

大蒜茎尖培养脱毒效果

栾雨时 栾非时 崔喜波

在大蒜的栽培生产过程中，由于长期进行无性繁殖，感染病毒后便世代相传，越发严重。据报导，已感染我国大蒜的病毒有九种之多，其中影响较大的主要有大蒜花叶病毒（GMV）和洋葱黄矮病毒（OYDV），近年来，一些单位多采用茎尖培养来减轻或避免各种病毒造成的损失，但对其效果研究甚少，原因关键在于病毒的检测复杂。

材料与与方法：从当年收获的阿城大蒜中随机抽取10个叶球，分别编号，对贮藏叶进行病毒检测，同时摘取茎尖进行培养，四个月后取培养长出的叶片再进行病毒检测。

1. 病毒检测方法：(1) 指示植物检测：取贮藏叶（或培养长出的叶）约1克，加入10倍的PH7.0的磷酸缓冲液在研钵中研碎，制成病毒汁液，再将500~600目的金钢砂撒在指示植物藜和蚕豆的叶上，蘸取病毒汁液进行磨擦接种，两周后观察结果。(2) 点免疫结合检测（Dot immunobinding assay 简称DIBA）：以Biorad公司生产的硝酸纤维素膜纸（NC）为载体，在其上用铅笔按1×1cm的距离点出小点。将待检材料切成小块放到载片上，滴加50ul的TTBS（0.02MTris-HCL、0.5MNaCl、0.05%Tween20PH7.5）。用玻璃棒碾碎蒜叶制成粗汁液，取5ul该液点在NC上稍晾，然后用2%TritonX-100及2%牛血清白蛋白浸渍，再以稀释5000倍的GMV(OYDV)抗血清为一抗进行处理，将NC洗净后再用Tago公司生产的山羊抗兔IgG碱性磷酸酯酶标记抗体稀释2000倍为二抗进行处理，洗净后放到显色基质液中判读结果。一抗及二抗都放在37℃的温室中各30分钟，以Tris缓冲液（TBS）为对照。

2. 茎尖培养方法：把先后用99%的酒精浸渍数秒和5%的次氯酸钠浸渍15分钟进行了表面杀菌的鳞茎，移到超净工作台中，经灭菌水冲洗三遍后，在解剖镜下切取0.3~0.5mm的茎尖，接种到PH5.8的LS+BA2mg/l+NAA0.2mg/l的培养基中，放到温度

20℃，光照时间12h，光照强度3000Lux的培养室内培养。

试验结果：培养前后供试材料的病毒检测结果如表1。可见，由指示植物藜判断的脱毒率为100%，由蚕豆判断的脱毒率为90%，由DIBA检测的脱GMV率为70%，脱OYDV率为60%。

茎尖培养前后 GMV (OYDV) 的检测结果表

样 本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
培养前	藜	++	++	+	++	++	++	+	++	++
	蚕豆	++	++	++	++	++	++	+	++	++
	DIBA	++	++	++	++	++	++	++	++	++
培养后	藜	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	蚕豆	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	DIBA	++	+	-	+	-	++	-	-	+

++：有明显反应 +：有反应 -：无反应

讨论：在植物病毒的检测方面有很多方法，目前我国常用的有指示植物接种检测法、电镜观察法和酶联免疫吸附反应法（ELISA）等。其中，接种法因指示植物的不同，病症表现常常不同，且还受环境条件、生育状态、汁液作成的条件所左右，因而，检测结果不够精确，本试验的结果也证明了这一点；电镜观察法由于电镜昂贵，且在运用该法之前，应对病毒组的形态和典型病毒的特点有一定的了解，因此在某种程度上就限制了该法的应用；ELISA是70年代发展起来的新的血清学方法，是一种用酶标记抗体球蛋白技术的应用，由于灵敏度高，特异性强和操作方便，适于大量田间样品的检测，目前已成为世界上标准方法之一，广泛用于植物病毒的诊断和测定。但由于ELISA免疫反应物消耗量较大、抗体被酶联板吸附后与抗原结合力下降、抗原—抗体相互作用比在液相中慢，为克服这些缺点，寻求一种更好的物质代替酶联板，近年来发展起来的，已被广泛用于医学和动物病毒学的DIBA，可直接应用抗血清，反应时间短，所需抗原和抗体用量仅为ELISA的1/100和1/10，反应结果可长期保存，且非常经济，现已开始应用于植物病毒的检测。

从本试验的结果还可看出，不同种类的病毒脱除效果不一。GMV的脱除率为70%，OYDV的脱除率为60%，说明OYDV在大蒜体内分布更多，且越趋近生长点。若欲进一步提高脱毒效果，除取更小的茎尖（如0.2mm，但存活率降低）外，还可经由愈伤组织成苗（但变异多）、或在培养基中加入动物抗病毒剂之一的Virazole等，都有待于进一步研究。（参考文献略 吉林农业大学园艺系、东北农业大学园艺系、哈尔滨市农业供销公司）