

254-257

6764(13) http://www.cqvip.com

香蕉试管苗黄瓜花叶病毒检疫检验技术研究

肖火根 高乔婉 张曙光 王振中

(华南农业大学植物病毒研究室, 广州 510642)

2
S436.41
S436.68

A

提要 建立了香蕉试管苗黄瓜花叶病毒 DAC-ELISA 检测技术。应用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.2, 内含 1%NaDIECA) 作为样品制备缓冲液, 检测灵敏度可达到 1/5120 (稀释度)。两年来检测了 1287 个样品, 香蕉试管苗生产繁殖材料的带毒率为 2.8%。

关键词 香蕉试管苗, 黄瓜花叶病毒, 间接 ELISA 法

检疫检验

随着香蕉试管苗生产的发展, 香蕉花叶病愈趋严重, 成为香蕉生产上最重要的病害之一。由于带毒试管苗是香蕉花叶病重要的初侵染来源, 因此对香蕉试管苗生产繁殖材料进行病毒检测, 以保证出圃试管苗不带毒是有效防治措施之一。

香蕉花叶病是由黄瓜花叶病毒 (CMV) 引起的。Devergne 等 (1981)^[1] 报道 DAS-ELISA 法可以检测亲缘关系密切 (SD I : 1-2) 的 CMV 株系, 而不能检测亲缘关系远 (SD I ≥ 3) 的 CMV 株系。因此, 血清学差异对于用 ELISA 法检测田间分离物有较大的影响。然而这个问题可以通过采用不同形式的间接 ELISA 法, 如 DAC-ELISA 法^[2] 来解决

本文报道了香蕉试管苗 CMV 的 DAC-ELISA 法检测方法的建立, 以及两年来对香蕉试管苗生产繁殖材料的检测结果。

材料与amp;方法

- 1 抗原材料** 取 0.1 克香蕉花叶病病叶置于 3ml 的样品制备缓冲液中, 研磨后的溶液即为检测用的病叶粗汁液, 对照为同法制备的健康叶粗汁液。
- 2 抗血清** 兔抗 CMV 香蕉株系 (BS) 血清由本研究室提供, 工作浓度为 1/400。
- 3 酶结合物** 辣根过氧化物酶标记 A 蛋白 (SPA-HRP) 购于上海科欣生物技术研究所, 工作浓度为 1/40。
- 4 DAC-ELISA 法** 采用肖火根和范怀忠 (1994)^[2] 的方法。
- 5 样品制备缓冲液的确定** 用 DAC-ELISA 法测定用不同组合的缓冲液和添加剂制备的病叶粗汁液, 以确定最好的样品制备缓冲液。试验用的缓冲液有 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.2)、0.2mol/L 硼酸盐缓冲液 (pH9.0) 和 0.1mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH6.5), 添加剂有 1% 铜试剂 (二乙基乙硫代氨基甲酸钠, NaDIECA) 5mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA)、0.5% 巯基乙醇、0.5% 亚硫酸钠、2% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、1% 福尔马林和 15mg/ml 皂土。
- 6 CMV 病毒浓度与花叶病症状严重度的关系** 用 DAC-ELISA 法测定 6 株香蕉病株的所有叶片的病毒浓度。
- 7 香蕉试管苗生产繁殖材料的病毒检测** 送检要求是: 种原采回后进行编号, 每一个外植体第一代芽取其中一个用 DAC-ELISA 法进行检测, 证实不带 CMV 后方可进行繁殖。

结 果

1 样品制备缓冲液的确定

本文于 1994 年 10 月 17 日收到, 1995 年 1 月 10 日修回

试验结果(表1)表明,不同组合的缓冲液和添加剂用以制备粗汁液,对DAC-ELISA法检测香蕉粗汁液里的CMV的效果的影响很大。用0.2mol/L硼酸盐缓冲液(pH9.0)、0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.2)和0.1mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH6.5)作为样品制备缓冲液,检测灵敏度分别为1/320、1/160和1/20。当上述三种缓冲液中加入1%NaDIECA,检测灵敏度则从1/320、1/160和1/20分别提高到1/5120、1/5120和1/1280。添加剂5mmol/L EDTA、0.5%巯基乙醇和15mg/ml皂土对提高检测灵敏度也有一定的效果,但都不如1%NaDIECA。而1%福尔马林和2%PVP则使检测灵敏度分别降低1和2倍。

试验结果(表1)还表明,样品制备缓冲液以(4)——0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.2,内含1%NaDIECA)和(9)——0.2mol/L硼酸盐缓冲液(pH9.0,内含1%NaDIECA)最好,都使检测灵敏度提高达1/5120。但是,在后来检测香蕉试管苗繁殖材料时发现,当检测某些样品时,缓冲液(9)容易产生假阳性反应,而缓冲液(4)则没有这个问题。因此,随后的香蕉试管苗繁殖材料病毒检测都采用缓冲液(4)作为样品制备缓冲液。

表1 制备粗汁液的缓冲液和添加剂对DAC-ELISA法检测香蕉花叶病毒的影响

Tab. 1 The effects of different buffer and additives on the detection of CMV by DAC-ELISA

| 缓冲液和添加剂 ^a Buffer solutions and additives ^a | 灵敏度 ^b Sensitivity ^b |
|---|--|
| (1) 0.1mol/L PB(pH7.2) | 1/160 |
| (2) (1)+5mmol/L EDTA+0.5%ME | 1/640 |
| (3) (1)+0.5%Na ₂ SO ₃ +0.5%ME | 1/640 |
| (4) (1)+1%NaDIECA | 1/5120 |
| (5) (2)+1%FM | 1/320 |
| (6) (2)+15mg/ml BT | 1/1280 |
| (7) 0.2mol/L BB(pH9.0) | 1/320 |
| (8) (7)+5mmol/L EDTA+0.5% ME | 1/1280 |
| (9) (7)+1%NaDIECA | 1/5120 |
| (10) (9)+2% PVP | 1/1280 |
| (11) 0.1mol/L CiB(pH6.5) | 1/20 |
| (12) (11)+5mmol/L EDTA+0.5% ME | 1/320 |
| (13) (11)+1% NaDIECA | 1/1280 |
| (14) 0.1mol/L CB(pH9.6)+1% NaDIECA | 1/1280 |

a: PB-磷酸盐缓冲液, BB-硼酸盐缓冲液, CiB-柠檬酸盐缓冲液, CB-碳酸盐缓冲液, NaDIECA-铜试剂(二乙基乙硫代氨基甲酸钠), BT-皂土, FM-福尔马林, PVP-聚乙烯吡咯烷酮, ME-巯基乙醇; b: 三次重复测定的结果相似

a: PB-phosphate buffer, BB-borate buffer, CiB-citrate buffer, NaDIECA-sodium diethyldithiocarbamate, BT-bentonite, FM-formalin, PVP-polyvinylpyrrolidone, ME-2-mercaptoethanol; b: results of three replicates were similar.

2 CMV 病毒浓度与香蕉花叶病症状严重度的关系

不同香蕉植株和同一香蕉植株不同叶片之间,病毒浓度和症状表现有很大的差异(见表2)。症状很强的植株(如E植株)和叶片(如C植株第1叶,E植株第1和2叶)中可以检测不到病毒,反过来症状很轻的植株(如B植株)和无症的叶片(如B植株第4,5和6叶)中却可以检测到较高浓度的病毒。

3 香蕉试管苗生产繁殖材料的病毒检测

受广东省和广西壮族自治区农业厅委托,我们从1992年开始负责两省香蕉试管苗生产繁殖材料的病毒检测工作。1992—1994年共检测香蕉试管苗生产繁殖材料样本1287个,检测到

带有 CMV 的样本 36 个,带毒率平均为 2.8%。

表 2 CMV 病毒浓度与香蕉花叶病症状严重度的关系

Tab 2 Relation between CMV concentrations and symptom severity

| 叶序 ^a Leave number ^a | 植株 Plant (症状严重度 ^b / 病毒浓度 ^c) (Symptom severity ^b / Virus concentrations ^c) | | | | | |
|--|--|-----------|------------|------------|------------|------------|
| | A | B | C | D | E | F |
| 1 | +++ / 0.42 | ++ / 0.53 | +++ / 0.08 | +++ / 0.11 | +++ / 0.09 | - / 0.07 |
| 2 | +++ / 0.35 | + / 0.54 | ++ / 0.37 | +++ / 0.24 | +++ / 0.08 | + / 0.19 |
| 3 | +++ / 0.40 | + / 0.38 | ++ / 0.30 | - / 0.28 | +++ / 0.13 | +++ / 0.43 |
| 4 | +++ / 0.21 | - / 0.29 | - / 0.27 | ++ / 0.12 | ++ / 0.11 | +++ / 0.14 |
| 5 | + / 0.26 | - / 0.47 | + / 0.23 | + / 0.24 | ++ / 0.10 | - / 0.08 |
| 6 | + / 0.23 | - / 0.36 | +++ / 0.34 | - / 0.11 | + / 0.09 | ++ / 0.25 |
| 7 | | | | - / 0.09 | + / 0.08 | +++ / 0.27 |

a-叶序是从幼叶(1)到老叶(7);b-"-"=无症,"+++"=最严重症状;c-DAC-ELISA OD 值。

a-Leaves numbered consecutively from youngest(1)to oldest(7);b-"-"=no symptoms,"+++"=very strong symptoms;c-DAC-ELISA OD value.

讨 论

由于香蕉植物组织含有酚类、单宁等物质,容易产生氧化反应。如何选用适当的缓冲液和添加剂来防止氧化是提高检测效果的关键问题。NaDIECA 作为还原剂常用于病毒接种和提纯。已报道 EDTA、巯基乙醇、福尔马林和皂土用于 CMV 的提纯,它们或者有利于病毒粒子的释放,或者能减少病毒粒子的降解。本研究发现 NaDIECA、EDTA、巯基乙醇和皂土加入样品制备缓冲液中可以提高 DAC-ELISA 法检测香蕉组织粗汁液里的 CMV 的效果,其中以 NaDIECA 对检测效果的提高最大,这与 Ahmad & Scoot(1984)^[3]报道这些物质能提高免疫双扩散对烟草植物组织粗汁液中完整 CMV 粒子的检测效果是一致的。但福尔马林则有降低检测效果的作用,这与 Ahmab & Scoot(1984)^[3]的报道不同,其原因可能在于所用的检测方法不同所致。

2%PVP 常加入样品制备缓冲液中,用来降低非特异性反应。但是本研究却发现它有降低检测灵敏度的作用,因而不适用于检测香蕉。这进一步表明,2%PVP 作为添加剂在病毒检测中的作用因寄主植物的不同而有显著的差异^[2]。

Thomas(1991)^[4]报道在检测香蕉组织粗汁液里的 CMV 时,虽然有些样品制备缓冲液的应用能大大提高检测灵敏度,但它们在检测某些样品时有假阳性反应。本研究同样发现这样的问题。样品制备缓冲液 0.2mol/L 硼酸盐缓冲液(pH9.0,内含 1%NaDIECA)和 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2,内含 1%NaDIECA)一样,能使检测灵敏度达到 1/5120。但是,在后来检测香蕉试管苗繁殖材料时却发现,当检测某些样品时,使用前者容易产生假阳性反应,而使用后者则没有这个问题。此外,根据对番木瓜环斑病毒的研究结果^[2],我们认为在用 ELISA 法检测植物病毒中,样品制备缓冲液的选择对于提高检测效果是十分重要的。不同植物不同病毒都要研究出相应适合的样品制备缓冲液。

要得到较满意的检测结果,除了样品制备缓冲液的选择外,取样也极为重要。不同香蕉植株和同一香蕉植株不同叶片之间,病毒浓度和症状表现有很大的差异(见表 2)。因此在检测某

一植株时应当采集尽量多的叶片混合一起测定。

检测结果表明,香蕉试管苗母株和带毒率可达2.8%。如果让这2.8%的带毒母株经扩大繁殖后释放田间,将会成为巨大的毒源库,从而造成病害大面积发生。因此,带毒试管苗母株作为香蕉花叶病毒的毒源的作用是绝对不容忽视的,这也进一步表明了对香蕉组培苗进行病毒检疫的重要性。但是,当前存在的某些研究和管理问题有待解决。

CMV 是一种比较特殊的病毒,其病毒浓度在达到最高浓度后会急剧下降。本研究结果也表明,CMV 病毒浓度与其在香蕉上引起的症状的严重度是不相关的,有时症状很明显的香蕉植株,ELISA 检测却为阴性反应,这与 Thomas (1991)^[4]的研究结果是一致的。因此,还存在提高检测灵敏度的问题。此外,带病母株的病毒在组培扩大繁殖中是如何传递的?由带毒母株繁殖出来的试管苗的发病率有多高?田间病毒株系的种类及其血清学关系如何?这些问题的深入研究将对检测工作和病害防治有很大的指导作用。

通过分析两年来的检测结果,我们发现凡按要求送检的材料都能检测到少数材料带毒,不符合送检要求的材料未能检测到带毒材料。有些试管苗生产单位繁殖香蕉苗若干代后从中送几个样检测不到病毒,并不等于所繁殖的材料绝对无毒。此外,送检的材料并不代表该生产单位繁殖的材料数,只是从繁殖材料中送少数样检测,有部分材料未检就扩大生产,这些问题有赖于植检、植保和其它管理部门共同研究解决。

致谢 本文承蒙华南农业大学范怀忠教授审阅和提出宝贵意见,谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 Devergne J C, Cardin L, Burckard J, et al. Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related cucumoviruses. *J Virol Methods*, 1981, 3, 193—200
- 2 肖火根,范怀忠.植物组织粗汁液里的番木瓜环斑病毒的 ELISA 检测技术. *中国病毒学*, 1994, 10(3), 249—255
- 3 Ahmad I B, Scott H A. An improved immunodiffusion test for the detection of intact cucumber mosaic virus in crude tobacco sap. *Phytopathology*, 1984, 74, 1097—1100
- 4 Thomas J E. Virus indexing procedures for banana in Australia. In: INIBAP network for Asia and the Pacific. Valmayor R V, et al. ed 1991

Studies on the Detection of Cucumber Mosaic Virus in Micropropagation of Banana

Xiao Huogen Gao Qiaowan Zhang Shuguang Wang Zhenzhong

(Department of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

The present study established the direct antigen coating form for indirect ELISA (DAC-ELISA) for the detection of cucumber mosaic virus (CMV) in banana tissue culture. With a proper phosphate buffer solution, i. e. 0. 1mol/L phosphate buffer (pH7. 2, including 1% sodium diethyldithiocarbamate) for preparing the crude plant sap to be detected, it was possible to increase the sensitivity of DAC-ELISA to a dilution of plant sap at a rate of 1/5120. A total of 1287 samples of productive material for banana tissue culture were detected for CMV, 2. 8% of them were found to be infected with CMV.

Key words Micropropagation of banana, Cucumber mosaic virus, DAC-ELISA