

# 植物病毒病的诊断技术

施 曼 玲

周 雪 平

(杭州师范学院生物系 杭州 310012)

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

**关键词:** 植物病毒, 诊断, 鉴定**中图分类号:** Q93 **文献标识码** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0149-03

植物病毒病是一种全球性的病害,每年全世界由植物病毒病造成的农作物损失估计高达 150 亿美元。植物病毒病的准确诊断有利于病毒病的综合防治。近年来,由于植物病毒分类体系的逐步完善,以及病毒鉴定技术的不断进步,植物病毒病的诊断方法有很大发展。本文介绍植物病毒诊断技术的发展现状。

## 1 生物学鉴定

利用生物学鉴定进行植物病毒病的诊断,主要依据寄主植物和病毒的传播方式。寄主植物诊断的方法主要包括利用寄主病症、寄主范围和交叉保护现象。在早期的植物病毒研究中,病毒检测和鉴定是以病症为主要根据,现证实这不太可靠<sup>[1]</sup>,因为:(1)不同病毒在同种植物上常产生相同症状;(2)同种病毒在植物的不同栽培品种上的症状不尽一致;(3)同种病毒的不同株系可产生不同症状;(4)复合侵染及病毒卫星 RNA 会影响症状表现;(5)病毒常会产生潜隐侵染;(6)不同土壤和气候条件可改变症状表现。当然,寄主植物的某些特定病症,如花叶、耳突、蕨叶、脉间枯斑等,确实能给病毒病诊断提供一定帮助。在自然界,植物病毒的寄主范围变化很大,对于寄主范围比较窄的病毒来说,寄主范围有助于病毒病的诊断。交叉保护现象曾被认为可用于相关病毒株系间的鉴定。但很多例子表明,在相关病毒株系间存在的交叉保护作用不完全等同,而不同属的病毒间却可能存在交叉保护。因而交叉保护虽然曾广泛用于病毒病的诊断,但目前已不太使用。

不同病毒的传播方式不尽相同,通过病毒的传播试验可判断植物的病症是由病毒还是别的因素引起。在早期的植物病毒研究中,嫁接接种是病毒传播试验的重要手段,也是鉴定本种植物上的一些病毒或病毒株系的唯一方法。但它具有病症出现的时间长、不适用于单子

叶植物、不能传播潜隐病毒等缺点,因此嫁接接种只是一种粗放的病毒检测手段。菟丝子传播法现在很少使用,它唯一的优点是能传播一些不能由嫁接接种传播的病毒。在一些特别寄主中,种传病毒的检测可以排除属于同属的相似病毒。容易种传的植物病毒属包括:大麦条纹花叶病毒属(Hordeivirus),等轴不稳环斑病毒属(Illarvirus),线虫传多面体病毒属(Nepovirus),马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus),烟草花叶病毒属(Tobamovirus),烟草脆裂病毒属(Tobravirus)以及类病毒。大约有 80% 植物病毒能机械接种传播,与嫁接或菟丝子传播方式相比,机械传播更利于病毒寄主范围、病症和许多其他性状的研究。植物病毒机械传播试验是病毒病诊断的一个较重要步骤。病毒的媒介传播,常是确定病毒类型的辅助方法。根据蚜虫与病毒之间的生物学关系,把蚜虫传播的病毒分为非持久性、半持久性和持久性 3 类。由线虫传播的病毒只有两个属:烟草脆裂病毒属和线虫传多角体病毒属。根据传毒方式可确定病毒的属,如毛刺科线虫传的病毒肯定为烟草脆裂病毒属病毒<sup>[1]</sup>。生物学鉴定为植物病毒病的诊断提供一定帮助,但现在已不作为主要依据,病毒的最后鉴定,还需应用别的方法。

## 2 光镜和电镜观察

光学显微镜常用于植物病毒内涵体的细胞学研究,包括观察内涵体类型、形态、组成、亚结构以及在寄主植物细胞中的位置等。内涵体的细胞学研究为病毒病诊断提供了依据,它是一种快速且相对廉价的方法。通过研究内涵体,可判断病害是否由病毒引起,并且可在病毒属、种和株系水平上鉴定病毒。

但是有些病毒的鉴定还依赖于电镜,以提供更多

的内涵体组成和亚结构等方面的资料。利用电镜负染技术鉴定植物病毒的优点是快速、简单和直接。但电镜操作需要一定技能,而且工作比较集中,所以样本数量大则不易处理。电镜技术灵敏度与 ELISA 反应相似,但不如核酸杂交技术。电镜技术若与别的技术结合,则更有利于植物病毒的鉴定。免疫吸附电镜(ISEM)技术就是电镜与血清学技术结合的产物,它的特点是利用电镜高度放大率和分辨能力,能直接看到抗原与抗体之间特异性反应和免疫复合物的形态学特征,故具有高度敏感性和特异性。当被测样本小时,它尤其适用。ISEM 技术从 1973 年 Demick 发明以来,已成为植物病毒研究的一个重要手段,尤其是经过改进的胶体金免疫电镜技术,可成功地用于检测和鉴定植物病汁液中不同形态(线状、棒状和球状)的病毒<sup>[2]</sup>,它至今仍被广泛地用于植物病毒病的诊断<sup>[3]</sup>。

### 3 免疫学方法

酶联免疫吸附测定(ELISA)是在植物病毒病诊断上最广泛使用的一种免疫学方法。它不仅具有免疫荧光法和放射免疫法的反应灵敏、特异性强的优点,而且克服了常规血清学方法受病毒浓度、粒体形态和抗血清用量等限制的缺点。ELISA 反应有多种方法,如间接法、双抗体法、竞争法、双夹心法和酶-抗酶抗体法等,但实验的基本过程都相似。ELISA 反应有很高的灵敏度,用它检测菜豆黄斑花叶病毒(BYMV),所使用提纯的病毒抗原浓度仅需 5ng/mL<sup>[4]</sup>。但其灵敏度与核酸杂交技术相比还稍差<sup>[5]</sup>。ELISA 反应快速便利,很适用于大规模田间样本的常规病毒检测,也广泛用于脱毒植物、无性繁殖的苗木以及种子上的病毒检测。

第 2 种在植物病毒病诊断上常用的免疫学方法是免疫扩散,尤其是双扩散技术,可以用来比较同源、异源抗原,甚至可以区别病毒的不同种和不同株系<sup>[6]</sup>。第 3 种免疫学方法是斑点免疫结合测定法(DIBA),它是以硝酸纤维薄膜为载体进行酶联免疫吸附测试。硝酸纤维膜比酶联板便宜而且携带方便,进行田间病害诊断时,可直接用病毒粗汁液进行大量样本的测定。它比 ELISA 简单、实验流程短,不需任何特殊设备,而且灵敏度高。实验结果表明,用 DIBA 法检测提纯的 TMV 最低检出率为 0.184ng/mL,比 Hibi 等报道高出 544 倍<sup>[7]</sup>。直接组织斑免疫测定(IDDTB)法是在 DIBA 法基础上进行改进,它直接把感病组织在硝酸纤维膜上进行印

迹。IDDTB 法与 ELISA 和 DIBA 相比,除简易、快速、灵敏、准确外,还具有节省抗原,检测结果可在室温下长期保存等优点。此外,别的一些免疫学方法如金黄色葡萄球菌协同凝集试验也能与 ELISA 相媲美,它无需特殊试剂和仪器,更适用于基层大规模样品检测。诊断植物病毒病常用的免疫学方法还有沉淀反应、免疫电泳、放射免疫、荧光免疫和免疫电镜等。

### 4 核酸检测

过去,大多数病毒病的诊断方法是针对病毒外壳蛋白设计的。如今针对病毒核酸的诊断方法也在逐步发展。如核酸杂交技术,其原理是采用带有放射性或非放射性物质标记的已知序列核酸单链作为探针,在一定条件下与靶病毒的核酸单链退火形成双链杂交体。通过杂交信号的检测,从而鉴定出样本中有无相应病毒的基因。核酸探针的来源有 4 种:克隆的基因组 DNA、cDNA、RNA 和寡核苷酸探针,常用杂交方法有:斑点杂交、Southern 印迹、原位杂交和 Northern 印迹等。核酸杂交技术的特异性强于血清学反应,它可区分同一病毒的不同株系,灵敏度大于 ELISA 和放射免疫,它对病毒或类病毒的极限感量为 1~10ng。既适用于 DNA 和 RNA 病毒,又适用于类病毒<sup>[8]</sup>。由于核酸杂交技术具有特异性强、灵敏度高、适用面广和快速简便等特点,近十年来已成为植物病毒病诊断的重要手段。

核酸杂交技术对植物病毒病诊断产生重要影响的新发展是多聚酶链式反应技术(PCR),它是 1985 年 Mullis 等发明的一种特异性 DNA 体外扩增技术,它对来自任何植物病毒基因组的少量 DNA 或 RNA 的 cDNA 进行扩增,再对扩增产物进行琼脂电泳或核酸杂交分析或酶谱分析或序列分析等。对已知核苷酸序列的植物病毒,可参照其序列直接合成引物;若核苷酸序列是未知,则可采用随机引物进行扩增。PCR 技术用于植物病毒病诊断,最重要的特征是高度灵敏性。它不仅可在属和种的水平上,对病毒进行鉴定,如马铃薯 Y 病毒属<sup>[9]</sup>,黄瓜花叶病毒<sup>[10]</sup>,小麦黄花叶病毒(WYMV)<sup>[11]</sup>等;而且可通过 PCR 扩增并克隆病毒基因组上的特异区域合成探针,通过核酸杂交,鉴定病毒株系,如鉴定大豆花叶病毒(SMV)的 Sa 与 Sc 株系<sup>[12]</sup>。此外,PCR 技术也可用于检测在昆虫介体中的植物病毒<sup>[13]</sup>。PCR 技术理论上被认为可以检测靶病毒的单个分子,据报道它的灵敏度可达到 30pg 水平,比 ELISA 灵敏得多<sup>[14]</sup>。

近年来,PCR 技术又有新发展。常规的 PCR 技术与免疫学、酶学和生物物理学相结合,产生了一系列改良的 PCR 技术,如免疫 PCR 技术(I-PCR)、免疫捕捉 PCR 技术(IC-PCR)、生物素化引物模板捕捉 PCR 技术、转录扩增 PCR 技术(TAS-PCR)、半保留式复制 PCR 技术(3SR-PCR)以及 PCR-ELISA 定量分析技术等<sup>[15]</sup>。它们的灵敏度比常规 PCR 技术有了进一步的提高,更有利于植物病毒的检测和鉴定。

植物病毒病诊断时,采用 dsRNA 分析法只是对血清学反应等特异性实验的补充。dsRNA 分析法在植物病毒病诊断上有 4 个方面用途:(1)判断 RNA 病毒是否存在,(2)在病毒属水平上,对病毒进行鉴定;(3)鉴别单个病毒或株系;(4)检测卫星 RNA 和卫星病毒。dsRNA 分析法是非特异性的实验方法,可检测样本中的任何 dsRNA,包括数量少的病毒,以及除病毒侵染外其他来源的 dsRNA。因而,它很适合于病毒复合侵染的检测。dsRNA 分析法还可对来自田间的样本直接检测,如果是新病毒或不易纯化的病毒,dsRNA 分析则是病毒检测的唯一选择。但 dsRNA 分析法也有局限性:(1)无法用于大数量样本的诊断;(2)诊断需要知识和技能,尤其当无法与已知病毒相比较时。(3)病毒诊断时进行的 dsRNA 分析,常包括潜隐病毒和非病毒的 dsRNA;(4)dsRNA 不能用于 DNA 病毒检测,也未见报道可用 dsRNA 分析法诊断负链 RNA 病毒。

总的来说,植物病毒病的诊断比几十年前容易了,这主要归功于灵敏的检测技术的出现,如电镜扫描,血清学反应和核酸检测技术等。随着分子生物学技术的

发展,植物病毒病的准确诊断必将日益快速、便捷。

## 参 考 文 献

- [1] Matthews R E F. *Plant Virology*, 3<sup>rd</sup> ed., New York: Academic Press, 1991.
- [2] 陈剑平,董玛佳,陶金斐等. 植物病理学报, 1993, 23(2): 169~173.
- [3] Antignus Y, Levy D, Cohen S. *Ann App Bio*, 1995, 126(1): 111~120.
- [4] 久原重松. 植物防疫, 1980, 34(3): 129~135.
- [5] Herrbach E, Lemaire O, Ziegler V *et al.* *Ann Appl Biol*, 1991, 118: 126~130.
- [6] Jones A T, Koenig R, Lesemann D E *et al.* *J Phytopathol*, 1990, 129: 339~344.
- [7] 陈南海,杨立,裴维蕃. 植物病理学报, 1992, 22(1): 89~93.
- [8] Loreti S, Faggioli F, Barba M. *J Phytopathol*, 1997, 145(11-12): 541~544.
- [9] Wetzel T, Candress T, Ravelo M *et al.* *J Virol Meth*, 1991, (33): 355~357.
- [10] Singh Z, Tones R A C, Jones M C K. *Plant Disease*, 1995, 79(7): 713~716.
- [11] 李大伟,韩成贵,邢怡明等. 植物病理学报, 1997, 27(4): 303~307.
- [12] 周雪平,濮祖芹,方仲达等. 病毒学报, 1994, 10(1): 81~85.
- [13] Deng D, McGrath P F, Robinson D J *et al.* *Ann App Bio*, 1994, 125(2): 327~336.
- [14] 胡稳奇. 植物保护, 1994, 2: 31~33.
- [15] 陈枝楠,卢泽高,卢俭. 植物病理学报, 1997, 27(3): 198~200.