

苹果褪绿叶斑病毒和茎沟病毒的鉴定提纯和酶联法检测

王小凤 李秋波 王 荣

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

洪 霓 王国平 刘福昌

(中国农业科学院果树研究所, 兴城 121600)

苹果褪绿叶斑病毒 (CLSV) 和茎沟病毒 (SGV) 是感染苹果和其它果树的两种重要潜隐病毒。根据生物学特性和血清学反应, 确定 W-55 分离物属于 CLSV, W-29 分离物属于 SGV。采用皂土澄清, PEG 6000 沉淀及超离心等步骤, 得到部分提纯的病毒。经电镜观察, W-55 和 W-29 病毒颗粒长度分别为 800nm 和 650nm。

用 CLSV W-55 分离物制备的兔抗血清效价为 1/3200, 用 SGV PV-71 (ATCC) 分离物制备小鼠腹水抗体效价为 1/800, 均用间接 ELISA 法测定。对感染 CLSV 和 SGV 的昆诺藜、苹果叶和花瓣检测结果表明, P/N 值具有显著性。本工作为苹果无毒苗木的生产提供了快速、灵敏的病毒检测手段。

关键词 苹果褪绿叶斑病毒; 苹果茎沟病毒; 酶联免疫检测

迄今为止, 已报道 30 余种侵染苹果的病毒^[1,2], 其中大部分在苹果叶、果实或枝条上引起明显症状, 例如苹果花叶病毒、苹果褐斑病毒等。另外, 有些病毒在一般苹果栽培品种上呈潜伏性感染, 又称潜隐病毒, 例如苹果褪绿叶斑病毒 (Apple chlorotic leaf spot virus, 简称 ACLSV 或 CLSV) 和苹果茎沟病毒 (Apple stem grooving virus, 简称 ASGV 或 SGV)。它们是黄化线条病毒组 (Closterovirus Group) 的可能成员^[3], 是危害仁果和核果类果树的重要病毒, 在世界各地普遍流行。CLSV 和 SGV 在苹果上通常引起慢性衰退症, 如树势衰弱, 枝条稀疏, 年周生长量平均降低 17.9%, 严重的可减产 45—73%, 果质下降。当用感病材料嫁接时, 往往导致急性暴发的衰退病, 对生产造成毁灭性损失^[4]。

40 年代以来, 普遍使用木本指示植物嫁接法检测 CLSV 和 SGV^[1]。随着这两种病毒汁液接种草本指示植物和提纯的成

功^[5-7], 80 年代前后, 国外已开始把 ELISA 等血清学方法应用于苹果无毒苗木生产体系中病毒的检测, 大大提高了效率, 并节约了人力、物力^[8,9]。本文报道 CLSV W-55 和 SGV W-29 分离物的鉴定、提纯及血清学检测的试验结果。

材料和方法

(一) 分离

1987 年 5 月上旬在北京、山东莱阳、辽宁兴城等地采集苹果标样 74 个 (包括花瓣和嫩叶), 加入 5 倍体积冰冷缓冲液研磨, 按常规汁液摩擦接种法, 接种在草本指示植物上。以下两种缓冲液任选一种: (1) 0.05mol/L 磷酸缓冲液 pH7.6, 含 0.02mol/L 巯基乙醇和 0.02mol/L 铜试剂。(2) 0.01mol/L Tris-HCl pH7.5, 含 0.05mol/L

本文于 1991 年 5 月 17 日收到。

本工作为国家“七五”攻关项目。

郭本亮同志参加部分工作, 特此致谢。

L $MgSO_4$ 、0.1% Na_2SO_3 、0.1% 抗坏血酸。以上缓冲液使用前均加入 2% 尼古丁。根据指示植物上的症状,筛选出 W-55 分离物(辽宁兴城)和 W-29 分离物(北京郊区)作为进一步研究的材料。此外,CLSV PV-160 和 SGV PV-71 (ATCC) 也作为对比材料同时进行研究。

(二) 提纯

W-55 和 W-29 分离物均以昆诺藜作繁殖寄主, W-55 接种 3 周后采集病叶, W-29 接种 10 天后采集。参照文献[6,7]的方法,用皂土澄清, PEG6000 沉淀和超速离心等方法提纯病毒。

(三) 电镜观察

提纯的病毒样品经适当稀释后,点在碳膜加固的火棉胶膜上,用 2% 醋酸铀负染,或将病毒样品先用 2% 戊二醛固定,再用 2% 醋酸铀负染。免疫修饰制片法参照文献[10]。

(四) 抗体制备

1. W-55 兔抗血清:提纯的样品与等体积福氏全佐剂乳化,肌肉注射家兔 4 次,每次间隔 1 周,末次注射后 18 天开始耳静脉取血,离心,取上清液, $-20^{\circ}C$ 保存。

2. PV-71 小鼠腹水:提纯的病毒样品与等体积福氏全佐剂乳化,注射小鼠腹腔,每次 $200 \mu l$,隔周注射共 3 次,末次注射 1 周后注射腹水癌细胞 S-180^[11],第 5 天取腹水,低速离心取上清, $-20^{\circ}C$ 储存。

在腹水抗体的吸收试验中,腹水先以 PBS 稀释 10 倍,加入不同浓度昆诺藜蛋白, $37^{\circ}C$ 保温 1 小时,离心,取上清液^[12]。

病毒鉴定中使用的 CLSV 和 SGV 抗血清由英国 East Malling 果树试验站提供。

(五) 血清学检测

1. ELISA: PAS-ELISA 法(A 蛋白双夹心-ELISA)步骤参照文献[13]。A

蛋白和辣根过氧化物酶标记的 A 蛋白为上海生物制品研究所产品。Lommel's 间接 ELISA 法参照文献[12]。辣根过氧化物酶标记的抗兔和抗鼠免疫球蛋白抗体为北京生物制品研究所产品。过氧化氢和邻苯二胺为酶反应底物,聚苯乙烯微孔板反应体积 $100 \mu l$,用 $2 mol/L H_2SO_4$ 终止反应,在 DG-3022 酶联免疫检测仪上测 A_{490} 。

2. 0.5% 琼脂糖免疫双扩散:按常规方法操作^[14]。

3. 植物粗提液制备:昆诺藜叶(按 1:2 W/V)和苹果嫩叶或花瓣(按 1:5 W/V)加入 PBST(含 $0.02 mol/L$ 铜试剂, 2% PVP 和 0.1% 牛血清白蛋白)研磨,低速离心,取上清液,使用时适当稀释。

结 果

(一) 寄主范围和体外抗性

1. W-55 分离物:在昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*) 接种叶上产生 $\phi 2 mm$ 左右的坏死凹斑(图版 I-1 左上),顶部叶片表现褪绿斑驳、环斑及花叶,并伴有坏死(图版 I-1)。在苋色藜 (*C. amaranticolor*) 接种叶上产生针尖状坏死斑点,顶部叶片表现轻斑驳。在蒼达菜 (*Beta cicla*) 顶部叶产生褪绿小斑(图版 I-2)。感病昆诺藜汁液致死温度 $55^{\circ}C$,稀释限点 10^{-3} 。

2. W-29 分离物:在昆诺藜接种叶上产生针尖状褪绿斑,其后成为坏死斑,顶部叶片表现轻斑驳,后期叶缘下卷、畸形,植株生长受到抑制(图版 I-3)。在心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 上产生系统轻斑驳,偶见坏死,2—3 周后症状消失(图版 I-4)。在四季豆 (*Phaseolus vulgaris*) 接种叶上产生少量紫色斑或环斑,顶部花叶及坏死症。感病昆诺藜汁液致死温度 $65^{\circ}C$,稀释限点 10^{-2} 。同时测试的 SGV PV-71 分离物的稀释限点为 10^{-3} 。

74 个标样(包括 W-55 和 W-29)汁液接种的总情况如下: 在昆诺藜和苋色藜上产生症状的共有 28 个样品, 占总数的 37.8%, 其中同时在心叶烟上引起系统感染的占 21%。从而说明 CLSV, SGV 或其它可能的病毒对苹果的感染率。

(二) 血清学相关性

1. W-55 分离物: 用 CLSV 兔抗血清和 Lommel's 间接 ELISA 测试 W-55 和 CLSV PV-160 接种的昆诺藜粗液, A_{490} 分别为 0.43 和 0.71, 健昆诺藜对照为 0.2, 从而证明 W-55 与 CLSV 的血清学相关性。

2. W-29 分离物: 免疫电镜观察结果表明, SGV 兔抗血清与 W-29 病毒颗粒相互作用产生了明显的修饰作用(图版 II-7)。在 0.5% 琼脂糖免疫双扩散中靠近 W-29 抗原孔边形成了沉淀线(图版 II-4)。以上试验表明 W-29 分离物与 SGV 有血清学关系。

(三) 病毒的紫外吸收

部分提纯的 W-55 病毒样品 $A_{260}/$

$A_{280} = 1.63-2.18$, 文献值 CLSV $A_{260}/A_{280} = 1.85^{[3]}$ 。部分提纯的 W-29 病毒样品 $A_{260}/A_{280} = 1.3$, 文献值 SGV $A_{260}/A_{280} = 1.18^{[3]}$ 。

(四) 病毒颗粒形态

W-55 和 W-29 分离物病毒颗粒均为线状。W-55 病毒颗粒长 800—860nm, 宽 13.5nm, 富于柔性, 颗粒之间相互盘绕, 不易准确测量长度(图版 II-5)。文献报道 CLSV 病毒颗粒长度因株系和提取方法的不同, 在 703—824nm 之间^[4]。W-29 病毒颗粒长 650nm, 宽 12nm(图版 II-6)。

(五) 兔抗血清和小鼠腹水效价

1. CLSV W-55 兔抗血清: 用 W-55 提纯样品免疫家兔后, 在第 18、25 和 32 天耳静脉取血制备的抗血清, 免疫扩散法测定的效价均在 1/32 以上(图版 II-1)。除在抗原孔边形成的病毒沉淀线外, 在抗原与抗血清两孔之间也出现植物寄主蛋白的非特异性沉淀线, 当抗血清稀释 1/16 以上时, 此沉淀线减弱, 并逐渐消失。W-55 抗血清经健昆诺藜蛋白吸收后, 同样可以消

表 1 PAS-ELISA 法测定 CLSV 抗血清的效价

Table 1 The titer estimation of antiserum to CLSV by PAS-ELISA

汁液稀释度 Sap dilution	第二抗体稀释度 Dilution of second antibodies			
	1/400	1/800	1/1600	1/3200
CLSV 感染的昆诺藜 Infected <i>C. quinoa</i>				
1/50	1.35(1.7)	0.98(4.26)	0.72(5.2)	0.265(1.4)
1/100	1.25(3.2)	0.72(2.2)	0.52(6.5)	0.35(3.04)
1/200	0.92(3.67)	0.59(2.36)	0.212(7.06)	0.155(3.4)
健昆诺藜 Healthy <i>C. quinoa</i>				
1/50	0.78	0.23	0.138	0.18
1/100	0.39	0.325	0.08	0.115
1/200	0.245	0.249	0.03	0.045

注: 1. 表中数据是 A_{490} 测定值。2. 括弧中的数据是 P/N 值。3. 第 1 抗体稀释 1/2500。

Notes: 1. The data were expressed in A_{490} . 2. Figures in brackets were P/N values. 3. The first antibodies were diluted by 1/2500.

除免疫扩散中的非特异性沉淀线(图版 II-2,3)。

用 PAS-ELISA 法测试 W-55 抗血清效价的结果见表 1。当昆诺藜粗提液稀释 1/100 和 1/200 时,抗血清稀释 1/3200 时,其 P/N > 3, 因此其效价高于 1/3200。此外,当抗血清稀释 1/1600, 昆诺藜粗提液稀释 1/100 和 1/200 时,其 P/N 值为 6.5 和 7,为最佳工作条件。

2. SGV PV-71 小鼠腹水抗体: 表 2 的试验数据表明, SGV 小鼠腹水以健康昆诺藜蛋白原液及稀释液吸附后, 均有较好的测试效果, 其 P/N 值范围 2.5—4.6, 不经吸附的腹水测试 P/N 值为 1.5, 如提高抗原稀释倍数时, 测出 P/N > 3, 这一结果的趋势与 CLSV 抗血清的测试情况相似(表 1)。吸收后的腹水抗体效价为 1/800, 此时 P/N 值为 2.9。

表 2 SGV 腹水抗体吸收条件选择 (Lommel 间接-ELISA 法)

Table 2 Selection of absorption condition of ascites to SGV by Lommel's Indirect-ELISA

抗原稀释度 Antigen dilution	SGV 腹水抗体吸收 Absorption of ascites to SGV									
	a		b		c		d		e	
	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V
1/100	0.38	1.3 (3.4)	0.38	1.50 (3.9)	0.44	1.28 (2.9)	0.43	1.30 (3.0)	0.42	0.64 (1.5)
1/200	0.24	1.08 (4.5)	0.31	1.07 (3.4)	0.35	1.06 (3.0)	0.32	0.82 (2.6)	0.33	0.51 (1.5)
1/400	0.19	0.87 (4.6)	0.2	0.93 (4.6)	0.22	0.74 (3.4)	0.24	0.79 (3.3)	0.23	0.73 (3.2)
1/800	0.14	0.56 (4.0)	0.14	0.58 (4.1)	0.15	0.38 (2.5)	0.15	0.55 (3.7)	0.14	0.44 (3.1)

注: 1. SGV 腹水抗体以不同浓度健昆诺藜蛋白吸收: a. 原液; b,c,d. 原液稀释 1/10, 1/50, 1/100; e. 不吸收的对照。2. H(健昆诺藜蛋白), V(部分提纯的病毒)用作抗原。

Notes: 1. Ascites was absorbed by different concentration of healthy *C. quinoa* leaf protein: a. undiluted; b,c,d. diluted by 1/10, 1/50, 1/100; e. control, unabsorbed ascites. 2. H(healthy *C. quinoa* protein) and V(partially purified SGV) were used as antigen.

表 3 PAS-ELISA 法检测苹果叶中 CLSV

Table 3 Detection of CLSV in leaves of apple tree by PAS-ELISA

试验 No Exp.	汁液稀释度 Sap dilution	CLSV 感染的苹果 Apple infected with CLSV		对照 Control		
		P204	国光	R12740-7A	山定子 (<i>Malus baccata</i>)	苹果实生苗 Apple seedling
1	1/5	0.88(3.8)	0.4(1.7)	0.23	—	—
	1/10	0.31(1.9)	—	0.16	—	—
2	1/5	0.9(3.1)	—	0.29	—	—
	1/10	0.16(1.3)	—	0.12	—	—
3	1/5	2.09(13.0)	0.39(2.43)	0.16	0.18	0.16
4	1/5	1.53(5.75)	—	0.25	0.28	—
5	1/10	—	1.09(3.3)	—	—	0.33

注: 1. CLSV 感染的苹果树曾由木本指示植物鉴定。2. 检测日期: 1989 年 7 月。

Notes: 1. Apple trees infected with CLSV have been identified by woody indicator. 2. Date of detection: July, 1989.

表 4 PAS-ELISA 法检测苹果花瓣中 CLSV
Table 4 Detection of CLSV in petals of apple

检测方法 Detection method	样品号 No sample					
	1	2	3	4	5	6
PAS-ELISA	0.175	0.51 (3.2)	0.20	0.17	0.16 (1.0)	0.45 (2.8)
接种昆诺藜 Inoculation on <i>C. quinoa</i>	-	+	-	-	-	+

表 5 PAS-ELISA 法检测苹果叶中 SGV
Table 6 Detection of SGV in leaves of apple by PAS-ELISA

样品 Sample	第一抗体稀释度 Dilution of first antibody					
	试验 1 Exp. 1	试验 2 Exp. 2				
	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/2000	1/5000
SGV 感染的苹果 Apple with SGV	0.37 (2.18)	0.25 (2.3)	0.17 (4.2)	0.16 (5.3)	0.16 (8.0)	0.15 (7.5)
山定子 <i>Malus baccata</i>	0.17	0.11	0.04	0.03	0.02	0.02

注: 1. SGV 腹水抗体未经吸收。2. 第 2 抗体在试验 1 和试验 2 中分别稀释 1/100 和 1/500。3. SGV 感染的苹果曾由木本指示植物鉴定。4. 检测日期: 1990 年 10 月。

Notes: 1. Unabsorbed ascites to SGV was used. 2. The ascites used as second antibody in Expt 1 and 2 was diluted 1/100 and 1/500. 3. Apple infected with SGV have been identified by woody indicator. 4. Date of detection: Oct 1990.

(六) 苹果中 CLSV 和 SGV 检测

1. CLSV 检测: 表 4 的结果说明: 以苹果 R12740-7A, 苹果实生苗和山定子作阴性对照, 用 CLSV W-55 抗血清检测 CLSV 感染的苹果(曾由木本指示植物鉴定)毒源, 当嫩叶粗提液稀释 1/5 和 1/10 时, 测出 P/N 值多在 1.7—13 之间, 个别数值偏低, 可能是偶然因素所致(表 3)。用 PAS-ELISA 法和汁液接种法检测苹果花瓣(随机取样的未知标样)结果表明, ELISA 测出值较高的两个标样接种昆诺藜后, 产生 CLSV 典型症状, 其余标样在昆诺藜上均为阴性反应(表 4)。

2. SGV 检测: 以山定子作阴性对照, 用未经吸收的 SGV PV-71 腹水抗体和

PAS-ELISA 法检测 SGV 感染的苹果毒源(曾由木本指示植物鉴定)。结果表明, 第一抗体可在较大范围稀释(1/400—1/5000), 第 2 抗体为 1/100 和 1/500 时 P/N 值的范围在 2—8, 从而表明不经吸收的 SGV 腹水抗体在适当稀释后使用, 也可获得较好的检测结果(表 5)。

讨 论

我们从苹果分离、鉴定出 CLSV W-55 和 SGV W-29 分离物。用部分提纯的病毒制备的 CLSV 抗血清和 SGV 腹水抗体, 经过合理的稀释或吸附, 可避免非特异性干扰, 达到检测目的。SGV 腹水的制备表明, 用很少量的病毒(μg 水平)免疫

小鼠,可以获得相对较多的腹水抗体,这对那些在植物组织中含量低的病毒抗体制备是行之有效的。

PAS-ELISA 法^[1]的方便之处在于可以直接用抗血清(或腹水抗体)包被,而不需提取 IgG,所用 A 蛋白和辣根过氧化物酶标记的 A 蛋白均有市售商品,其特异性和灵敏度优于或相当于其它间接 ELISA 法。我们对一系列检测条件的研究,为该方法在苹果无毒种苗生产中的应用奠定了基础。

CLSV 和 SGV 的不稳定性和低浓度为提纯带来一定困难(尤其是后者),因此提纯方法的改良仍是重要的一个方面。同时,我国 CLSV 和 SGV 株系类型的分离、鉴定及基本生化特性的研究有待进一步开展。

参 考 文 献

[1] Nemeth, M.: Virus Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees, pp. 153—223, Akade-

- miai Kiado, Budapest, 1986.
- [2] 刘福昌: 植物检疫, 5: 6—10, 1984.
- [3] Francki, R. I. B. et al.: Atlas of Plant Viruses, Vol. II, pp. 219—234, CRC Press, 1985.
- [4] 芮光绳: 中国果树, 4: 41, 1980.
- [5] Lister, R. M. et al.: *Phytopathol.*, 55: 859—875, 1965.
- [6] Lister, R. M. et al.: *Virology*, 45: 240—251, 1971.
- [7] Sequeira, O. A.: *Phytopathol.*, 59: 1740—1745, 1969.
- [8] Flegg, C. L. et al.: *Ann. Appl. Biol.*, 91: 61—65, 1979.
- [9] Fuchs, E.: *Acta Phytopathol. Academiae Scientiarum Hungaricae*, 15: 69—73, 1980.
- [10] Stephen, A. H.: *Methods in Plant Virology*, pp. 150—153, Oxford Oxfordshire: Blackwell Scientific Pub., 1984.
- [11] Reddecliff, J. M. et al.: *Appl. Microbiol.*, 14(5): 834—835, 1966.
- [12] Lommel, S. A. et al.: *Phytopathol.*, 72: 1018—1022.
- [13] Edwards, M. L. et al.: *J. Virol. Methods*, 11: 309—319, 1985.
- [14] Van Regenmortel, M. H. V.: *Serology and Immunochimistry of Plant Viruses*, pp. 89—97, Academic Press, INC. New York, 1982.
- [15] Thomas, B. J.: *Phytopathol. Z.*, 106: 233—238, 1983.

IDENTIFICATION AND DETECTION OF APPLE CHLOROTIC LEAF SPOT AND APPLE STEM GROOVING VIRUS BY INDIRECT ELISA METHODS

Wang Xiaofeng Li Qiubo Wang Rong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Hong Ni Wang Guoping Liu Fuchang

(Fruit Tree Research Institute, Chinese Academia of Agricultural Sciences, Xingcheng 121600)

Apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and stem grooving virus (SGV) are two important latent viruses, which infect apple and other fruit trees. 74 samples collected from areas of Beijing and Liaoning Prov. etc. were sap inoculated on herbaceous indicator plants. According to the biological properties, serological reactions and morphology of virus particles W-55 and W-29 were identified as isolates of CLSV and SGV.

The antiserum to CLSV W-55 were prepared from rabbits, the titer of which was

1/3200 tested by PAS-ELISA. The ascites to SGV PV-71 (ATCC) were prepared from mice, the titer of which was 1/800 tested by Lommel's Indirect ELISA. The results of detection of CLSV and SGV by PAS-ELISA using apple leaves and petals expressed by P/N values were satisfied.

Key words

Apple chlorotic leaf spot virus; Apple stem grooving virus; Indirect ELISA