

温州蜜柑萎缩病毒和柑桔衰退病毒在苗木  
各部位分布的全年分析

周常勇 赵学源 蒋元晖

(中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 630712)

S 432.4

A

提要 1991年9月至1992年8月逐月采样,采用 DAS-ELISA 法对温州蜜柑萎缩病毒(SDV)在温州蜜柑苗木各部位及对柑桔衰退病毒(CTV)在甜橙苗木各部位的分布进行了全年分析。结果表明 SDV 在老叶、老枝皮中全年均检测不到,在根中仅在7、8月份可检出有少量病毒存在,在嫩叶中3、4、5、6、9、10月均可检出且浓度较高,而7、8月在嫩叶中检测不出,在嫩枝皮中4、5、6、7、10月均可检出而7月份浓度有较大幅度降低,这说明冷凉温度下的嫩组织适宜于SDV的繁殖,最佳检测时期为春梢和秋梢的嫩梢期,最佳检测部位为幼嫩的叶和嫩枝皮。对CTV在甜橙苗木各部位分布检测结果表明各部位全年均可检测出带毒且含量均较高,总的变幅不大,冬季和夏季含量有所下降,在老叶中变幅稍大些,这说明甜橙苗木各个部位均适宜于采样且全年均可进行分析。

关键词 温州蜜柑萎缩病毒, 柑桔衰退病毒, 病毒的分布

温州蜜柑萎缩病(Satsuma dwarf virus, SDV)是日本温州蜜柑的主要病毒病害<sup>[1]</sup>,土耳其<sup>[2]</sup>、南朝鲜<sup>[3]</sup>亦报道有本病发生,我国80年代初从日本引进的某些特早熟温州蜜柑品系亦感染有该病毒<sup>[4]</sup>。久原重松<sup>[5]</sup>首次采用ELISA法检测此病毒。未见有对该病毒在温州蜜柑苗木各部位分布的全年系统分析的报告。柑桔衰退病毒(Citrus tristeza virus, CTV)引起的柑桔衰退病,由蚜虫传播,是世界柑桔产区的严重病害之一,30年代以来,毁树达5000万株以上<sup>[6]</sup>。有50多个国家和地区有此病发生,20多个国家将其列为检疫对象<sup>[7]</sup>。M. Bar-Josph等<sup>[8]</sup>首次应用ELISA法对此病进行检测。J. A. Dodds等<sup>[9]</sup>在研究CTV的dsRNA电泳的同时逐月采样甜橙枝皮进行ELISA检测,结果全年均可检出CTV,冬季低温期读数有所下降,夏季高温期下降幅度较大,以往CTV提纯和检测均采枝皮作样品,未见有对老叶、嫩叶、根中带毒情况作系统的全年检测、分析的报告。故我们于1991年9月至1992年8月逐月采样进行此试验。

## 材料与方 法

- 1 试验用苗木及抗血清 检测的病材料分别为带SDV的4年生兴津温州蜜柑嫁接苗(砧木为粗柠檬)和经蚜传CTV的4年生新会橙实生苗,无病材料分别为不带毒的温州蜜柑实生苗和4年生新会橙实生苗,均保存于网室。所用SDV的IgG及其碱性磷酸酯酶标记的IgG是日本植保所1990年10月制作,CTV的IgG及其碱性磷酸酯酶标记的IgG是日本植保所1990年8月制作,上述两种病毒的抗血清皆由日本佐佐木真博士惠赠。
- 2 方法 1991年9月至1992年8月逐月(一般为每月中旬)采有病和无病样品,包括老叶、嫩叶、枝皮和根,

本文于1993年6月21日收到,10月4日修回

• 本课题得到中国农科院院长基金和农业部“八五”攻关项目资助

按 1:10 加入 0.02mol/L PBS-Tween(pH7.5, 含 2%PVP, 0.05%TGA)在乳钵中磨碎, 低速离心后取上清液作成待检抗原材料和无病对照样。按常规 DAS-ELISA 法<sup>[10]</sup>进行检测。SDV 的 IgG 和酶标 IgG 浓度约为 2.5ppm, CTV 的 IgG 和酶标 IgG 浓度约为 2ppm, 每样孔加样量为 200 $\mu$ l, 每样品重复 2 孔, 每次检测均设其相对应部位无病材料作对照读数。底物对硝基苯酚磷酸盐浓度为 1000ppm, 一般在室温下反应 20 至 30 分钟终止反应, 后在 DG-3022 酶联免疫读数仪下读 410nm 吸光度值。

## 结果与讨论

1 SDV 在温州蜜柑苗木叶片中的分布情况 3、4、5、6、9、10 月的嫩叶样品可检出带毒, 含量变化不大, 读数值为 0.90—1.30, 而 7、8 月的嫩叶检测不到带毒, 其变化趋势见图 1。老叶中全年检测不到带毒(见表 1)。

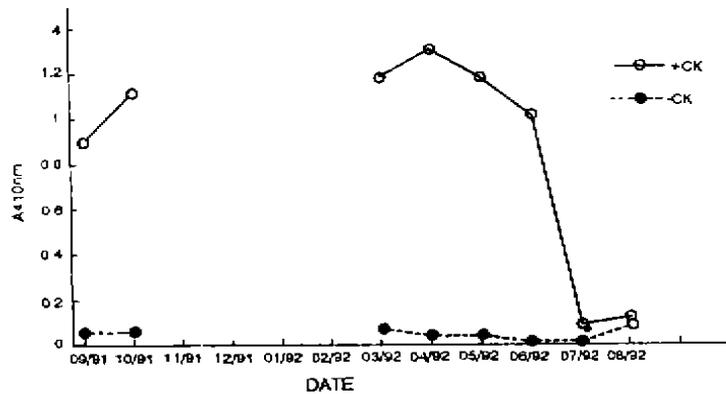


图 1 温州蜜柑苗木的幼嫩叶片中 SDV 的 ELISA 值的变化情况

Fig. 1 Changes of ELISA values of SDV in young leaves of satsuma budling

2 SDV 在温州蜜柑苗木枝皮中的分布情况 4、5、6、7、10 月的嫩枝皮样品可检出带毒, 读数值为 0.54—1.27, 7 月含量有较大幅度降低, 主要是温度逐渐升高之故, 其变化趋势见图 2。老枝皮中均检测不出带毒(见表 1)。

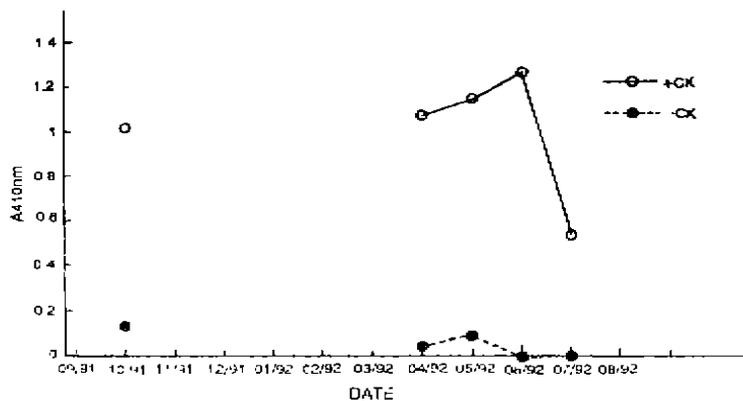


图 2 温州蜜柑苗木的幼嫩枝皮中 SDV 的 ELISA 值的变化情况

Fig. 2 Changes of ELISA values of SDV in young stem barks of satsuma budling

3 SDV 在温州蜜柑苗木根中的分布情况 7、8 月份的根中可检出少量带毒,读数值为 0.37—0.41,此期正是长新根时期,说明 SDV 在嫩根中可以繁殖。其余月份均检测不出带毒(见表 1)。

表 1 DAS-ELISA 检测 SDV 在温州蜜柑苗木各部位的全年分布\*\*

Table 1 Annual change of ELISA values ( $A_{410nm}$ ) of SDV in different parts of satsuma budling\*\*

采样年月 Date	嫩叶 Young leave		老叶 Old leave		枝皮 Stem Bark		根 Root	
	病	健	病	健	病	健	病	健
	Infected	Healthy	Infected	Healthy	Infected	Healthy	Infected	Healthy
1991.9	0.90	0.06	0.04	0.05	0.13	0.02	0.01	0.01
10	1.11	0.06	0.23	0.14	1.01*	0.13	0.19	0.15
11			0.04	0.02	0.16	0.12	0.05	0.00
12			0.18	0.09	0.17	0.18	0.15	0.21
1992.1			0.16	0.10	0.13	0.18	0.20	0.21
2			0.00	0.05	0.00	0.08	0.08	0.03
3	1.18	0.07	0.01	0.05	0.05	0.06	0.07	0.03
4	1.30	0.04	0.00	0.02	0.00	0.16	0.03	0.02
					1.07*	0.04		
5	1.18	0.04	0.11	0.04	0.12	0.09	0.05	0.02
					1.15*			
6	1.01	0.01	0.15	0.09	1.27*	0.00	0.01	0.01
7	0.09	0.01	0.08	0.00	0.13	0.00	0.37	0.02
					0.54*			
8	0.12	0.08	0.10	0.05	0.12	0.07	0.41	0.03

\* 幼嫩枝皮, Young bark.

\*\* 样品:抽提缓冲液=1:10(W/V);  $A_{410}$ 吸收值均为两个重复样孔的平均值.

\*\* Sample; Extraction buffer=1:10(W/V); Value of  $A_{410}$  is the average of two replication.

4 CTV 在甜橙苗木叶片中的分布情况 3、4、7、9、10 月的嫩叶样品,均可稳定检出带毒,含量

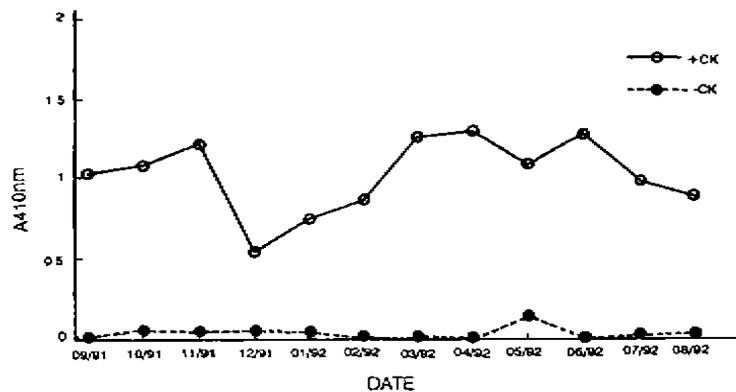


图 3 甜橙苗的老叶中 CTV 的 ELISA 值的全年变化情况

Fig. 3 Annual change of ELISA values of CTV in old leaves of sweet orange seedling

变化不大,病材料读数值为 1.27—1.48,平均值为 1.33,无病对照平均值为 0.02。老叶样品各月均能检出带毒,含量随季节变化较明显,冬季低温期以及夏季高温期含量下降,读数值为

0.53—1.29, 平均值 1.01, 无病对照平均值为 0.03 (见图 3、表 2)。

5 CTV 在甜橙苗木枝皮中的分布情况 各月均检出带毒, 含量随季节变化不大, 病材料读数值为 1.13—1.55, 平均值为 1.37。而无病对照平均值为 0.04。1992 年 7 月同时采嫩枝皮和老枝皮进行检测, 前者吸收值比后者略高 (表 2)。变化趋势见图 4。

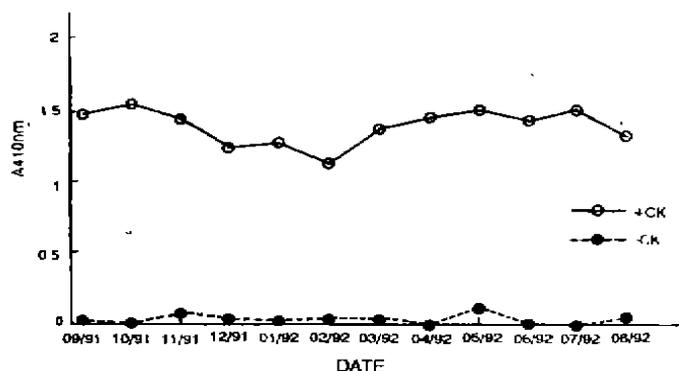


图 4 甜橙苗木的枝皮中的 ELISA 值的全年变化情况

Fig. 4 Annual changes of ELISA values of CTV in stem barks of sweet orange seedling

6 CTV 在甜橙苗木根中的分布情况 各月均检出带毒, 含量随季节变化不大, 病材料读数值为 1.06—1.55, 平均值为 1.25。无病对照平均值为 0.01 (图 5、表 2)。

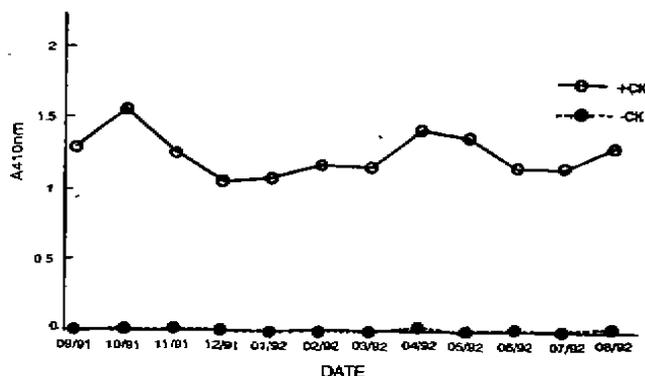


图 5 甜橙苗木的根中 CTV 的 ELISA 值的全年变化情况

Fig. 5 Annual change of ELISA values of CTV in roots of sweet orange seedling

上述结果说明, SDV 在嫩组织中冷凉温度下繁殖, 在温州蜜柑苗木中的最佳检测时期为春梢和秋梢的嫩梢期, 最佳检测部位为幼嫩的叶和嫩枝皮。CTV 在甜橙病苗各部位全年均能检出, 各部位均适宜于采样检测, 而不是只有枝皮才行。采用其它部位样品还有一比枝皮容易研磨和采样不致于过份伤害植株的优点。此结果对于 CTV 的 dsRNA 分析的取材以及 CTV 提纯样品的取舍均有参考价值。

表 2 DAS-ELIAS 检测 CTV 在甜橙苗木各部位的全年分布\*\*  
Table 2 Annual change of ELISA values ( $A_{410nm}$ ) of CTV in different parts of sweet orange seedling\*\*

采样年月 Date	嫩叶		老叶		枝皮		根	
	Young leave		Old leave		Stem Bark		Root	
	病	健	病	健	病	健	病	健
	Infected Healthy		Infected Healthy		Infected Healthy		Infected Healthy	
1991. 9	1.25	0.04	1.03	0.01	1.48	0.03	1.29	0.00
10	14.8	0.00	1.08	0.05	1.55	0.01	1.55	0.01
11			1.21	0.04	1.45	0.08	1.26	0.02
12			0.53	0.05	1.25	0.04	1.06	0.00
1992. 1			0.74	0.04	1.28	0.03	1.08	0.00
2			0.86	0.01	1.13	0.04	1.18	0.00
3	1.27	0.04	1.25	0.01	1.37	0.04	1.16	0.00
4	1.24	0.00	1.29	0.00	1.45	0.00	1.42	0.03
5			1.06	0.13	1.50	0.12	1.37	0.00
6			1.27	0.00	1.43	0.01	1.16	0.02
7	1.42	0.00	0.98	0.02	1.51*	0.00*	1.16	0.01
					1.13	0.01		
8			0.89	0.03	1.33	0.05	1.31	0.03

\* 幼嫩枝皮; Young bark.

\*\* 样品:抽提缓冲液=1:10(W/V);  $A_{410}$ 吸收值均为两个重复样孔的平均值.

\*\* Sample, Extraction buffer=1:10(W/V); Value of  $A_{410}$  is the average of two replication.

### 参 考 文 献

- 1 北岛博. 果树的病害. 农业すよび园艺, 1978, 53(7), 935~939
- 2 Azzi T. First report of satsuma dwarf virus disease on satsuma mandarins in Turkey. *Pl Dis Repr.*, 1973, 57, 149~153
- 3 Moon D Y. Viral diseases of horticultural subtropical and tropical crops in Korea. In: *Plant Virus Diseases of Horticultural Crops in the Tropics and Subtropics*, FFTC Book Series No. 33. Taipei, Food and Fertilizer Technology Centre for the Asian and Pacific Region, 1986, 12~13
- 4 周常勇, 赵学源, 蒋元晖, 等. 温州蜜柑萎缩病的鉴定. 西南农业大学学报, 1990, 12(4), 346~348
- 5 久原重松. 酵素结合抗体法(ELISA)による植物ウイルス病の診断. 植物防疫, 1980, 34(3), 129~135
- 6 Bar-Joseph M, Roistacher C N, Garnsey S M, et al. A review on tristeza, an ongoing threat to citriculture. *Proc. Int Soc Citriculture*, 1981, 1, 419~423
- 7 张作芳, 张成良, 相宁, 等. 禁止和限制入境植物病毒的研究 25—柑桔衰退病毒. 植物检疫研究报告(单行本), 1990, 1~27
- 8 Bar-Joseph M, Garnsey S M, Goncalves D, et al. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 1979, 69(2), 190~194
- 9 Dodds J A, Jarupat T, Lee J G, et al. Effects of strain, host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 1987, 77(3), 442~447
- 10 Clark M F, Adams A M. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses *J Gen Virol*, 1977, 34, 475~483

**Annual Change of ELISA Values of Satsuma Dwarf Virus  
in Different Parts of Satsuma Budling and of Citrus  
Tristeza Virus in Different Parts of Sweet Orange Seedling**

Zhou Changyong Zhao Xueyuan Jiang Yuanhui

(*Citrus Research Institute, CAAS, Chongqing 630712*)

From September 1991 to August 1992, leaves, stem barks and roots collected in each month from four-year-old satsuma budling infected with satsuma dwarf virus (SDV) and from four-year-old sweet orange seedling infected with citrus tristeza virus (CTV) were used for detecting SDV and CTV by using DAS-ELISA. The results show that SDV could not be detected in old leaves and stem barks all over the year. It could be stably detected in young leaves in March, April, May, June, September and October but not in July and August, and in young stem barks it could be detected in April, May, June, July and October, the concentration of SDV in young stem bark decreased sharply in July. Low concentration of SDV in roots could be detected in July and August as the new roots grow. This indicates that SDV propagated in young tissues under the terms of cool temperature. CTV could be stably detected not only in stem barks but also in leaves and roots all over the year, but the ELISA values ( $A_{410nm}$ ) decreased in summer and winter season, especially in old leaves, and in the other parts, the decrease of ELISA values is slight. This report revealed that SDV could be detected only in young shoots of satsuma growing under cool temperature but CTV could be detected in any part of sweet orange seedling all over the year.

**Key Words** Satsuma dwarf virus, Citrus tristeza virus, Distribution of virus

---

\* This work was funded by CAAS and The Chinese Agricultural Ministry