烂、地蛆)。在抱心结球前连喷两次。将2支链霉素加清水20斤。

5. 喷施1000倍液的高锰酸钾可防止病毒病的发生。

6. 叶面喷施食醋,增强耐贮性、防止贮期脱帮。最好在晴天下午,沿白菜基部自下而上喷施,以药液湿润叶面而不下流为宜。喷施后的大白菜采收时很少掉帮,贮存到3月中旬外层老帮仍保持鲜绿。(辽宁大洼县新立农场放丙佳)