

葡萄卷叶病毒的纯化、血清学研究及其 在脱毒组培苗检测中的应用*

蔡文启 徐绍华 莽克强

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

孟保中 马云霞

(河北省农林科学院昌黎果树研究所 昌黎 066600)

摘 要 将具有典型葡萄卷叶病(Grapevine leafroll diseases, GLRD)症状的葡萄组织,经差速和硫酸铯-蔗糖密度梯度离心,提纯了 GLRV,并制备了兔抗血清。电镜下可观察到长度从 600~2000nm 的线形病毒颗粒,其中以 1400nm 左右为主。免疫电镜结果表明线形病毒颗粒能被美国的 NY-1 分离株抗血清(III 型)所修饰。在间接 ELISA 中提纯制品与 GLRV 的 III、IV、II 型抗血清均能产生免疫反应。与 III 型抗血清产生较强的免疫反应,IV 型次之,II 型最弱。在 SDS-免疫双扩散实验中病组织韧皮部粗提液与 GLRV 的 III、IV、II 型抗血清均产生免疫沉淀线。从而推测我国葡萄园内的葡萄卷叶病很可能由 2 种或 3 种卷叶病毒感染所致。采用 A 蛋白夹心酶联免疫吸附试验(PAS-ELISA)检测葡萄试管苗,III 型抗血清和自制抗血清的平行测试结果基本相符,共获得 11 个生食葡萄和 10 个山葡萄品种的脱葡萄卷叶病毒和扇叶病毒的组培苗,扩繁后田间试种表现出良好的农艺性状。

关键词 葡萄卷叶病毒, 纯化, 血清学, 检测

葡萄卷叶病(Grapevine leafroll diseases, GLRD)一般在生长末期表现症状,叶片下卷,除叶脉外叶片变红或变黄,果粒小,数量少,果实色泽差含糖量降低,晚熟,严重为害时可减产 80%,是在世界范围内严重为害葡萄的病害之一。该病在我国葡萄园内也普遍发生,不仅使葡萄产量大减,而且因果实含糖量降低直接影响酿酒质量。

GLRD 症状描述始于 1936 年,该病可通过嫁接传播,但病原并未确定。与 GLRD 相关的病原物研究世界上报道得很多,认为像是马铃薯 Y 病毒^[1]、球形病毒^[2]和线形病毒^[3]。近年来更多证据支持 GLRD 是由一种或多种线形病毒(Closterovirus)^[4~9]侵染引起的。1989 年 Rosciglione^[10]和 Tanne^[11]曾报道,通过粉蚧(Mealybugs)可将这种像线形病毒的颗粒从 GLRD 葡萄传到健康葡萄。1984 年 Gugerli 等人^[6]从 GLRD 葡萄组织中首次提纯了像线形病毒的颗粒(2200nm, 1800nm)。此后 Zee 等人^[8]从纽约的 GLRD 葡萄

* 国家“八五”攻关资助项目。

参加本研究的作者还有河北省农林科学院昌黎果树研究所陈霜莹,章德明。

本文于 1996 年 6 月 13 日收到。

组织中分离了线形病毒(NY-1分离株,1800~1900nm),制备了高滴度的抗血清,用直接双抗体夹心法(DAS-ELISA)检测田间葡萄病毒的分布。1990年Hu等人^[9]改进了提纯方法,对GLRV进行了理化特性分析,并制备了CA-4分离株的抗血清,根据血清学相关性试验将这些分离株分成4种血清型(2200nm,I型;1800nm,II型;NY-1,III型;CA-4,IV型)。

生产脱病毒葡萄苗木是防治GLRD的有效途径之一,为此我们直接从感病葡萄组织提纯了GLRV,并制备了兔抗血清,采用A蛋白夹心酶联免疫吸附试验(PAS-ELISA)检测到11个生食葡萄和10个山葡萄品种的脱GLRV和扇叶病毒(Grapevine fan leaf virus, GFLV)的组培苗,扩繁后田间试种表现出良好的农艺性状。此外,对国内GLRV的血清型进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 材料来源

采自河北省昌黎果树研究所果园,秋季选具有明显GLRD症状的新玫瑰和玫瑰香杂交的实生苗感病植株,取基部枝条和叶柄,削去表层后收集韧皮部,韧皮部材料经液氮冷冻后粉碎成末,置-70℃备用。

1.2 病毒提纯

参考Hu^[9]和Zee^[6]方法并稍作修改。100g粉碎的韧皮部加150ml 0.5mol/L Tris-HCl(pH8.2)提取液(含0.5%皂土,4%水不溶聚乙烯吡咯烷酮,0.2%巯基乙醇,5% Triton X-100),在大研钵中充分研磨,低速离心后沉淀再加100ml上述提取液,研磨后低速离心,合并的上清液经27000r/min,2h超速离心,沉淀悬浮在0.1mol/L Tris-HCl(pH8.2)缓冲液(含0.01 mol/L MgSO₄, 10%蔗糖),4℃放置3~5天后吸出其上清液,经低速离心后进行硫酸铯-蔗糖密度梯度离心,各分部(600μl)分别测定260nm的吸光度值及间接ELISA的 A_{490nm} 值,合并与GLRV抗体有免疫反应的分部,再经一次超速和低速离心即可获得纯化的病毒制品。

1.3 间接ELISA和PAS-ELISA

间接ELISA参考Zee^[6]的方法,硫酸铯密度梯度离心后各分部用包被缓冲液稀释5倍后作为抗原,抗血清为GLRV的II、III或IV型抗血清,辣根过氧化物酶标记羊抗兔Ig为结合物。PAS-ELISA按Edwards^[12]方法,以1g组织加5ml提取液比例研磨,7000r/min,10min,取上清液作为抗原,辣根过氧化物酶标记A蛋白为结合物,GLRV的II、III和IV型抗血清作为标准抗血清。

1.4 抗血清制备

兔抗血清按常规方法制备。

1.5 电镜和免疫电镜

参考Hu^[9]方法制备电镜和免疫电镜样品,在日立H-600型电镜下观察病毒颗粒。

1.6 SDS-免疫双扩散

参考Zee^[8]的方法。

2 结果和讨论

2.1 病毒纯化

GLRV 目前尚无繁殖寄主,只能从感病组织中直接提取,但病组织中病毒含量极微,为了得到足以制备抗血清的纯病毒制品,首先要挑选病毒含量较高的葡萄品种,从河北昌黎、河南郑州和北京采集了 12 个葡萄品种,以显卷叶病症状的病叶为材料用标准 GLRV 抗血清通过 PAS-ELISA 检测 GLRV 含量,其中深索、白谢希、蛇龙珠、

表1 利用PAS-ELISA筛选感染GLRD的葡萄品种

Table 1 Reactivity of grapevine variety to various antisera of GLRV by PAS-ELISA

葡萄品种 Variety	Absorbance		
	NY-1(III)	CA-4(IV)	1800nm(II)
	1:1000	1:500	1:500
深索 Cinsaut N.	1.43	0.99	0.39
白谢希 Baixiexi	1.36	0.94	0.43
蛇龙珠 Shelongzhu	1.12	0.56	0.21
新玫瑰×玫瑰香 (Neo Muscat×Muscat Hamurg)	1.10	0.65	0.31
28号	0.99	0.35	0.10
赛美容 Semillo	0.92	0.41	0.15
霞多丽 Chardonnay	0.90	0.44	0.14
黑比诺 Pinot noir	0.90	0.42	0.13
品丽珠 Cabernet	0.89	0.44	0.13
龙眼 Longyan	0.84	0.41	0.04

新玫瑰和玫瑰香杂交的实生苗、28号、赛美容、霞多丽七个品种病毒含量较高(表 1)。对这 7 个品种用 10g 叶片或叶柄韧皮部进行病毒提取小样试验,电镜下能观察到线形病毒颗粒,白谢希和 28 号材料来源不足,有些品种提纯实验重复性差,最后确定以河北昌黎果树研究所新玫瑰和玫瑰香杂交的实生苗作为提纯 GLRV 的最适材料。

PAS-ELISA(未发表数据)、SDS-免疫双扩散(图 3)和小量初步提纯实验均表明,秋季基部病枝或叶柄的韧皮部是提纯 GLRV 较好的组织。由于病组织中病毒含量极微,需要数千克韧皮部为起始材料,而韧皮部质地

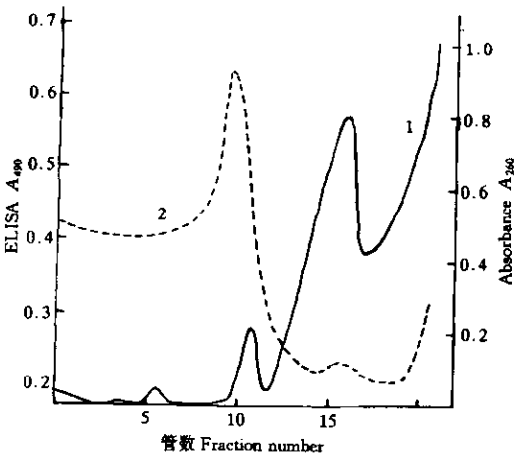


图 1 感染了 GLRV 葡萄组织提取液超速离心后硫酸铯-蔗糖密度梯度沉降图谱

Fig. 1 Sedimentation profile of a Cs₂SO₄-sucrose density gradient centrifugation of GLRV-infected grapevine tissue extraction after ultra-speed centrifugation

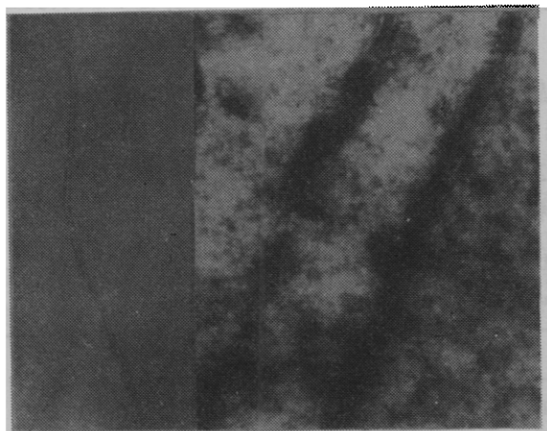


图2 硫酸铯-蔗糖密度梯度离心后的 GLRV 颗粒。

左: 磷酸钨负染的线形病毒颗粒 (40000 \times); 右: III 型抗血清制备的免疫电镜颗粒 (60000 \times)。

Fig. 2 Purified GLRV particles after cesium sulfate-sucrose density gradient centrifugation

Left: a particle negatively stained with 2% PTA;

Right: Particles decorated by anti-NY-1 antiserum

2.3 血清学相关性

纯化的病毒制品用包被缓冲液稀释 200 倍后用间接 ELISA 测试与 III 型 (Zee, 1987), II 型 (Gugerli, 1984) 及 IV 型 (Hu, 1990) 的血清学相关性。由表 2 可见从新玫瑰和玫瑰香杂交的实生苗提纯的 GLRV 与 NY-1, 1800nm 及 CA-4 均有血清学相关性, 从 A_{490nm} 值表明与 NY-1 血清学相关性更加密切。在用 PAS-ELISA 挑选病毒含量较高的葡萄品种时 (表 1), 无论北京地区的 28 号, 郑州地区的白谢希还是昌黎的新玫瑰和玫瑰香杂交的实生苗、深索等品种都与 NY-1, 1800nm 及 CA-4 有血清学相关性, 而且与 NY-1 的血清学相关性最密切, CA-4 其次, 1800nm 最弱。再从图 3 的 SDS-免疫双扩散图谱也显示白谢希和龙眼病叶柄的粗提液与 II, III, IV 型抗血清都能产生沉淀线。以上实验结果均表明我国许多显现 GLRD 的葡萄品

坚硬难以用常规匀浆方法抽提病毒, 采用液氮冷冻碾磨器快速碾磨成末解决了大量样品的粉碎问题。

从图 1 硫酸铯-蔗糖密度梯度离心沉降图谱可见紫外吸收高峰 (1) 与免疫特异高峰 (2) 并不重合, 所以要从感病组织直接提取含量极微病毒时, 密度梯度离心后检测各分部免疫特异性是非常必要的, 否则病毒制品中夹带较多寄主成分将影响抗血清制备的质量。采用上述方法制备 GLRV 重复性好。

2.2 病毒的形态

电镜下可观察到长度从 600~2000nm 分布的线形病毒颗粒, 其结果与 Hu^[9] 报道类似。图 2 左是长度为 1375nm 的 GLRV 颗粒, 图 2 右是用 NY-1 (III 型) 抗血清制备的免疫电镜。

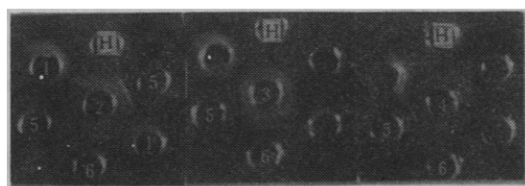


图3 感染 GLRD 葡萄组织粗提液与 GLRV 标准抗血清的 SDS-免疫双扩散

H: 健康葡萄叶片; 1: 新玫瑰和玫瑰香杂交的实生苗病叶;

2: II 型抗血清; 3: III 型抗血清; 4: IV 型抗血清;

5: 龙眼病叶柄; 6: 白谢希病叶柄。

Fig. 3 Reactions of antisera of GLRV II, III, and IV against diseased tissues in SDS-immunodiffusion

H: leaf extract of healthy.

表2 通过间接ELISA测试纯化的GLRV与标准抗血清的相关性

Table 2 Reactivity of purified GLRV to various antisera by indirect ELISA

病 毒 Virus	<i>A</i> _{490nm}		
	NY-1(III)	CA-4(IV)	1800nm(II)
	1:1000	1:500	1:500
纯化的葡萄卷叶病毒 Purified GLRV (1:200)	1.12	0.59	0.42

种与 NY-1, 1800nm 及 CA-4 分离株有血清学相关性, 考虑到我国具有从世界各地引

表3 A 蛋白夹心酶联免疫吸附试验检测脱扇叶和卷叶病毒葡萄组培苗

Table 3 Detection of grapevine plantlet virus-free by PAS-ELISA

葡萄品种 Variety	扇叶病毒 GFLV(1:4000)		抗血清 (Ab) 卷叶病毒 (NY) GLRV(1:1000)		卷叶病毒 (中国) GLRV (China, 1:100)	
	<i>A</i> _{490nm}	P/N	<i>A</i> _{490nm}	P/N	<i>A</i> _{490nm}	P/N
乍娜 (阴性) Zana (negative)	0.15		0.20		0.15	
藤稔8号 Fujiminori 8 [*]	0.25	1.70	0.20	1.00	0.19	1.27
藤稔 Fujiminori	0.29	1.70	0.15	0.75	0.15	1.00
玫瑰香 Muscat Hamburg	0.25	1.70	0.20	1.00	0.27	1.81
红依豆 Beniizu	0.17	1.10	0.13	0.65	0.13	0.86
里扎马特 Rizamat	0.30	1.96	0.15	0.75	0.23	1.53
选拔巨峰 Selected Kyoho	0.14	0.93	0.18	0.90	0.16	1.07
京亚 Jingya	0.21	1.40	0.20	1.00	0.14	0.93
红意大利 Red Italian	0.13	0.87	0.19	0.95	0.23	1.53
藤稔11号 Fujiminori 11 [*]	0.40	2.70	0.50	2.50	0.30	2.00
藤稔10号 Fujiminori 10 [*]	0.31	2.06	0.21	1.05	0.21	1.40

表4 A蛋白夹心酶联免疫吸附试验检测脱扇叶和卷叶病毒山葡萄组培苗

Table 4 Detection of grapevine plantlet (virus-free) by PAS-ELISA

葡萄品种 Variety	抗血清					
	扇叶病毒		卷叶病毒(NY-1)		卷叶病毒(中国)GLRV	
	GFLV(1:4000)		GLRV(1:1000)		(China,1:100)	
	A_{490nm}	P/N	A_{490nm}	P/N	A_{490nm}	P/N
乍娜 Zana	0.25		0.13		0.21	
84-14-18	0.17	0.69	0.10	0.73	0.16	0.76
88-100	0.16	0.65	0.18	1.37	0.18	0.83
011	0.15	0.61	0.14	1.03	0.15	0.71
016	0.14	0.55	0.14	1.09	0.21	1.01
84-15-21	0.20	0.79	0.12	0.87	0.15	0.73
83-15-80	0.14	0.57	0.19	1.44	0.22	1.05
83-17-34	0.25	1.02	0.17	1.31	0.21	1.00
83-12-33	0.21	0.94	0.10	0.76	0.19	0.91
79-33-3	0.16	0.65	0.08	0.57	0.11	0.50
84-15-96	0.20	0.79	0.13	0.95	0.12	0.56
双优 Shuangyou	0.15	0.59	0.10	0.78	0.74	0.35
74003	0.38	1.55	0.14	1.06	0.14	0.68
83-21-17	0.18	0.74	0.12	0.94	0.10	0.47
75-1-104	0.05	0.20	0.05	0.37	0.20	0.93
左山-Zuoshanyi	0.32	1.30	0.08	0.58	0.10	0.45
024	0.14	0.57	0.13	0.99	0.24	1.15
84-16-77	0.20	0.79	0.14	1.10	0.25	1.19
84-16-153	0.29	1.18	0.10	1.74	0.20	0.93
85-14-45	0.19	0.77	0.32	2.44	0.16	0.75
86-24-53	0.34	1.36	0.27	2.01	0.41	1.95

种栽培葡萄的悠久历史,推测这些葡萄品种可能由2种或3种类型线形病毒感染所致。

SDS-免疫双扩散实验中新玫瑰和玫瑰香杂交的实生苗用的是病叶,叶片中病毒含量低,所以不能产生沉淀线。而PAS-ELISA检测GLRV灵敏度大大高于SDS-免疫双扩散,所以显示一定的 A_{490nm} 值,也是提纯病毒时选用叶柄或枝条韧皮部的依据之一。

2.4 脱GLRV和GFLV葡萄组培苗的检测

国内葡萄园中往往扇叶病(Grapevine fan leaf disease, GFLD)和GLRD同时为害葡萄,因此生产脱病毒葡萄苗木时,一定要用同时脱除这两种病毒的组培苗。为此我们用自制GFLV^[13]和GLRV及GLRV(III型)免抗血清,通过PAS-ELISA检测了甘肃农业大学(表3)和中国农业科学院特产研究所(表4)送检的葡萄组培苗。表3所列乍娜是最初选到的已脱除这两种病毒的组培苗为阴性对照,P为被检样品的 A_{490nm} 值,N示为阴性对照的

A_{490nm} 值, P/N 大于或等于 2.0 被示为该样品带病毒, P/N 小于 2.0 示为已脱病毒。平行测试结果表明我们制备的 GLRV 抗血清完全能用于 GLRV 的检测。只是用于提纯 GLRV 的感病材料其病毒浓度不如 NY-1 高, 因此制备的抗血清滴度较低。

1992~1994 年间共检出 11 个生食葡萄(玫瑰香、龙眼、藤稔、乍娜、凤凰 51、京亚、里札马特、信农蓓蕾、红依豆、红意大利和选拔巨峰)及 10 个山葡萄品种的脱 GFLV 和 GLRV 的组培苗, 试种后表现出良好的农艺性状。该研究在葡萄无病毒种苗生产、科研和病毒检疫中具有广阔的应用前景。

致谢 美国康乃尔大学植物病理系 Dr.Dennis Gonsalves 惠赠 GLRVII, III 和 IV 型抗血清, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Tanne E, Sela L, Klein M *et al.* *Phytopathology*, 1977, 67:442~447.
- [2] Castellano M A, Martelli G P, Savina V. *Vitis*, 1983, 22:23~39.
- [3] Namba S, Yamashita S, Dei Y *et al.* *Ann Phytopath Soc Japan*, 1979, 45:497~502.
- [4] Conti M, Milne R G. *Phytopath Medit*, 1985, 24:110~113.
- [5] Faoro F, Tomaghi R, Fortusini A *et al.* *Riv Patol Veg*, 1981, 17:183~189.
- [6] Gugerli P, Brugger J J, Bovey R. *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic*, 1984, 16:299~304.
- [7] Milne R G, Conti M, Lesemann D E *et al.* *Phytopath Z*, 1984, 110:360~368.
- [8] Zee F, Gonsalves D, Goheen A *et al.* *Phytopathology*, 1987, 77:1427~1434.
- [9] Hu J S, Gonsalves D, Teliz D J. *Phytopathology*, 1990, 128:1~14.
- [10] Rosciglione B, Gugerli P. Proc. 9th meeting of the international council for the study of viruses and virus diseases of the grapevine. 1989.
- [11] Tanne E, Dov B, Raccach R. Proc. 9th meeting of the international council for the study of viruses and virus diseases of the grapevine. 1989.
- [12] Edwards M L, Cooper J L. *Virological Methods*, 1985, 11:309~319.
- [13] 蔡文启, 郭德银, 徐绍华, 等, 植物病理学报, 1990, 20:99~105.

PURIFICATION, SEROLOGY AND DETECTION OF GRAPEVINE LEAF ROLL VIRUS

Cai Wenqi Xu Shaohua Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Meng Baozhong Ma Yunxia

(Changli Fruit Science Institute, Hebei Academy of Agricultural & Forestry Sciences Changli 066600)

Abstract Closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease were purified from stem phloem tissue by differential centrifugation and cesium sulphate-sucrose density gradient centrifugation. The particles were between 660–2000nm long. Most of them were about 1400nm long and also decorated by the antiserum against GLRV NY-1 isolate. The purified preparation was tested for their serological relatedness in indirect ELISA. The results indicated that these closterovirus-like particles reacted with serotype II, III and IV of GLRV. The antiserum to NY-1 (type III) reacted more strongly than type IV (to VA-4) and type II. (to 1800nm). In sodium dodecyl sulfate immunodiffusion test, the extract of diseased petiole reacted with serotype III, IV and II. It is possible to be infected by 2 or 3 closterovirus-like particles in China. We have made antiserum to the purified closterovirus-like GLRV and set up a PAS-ELISA to detect GLRV-free grapevine plantlets. We have obtained 21 varieties of GLRV-free and GFLV-free grapevine. They shown high quality and quantity in field test

Key words Grapevine leaf roll virus, Purification, Serology, Detection