

311-316

8426(12)

第7卷第3期
1992年9月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 7 No. 3
Sep. 1992

酶联免疫吸附法(ELISA)检测四川 “榨菜”病毒种类

李新予 蔡岳松* 王彬 余家兰

(四川省涪陵地区农科所, 涪陵648000)

S432.41

提 要

1990至1991年在“榨菜”病毒病发生的始期和盛期, 从四川九个县(市)近郊、远郊采集样品492份, 用TuMV、CMV、TMV、PVX、PVY和CaMV六种抗血清, 经酶联免疫吸附间接法进行检测, 属于TuMV和TuMV与其它五种病毒之一或之二复合感染的有422份, 占总样品数的85.77%, 其中由TuMV单一感染的305份, 占61.99%。此外, 还有PVX、PVY、CaMV单一感染病样27份, 占5.49%, 而情况不明的43份, 占8.74%, 总检出率91.26%。检测结果表明, 发病始期或盛期, 近郊或远郊均以TuMV和TuMV与CMV复合感染的病毒为主, 是四川“榨菜”生产上主要的病毒种类。

关键词: 榨菜, 病毒病, 酶联检测, ELISA;

四川“榨菜”以鲜、香、嫩、脆特色驰名中外, 原料作物茎瘤芥 (*Brassica juncea* Cosson var. *tumida* Tsen et Lee) 病毒病历年是产区的主要病害, 直接影响产量和品质。“榨菜”病毒病, 在五十年至六十年代, 学者余永年、田筱君、王廷泉曾作过生物学测定^[1,2]。在此基础上, 为了全面、快速鉴定当前产区大面积病毒病的种类及其分布, 以利抗病品种选育和综合防治工作, 作者分期、分片广泛采集样品, 以六种抗血清 (TuMV、CMV、TMV、PVX、PVY、CaMV), 用近年广泛使用的灵敏度高的酶联免疫吸附 (ELISA) 血清学技术进行检测, 首次明确了四川茎瘤芥产区病毒病种类, 以TuMV和TuMV与CMV复合感染为主。

材 料 和 方 法

1. 材料来源

所有检测样品在茎瘤芥发病始期、盛期, 分近郊、远郊, 分别采自主区的涪陵、丰都、垫江, 副区的长寿、江北、巴县、合川、宜宾、内江九县(市)的49个乡镇, 代表面积二十万亩菜田, 共计病样492份, 同期同田采集健样114份, 均保存于-20℃低温冰箱内备检。

本文于1991年7月13日收到, 10月4日修回。

*西南农业大学植保系, 重庆北培630716。农业部植物检疫实验所张成良研究员等和中国农科院蔬菜花卉所冯兰香副研究员赠送抗血清, 特此致谢!

抗血清 TuMV、CMV、TMV、PVX、PVY 来自农业部植物检疫实验所, CaMV 抗血清来自中国农科院蔬菜花卉所病毒室; 冻干辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 结合物为北京生物制品研究所产品; 聚苯乙烯微量多孔板购自上海市塑料三厂, 用前在氢氧化钠/乙醇溶液内浸泡 48 小时^[7]。

2. 检测方法

采用酶联免疫吸附间接法。1 份样品加 10 倍 0.1mol/L pH9.5 的碳酸盐缓冲液, 研磨后汁液双层纱布过滤, 每孔加 200 μ l 于反应板内, 并移入 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜。洗涤液为 0.02mol/L pH 7.2 的 PBS-Tween20; 抗血清用洗涤液稀释成 1024 倍, 每孔加入 200 μ l, 在室温 (20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C) 下孵育两小时后洗涤; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 结合物用 0.02mol/L pH7.4 的 PBS 稀释 1000 倍。每孔加入 200 μ l 在室温下孵育 3 小时后洗涤; 邻苯二胺为底物溶液, 2mol/L 的硫酸终止反应; 设相应的标准病毒汁液为阳性对照, 标准健株汁液为阴性对照, 并设空白对照, 各处理均重复两次。

结果判断先用肉眼观察颜色反应, 然后移入放有 492nm 波长滤光片的酶联免疫检测仪 (DG 3022 型) 上测出各孔的光密度值 (O.D) 值^[3-6]。

结 果

1. 茎瘤芥病毒病病毒种类。从九个县(市)分期、分片采集的 492 份病样检测结果看, TuMV 和 TuMV 与其它五种病毒之一或之二复合感染为主导种类, 占总病样数的

表 1. 茎瘤芥病毒种类血清检测结果
Table 1. Kind(s) of virus detected by ELISA test from virus-diseased *Brassica juncea* var. *tumida*

采样地点(县、市) location of sampling (county, city)	样 品 数 amount of sample	病 毒 种 类 kind(s) of virus detected			待 定 unclarified
		TuMV	TuMV 与 CMV 复合感染 composite infection of TuMV+CMV, etc.	PVX PVY CaMV 单一感染 mono-infection of PVX, PVY or CaMV	
涪陵 Fuling	80	39	31	6	4
丰都 Fengdu	64	35	17	9	3
垫江 Dianjiang	64	39	14	3	8
长寿 Changshou	60	24	30	4	2
江北 Jiangbei	39	26	6	0	7
巴县 Baxian	65	50	6	3	6
合川 Hechuan	67	52	6	2	7
宜宾 Yibin	14	12	2	0	0
内江 Niejiang	39	28	5	0	6
合计 Total	492	305	117	27	43
% of the total 占总样品数%		61.99	23.78	5.49	8.74

85.77%, 少量其它病毒, 也多以复合感染存在, 如表1。

2. 不同发病时期茎瘤芥病毒种类。发病始期七个县(市)采集的198份病样, TuMV单一感染的114份占57.58%, TuMV与其它五种病毒之一或之二复合感染样48份占24.24%, 其它病毒16份占8.01%; 发病盛期九个县(市)采集的294份病样, TuMV单一感染的191份占64.97%, TuMV与其它五种病毒之一或之二复合感染样69份占23.47%, 其它病毒11份占3.74%。证明无论发病始期或盛期TuMV和TuMV复合病样都是茎瘤芥病毒病的主导种类, 同时看出发病始期病毒种类较盛期复杂, 如表2。

表2. 不同发病时期病样检测结果

Table 2. Kind(s) of virus detected by ELISA test from accessions collected in different periods of disease incidence

发病时期 period of disease incidence	样品数 amount of sample	病毒种类(%) kind(s) of virus detected(%)			待定 unclarified
		TuMV	TuMV与CMV等复合感染 composite infection of TuMV+CMV, etc'	PVX PVY CaMV单一感染 mono-infection of PVX, PVY, or CaMV	
始期 initial period	198	57.58	24.24	8.01	10.17
盛期 prevalent period	294	64.97	23.47	3.74	7.82

3. 复合感染以TuMV与CMV复合为主。总样品中除TuMV单一感染病样所占比例最高外, 复合感染病样数量多、比例大, 占总病样数的23.47%。其中, 又以TuMV与CMV复合感染为主, 在发病始期的48份复合感染样品中, TuMV与CMV复合样有37份占70.83%, 发病盛期的69份中, TuMV与CMV复合样有46份占66.66%。可见CMV不仅与TuMV共同感染为害, 更重要的是CMV在茎瘤芥生产上也是一个重要的病毒种类, 如表3。

表3 与TuMV复合感染的CMV检测结果

Table 3. CMV in percentage of TuMV-composite-infection accession.

发病时期 period of disease incidence	复合感染样 amount of composite infection sample	TuMV+CMV amount of TuMV+CMV infected samples	CMV占复合感染样品总数(%) CMV in percentage of total composite infection sample
始期 initial period	48	34	70.833
盛期 prevalent period	69	46	66.666

4. 近郊、远郊茎瘤芥病毒种类比较。县城附近蔬菜区茎瘤芥的插花种植区为近郊菜区, 远离城镇粮食产区茎瘤芥的种植区为远郊菜区, 一般近郊菜区病情重。在发病始期和盛期分别从近郊、远郊采样, 检测结果表明, 不同生态区茎瘤芥病毒病, 无论发病始期或盛期, 均仍以TuMV和TuMV与其它五种病毒之一或之二复合感染为主, 占总

样品数的 73.38%~92.52%，而近、远郊病样比较，除近郊 TuMV 单一感染病样比例稍高以外，其它差异不大，如表 4。

表 4 近、远郊茎瘤芥病毒种类检测结果

Table 4. Kind(s) of virus detected from accessions collected in near-or-farsuburb

采样地点 location of sampling	发病时期 period of disease incidence	病毒种类 % kind of viruse(in percentage of total samples)		
		TuMV	TuMV 与 CMV 等复合感染 composite infection of TuMV+CMV, etc.	PVX、PVY、CaMV 单一感染 mono-infection of PVX, PVY or CaMV
近 郊 near-suburb	始 期 initial period	64,516	26,881	2,150
	盛 期 prevalent period	69,540	22,968	2,296
远 郊 far-suburb	始 期 initial period	51,426	21,904	3,333
	盛 期 prevalent pperiod	58,333	24,168	5,833

5. 主、副区茎瘤芥病毒种类比较。主区为面积大而集中的主产区，副区茎瘤芥面积小。两地病样病毒种类比较，仍均以 TuMV 和 TuMV 与其它五种病毒之一或之二复合感染为主占 84.1% 至 86.9%，但主区病毒种类较副区复杂，如表 5。

表 5 主、副区茎瘤芥病毒种类检测结果

Table 5. Kind(s) of virus detected from accessions of diseased *Brassica juncea* var. *lumida* collected in its major-or-minor growing area

采样地点 location of sampling	样品数 amount of samples	病毒种类 (%) kind of virus(in % of total samples)			待 定 unclarified
		TuMV	TuMV 与 CMV 等复合感染 composite infection of TuMV+CMV, etc.	PVX PVY CaMV 单一感染 mono-infection of PVX, PVY, or CaMV	
主 区 major area	208	54,326	29,807	8,655	7,21
副 区 minor area	264	67,666	19,366	3,169	9,86

讨 论

1. 四川茎瘤芥病毒种类虽较复杂，但经六种抗血清用酶联免疫吸附间接法检测证实，九县(市)全部病样无论主区、副区，近郊或远郊，在发病始期或发病盛期，均以 TuMV 和 TuMV 与其它五种病毒之一或之二复合感染为主，是主要的病毒种类，占检测样品数的 85.77%。复合感染样品 177 份，占总样品数的 23.78%，其中，TuMV 与 CMV 复合感染样占 68.38%，可见总样品数中有 16% 以上含 CMV。作者认为：TuMV 是茎瘤芥最突出的病毒病种类，而 CMV 也是值得重视的另一种病毒病。因此，筛选抗原材

料, 选育抗病品种和病害综合防治方案的制订, 都应以 TuMV 为重点对象, 并兼顾 CMV。

2. ELISA 是多年来广泛使用的一种灵敏度较高的血清学技术, 它是把抗原、抗体的免疫学反应和酶的高效催化反应有机结合起来以检测抗原和抗体的一种方法^[1], 常用检测方法为双抗体夹心法, 本试验采用间接法, 直接利用商品酶标抗体, 省略了抗体标记这一繁杂程序, 并且样品无需提纯, 直接加入反应板孔内, 方法简便。与生物学寄主谱鉴定相比, 快速、简便、灵敏度高, 试验结果与1987年~1989年综合鉴定结果是基本相似, 检出率高, 检出的复合感染样品较多。与全国蔬菜抗病毒育种攻关组交流的关于十字花科蔬菜病毒种群研究结果基本一致。

3. 在总样品中还检出少量 TMV、PVX、PVY、CaMV 病毒样品, 数量虽少, 但也反映了茎瘤芥病毒种类的复杂性。另外, 对同田同期采集的114份目测健样, 检出阳性样品13份, 占11.4%, 健样病毒种类组成无规律性, 但可以佐证田间无症带毒株具有一定数量, 值得重视。

4. 492份总病样中, 未测出结果的待定样 43 份, 占8.74%, 其中, 可能存在六种抗血清以外的病毒种类。也可能是采样时标准放宽而采到的少量非病毒样品, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 余永年, 1957, 植保知识, 1(4): 27~30。
- [2] 王廷泉, 1962, 植物保护学报, 1(4): 427~436。
- [3] 蔡祝南等, 1986, 植物病理学报, 16(1): 23~26。
- [4] 田波, 1985, 植物病毒研究方法, 科学出版社。
- [5] 张成良, 1980, 植物病毒鉴定, 农业出版社。
- [6] 梁训生, 1985, 植物病毒血清学技术, 农业出版社。
- [7] 由雪娟, 1989, 植物检疫, 3(2): 112~115。

Kinds of Virus Causing Viral Disease on Sichuan Zha-Cai (*Brassica juncea* var. *tumida*) as Detected by ELISA Method

Li Xin-yu* Cai Yue-song** Wang Bin* Yu Jia-lan*

In 1990—1991, from the fields in near- and-far suburb of nine counties or municipalities in Sichuan province, 492 accessions of *Brassica juncea* plant showing viral disease symptom were collected both in the initial and the prevalent period of the disease and were subjected to indirect ELISA tests with 6 kinds of antiserum—— TuMV, CMV, TMV, PVX, PVY, CaMV—— in an attempt to find their causal agent. 422 specimens, accounting for 85.77% of the total, showed reaction with TuMV antiserum or with antiserum of one or two of the rest five viruses in addition to that of TuMV. 305 (61.99% of the total) of these 422 specimens could be confirmed as TuMV mono-infected. Furthermore, of the rest specimens, 27 (5.49% of the total) were confirmed to be mono-infected by PVX, or PVY, or CaMV, while 43 (8.74% of the total) were unclarified yet by the present test. Thus, 91.26% of these 492 specimens were identified for their causal viral agent. The results suggest that TuMV or TuMV + CMV complex are the predominant causal viruses infecting *Brassica juncea* both in the initial and the prevalent periods of the disease in either near-or-far suburban fields. According to the present results of ELISA test, they are the major viruses imposing heavy damage on Sichuan Zha-Cai in its growing areas.

Key words, *Brassica juncea* Viral disease Enzyme-linked immunosorbent assay

* Present Address: Fuling Prefecture Institute of Agricultural Science, Fuling City, Sichuan Province, 648000

** Present Address: Department of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing 630716