

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)

北方园艺 (总 109) 37

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 (0.02M Tris-HCL, 0.5M NaCl, 0.05% Tween20 PH7.5)。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