

大蒜病毒病电镜检测研究

STUDIES ON ELECTRON MICROSCOPE OF GARLIC VIRUSIS(*Allium sativum* L.)

姜立荣

(北京市理化分析测试中心)

Jiang Lirong

(Beijing Centre of physico-Chemical Analysis)

周桂珍

(北京农林科学院)

Zhou Guizhen

(Beijing Academy of Agriculture and Forestry)

摘要 本研究发现在大蒜(*Allium sativum* L.)病株细胞中含大量病毒粒体和风轮状内含体。线状病毒粒体长度 250~1 875 nm,以长度 550~800 nm 的粒体居多。其中 700~800 nm 粒体被鉴定为 GMV, 间接脱毒大蒜, 叶片产生条纹花叶症状。免疫电镜和血清学表明 GMV 与 OYDV 有近缘关系。是导致大蒜种性退化, 产量下降的主要危害病毒。长度 500~600 nm 的粒体为 GLV, 间接脱毒大蒜不产生花叶症状。对大蒜生长发育和产量性状似无影响。

关键词 GMV; GLV; 免疫电镜

Key words GMV; GLV; Immunoelectron microscopy

大蒜病毒病是当前生产上普遍流行的一种病害。患病大蒜的产量和品质均有不同程度下降, 造成所谓“种性退化”。自 40 年代以来, 我国及美、法、日等 20 余国对大蒜病毒病的病源均有研究。各国对大蒜花叶或条纹花叶病毒的症状及其粒体形态的描述大致相似, 各自测得的粒体长度差异甚大。此外对大蒜花叶病毒(GMV)与洋葱黄矮病毒(OYDV)的关系也有不同看法, 有学者认为大蒜花叶病毒与洋葱黄矮病毒是同一病毒, 有学者认为二者关系远缘。

本研究始于 1984 年, 目的在于对大蒜病毒病原进行研究和鉴定, 从而为大蒜分生组织培养脱毒技术的应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 病毒粒体的电镜观察

采用直接负染法用涂有 Formvar 膜的载网(230 目)沾取大蒜病毒纯化物或大蒜病汁液, 以 2% 醋酸双氧铀或 2% PTA 负染, H700 电镜观察病毒粒体形态, 并测量 200 个病毒粒体长度。

1.2 染病组织细胞内含体的检测

用感染病毒的叶片, 鳞茎等植物切块, 以 2.5~4% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, 酒精系列脱水, Epon812 包埋, 超薄切片后 2% 醋酸双氧铀染色, H700 电镜观察其病毒粒体及内含体的形态、结构。

1.3 免疫电镜检测

用大蒜主要病毒为抗原、以 PVY 病毒组中若干常见病毒 PVX · SMV · WCMV · OYDV 抗血清为抗体, 进行免疫电镜检测, 以明确大蒜病毒的归所。

1.3.1 “捕捉法”: 参照 Mline 和 Buisson (1977) 及 Lesemann (1982) 方法将带有 Formvar

支持膜的载网置于稀释 100 倍的抗体上,室温反应 15~30 min,再将包被了抗体的载网复盖在 GMV-GLV 复合病毒上,室温反应 5~10 min,冲洗后 2% 醋酸双氧铀染色,吸去多余液,室温干燥,观察。

1.3.2 “修饰法”:取一滴 GMV-GLV 复合病毒,将载网膜面扣其上停留 5~10 min,然后再将包被了抗原的载网复盖在抗体上,室温反应 15~30 min,吸干,染色观察。

1.3.3 “捕捉-修饰法”:在方法(1)染色前,再加一滴稀释 20~40 倍的抗体,室温反应 15~30 min,吸干,染色观察。

2 实验结果

2.1 大蒜病毒粒体的形态特征

汁液浸出法,免疫吸附法,或提纯物的直接负染法,在电镜下均可观察到大量的线状病毒粒体。线状病毒粒体长度范围为 250~1 875 nm,以长度 550~800 nm 粒体居多,占 60% 左右,病毒粒体弯曲度较大,回接脱毒大蒜叶片产生条纹花叶症状,被鉴定为大蒜花叶病毒(GMV)(图版 1)。另一种线条状病毒粒体长度为 500~600 nm,弯曲度较小,回接脱毒大蒜不产生花叶症状,被鉴定为大蒜潜隐病毒(GLV)(图版 2)。另外在个别标样中还可可见病毒粒体长度为 300 nm 的杆状病毒即烟草花叶病毒(TMV)。

2.2 大蒜染病细胞中内含体形态特征

植物病毒在寄主细胞中,其内含体都有一定形态。内含体的形成是由于病毒粒体的集聚或是由病毒所致的蛋白质结构的集聚而成。所以内含体的形态特征对鉴别病毒种类是十分重要的。我们在品种“蒲棵”的大蒜病叶、鳞茎超薄切片中均发现典型的风轮状内含体(图版 3),风轮状内含体是马铃薯 Y 病毒组的主要特征,据此可初步认为,在浸染病毒的大蒜中,有一种是属于马铃薯 Y 组的病毒。正常株的细胞中未见到。

2.3 利用免疫电镜“修饰”法对大蒜主要病毒的鉴定

免疫电镜观察表明在 PVX·PVY·SMV·WCMV 和 OYDV 等病毒抗血清中,仅有 OYDV 抗血清与大蒜复合病毒中长度约为 700~800 nm 的病毒粒体有血清学关系。OYDV 与指示植物苋色藜、千日红叶片局部斑内病毒粒体(长 700~800 nm)有血清学关系。具体表现为上述病毒粒体均受到 OYDV 抗血清的修饰(图版 4)。

另外琼脂双扩散和对流免疫电泳测验表明,在上述的 PVX·PVY·SMV·WCMV 和 OYDV 等病毒抗血清中,唯有 OYDV 抗血清与大蒜纯化复合病毒及病蒜叶汁和苋色藜、千日红叶片局部斑内的病毒产生清晰沉淀线。余均为阴性反应。

3 讨论与结论

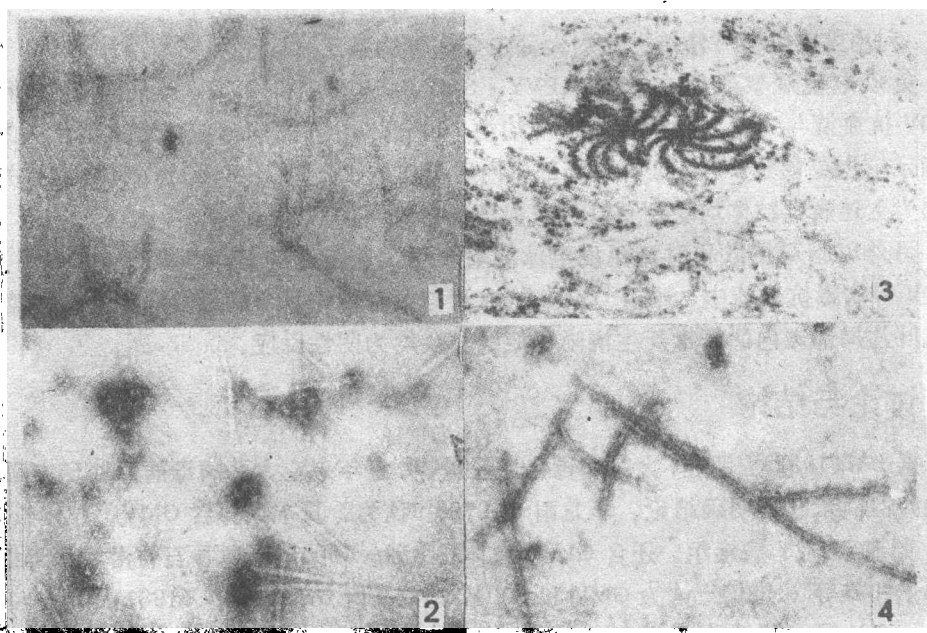
据 Bos(1982)^[7]评述,大蒜病毒已遍及世界。近年来在大蒜病毒病原鉴定方面取得某些进展,但尚未获得明确结论。李龙雨(1979)^[8]认为,日本大蒜含 GMV,粒体长 750~800 nm,归属于 PVY 病毒组。还含 GLV,粒体长 650~700 nm,属香石竹潜隐病毒组(Calv)。我孙子和雄等(1980)^[9]认为 GMV 和 OYDV 远缘。但 Delecalle 等(1981)^[10]用免疫电镜法证实一个法国大蒜品种发现有 2 种 PVY 组病毒可被 OYDV 抗体修饰,另 2 种病毒则与已知的葱属病毒无任何关系。我们用 Delecalle 提供的 OYDV 抗血清对京郊、苍山和宝抵等的大蒜进行了免疫电镜鉴定,证实这些品种中也存在能被 OYDV 抗血清修饰的病毒。这种线状病毒粒体长 700~800 nm,回接脱毒大蒜叶片即显花叶症状。显然它可能就是前人所称的

GMV。可以这样认为 GMV 是与 OYDV 有关的一个株系, 或者就是 OYDV。长为 500~600 nm 的线状病毒粒体与 OYDV 等 6 种 PVX·PVY 组病毒抗血清均呈阴性反应, 回接脱毒大蒜后不显花叶症状, 而在蚕豆上产生系统坏死斑, 与李龙雨等^[7]的报道一致。故可能是 GLV。长 800 nm 以上的线状粒体尚待进一步鉴定。少数标样中存在的长 300 nm 的杆状病毒与 TMV 抗血清呈阳性反应, 故应是归属于 TMV。由于多数标样中不含这种病毒故不列为大蒜主要病毒。GLV 线状病毒, 经我们 2 年的观察, 发现对大蒜的品质和产量均不造成影响。综上所述, 我们认为 GMV 为主的线条状病毒, 是大蒜病毒的主要毒原。这种病毒的感染是大蒜退化的主要原因。

利用电子显微镜检测植物病毒, 目的在于弄清病毒的种群, 形态特征, 在寄生细胞内存在的形式以及病毒内含体的形态结构。此种检测必须和生物检测、血清学检测结合, 才能得出正确结论。

参 考 文 献

- 1 谢浩等. 植物病理学报, 1981, 11 (3), 57~59
- 2 赵顺庄. 病毒学杂志, 1987, 2, 75~86
- 3 我孙子和雄等, 菜试验场报告 1980, A7, 139~147
- 4 Bos. L. Acta Horticulturae. 1982, 127, 11~29
- 5 Bvierley. P. and Smith. F. F. phytopathology, 1984, 34, 990
- 6 Delecalle. B. and Lot, H. Agromoiel, 1981 (9), 763~770
- 7 Loe, Z. W. et al, Ann pntopath, Soc · Japon, 1979, 45, 727~734
- 8 Derrick. K. S. Virology 1973, 56, 625~653
- 9 Lesemann. D. E. Acta. Horticulturea. 1982, 127, 159~173



图版 1 大蒜花叶病毒 GMV 27 000×; 2 大蒜潜隐病毒 GLV 30 000×; 3 大蒜病标细胞内的风轮状内含体 20 000×; 4 受 OYDV 抗血清修饰的 GMV 24 000×。