文章编号: 1674 - 7054(2013) 01 - 0056 - 05

病毒抑制剂对蝴蝶兰病毒植株的脱毒效果

李正民1,王安石2,王 健1,陶 楚1

(1. 海南大学 园艺园林学院 海南 海口 570228 2. 海南出入境检验检疫局 热带植物隔离检疫中心 海南 海口 570311)

摘 要:选取感染建兰花叶病毒(CyMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)的蝴蝶兰植株进行离体培养,在芽增殖培养基中添加不同的病毒抑制剂研究对CyMV和 ORSV病毒的脱除效果。结果表明,氨基寡糖素具有很好的脱毒效果,对CyMV的脱除率为83.33%,对ORSV的脱除率为66.67%;病毒唑次之,对CyMV的脱除率为83.33%,对ORSV的脱除率为50%;中药类的脱毒效果不明显。

关键词: 蝴蝶兰; 脱毒; CyMV; ORSV

中图分类号: Q 949.71 *8.43 文献标志码: A

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.) 属热带或亚热带的气生兰 ,又称蝶兰 ,因其株型美观 ,花形奇特 ,色彩艳丽 ,花期长久 ,素有"兰花皇后"之美称 ,在国际花卉市场上有很高的经济价值^[1]。 蝴蝶兰的病毒病是当今困扰兰界的一大难题。目前 ,在蝴蝶兰上分离到的病毒超过 25 种 ,其中危害最重、分布最广的是建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus* ,CyMV) 和齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus* ,ORSV) ^[2]。 病毒可通过日常管理操作中的机械性伤口进行传播 ,感病兰株表现出花叶、坏死、畸形、花瓣变形等症状 ,严重影响其观赏价值和经济价值^[3-4]。 针对以上病状 ,笔者对 11 种病毒抑制剂进行了筛选 ,旨在寻找最佳的兰花病毒抑制剂及剂量。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 病毒检测样品的制备 实验在海南省文昌市动植物隔离检疫农场进行,先从蝴蝶兰温室采集带有疑似 CyMV 和 ORSV 症状的蝴蝶兰"满天红"成株(Dtps. Queen Beer "RedSky"),选择经检测确认感毒兰株作为病源母株 经低温催花使其萌发出花梗。待花梗长到一定程度,切取腋芽作为外植体进行离体培养,待增殖芽达到一定数量后,抽查 10% 的增殖芽进行检测,并确认携带病毒后,再将芽接种到添加了不同病毒抑制剂的增殖培养基中。
- 1.1.2 病毒抑制剂 供试的病毒抑制剂共 11 种 ,分三大类: 1) 中药类: 连翘、黄芪、金银花、紫苏叶、黄连、贯众、五味子、甘草 均购于当地广安堂药品店; 2) 农药类: w=0.5% 的氨毒胜・氨基寡糖素 ,山东禾宜生物科技有限公司制 w=20% 的吗胍・乙酸铜 ,成都科利隆生化有限公司制; 3) 病毒唑。

1.2 方法

1.2.1 处理方法 以花宝 1 号 3 g • L^{-1} + BA 5.0 mg • L^{-1} + NAA 0.5 mg • L^{-1} + 蔗糖 20 g • L^{-1} + 卡拉胶 9 g • L^{-1} pH5.8 为蝴蝶兰增殖培养基。中药类设 4 个质量浓度: 3 6 9 12 g • L^{-1} ,用传统的煎熬法来提取中药成分,所得液体当做溶剂加入培养基中。农药类用量范围参考产品介绍,氨毒胜用量为: 0.1 , 0.3 0.5 1.0 2.0 mL • L^{-1} ; 乙酸铜设 5 个质量浓度: 1 2 3 4 5 g • L^{-1} 。病毒唑设 5 个质量浓度: 5 10 ,

收稿日期: 2012 - 12 - 28

基金项目: 三亚市院地合作项目"蝴蝶兰脱毒苗工厂化繁育技术研究"(2010YD59)

作者简介: 李正民(1988 -) 男 山东泰安人 海南大学园艺园林学院 2010 级硕士研究生.

通信作者: 王健(1967 -) "男 "海南大学教授. E-mail: wjyym@ yahoo. com. cn

15 20 30 mg • L $^{-1}$ 。为方便统计 ,用符号 T1 ~ T5 表示各病毒抑制剂浓度由低到高的处理 ,但中药类处理 无 T5 。另外,设不添加组做 CK ,共计 48 个小组,每组各配 1 L 培养基 接种 20 组培袋,每袋 3 个芽。培养 60 d 后,统计其生长状况。在相同病毒抑制剂添加物中,选择添加浓度高、长势较好的处理组,抽查其中 6 袋进行病毒检测。

- 1.2.2 病毒检验方法 CyMV 和 ORSV 检测用 ADGEN Phytodiagnostics 公司相对应病毒的 SPOT $\sqrt{}$ CHECK LFTM(2 min 快速检测试纸条) 其工作原理是以硝酸纤维素膜为载体 利用微孔膜的毛细管作用,样品在膜上从一端向另一端的渗透移动过程中发生相应的抗原抗体反应,并通过颜色显示出来。
- 1.3 培养环境 培养温度为(25 ± 2) ℃ ,光照强度 1 500 ~ 2 000 lx ,每天光照 12 h。

2 结果与分析

2.1 不同病毒抑制剂对蝴蝶兰增殖芽成活率和长势的影响 表 1 中可以看出,中药类处理的增殖芽成活率与质量浓度无明显相关性,各处理均表现良好,成活率均在 80% 以上;乙酸铜处理的增殖芽,随着质量浓度的升高,其成活率降低,当质量浓度达到 5 g \cdot L $^{-1}$ 时(T5),成活率为 0;氨毒胜的增殖芽,除 T5 处理 $(2.0~\text{mL} \cdot \text{L}^{-1})$ 的成活率达不到 80% 外,其余处理的成活率均超过 90%,长势好,有增殖现象;除 CK 外,病毒唑处理的增殖芽成活率最高,长势良好,增殖生叶现象明显。在观察中还发现,与 CK 组比,其余处理都存在随药物浓度升高新生叶片发黄的现象,这可能与药物浓度过高,影响生物膜的平衡有关。乙酸铜处理的增殖芽,叶片较其他处理更显灰暗,有些叶片带有猩红色斑,这可能与铜浓度过高有关。根据各处理的表现,以有较高成活率为基本原则,选择中药类 $T4(12~\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 、氨毒胜 $T4(1.0~\text{mL} \cdot \text{L}^{-1})$ 、乙酸铜 $T3(3~\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 、病毒唑 $T5(30~\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 和 CK 组处理的增殖芽进行病毒检测试验(见表 2)。

表 1 不同病毒抑制剂对增殖芽成活率和长势的影响 Tab. 1 Growth of proliferation buds under various treatments

	抑制剂	成活፯	率 Surv	vival r	ate/%		生长描述		
	Virus inhibitors	T1	T2	Т3	T4	T5	Description of growth		
中药类	连翘 Forsythia suspense	96.7	83.3	90	95	_	整体长势好 有增殖现象 浓度升高 新叶叶色变淡 Buds grew well, tended to proliferate; new leaves turned pale with increasing concentration		
	贯众 Cyrtomium rhizome	100	90	100	96.7	_	长势好,有增殖现象,新叶健康正常,浓度升高后,长势略显下降 Buds grew well , tended to proliferate; new leaves normal; growth vigor decreased slightly with the increasing concentration		
	黄连 Coptis chinensis	100	83.3	96.7	100	_	长势好 增殖效果好 ,与贯众相当; 新生叶片较多 ,各浓度间无明显差异 Buds grew and proliferate well , similar to those treated with <i>Cyr-tomium rhizome</i> ; more new leaves; no significant differences between the concentrations		
	黄芪 Astragalus membrana– ceus	96.7	93.3	81.7	85	_	长势不及连翘 ,老叶浓绿扭曲 ,新叶细小发黄 ,颜色差异明显; 浓度升高 ,长势变缓 Growth vigor was no better than that treated with weeping forsythia; old leaves were twisted and dark green in colour , significantly different from the new tiny yellow leaves. With the increase in concentration , growth vigor decreased		
	甘草 Glycyrrhiza uralensis	95	91.7	88.3	86.7	_	长势好 增殖效果与生叶现象显著 叶色健康正常 Buds grew well with obvious proliferation and leaf emerging; leaves normal		

	续表 1								
	金银花 Lonicera japonica	100	98.3	98.3	96.7	—	长势略差 仅萌发几片小叶 增殖效果不显著 Buds grew slightly poor; only a few small leaves emerged; bud proliferation was not obvious		
	五味子 Schisandra chinensis	90	91.7	88.3	91.7		整体长势一般 有增殖生叶现象 Buds grew not bad , and tended to proliferate and foliate		
	紫苏叶 Leaf of Perilla frutes- cens	96.7	98.3	100	100	_	长势一般,质量浓度升高后,叶片由卵圆形变为狭长形,低浓度处理中有生根现象,而高浓度中却没有Buds grew not bad. With the increase in concentration, leaf blade turned suborbicular to long and narrow. No roots induced on medium at high concentrations, but some roots in low concentrations		
农药类	氨基寡糖素 Amino-oligosaccharin	93.3	90	93.3	93.3	78.3	T5(2.0 mL·L ⁻¹) 处理死亡率较高 其余处理长势好 有增殖现象 浓度升高 叶片略变小 颜色由浓绿变为黄绿色 T5 had a higher mortality while buds of other treatments grew well with proliferation. With the increase in concentration, the leaves turned smaller slightly, and leaf colour changed from dark green to yellowish green		
	乙酸铜 Copper acetate	95	93.3	86.7	60	0	长势最差 ,T5(5 g • L ⁻¹) 处理全部死亡 ,浓度升高 ,叶片颜色 越灰暗 ,并有浅猩红色斑块出现 ,长势越差 ,死亡率越高 ,无增殖现象 Buds grew poor. All buds of T5 were dead. With the increase in concentration , the leaf color turned to gray with some scarlet patches and the mortality became higher. No proliferation		
	病毒唑 Ribavirin	100	100	100	100	96.7	整体长势不错,有明显增殖生叶现象;浓度升高,增殖效果渐缓,叶片显黄绿色 Buds grew better with significant proliferation and foliation; With the increase of concentration, proliferation decreased slightly and leaf colour became yellowish green		
	CK			100			长势好 叶色健康 有增殖生叶迹象 Buds grew well; leaf healthy; buds tended to proliferate and foli– ate		

注: T1~T5表示各病毒抑制剂浓度由低到高的处理; 成活率 = 存活芽体个数/接种芽体个数; 下同

Note: T1 – T5 mean the treatments of the virus inhibitors from low to high concentration; Survival rate = the number of survival buds/the number of inoculated buds; the same as below

2.2 病毒检测结果 由表 2 可以看出, CK 处理无脱毒表现; 中药类中只有贯众、甘草、五味子和紫苏叶有脱毒表现,除甘草处理可以同时脱除 2 种病毒外,贯众、五味子和紫苏叶只能脱除 1 种病毒(ORSV),但脱毒率仅为 16.67%; 乙酸铜处理中,仅有 1 芽脱除 CyMV,脱毒效果也不理想; 氨毒胜处理中,受检 6 芽体中有 4 芽脱除 CyMV 和 ORSV,剩余的有 1 芽有脱除 CyMV 表现; 病毒唑处理中,有 3 芽脱除 2 种病毒,剩余有 2 芽仅脱除 CyMV,1 芽无脱毒表现。CyMV 脱除率以氨毒胜和病毒唑处理最高,均达到 83.33%; ORSV 脱除效果以氨毒胜和病毒唑处理较佳,分别为 66.7% 和 50%。综合 2 种病毒脱除情况,CyMV 较 ORSV 更易脱除。

表 2 CyMV 和 ORSV 的检测结果

Tab. 2 Detection of CYMV and ORSV under different virus inhibitors

药剂 Virus Inhibitors	用量 Dosage	检测芽数 Number for test	带 CyMV 和 ORSV 芽数 Number of buds carrying CyMV and ORSV	仅带 CyMV 芽数 Number of buds only with CyMV	仅带 ORSV 芽数 Number of buds only with ORSV	无毒芽数 Number of virus-free buds	CyMV 脱除 率/% Elimination rate of CyMV	ORSV 脱除 率/% Elimination rate of ORSV
连翘 Weeping forsythia	12 g • L ⁻¹	6	6	0	0	0	0	0
贯众 Cyrtomium rhizome	12 g • L ⁻¹	6	5	1	0	0	0	16.67
黄连 Coptis chinensis	12 g • L ⁻¹	6	6	0	0	0	0	0
黄芪 Radix astragali	12 g • L ⁻¹	6	6	0	0	0	0	0
甘草 Liquorice	12 g • L ⁻¹	6	5	0	0	1	16.67	16.67
金银花 Lonicera japonica	12 g • L ⁻¹	6	6	0	0	0	0	0
五味子 Schisandra chinensis	12 g • L ⁻¹	6	5	0	1	0	16.67	0
紫苏叶 Perilla leaf	12 g • L ⁻¹	6	5	0	1	0	16.67	0
氨基寡糖素 Amino-oligo saccharin	1.0 mL • L	-1 6	1	0	1	4	83.33	66.67
乙酸铜 Copper acetate	3 g • L ⁻¹	6	5	0	1	0	16. 67	0
病毒唑 Ribavirin	30 mg • L	1 6	1	0	2	3	83.33	50
CK		6	6	0	0	0	0	0

3 讨论

 C_yMV 和 ORSV 病毒侵入寄主细胞复制增殖后 通过胞间连丝和维管束的转运 ,可对寄主植物造成系统性侵染 [5-6]。随着越来越多的国家对进出口蝴蝶兰无上述病毒的明确要求 ,生产无 ORSV 和 C_yMV 病毒的种苗是兰花产业发展的必然趋势。良好的脱毒技术应该具备以下 3 个特点: 1) 较高的脱毒率和成活率; 2) 操作简便; 3) 便于推广 [7]。目前的植物脱毒技术有茎尖脱毒、热处理、病毒抑制剂处理、生物学法

(抗病毒品种、种子繁殖等)和玻璃化超低温处理等^[8]。茎尖脱毒法利用病毒在寄主体内分布不均性,取最不易带病毒的茎尖生长点,利用组培技术诱导成无毒苗。但蝴蝶兰茎尖存在深藏较深,生长缓慢,摘取茎尖难度大、成活率低等缺点。热处理脱毒方法应用于蝴蝶兰研究较多,单独使用效果不好,常见与茎尖培养、病毒抑制剂处理法等结合使用。抗病毒育种需要一定育种周期且只能针对某些特定病毒,不能兼抗各种病毒。种子繁殖可剔除某些而非全部病毒,如 CyMV 可随种子传播^[9]。玻璃化超低温处理是利用含病毒细胞液泡大,超低温保存下可结晶致死来除去病毒,但存在成本太高、操作复杂的缺陷,故尚未见有应用于蝴蝶兰脱毒的报道。

本实验采用病毒抑制剂单独处理法 ,结合组培技术 ,对携带 CyMV 和 ORSV 的待增殖芽进行脱毒试验 ,以寻找最佳的病毒抑制剂和适宜浓度。结果表明: 单纯增殖培养无法脱除病毒; 8 种中药处理中 ,仅贯 众有 1 芽脱除 ORSV ,五味子、紫苏叶各有 1 芽脱除 CyMV ,甘草有 1 芽可同时脱除上述 2 种病毒 ,其余中药处理的无脱毒表现; 农药类中乙酸铜恶化增殖苗的生长 ,降低成活率 ,抽检 6 芽中仅 1 芽脱除 CyMV; 氨毒胜(氨基寡糖素) 1.0 mL • L^{-1} 表现优异 ,有 4 芽全部脱除 2 种病毒 ,CyMV 脱除率与病毒唑 30 mg • L^{-1} 处理的相当 ,均为 83. 33%; ORSV 脱除率与病毒唑 30 mg • L^{-1} 处理相差不大 ,都有 50% 以上的脱除效果。

中药作为一种添加物有应用于组培上的研究报道,如对组培苗长势和抑菌效果研究^[10-11],但应用于蝴蝶兰脱毒研究较少,病毒唑应用于植物脱毒研究较多。有研究指出^[12] 乡 g • L ⁻¹ 板蓝根结合蝴蝶兰茎尖培养可脱除 CyMV 脱毒率为 77.33% 与本实验的中药类中 CyMV 脱毒效果最好的甘草、五味子、紫苏叶 12 g • L ⁻¹ 处理的脱毒率相差很大,仅为 16.67%;而 50 mg • L ⁻¹ 病毒唑脱除 CyMV 率仅为33.33%,低于本实验中 30 mg • L ⁻¹ 病毒唑处理的脱毒率(83.33%),这可能与材料和具体处理方式不同有关。靖晶^[13] 研究表明 30 mg • L ⁻¹ 病毒唑结合热处理茎尖培养,CyMV 脱毒率为 85.7%,与本实验结果相差不大;ORSV 脱毒率为 81.2%。高于本实验中处理的脱毒率(50%);成活率仅为 23.3%,远低于本实验中处理的 96.67%。这可能是病毒唑结合热处理茎尖培养方式不同所致。许传俊等^[14] 研究认为,病毒唑对大花蕙兰 CyMV 病毒脱除效果好于 ORSV。这与本实验结果一致。氨基寡糖素作为一种糖类生物农药,具有对非靶标生物毒性低、影响小、用量低、安全性好等特点,在烟草花叶病毒防治上曾有报道^[15-17]。笔者首次将氨基寡糖素应用蝴蝶兰组培苗脱毒,脱毒效果与病毒唑相当,由于本实验检测的样品略少,两者的脱毒效果仍需进一步对比。病毒抑制剂的作用机理主要有 4 种方式:竞争寄主细胞表面受体、阻碍病毒穿入脱壳、阻碍病毒生物合成和提高寄主抗病能力^[18]。关于病毒唑和氨基寡糖素的脱毒机理、最适使用浓度、降低对植株本身的不利影响和脱毒效果,是否受植物材料、培养基等因素的影响,还需进一步研究。

参考文献:

- [1] GOW Weepeng , CHEN Jentsung , CHANG Weichin. Effects of genotype , light regime , explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of Phalaenopsis orchids [J]. Acta Physiol Plant 2009 31(2):363 369.
- [2] ZETTLER F W, KO N J, GAIL C W, et al. Viruses of orchids and their control [J]. Plant Disease, 1990, 74(9): 621 626.
- [3] HUJS, FERREIRAS, WANG M, et al. Detection of Cymbidium mosaic virus, Odontoglossum ringspot virus, Tomato spotted wilt virus, and Pitryviruses infecting orchids in Hawaii [J]. Plant Disease, 1993, 77(5): 464-468.
- [4]曾燕君 王健华 余志金 等.3 种热带兰感染2 种病毒的症状探讨[J]. 热带农业科学 2011 31(3):20-23.
- [5] VERVER J ,WELLINK J ,VAN LENT J , et al. Studies on the movement of cowpea mosaic virus using the jellyfish green fluo-rescent protein [J]. Virology ,1998 242(1):22-27.
- [6]施农农 徐莺 汪慧中 等. 复合感染建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的兰花超微结构观察及病原物快速鉴定 [J]. 分子细胞生物学 2007 40(2):153-163.
- [7] 郑丽娜, 刁义维, 吴杀杀, 等. 百合无毒化种球繁育关键技术[J]. 分子植物育种 2009 7(6): 1245 1253.
- [8]许传俊 黄珺梅 曾碧玉 等. 植物组织培养脱毒技术研究进展[J]. 安徽农业科学 2011 39(3):1318-1320 ,1335.
- [9]刘黎卿 林志楷 ،郭莺. 蝴蝶兰病毒病研究进展及防治对策综述[J]. 安徽农学通报 2010 ,16(24):21 -23 ,126.

vasive. The plant communities in the bog were classified by using two-way indicator species (TWINSPAN) method , and their interspecific associations of 30 dominant species were analyzed by using χ^2 -test. Twelve communities are classified , namely Comm. Nelumbo nucifera-Lemna minor-Azolla imbircata-Lolium perenne , Lolium perenne-Vicia sepium-Artemisia argyi-Bidens pilosa , Brassica sp. -Lolium perenne-Cynodon dactylon-Bidens pilosa , Phragmites australis-Lolium perenne-Cynodon dactylon , Taraxacum sp. -Lolium perenne-Bidens pilosa-Phragmites australis , Cynodon dactylon-Bidens pilosa-Ateria sp. , Artemisia argyi-Cynodon dactylon-Bidens pilosa-Alternanthera philoxeroides-Eupatorium adenophorumk , Cynodon dactylon-Phragmites australis-Alternanthera philoxeroides-Myriophyllum verticillatum , Bidens pilosa-Alternanthera philoxeroides-Calystegia hederacea , Bidens pilosa-Phragmites australis-Solanum nigrum , Malva sinensis , and Ranunculus japonicus-Rumex acetosa-Bidens pilosa. In the plant communities 435 species dyads consisting of 30 dominant plant species were selected and run with χ^2 -test. Of the species dyads 42.5% , 56.3% and 1.2% were positively , negatively and null associated , respectively. No significant levels of either positive or negative associations are found in the plant species dyads , suggesting that the plant species under survey act as the pioneers and experience the initial stage of colonizing the region of the Jialize peat bog , suffering human activities and invasive grasses as recorded , and that this area is far from a biodiverse steady ecosystem.

Key words: peat bog; phytodiversity; community; invasion; interspecific relationship; wild grass; human disturbance

(上接第60页)

- [10] 张凤琪 董明. 几种中草药对葡萄茎尖组培苗长势的影响 [C]// 中国园艺学会. 中国园艺学会成立 70 周年纪念优秀论文选编. 北京: 中国园艺学会 1999: 240 244.
- [11]穆兰 廖辉伟, 尹贇, 等. 一种筛选常用中草药用作抑菌剂的新方法[J]. 中国食品添加剂 2008(6): 112-117, 122.
- [12] 贺嘉. 蝴蝶兰脱毒快繁关键技术及其生理基础的研究[D]. 南京: 南京农业大学 2010.
- [13]靖晶. 蝴蝶兰组织培养与脱除病毒技术研究[D]. 北京: 北京林业大学 2011.
- [14] 许传俊 . 黄珺梅 . 曾碧玉 . 筹. 病毒唑对大花蕙兰 CyMV 和 ORSV 脱毒效果初探 [J]. 亚热带植物科学 2012 . 41(1):7-9.
- [15]苏小记,贾丽娜. 2.0% 氨基寡糖素水剂防治烟草病毒病药效试验[J]. 陕西农业科学 2005(3):55-56.
- [16]严凯 宋宝安 杨松 等. 0.5% 氨基寡糖素 AS 对烟草 TMV 的抑制及作用机制的初步研究 [J]. 农药 2007 A6(4): 280-282.
- [17]赵小明 杜昱光 白雪芳. 氨基寡糖素诱导作物抗病毒病药效试验[J]. 中国农学通报 2004 20(4):245-247.
- [18]侯娜. 东方百合脱毒技术的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学 2008.

Detoxification Effect of Virus Inhibitors on Viruses in Phalaenopsis

LI Zhengmin¹, WANG Anshi², WANG Jian¹, TAO Chu¹

- (1. College of Horticulture and Landscape, Hainan University, Haikou 570228, China;
- 2. Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plants , Hainan Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau , Haikou 570311 ,China)

Abstract: Cymbidium mosaic virus (CyMV) and Odontoglossum ringspot virus (ORSV) are the most serious viruses which affect the quality of Phalaenopsis plants. It is of a great significance to control CyMV and ORSV. Proliferation buds of Phalaenopsis inoculated with both the CyMV and ORSV viruses were used as explants and cultured on proliferation medium added with different virus inhibitors. The result showed that amino-oligosaccharin gave the highest CyMV and ORSV elimination rate , up to 83.33% and 66.67% , respectively , followed by ribavirin with the respective elimination rates of 83.33% (CyMV) and 50% (ORSV). The Chinese Herbs inhibitor was the worst.

Key words: *Phalaenopsis*; virus-free; CyMV; ORSV