

昆明地区香石竹病毒病流行状况调查及脱病毒苗的制备*

伊廷双, 胡虹^{**}, 罗桂芬

(中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 对昆明地区 3 种不同生产模式下的香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 进行了调查, 采集样本 146 号, 利用酶联免疫法和电镜检测法对样本感染香石竹病毒的情况进行检测。结果表明昆明地区主要流行的香石竹病毒为香石竹斑驳病毒和香石竹坏死斑点病毒。以带香石竹斑驳病毒的香石竹品种“俏新郎”为实验材料, 研究了直接剥茎尖法、高温处理结合剥茎尖法和病毒唑处理结合剥茎尖法 3 种方法在脱病毒效率和茎尖成苗率的差异。实验结果表明以加热处理结合剥茎尖法脱病毒效果最好, 0.2 mm 茎尖脱病毒率可达 77.78%, 加 5% 病毒唑处理对脱病毒有一定的影响, 直接剥茎尖法脱病毒效果最差。

关键词: 香石竹; 酶联免疫检测法; 香石竹斑驳病毒; 脱病毒苗

中图分类号: S 432, Q 945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253 - 2700(2001)03 - 0345 - 05

Studies on Prevalent State of Carnation Viruses in Kunming District and Methods of Producing Virus - Free Carnation Seedlings

YI Ting - Shuang, HU Hong, LUO Gui - Fen

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Carnation (*Dianthus caryophyllus*) in 3 production models growing in Kunming was investigated, and 146 samples were collected for experiments. The samples were inspected by ELISA and SEM to identify whether they were infected by carnation virus. The results indicated the main prevalent carnation viruses in Kunming region are carnation mottle virus and carnation necrofect virus. Using carnation variety "Qiaoxinlang" as test material, which infected by carnation mottle virus, we studies the differences of de-virus rate and survive rate by using 3 different methods, i.e. direct meristem - tip culture, meristem - tip culture in combination with thermotherapy, and meristem - tip culture in combination with Ribavirini. The results indicated that meristem - tip culture in combination with thermotherapy has the best de - virus rate, and the de - virus rate of 0.2 mm meristem - tip reaches 77.78%, 5% Ribavirini has some effect on de - virus rate, and direct meristem - tip culture has lowest de - virus rate.

Key words: Carnation; ELISA; Carnation mottle virus; De - virus carnation seedlings

香石竹是世界上仅次于郁金香和玫瑰的第三大鲜切花 (李少球, 1996), 也是我国最

* 基金项目: 中国科学院“西部之光”及中国科学院西南生物资源与生物多样性保护研究基地资助项目

** 通讯作者

收稿日期: 2000 - 04 - 06, 2000 - 06 - 22 接受发表

作者简介: 伊廷双 (1973 -) 男, 山东人, 在读博士研究生; 主要从事植物分子系统与地理学研究。

主要的鲜切花。香石竹繁殖方式为无性繁殖,容易感染病毒并逐渐积累,造成植株长势衰弱、花叶、植株畸形、花朵变小、花碎色、花苞开裂、叶、茎和花出现枯斑,极大影响了香石竹的商品价值(张健如等,1990)。我国在引进香石竹种苗时,由于检疫措施不够完善,也带进了香石竹病毒病。香石竹病毒病在我国上海、北京等香石竹主要产地广泛流行(于嘉林等,1991;孙光荣等,1982;张健如等,1987);随种植面积扩大,田间管理措施不得当,致使病毒病流行有日趋严重的趋势。

昆明是我国当前最大的香石竹生产地,香石竹产量占全国总产量的80%以上。但由于种苗来源混杂,检疫措施不够完善,管理技术和生产设施相对落后等原因,致使香石竹病毒病在昆明地区大面积流行。一般认为,香石竹斑驳病毒(Kassanis, 1955)、香石竹潜隐病毒(Kassanis, 1954)、香石竹环斑病毒(Kassanis, 1955)和香石竹坏死斑点病毒(Iny-ouye, 1973)是世界上对香石竹生产危害最大的4种病毒(张健如, 1990; David, 1985)。为了给昆明香石竹产区病毒病的防治提供依据,我们对昆明香石竹产区这4种病毒病进行了调查。

1 材料和方法

1.1 样本采集

我们从1997年8月到1999年6月,先后对昆明香石竹种植区的3种植植模式进行调查:①花农竹制隧道大棚生产模式,设备和管理技术相对落后;②国产钢架大棚生产模式,管理人员为我国科技人员,设备多用国产设备,管理技术多采用国内较现代化的技术;③国外引进温棚生产模式,设备、管理技术和种苗多为直接引自花卉生产发达国家。调查的方法是,对大面积种植区分5点调查,每点调查10个大棚,零星种植区作全面调查。样本为随机采集,样本装于小食品袋内,标明采集地点、时间、症状特点,编号,然后置于冰壶内,带回实验室进行病毒检测。两年时间内,共调查花农竹制隧道大棚50多个,采集样本73号,大中型花卉种苗公司4个,采集样本73号,共调查了70多个品种。

1.2 病毒检测方法

酶联免疫方法是本实验的主要检测方法,香石竹病毒抗血清(包括包被抗体、第一抗体、酶联抗体、抗第一抗体酶联抗体,阴性对照、阳性对照)从美国Agdia公司购得,采用Lommel等人(陆家珏, 1987; Lommel, 1983; Sanchez - Navarro, 1996)的方法建立双夹心ELISA方法和间接ELISA方法。双夹心ELISA方法用于香石竹斑驳病毒、香石竹环斑病毒、香石竹潜隐病毒的检测,间接ELISA方法用于香石竹坏死斑点病毒的检测。

电镜检测方法为本实验的辅助检测手段。制片方法采用蘸取法(田波, 1987)和直接制片法(Clark, 1981),染色法为磷钨酸钾负染。

1.3 香石竹脱病毒苗的制备

选择带有香石竹斑驳病毒的枝条,用刀片从叶子的基部去除叶片,切成段状,每段带有1个节,0.1%的升汞消毒10 min,植于MS培养基中(含0.3 mg/L NAA、3.0 mg/L 6-BA及5%蔗糖),待芽长至1至2 cm,切取芽体,用同样的培养基繁殖扩增,用作脱病毒苗制备的材料。脱病毒方法研究进行3组实验,第1组为直接剥茎尖法,剥茎尖的方法同上所述;第2组为高温长时间处理结合剥茎尖法,上述扩增的香石竹苗定植于相同培养基

中，置于 LRH-250-G 型光照培养箱中，每天 38℃ 下光照培养 16 h，光照强度约为 1500 lx，32℃ 下黑暗培养 8 h，处理 40 d，然后剥茎尖；第 3 组为病毒座结合剥茎尖法，上述扩增的香石竹苗，植于以 MS 为基本培养基，加入 0.2 mg/L NAA，3 mg/L 6-BA，5% 蔗糖，5 mg/L 病毒座的培养基中培养 40 d，然后剥茎尖。3 种方法剥得的茎尖培养在 MS 培养基中，含 0.5 mg/L IAA、0.5 mg/L 6-BA 及 5% 蔗糖，生长 3 个月后，统计成苗率，用 ELISA 法和电镜检测法检测茎尖苗带病毒状况，ELISA 反应结果用 Spectra Max 340 型酶标仪测量 405 nm 的光吸收值，吸收值小于阴性对照吸收值 2 倍者，定为阴性，不带病毒，统计脱病毒率，分析比较 3 种脱病毒方法的效果。

2 结果与分析

2.1 昆明地区香石竹病毒病流行状况调查

由表 1 可见，昆明地区香石竹病毒病流行程度比较严重，尤其花农竹制隧道大棚生产模式，由于生产设备简陋、缺乏防虫措施、管理技术落后、不注意田间操作卫生，及种苗来源混杂等原因，致使香石竹普遍感染病毒病。所采集的 73 号样本中，主要感染的病毒为香石竹斑驳病毒和香石竹坏死斑点病毒，分别占采集样本的 97.26% 和 41.10%，另外发现有香石竹环斑病毒感染，但不太严重，只占采集样本的 4.11%，采集样本中未见有香石竹潜隐病毒感染。国产钢架大棚生产模式，共采集样本 32 号，病毒感染程度相对较轻，其中感染香石竹斑驳病毒的样本占 87.50%，感染香石竹环斑病毒的样本占 9.38%，感染香石竹坏死斑点病毒的样本占 6.26%，未见感染香石竹潜隐病毒的样本。国外引进温棚生产模式，感染病毒病程度最轻，在采集的 41 个样本中，感染香石竹斑驳病毒的样本占 56.10%，未检测到香石竹环斑病毒、香石竹坏死斑点病毒、香石竹潜隐病毒。

表 1 4 种病毒在昆明地区的发生和分布

Table 1 The prevalenting and distribution of 4 viruses in Kunming region

Model	No. sample	No. sample infected by virus				Percentage infected by virus			
		CMV	CRSV	CLV	CNFV	CMV	CRSV	CLV	CNFV
model A	73	71	3	0	30	97.26	4.11	0	41.10
model B	32	28	3	0	2	87.50	9.38	0	6.25
model C	41	23	0	0	0	56.10	0	0	0
Total	146	122	6	0	32	83.56	4.11	0	21.92

Note: model A, model of peasant self-made shed; model B, China-made middle type steel structure shed; model C, imported greenhouse. CMV, carnation mottle virus; CRSV, carnation ringspot virus; CLV, Carnation Latent virus; CNFV, carnation necrofleck virus (The names of sample hosts do not appear here according to their requirement)

总之，从 3 种不同生产模式的病毒病流行状况来看，昆明地区香石竹病毒病流行程度已十分严重，采集样本中，3 种生产模式中香石竹斑驳病毒平均感染率达 83.56%，香石竹坏死斑点病毒平均感染率达 21.92%，香石竹环斑病毒平均感染率达 4.11%。

2.2 香石竹脱病毒苗的制备

由表 2 可见，3 种方法的成苗率以直接剥茎尖法最高，0.2 mm 的茎尖成苗率可达到

63.16%，0.5 mg/L 病毒唑处理为其次，0.2 mm 茎尖成苗率达 58.85%，加热处理成苗率最低，0.2 mm 的茎尖成苗率仅为 33.33%，导致加热处理后成苗率低的主要原因是很多茎尖苗为玻璃苗。但脱病毒率效果最好的为加热处理结合剥茎尖法，0.2 mm 的茎尖脱病毒率可达 77.78%，长度为 1 mm 的茎尖苗脱病毒率可达 25.00%。病毒唑处理法效果其次，0.2 mm 的茎尖脱病毒率可达 57.14%，茎尖小于 0.5 mm 效果较好，大于 0.7 mm 的茎尖苗基本上脱不掉病毒。脱病毒效果最差的是直接剥茎尖法，0.2 mm 的茎尖苗脱病毒率为 58.33%，总脱病毒率仅为 25.31%，大于 0.5 mm 的茎尖基本上脱不掉病毒。在实验过程中发现，人为的规定 OD405 nm 小于 2 倍阴性对照者为脱掉病毒的做法并不太合理，通过电镜检测证明，有些光吸收值接近阴性对照 2 倍的茎尖苗仍带有低浓度的病毒，如种植时间过长，病毒经扩增繁殖后浓度会重新升高，因此要完全脱掉病毒，应选择 ELISA 实验结果中光吸收值尽量接近阴性对照光吸收值的茎尖苗，再经电镜检测或生物检测等多种检测手段确定。从综合效果考虑，经实验证实加热处理结合剥茎尖方法是最有效的脱病毒方法。

表 2 3 种香石竹脱病毒苗制备方法比较

Table 2 A comparison of 3 methods to producing carnation de-virus seedlings

Method	Length of meristem (mm)	Number of meristem	Number of seedling	Number of de-virus seedlings	percentage of seedlings	percentage of de-virus rate
1 direct meristem - tip culture	0.2	19	12	7	63.16	58.33
	0.3	25	19	8	82.35	42.11
	0.4	17	14	4	100.00	28.57
	0.5	14	14	1	80.00	7.14
	0.7	10	8	0	80.00	0.00
	0.8	2	2	0	100.00	0.00
	1	11	10	0	90.91	0.00
2 meristem - top culture in combination with thermotherapy	0.2	21	9	7	33.33	77.78
	0.3	18	12	8	44.44	75.00
	0.4	13	7	4	53.85	57.14
	0.5	11	5	2	45.45	40.00
	0.7	12	9	3	75.00	33.33
	0.9	8	6	1	75.00	16.67
	1	13	8	2	61.54	25.00
3 meristem - tip culture in combination with Ribavirin	0.2	13	7	4	58.85	57.14
	0.3	11	6	3	54.55	50.00
	0.4	14	10	4	71.42	40.00
	0.5	14	11	3	78.57	27.27
	0.6	10	8	1	80.00	12.50
	0.7	7	6	1	85.71	16.67
	1	7	7	0	100.00	0.00

本文的直接剥茎尖法的总脱病毒率与 Stone (1968) 的实验结果接近，0.2 mm 至 1 mm 的茎尖所长成的苗总脱病毒率为 20% 多，但与张健如等 (1987) 报道结果相差较大，张健

如等人的实验结果认为, 1.0 mm 的茎尖长成的苗中有电镜检测结果成阴性者, 1.2 mm 的茎尖长成的苗中有生物检测结果成阴性者, 本实验结果是大于 0.7 mm 的茎尖长成的苗未发现脱掉香石竹斑驳病毒的。王蓓等人^①的实验结果认为, 用 5 mg/L 的病毒唑处理 5 周, 生长锥完全脱掉病毒, 1 mm 的茎尖长成的苗的脱病毒率达到 80%, 本实验的结果表明 5 mg/L 的病毒唑处理有助于通过剥茎尖获得脱病毒苗, 但 1 mm 的茎尖长成的苗未见有脱掉病毒者。Kacharmazov 等 (1977) 研究认为, 加热处理抑制了病毒复制, 使新生茎尖部分不含病毒, 因此加热处理结合剥茎尖极大地提高了茎尖苗脱病毒效率, 此处理中长度 2 倍于直接剥茎尖法中的茎尖所成的苗, 与直接剥茎尖脱病毒效率相近, 甚至优于直接剥茎尖法, 我们的结果与之相近。同时我们看到了每种方法中的脱病毒效果和茎尖大小是相联系的, 提供了每种脱病毒方法有效脱病毒茎尖长度范围。

〔参考文献〕

- 于嘉林, 刘仪, 陈雪梅等, 1991. 我国发生的一种香石竹斑驳病毒株系的生物化学特性及互补 DNA 合成 [J]. 病毒学报, 7 (1): 36—41
- 田波, 裴美云, 1987. 植物病毒研究方法 [M]. 北京: 科学出版社, 194—207
- 孙光荣, 王顺德, 王鸣岐等, 1982. 香石竹坏死斑点病毒的鉴定简报 [J]. 自然杂志, 5 (12): 952—953
- 李少球, 1996. 花卉情趣 [M]. 广东: 广东科技出版社, 76—78
- 张爱平, 1990. 上海地区香石竹斑驳病毒的若干行为 [J]. 上海农业学报, 6 (3): 85—88
- 张健如, 沈淑琳, 1990. 花卉病毒及病毒病 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 79—86
- 张健如, 赵忠, 张爱平, 1987. 香石竹病毒病及综合治理 [J]. 植物病理学报, 17 (4): 219—222
- 张健如, 赵忠, 1986. 无病毒香石竹母本园的建立 [J]. 上海农学院学报, 4 (3): 185—191
- 陆家珏, 张成良, 张作芳等, 1987. 检测植物病毒 ELISA 异种动物抗体双夹心法的研究和应用 [J]. 植物病理学报, 17 (4): 241—246
- Clark M F, 1981. Immunosorbent assays in plant pathology [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 19: 83—106
- David L. Strider, 1985. Diseases of Floral Crops [M]. Preager Publishers CBS Educational and Professional Publishing, a Division of CBS Inc. 388—406
- Inyoye T, Mitsuhta K, 1973. Carnation necrotic virus [J]. *Ber Ohara Inst, Okayama Univ*, 15: 195—205
- Kassanis B, 1954. A virus latent in carnation and potato plants [J]. *Nature*, 173: 1097—1098
- Kassanis B, 1955. Some properties of four viruses isolated from carnation plants [J]. *Ann Appl Biol*, 43 (1): 103—113
- Kacharmazov, Valeinin . Nedyalka Izvorska, 1977. Combined use of thermotherapy and tissue culture for healing the "Sin" carnation mottle virus [J]. *Fizioc Rast (Sofia)*, 4 (1): 92—97
- Lommel S, McCain A H, Morris T J, 1982. Evaluation of indirect enzyme - linked immunosorbent assay for detection of plant viruses [J]. *Phytopathology*, 72 (8): 1018—1022
- Sanchez - Navarro J A, Pallas V, 1996. Non - radioactive molecular hybridization detection of carnation mottle virus in infected carnations and its comparison to serological and biological techniques [J]. *Plant Pathology (Oxford)*, 45 (2): 374—382
- Stone O M, 1968. The elimination of four viruses from carnation and sweet william by meristem - tip culture [J]. *Ann Appl Biol*, 62: 119—122

① 王蓓, 陆妙康, 于善谦等, 1991. 香石竹斑驳病毒三种脱病毒方法比较. 上海植物病理学会成立四十周年纪念论文摘要汇编 (即 1988—1991 年论文摘要汇编), No. 59