

马铃薯卷叶病毒的鉴定与提纯

王人元 吕文清

(东北农学院)

摘 要

自东北农学院育种试验地的马铃薯植株上所分离的14个具有卷叶症状的病毒标样经生物鉴定、蚜传特性、粒体形态和血清反应等鉴定均为PLRV。分离物85-1在曼陀罗上繁殖, 经PEG沉淀, 两次差速离心和蔗糖梯度离心后的得毒率为0.1 mg/kg材料。提纯材料以接种后4~6周的曼陀罗最好。

学检测奠定了基础。

前 言

马铃薯卷叶病是在马铃薯上发现最早的一种病毒病, 但其研究工作进展很慢。早期各国主要靠田间植株症状表现来鉴定马铃薯卷叶病毒(PLRV), 1948年以后开始进行生物鉴定^[12], 50年代以后很多研究都致力于PLRV的提纯和血清学检测^[13, 14, 16, 19], 但由于PLRV在植株体内的浓度极低, 提纯十分困难, 使得血清学检测的进展缓慢。直到1967年Peters才成功地从带毒蚜虫体内提纯了少量的PLRV^[20], 1974年以后各国先后从植物体内提纯了PLRV^[1, 8, 11, 21, 22]。

1981年, Dufus报道, 甜菜黄化病毒(BWYV)在马铃薯上可产生卷叶症状^[6, 7]; 1981年, Hassan等报道, 番茄黄顶病毒(TYTV)在马铃薯上也可产生卷叶症状^[9]。

本研究对黑龙江省的PLRV进行了系统的鉴定, 并提纯了PLRV, 为PLRV的血清

材料与amp;方法

(一) 病毒的分离鉴定

分离毒源所用块茎由我院马铃薯育种室提供, 种于植物病理温室内, 待植株底部叶片表现明显的卷叶症状后进行分离。

接种方式为蚜传, 传毒介体为桃蚜(*Myzus persicae*), 在白菜上于养虫笼内饲养无毒蚜虫, 蚜虫接种均在养虫笼内进行。

鉴定寄主为洋酸浆(*Physalis floridana*)和曼陀罗(*Datura stramonium*), 均于子叶期接种。

将无毒无翅桃蚜用小毛笔轻轻移至马铃薯植株上得毒3天, 然后转移至白菜上饲喂4~5小时, 再转移至10株洋酸浆和10株曼陀罗上, 每株3~5头蚜虫, 传毒3天后灭蚜, 同时以无毒蚜虫接种为对照, 1个月后调查结果。

为确定病毒是否可汁液接触传播, 用常规的病毒汁液接种方法接种至洋酸浆和曼陀罗上, 各接15株, 定期调查结果。

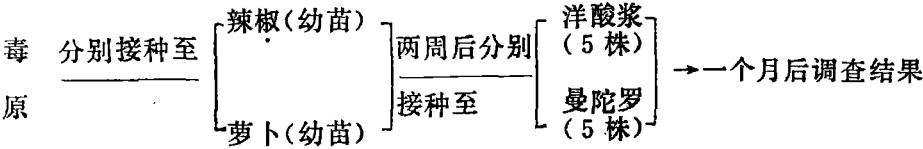
另外, 由于BWYV、TYTV 与 PLRV 在马铃薯、洋酸浆和曼陀罗上所产生的症状极易混淆, 为证实所得的毒原是否均为 PLRV, 又根据表 1 做了如下试验。

将保存在洋酸浆或曼陀罗 上的 14 个毒原, 做了如下处理:

表 1. PLRV、BWYV和TYTV
在几种寄主上的反应^[6, 9, 17]

病毒	洋酸浆 <i>Physalis</i> <i>floridana</i>	曼陀罗 <i>Datura</i> <i>stramonium</i>	辣椒 <i>Capsicum</i> <i>annuum</i>	萝卜 <i>Raphanus</i> <i>sativus</i>
PLRV	+	+	+	-
BWYV	+	+		+
TYTV	+	+	-	-

注: + 表示能侵染, - 表示不能侵染。



血清反应: 抗血清由日本北海道大学的 Kojima 提供的血清冻干粉, 效价为1/2048 (环状沉淀反应), 用生理盐水稀释。

血清反应采用免疫琼脂双扩散试验, 按 Hepp 等 1978年的方法进行^[11]。

(二) 病毒的提纯

1. 繁殖寄主的种类和采收时期的确定
将毒原85-1接种 (方法见病毒的分离) 于10株洋酸浆和10株曼陀罗上, 接种后置生长箱内 (温度为25~30℃), 于接种后3、4、5、6、7、8 周分别用 ELISA 方法检测植株中部叶片内病毒浓度的变化 (ELISA 检测

方法见王人元等1987年的报道^[2]), 每种寄主测 7 株, 同时以 2 株不接种为对照。

2. 病毒的提纯

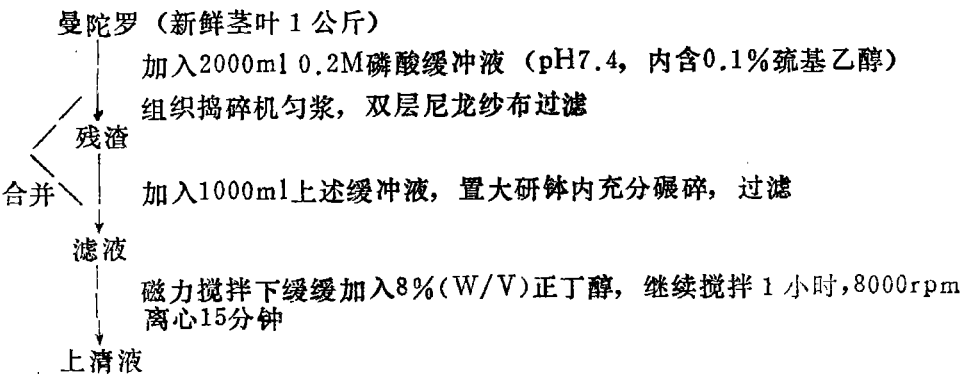
(1) 病毒的繁殖

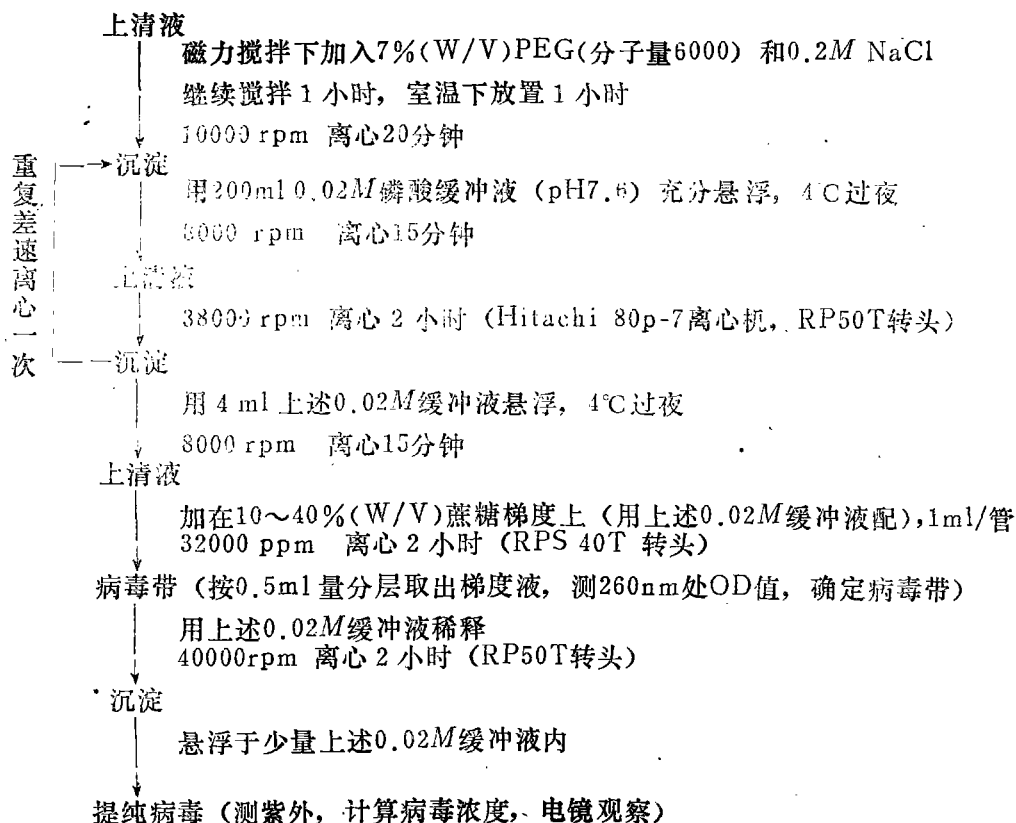
将PLRV接种 (方法见病毒的分离) 至曼陀罗幼苗上, 以后每株补充复合肥, 于接种后 30~40 天采收新鲜茎叶作为提纯材料。

(2) 提纯

按Rowhani 等 1979 年报道的提纯方法, 并参考其他PLRV、豌豆卷叶病毒和大麦黄矮病毒的提纯方法^[3-5, 8, 11, 20-22]。

提 纯 流 程 如 下:





试验结果

(一) 病毒的分离鉴定

1. 鉴别寄主反应

所分离的毒原在洋酸浆上一般2~3周表现出症状, 植株明显矮化 (见图1), 叶片



图1. PLRV在洋酸浆上产生的矮化症状

表现出脉间褪绿, 在曼陀罗上一般3~4周表现出症状, 植株矮化不明显, 叶片表现出明显的脉间褪绿 (见图2)。上述症状与文献报道的PLRV症状完全一致^[12]。

所分离到的14个毒原接种辣椒后没有出

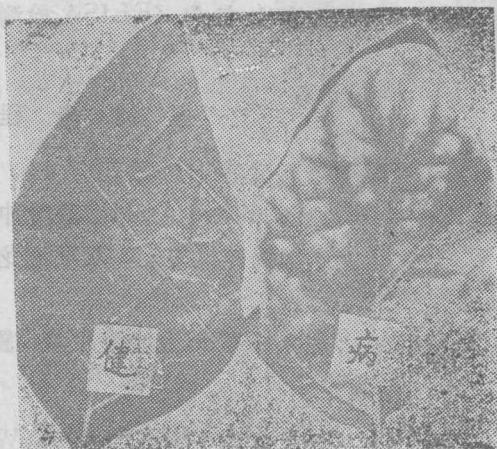


图2. PLRV在曼陀罗上产生的脉间褪绿症状

现症状, 再从辣椒转接到洋酸浆和曼陀罗上, 又恢复了原来的症状; 而萝卜对这些毒原均表现免疫, 因此可以认为不含有BWYV和TYTV。

2. 汁液接触传播

所接种的洋酸浆和曼陀罗于接种后2个月均没表现出任何症状。说明该病毒不能通过汁液接触传播。

3. 蚜虫传播

桃蚜得毒后在白菜(对PLRV免疫)上饲喂4~5个小时后, 均没有失去传毒的现象, 在曼陀罗上接种的传毒率为10~70%, 在洋酸浆上为80~90%。这一结果与毒原正常转接(不经过白菜)的传毒率基本一致, 说明是持久性传毒。

4. 病毒粒体形态

电镜下提纯的病毒粒体为等轴对称多面体(见图3), 直径为24.5~25mm。

5. 血清反应

所分离的毒原与PLRV抗血清反应后可见清晰的反应沉淀线。

从以上鉴定结果可知, 我们试验所分离的各毒原均为PLRV。

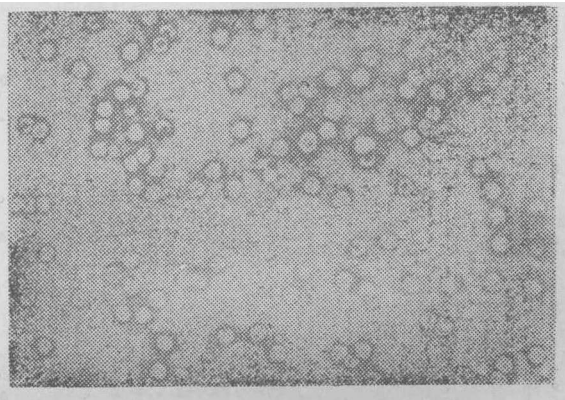


图3. 电镜下PLRV粒体
(放大12万倍)

(二) 病毒的提纯

1. 繁殖寄主的种类和采收时期的确定
用ELISA于接种后不同时期检测洋酸浆和曼陀罗体内PLRV浓度的变化, 结果见表2、图4。

由表2、图4可见, 曼陀罗和洋酸浆在接种3周以后植株体内的病毒浓度呈上升状

表2. 繁殖寄主接种后不同时期体内病毒浓度的检测

检测日期		9.22	9.29	10.6	10.13	10.20	10.27
接种后周数		3	4	5	6	7	8
平均	接种	0.6271*	0.7150	0.7264	0.7157	0.7036	0.6629
	洋酸浆 未接种	0.2300**	0.1925	0.2325	0.2475	0.2325	0.2125
	接种—未接种	0.3971	0.5225	0.4936	0.1682	0.4211	0.4504
OD值	接种	0.5211*	0.7236	0.7471	0.7462	0.7526	0.7459
	曼陀罗 未接种	0.2351**	0.2275	0.2409	0.2575	0.2500	0.2475
	接种—未接种	0.3164	0.5011	0.5071	0.4989	0.5086	0.4975

注: * 为7株平均OD值; ** 为2株平均OD值

态, 第4周时达到高峰, 曼陀罗在以后4周内基本保持稳定不变, 而洋酸浆却略呈下降的趋势。

2. 病毒的提纯
用国产751分光光度计分层测离心后梯度液各层260nm处的OD值, 结果见图5。

由图5可知, 病毒核酸的吸收峰为A点, 将A点处(第12、13两份)的梯度液进

一步离心浓缩后, 再用国产751分光光度计测220~290nm处的OD值(见图6), 按

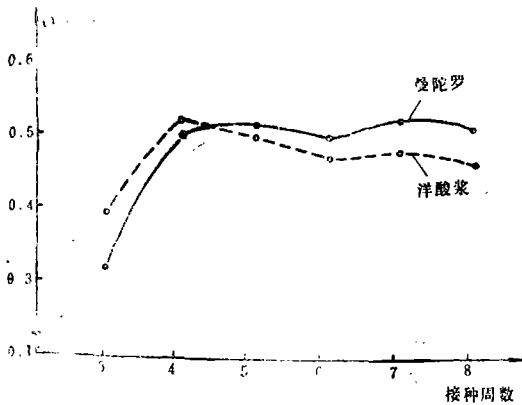


图4. 接种后不同时期植株体内病毒浓度的变化曲线

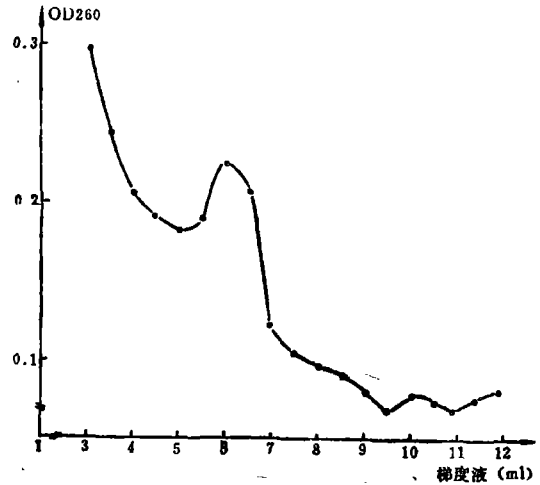


图5. 梯度离心后各层梯度液对260nm波长的吸收曲线

病毒粒体, 见图3。

讨 论

(一) 病毒的鉴定

能侵染马铃薯的多种病毒中, 不能通过汁液接触传播, 而只能由蚜虫持久性传播的仅3种, 即PLRV、BWYV和TYTV。这3种病毒均能在PLRV的鉴定寄主上产生相同的症状, 病毒粒体形态基本一致, 都具有一定的血清学相关性, 在马铃薯上所产生的症状差异也不大, 仅是各自的寄主范围有所差异^(6,7,9,10,17)。

本试验所得的14个毒原标样, 根据鉴定寄主反应、传播特性、粒体形态以及血清学反应等鉴定, 均为PLRV, 没有发现BWYV和TYTV。

(二) 病毒的提纯

关于繁殖寄主的种类及采收时期的确定, 一般认为繁殖寄主的种类及接种后不同时期植株体内病毒浓度的变化很大, 并

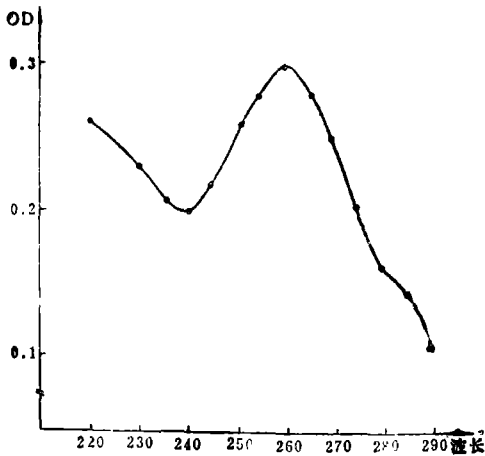


图6. 提纯病毒的紫外吸收曲线

$E_{260}^{0.1\%} = 8.6$ 计算出得毒率为0.1毫克/公斤材料⁽²²⁾。

由图6可知, 提纯病毒的最高吸收峰为260nm, 最低吸收峰为240nm, $OD_{260}/OD_{280} = 1.78$ 。

提纯液经2%磷钨酸(pH6.5)负染后, 在Jem-100CX型电镜下见到大量等轴对称

且不同病毒的影响也不同。我们的试验结果表明, 曼陀罗和洋酸浆在接种3周以后植株体内的病毒浓度呈上升状态, 第4周时达到高峰, 曼陀罗在以后4周内基本保持稳定不变, 而洋酸浆略呈下降的趋势。

由于提纯PLRV所需的材料很多(每次至少得1公斤新鲜茎叶), 植株接种又需在幼苗期进行。因此, 应在接种后1~8周内进行采收提纯。另外, PLRV仅局限在植株维束管内, 随着植株生育期的延长, 植株木质化的程度加剧, 势将导致在提纯过程中从寄主组织中提取PLRV更为困难。建议在接种后4~6周内进行提纯较好。

洋酸浆和曼陀罗两个繁殖寄主比较, 由于PLRV在洋酸浆上引致植株矮化, 植株生长缓慢, 茎叶产量较低(接种后5周90~100株可采收茎叶1公斤), 另外, PLRV在其上达到最大浓度后略呈下降的趋势; 而PLRV在曼陀罗上引致的植株矮化不明显, 植株生长快, 茎叶产量较高(接种后5周60~70株可采收茎叶1公斤), 并且PLRV在其上可保持稳定的高浓度。我们认为采用曼陀罗作为繁殖寄主最佳。

关于PLRV的提纯已有过较多报道^[1,4,5,8,11,13-18,19,21,22]。由于植株体内的PLRV浓度极低, 梯度离心后很少有可见病毒区带产生。因此我们认为, PLRV提纯成败的关键在梯度离心这一步。Kojima等1963年梯度离心后产生了3条可见区带^[13], 但这3条区带内均无PLRV粒子, 而病毒区带(不可见)是在那3条可见区带的上面。Peters 1967年梯度离心后产生了2条可见区带^[19], 但可见区带内均无PLRV粒子, 而病毒区带(不可见)是在那2条可见区带的下面。我们在梯度离心后, 没有可见病毒带产生。因此必须分层检测确定病毒区带位置, 这与国外许多提纯PLRV的报道基本一致。只是他们用配有紫外监测的分部收集器

分部收集, 而我们由于缺少这套设备, 只能分层取出, 然后分层测紫外吸收, 确定病毒位置。

参 考 文 献

- [1] 张鹤龄等, 马铃薯卷叶病毒的提取及抗血清初步制备, 《马铃薯》, 1984 (2): 1—5。
- [2] 王人元等, 应用酶联免疫吸附试验法检测马铃薯卷叶病毒, 《东北农学院学报》, 1987(2)。
- [3] Ashby, J.W., Purification and some properties of pea leafroll virus. *Neth. J. Pl. Path.* 1979, 85:113—123.
- [4] Clarke, R.G. et al., Potato leafroll virus purification and antiserum preparation for enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Potato J.* 1981, 58: 291—298.
- [5] Cleora, J. et al., Comparative purification of two luteoviruses. *Phytopathol.* 1983, 73:755—759.
- [6] Duffus, J. E., Beet western yellows virus; a major component of some potato leafroll affected plants. *Phytopathol.* 1981, 71: 193—196.
- [7] Duffus, J. E., Distribution of beet western yellows virus in potatoes affected by potato leafroll. *Pl. Dis.* 1981, 65: 819—820.
- [8] Gugerli, P., Potato virus A and potato leafroll virus; purification, antiserum production and serological detection in potato and test plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathol. Z.* 1979, 96:97—107.
- [9] Hassan, S. et al., Host range, transmission properties, and relationship of tomato yellow top virus. *Phytopathol.* 1981, 71:1004.
- [10] Hassan, S., Etiological distinctions between tomato yellow top virus and potato leafroll and beet western yellows. *Pl. Dis.* 1984, 68: 684—685.
- [11] Hepp, R. G. et al., Purification of potato leafroll virus and an evaluation of methods for its diagnosis. *Am. Potato J.* 1973, 55: 125—139.
- [12] Kirkpatrick, H. C., Indicator studies with the leafroll virus of potatoes. *Am. Potato J.* 1948, 25: 283—290.
- [13] Kojima, M. et al., Purification and electron microscopy of potato leafroll virus. *Virol.* 1969, 39:162—171.
- [14] Kojima, M. et al., The application of polyethylene glycol precipitation for purification of potato leafroll virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 1972, 38: 431—433.
- [15] Murayma, D., An attempt to purify potato leaf-

(下转227页)

1986年, 在所内进行了脱毒后连续6年隔离条件种薯和不隔离连续种植5年与茎尖脱毒苗网室原种作种的对比试验。

由田间发生病毒的调查结果看, 脱毒苗网棚生产出来的原原种无性第一年, 不隔离就感染皱缩花叶和叶脉, 坏死株率3%, 指数0.8%, 脱毒后在毛、皂原种基地种植6年, 周围无毒源, 不采用任何措施的隔离条件, 病毒病重新感染速度比较慢, 病株率20%, 指数

15%。将脱毒后种植在不隔离条件(所内杂种优势利用试验田)连续种植5年, 病毒株率达54%, 发病指数46%, 失去生产力。保持脱毒显著的增产效果, 延长使用年限, 提高增产效益, 关键是建立和健全一套留种、保种体系, 严格控制病毒病的再感染所造成的损失, 实现脱毒马铃薯持续高产更高产的目的。

(上接221页)

- roll viurs. Ann. Phytopath. Soc. Japan 1964, 29:279.
- [16] Murayma, D. et al.: Antigenicity of potato leafroll virus. Proc. Japan Acad. 1974, 50: 322—327.
- [17] Natti, J.J.: Host range of potato leafroll virus. Am. Potato J. 1953, 30: 55—64.
- [18] Peters, D.: The purification of viruslike particles from the aphid *Myzus persicae*. Virol. 1965, 26: 159—161.
- [19] Peters, D.: The purification of potato leafroll virus from its vector *Myzus persicae*. Virol. 1967, 31: 46—54.
- [20] Rochow, W.F.: Purification and antigenicity of three isolates of barley yellow dwarf virus. Virol. 1971, 46: 117—126.
- [21] Rowhani, A. et al.: Purification and characterization of potato leafroll virus. Virol. 1979, 98:45—54.
- [22] Takanami, Y. et al.: Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses, tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. J. Gen. Virol. 1979, 44: 153—159.

IDENTIFICATION AND PURIFICATION OF POTATO LEAFROLL VIRUS

Wang Renyuan and Lu Wenqing

(Northeast Agricultural College, Harbin)

ABSTRACT

All 14 virus samples bearing leafroll symptom isolated from potato plants in potato breeding experimental fields in Northeast Agricultural College belong to PLRV according to bioassays, particle shape, transmission character by aphids and serological reaction. The isolate 85-1 was propagated on *Datura stramonium* and purified by PEG precipitation, two cycles of differential centrifugation and sucrose density gradient centrifugation. The virus yield was 0.1 mg/kg of fresh plant material. In our experiments the best material for purification was *Datura stramonium* inoculated 4-6 weeks before purification,