

接种和检测苹果潜隐病毒

程玉琴,韩振海,许雪峰

(中国农业大学 农学与生物技术学院果树系,北京 100094)

摘要:通过试管微嫁接,分别将苹果褪绿叶斑病毒和苹果茎沟病毒接种到小金海棠组培苗上,并用 PAS—ELISA 法检测其带毒率。结果表明:接穗小金海棠苹果褪绿叶斑病毒的带毒率为 60.0%,其苹果茎沟病毒带毒率为 73.3%,从而证明用此方法可以对组培苗进行快速病毒接种而得到带毒的实验材料。

关键词:试管微嫁接;苹果潜隐病毒;检测

中图分类号:S661.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2003)03-0068-03

Inoculating and Detecting Apple Latent Viruses of *Malus xiaojinensis*

CHENG Yu-qin, HAN Zhen-hai, XU Xue-feng

(Department of Fruit Science, College of Agronomy and Biotechnology,
China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) and apple stem grooving virus (ASGV) were transmitted to *Malus Xiaojinensis* by *in vitro* micrografting. ACLSV-infected rate of *M. Xiaojinensis* detected by PAS-ELISA was 60.0%, and ASGV-infected rate was 73.3%. The results also indicated that virus-infected materials could be rapidly obtained by inoculated in shoots.

Key words: Micrograft *in vitro*; Apple latent viruses; Detect

苹果褪绿叶斑病毒(Apple chlorotic leaf spot virus,简称 ACLSV)和苹果茎沟病毒(Apple stem grooving virus 简称,ASGV)是两种主要的苹果潜隐病毒,对果树生产危害极大。检测苹果潜隐病毒的传统方法是木本指示植物二重芽接鉴定法,但这种方法费时费工,完成一个检测过程需 2~3 年。20 世纪 80 年代前后,国外已开始把酶联免疫吸附法(ELISA)应用于苹果苗木生产体系中病毒的检测^[1]。用该方法完成一个检测过程只需 1~2 d,可大大提高工作效率。我国在 20 世纪 90 年代也已开始应用 ELISA 法检测果树病毒^[2, 3],至今已对富士、新红星、山定子等苹果品种和砧木进行苹果潜隐病毒检测,但用 ELISA 方法检测小金海棠苹果潜隐病毒方面的研究还未见报道。

试管微嫁接在果树研究中应用广泛,可进行嫁

接亲和性、砧木生长类型的鉴定^[4, 5]及果树病毒检测等^[6],但通过试管微嫁接对小金海棠组培苗进行病毒接种及带毒率检测等方面的研究还未见报道。

小金海棠是一种抗缺铁、耐瘠薄、半矮化的优良砧木,其利用前景十分广阔。本文就是以小金海棠为试材,研究试管微嫁接技术和 PAS—ELISA 法在小金海棠病毒接种和检测上的应用。

1 材料和方法

1.1 试验材料

小金海棠(*Malus Xiaojinensis* Cheng et Jiang)组培苗为中国农业大学园艺研究所多年继代保存材料;ACLSV 毒源 1 和 ASGV 毒源 2 分别保存在苹果组培苗上。

ACLSV 和 ASGV 抗血清均由中国科学院微生物所提供;A 蛋白为 sigma 公司的产品;酶标 A 蛋白

收稿日期:2002-06-28

基金项目:北京市自然科学基金基础性研究实验室“果树逆境生理研究实验室”资助项目(1970103)

作者简介:程玉琴(1968-),女,浙江上虞人,讲师,硕士,主要从事果树教学及科研工作。

由上海生物制品研究所生产;酶标板由北京经科化学试剂公司出售。

反应溶液:包被缓冲液为 0.05 mol/L、pH 9.6 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;提取液为 0.02 mol/L、pH 7.4 磷酸缓冲液(内含 0.05% 吐温 20, 0.1% 牛血清白蛋白, 2% 聚乙烯吡咯烷酮);抗体及酶标 A 蛋白稀释液为含 0.05% 吐温 20 的磷酸缓冲液(PBST);酶底物为邻苯二胺。

1.2 试管微嫁接方法

在无菌条件下,选取毒源 1 或毒源 2 为砧木,将其去头去侧芽,留 1.5 cm 长的茎段,用解剖刀沿砧木顶部纵切一刀(长约 1 cm);切取长 1.5 cm 的小金海棠作为接穗,留顶部两片叶子,并将其基部削成楔形(长约 1 cm)。将接穗插入砧木中,并用锡铂纸绑缚接口部位。把嫁接好的试管苗插入 1/2MS+IBA 0.5 mg/kg 培养基中生长 7 d,再将其转入到 1/2MS 培养基中生长。组培室温度为 25℃,光照 1 500 lx,光照时间为 14 h。嫁接苗生长 60 d 且接穗长出新叶时,切下接穗(小金海棠),并将其转接在 MS+BA 0.5 mg/kg+NAA 0.05 mg/kg 培养基上待检测。

1.3 检测方法

1.3.1 检测浓度 测 ACLSV 时, A 蛋白浓度为 1 μg/kg, 第一抗血清稀释 2 000 倍, 第二抗血清稀释 1 000 倍。测 ASGV 时, A 蛋白浓度为 5 μg/kg, 第一和第二抗血清分别稀释 2 000 倍和 1 000 倍。抗原样品加 5 倍提取液研磨、离心得上清液备用。酶标 A 蛋白稀释 40 倍。

1.3.2 检测步骤 (1)包被 A 蛋白, 28℃ 孵育 2 h; (2)加第一抗血清, 28℃ 孵育 2 h; (3)加抗原样品, 4℃ 过夜; (4)加第二抗血清, 28℃ 孵育 2 h; (5)加酶标 A 蛋白, 28℃ 孵育 2 h; (6)加底物溶液^[1, 3]。以上各步骤后均需用 PBST 冲洗 3 次, 每次静置 3 min。在 28℃ 下放置 30 min 后用 Model 550 型酶联免疫仪测定在 A490 nm 的吸光值, 以“待检样品吸光值/阴性对照吸光值” ≥ 2 为阳性反应(即 $P/N \geq 2$)。

2 结果与分析

2.1 嫁接苗愈合和生根情况

嫁接 60 d 后对嫁接苗进行观察统计, 结果表明:小金海棠/毒源 1 砧穗组合的成活率为 81.2%, 生根率为 89.7%; 小金海棠/毒源 2 的成活率为 90.0%, 生根率为 87.0%(表 1)。

表 1 嫁接苗愈合、生根情况

砧木	接种病毒种类	嫁接棵数	成活棵数	成活率 (%)	生根率 (%)
毒源 1	ACLSV	48	39	81.2	89.7
毒源 2	ASGV	51	46	90.0	87.0

注:成活率和生根率为平均值

由此可见,用试管微嫁接可以对小金海棠组培苗接种苹果潜隐病毒;嫁接苗的成活率和生根率在 80% 以上,这在很大程度上保证了嫁接苗有较高的移栽成活率,有利于进一步研究和利用。

2.2 接穗带毒率检测

各取 15 个样品分别检测 ACLSV 和 ASGV。在检测 ACLSV 时,有 9 个样品的 P/N 值在 2.07~3.58 之间;在检测 ASGV 时,有 11 个样品的 P/N 值在 2.11~3.33 之间(表 2, 3)。

表 2 PAS-ELISA 法检测 ACLSV

样品	OD ₄₉₀	P/N	样品	OD ₄₉₀	P/N
1	0.279	2.07	8	0.354	2.62
2	0.232	1.17	9	0.383	2.83
3	0.452	3.35	10	0.245	1.82
4	0.413	3.06	11	0.240	1.78
5	0.335	2.48	12	0.255	1.89
6	0.187	1.39	13	0.376	2.79
7	0.454	3.36	14	0.483	3.58
苏俄苹果	0.135	1.00	15	0.191	1.41

注:苏俄苹果为阴性对照

表 3 PAS-ELISA 法检测 ASGV

样品	OD ₄₉₀	P/N	样品	OD ₄₉₀	P/N
1	0.215	1.42	8	0.332	2.20
2	0.343	2.27	9	0.345	2.28
3	0.319	2.11	10	0.206	1.36
4	0.467	3.09	11	0.280	1.85
5	0.296	1.96	12	0.503	3.33
6	0.487	3.24	13	0.435	2.88
7	0.424	2.81	14	0.385	2.55
弗琴尼苹果	0.151	1.00	15	0.388	2.57

注:弗琴尼苹果为阴性对照

根据 P/N 值 ≥ 2 为阳性,可以计算出接穗(小金海棠)的 ACLSV 带毒率为 60.0%, ASGV 带毒率为 73.3%。

由此可见,ELISA 方法可以检测小金海棠的两种苹果潜隐病毒;通过微嫁接不能百分百地将 ACLSV 和 ASGV 接种到小金海棠上,传染病毒的机率分别为 60.0% 和 73.3%。

3 讨论

小金海棠组培苗的两步生根法(先在 1/2MS+0.5 μg/g IBA 培养基中生长 7 d,再转入 1/2MS 培养基)具有生根率高,生长质量好的优点^[7]。这种生根方法同样适用于以小金海棠为砧木的嫁接苗的

生根,同时嫁接苗成活率高,长势好。

由于绝大部分种子不带病毒,所以经种子得到的小金海棠组培苗一般是无毒的。果树病毒可通过嫁接传染^[8],但需要将种子培育成可进行嫁接的材料,然后历经田间嫁接、愈合过程,再将带毒材料培养成组培苗,这个过程显然费工费时,同时在田间嫁接还受时间限制,即必须在果树生长旺盛期间进行^[9]。而试管微嫁接不受季节限制和环境的影响,可常年在实验室条件下进行。用试管微嫁接可对桃组培苗接种李属坏死环斑病毒(*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV)^[9,10],本试验结果表明,用该方法也可对小金海棠组培苗进行苹果潜隐病毒接种,快速得到带病毒的组培苗,从而为其他试验提供试材。

已有许多研究表明用 ELISA 方法可检测苹果潜隐病毒,简单、快速,且结果也比较准确^[2,3],本试验结果表明,该方法也同样适用于小金海棠苹果潜隐病毒的检测。

前人曾利用田间嫁接方法进行病毒接种来研究植物对病毒的抗性,指出病毒提取液在紫外区最大吸收处的吸光值或酶联法测得的 OD 值高低,可以表示植株带毒量的大小,并与植株抗性有关^[11,12],同时病毒在植株体内的分布也与抗性有关,具抗性的植物其病毒常局部分布在接种点附近^[13]。本试验通过试管微嫁接接种 ACLSV 后,经 PAS-ELISA 法检测,有 60% 小金海棠的检测结果显示阳性,说明这部分样品已感染了 ACLSV;同时有 40% 样品的 P/N 值在 1.17~1.91 之间,未到阳性水平,推测可能是病毒在这些待检样品中移动速度慢,只分布在嫁接口附近,而使接穗不含病毒;或是由于植株对病毒增殖的抑制作用导致接穗中病毒含量低,用 ELISA 方法未能检测出。这或许从另一个角度证明了前人的报道^[11],即小金海棠对 ACLSV 存在着某种程度的抗性。由于病毒株系致病性强弱和培养条件等也是抗性评价中的重要考虑因子^[12],同时通过嫁接接种病毒后,接穗在不同时期内其病毒浓度存在着相当大的差异^[9]以及实验方面的误差,故有必要综合考虑各种因素来深入探讨小金海棠对 ACLSV 的抗性。我们认为试管微嫁接可作为一种鉴定病毒抗性的方法,并进一步扩大砧木和品种范

围后可进行深入研究。

参考文献:

- [1] Edward M L, Cooper J I. Plant virus detecting using a new form of indirect ELISA[J]. Journal of Virological Methods, 1985, 11: 309-319.
- [2] 王小凤,李秋波,王 荣,等. 苹果褪绿叶斑病毒和茎沟病毒的鉴定提纯和酶联法检测[J]. 微生物学报, 1992, 32(2): 137-144.
- [3] 洪 霓,刘福昌,王国平. A 蛋白酶联法检测苹果褪绿叶斑病毒和茎沟病毒的研究[J]. 中国果树, 1992, 1: 44-47.
- [4] Jonard R, Ludman D, Schall F, et al. Early testing of grafting incompatibilities in apricot and lemon tree using *in vitro* techniques[J]. Sci Hort, 1982, 43: 117-128.
- [5] 李嘉瑞. 苹果茎顶的显微嫁接的研究[J]. 西北农学院学报, 1985, (3): 31-37.
- [6] Edna T, Shiamovitz N, Spiegel-Roy P. et al. Rapidly diagnosing grapevine corky bark by *in vitro* micrografting[J]. Hortscience, 1993, 28(6): 667-668.
- [7] 王 瑛. 小金海棠试管苗生根和移栽技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 1997.
- [8] 张少瑜,张尊平. 落叶果树病毒病及其研究[J]. 北方果树, 2000, (4): 1-4.
- [9] Kathleen H L, Rosemarie H, Janes M, et al. Monitoring *prunus necrotic ringspot virus* infection by hybridization with a cRNA probe after *in vitro* micrografting[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1995, 120(6): 928-931.
- [10] Stein A, Spiegel S, Faingersh G, et al. Responses of micropropagated peach cultivars to thermotherapy for the elimination of *Prunus necrotic ringspot virus* [J]. Annals of Applied Biology, 1991, 119: 265-271.
- [11] 曾 明. 苹果属植物对苹果褪绿叶斑病毒的抗性[J]. 果树科学, 1994, 11(1): 5-9.
- [12] Rankovic M, Sutic D. Resistance of some peach cultivars and variable pathogenicity of the sharka(plum pox)virus [J]. Acta Horticulturae, 1986, 193: 193-197.
- [13] Rankovic M. The degree of sensitivity of some plum cultivars and hybrids to sharka(plum pox) virus disease [J]. Acta Horticulturae, 1983, 130: 93-98.