

百合病毒及脱毒检测进展

王继华¹, 唐开学¹

张仲凯², 苏艳¹

(1. 云南省农科院农业花卉产品质检中心, 昆明 650205;

2. 云南省农科院生物技术研究所, 昆明 650223)

中图分类号: S682.2⁺9 文献标识码: B

文章编号: 1001-0009(2004)06-0073-03

百合病毒病分布广, 为害大, 是百合种球和鲜切花生产中的主要病害之一, 受到全世界的重视。近年来, 随着我国百合引种数量和种植面积的迅速增加, 以及不规范的种球自繁, 病毒病开始在我国各百合种植区发生流行, 一般发病率在 40%~50%, 二代种球的带毒率在 90% 以上, 严重地制约了我国百合鲜切花的产量和质量。因此, 为了加强百合无病毒体系的研究, 现就国内外百合病毒病及其脱毒技术和病毒检测技术研究进展作综述, 以其中得到启示, 进一步促进百合病毒相关研究。

1 百合病毒的种类

到目前为止, 全世界共报道了百合的病毒病原 10 余种, 植原体 1 种。其中为害最严重的主要病毒有 3 种, 既百合无症病毒 LSV、黄瓜花叶病毒 CMV、百合花叶病毒 LMoV。

表 1 百合病毒及分布

| 病 毒 | 属 | 传播介体 | 国家/地区 |
|--|---------------------|-------|----------|
| 南美菜花叶病毒 <i>Ardasis mosaic virus</i> (AMV) | <i>Nepovirus</i> | 线虫 | 荷兰 |
| 蚕豆斑病毒 <i>Broad bean wilt virus</i> (BBWV) | <i>Fabavirus</i> | 蚜虫 | 韩国 |
| 柑桔碎叶病 <i>Citrus tatar leaf virus</i> (CTLV) | <i>Capsidovirus</i> | 机械种子 | 日本 |
| 黄瓜花叶病毒 <i>Cucurbit mosaic virus</i> (CMV) | <i>Cuscutovirus</i> | 蚜虫 | 所有种植区 |
| 百合轻型斑病毒 <i>Lily mild mosaic virus</i> (LMMV) | — | 蚜虫 | 韩国 |
| 百合斑纹病毒 <i>Lily marbled virus</i> (LMoV) | <i>Reovirus</i> | 蚜虫 | 所有种植区 |
| 百合丛斑病毒 <i>Lily rosette virus</i> (LRV) | — | 蚜虫 | 英、荷、德、中 |
| 百合无症病毒 <i>Lily symptomless virus</i> (LSV) | <i>Carlavirus</i> | 蚜虫 | 所有种植区 |
| 百合 X 病毒 <i>Lily virus X</i> (LVX) | <i>Reovirus</i> | 线虫 | 英国、荷兰、日本 |
| 水仙花叶病毒 <i>Narcissus mosaic virus</i> (NaMV) | <i>Reovirus</i> | 蚜虫 | 意大利 |
| 草莓潜叶斑病毒 <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRV) | <i>Nepovirus</i> | 线虫 | 荷兰、意大利 |
| 烟草花叶病毒 <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) | <i>Tobamovirus</i> | — | 韩国 |
| 烟草脆裂病毒 <i>Tobacco rattle virus</i> (TRV) | <i>Tobravirus</i> | 线虫 | 荷兰、意大利 |
| 番茄丛斑病毒 <i>Tomato ringspot virus</i> (TRSV) | <i>Nepovirus</i> | 线虫 | 韩国 |
| 郁金香潜斑病毒 <i>Tulip top-breaking potyvirus</i> (TTBV) | <i>Reovirus</i> | 蚜虫 | 意大利 |
| 芙蓉花叶病毒 <i>Turnip mosaic virus</i> (TMV) | <i>Potivirus</i> | 蚜虫 | 意大利 |
| 植原体 <i>Phytoplasma</i> | — | 叶蝉、飞虱 | 美国、欧洲 |

2 百合病毒病的为害和发生特点

百合病毒病的发生和为害与其它病毒具有一些共同的特点: 感染病毒后, 终身带毒, 长期受害, 破坏植株正常的生理机能, 表现为生长势下降, 花朵数少, 黄化、花叶等病毒症状; 通过蚜虫等昆虫介体传播, 加快病毒的传播和扩大为害范围; 病毒尚难以用化学药剂或生物制剂进行直接有效防治。

同时, 由于百合生长的时间长, 无性繁殖、温室栽培、病毒

病种类多等特点, 百合病毒病与其它病毒相比也具有一些特殊之处。

2.1 多种病毒复合侵染

为害百合最重的病毒主要有 3 种, 既 LSV、CMV、LMoV。这 3 种病毒往往表现为其中 2 种或 3 种共同侵染百合。据 Bellardi(2002)报道, 在其检测百合鳞茎中, LSV 的带毒率为 100%, LSV+CMV 的带毒率为 42%~54%。Cohen(1996)报道, 在无良好防护的田块, 百合经过 3~4 年的栽培, 大部分植株将会感染 2~3 种病毒。

2.2 病症复杂为害重

由于带毒种类不同、季节不同、种类不同、品种不同, 百合病毒病的症状也有很大的不同, 常见的症状有坏死条斑、黄化、脉明、褪绿斑驳、褪绿条斑, 有时叶片上不产生任何特殊病斑, 而表现为整株黄化, 节间缩短, 生长势下降等。Blake(1996)报道, 带 LSV 的百合植株比无 LSV 的植株茎秆缩短 8.5%~10.4%, 鲜重下降 18.8%~23.4%, 花朵长度降低 12.3%。Kim(1998)报道带毒品种“Casablanca”植株的花朵数量较无毒株下降 30%, 长度仅为 49.2 cm(厘米)(健康株为 119.2 cm(厘米))。

2.3 传播速度快

在无有效防治措施条件下, 百合病毒在同一田块的传播速度很快。Cohen(1996)报道铁炮百合品种 Osant 下种时的种球有 1%~4% 的带毒率, 经过一个生长季节(约 4 个月)田间带毒率可达 50% 以上。

2.4 百合种类和生长环境对病毒影响大

Derks(1997)的研究表明, 亚洲百合种球贮藏于 0℃~2℃ 下 2~3 周, LSV 和 LMoV 的病毒含量高; 在相同状态下, 铁炮和东方中的 LSV、CMV 和 LVX 含量高, LMoV 的含量低。在 20℃, 12 h/d~16 h/d(小时/天)光照下 2~3 周, 铁炮百合中的 LMoV 和 LSV 含量较高, 而东方百合中的 LMoV 较低。

2.5 病毒在百合植株内分布不均

因生长期不同, 病毒在百合器官和组织中的含量也不同。病毒侵入百合植株后, 首先转移至植株顶部, 然后逐步侵染种球、根、珠芽、下部叶。已受侵染的百合植株中病毒含量最高的是茎, 然后是叶、鳞茎和鳞芽, 在鳞茎中, 病毒含量最高是外层鳞片, 其次是中部, 最低是内部, 对于单个鳞片, 病毒浓度最高的是中部, 底部和上部浓度较低。对于单个叶片, 叶片中部病毒浓度较高, 顶部和底部病毒浓度较低(Kim 1995)。百合种类不同, 病毒的分布也不一样, 百合品种 Enchantment 和 Star Gazer 的上部叶片的病毒高于下部叶片, 而对于 L. formosanum, 则刚好相反(Niimi-Y1999)。

2.6 初侵染与二次侵染特点不同

原发性侵染的典型症状为叶片黄化和坏死, 茎扭曲, 病症边缘明显; 继发性侵染的典型症状为花叶或条纹状斑驳。原发性侵染的症状主要出现在中部或上部的叶片; 继发性侵染的症状主要出现在首先侵染的叶片。原发性侵染的病毒不均等地分布地植株中; 而继发性侵染的病毒则存在于全株。原发性侵染在田间呈集聚分布或顺走道分布, 而继发性侵染在田间呈随机分布或所有植株都带病(Derks2002)。

3 百合病毒的脱毒技术

收稿日期: 2004-07-10

3.1 茎尖脱毒

百合脱毒的外植体可以是田间生长的珠芽,也可以是鳞片组培获得的珠芽。茎尖脱毒比率主要取决于茎尖的大小,一般采用 0.2 mm ~ 0.4 mm(毫米)茎尖分生组织最为有效(高尚士 1994)。赵祥云(1993)采用茎尖脱毒技术成功脱去淡黄花百合(*L. sulphureum*)中的烟草环斑病毒,李进(2000)采用茎尖脱毒技术生产出宜兴百合脱毒组培苗。Kim—JaeYeong(1996)对带 LSV、CMV、LMoV 的铁炮百合 *Georgia* 进行茎尖脱毒,经 4 个月的继代培养后,组培苗的带毒率降为 0%。Dapkuniene(2000)将组培小籽球在加有 5 mg/L(毫克/升)苄基腺嘌呤和 0.1 mg/L(毫克/升)NAA 的 MS 培养基中,获得了 4 个品种的无毒百合籽球。

3.2 热处理

病毒不耐高温,通过热处理可使其钝化后脱除。百合热处理的方法是将百合籽球放入恒温箱中,从低到高逐渐升至 35 ℃左右的处理温度,连续 4 周(Xu—PinSan 1999),可明显降低病毒含量。百合病毒的抗热性因其种类而异。CMV 在温度超过 25 ℃时就开始受到抑制(高尚士 1994),30 ℃对 LSV 的抑制作用要强于 LIMV(Lawson 1996)。

3.3 化学处理

化学处理是在外植体培养时加入病毒化学抑制剂,如病毒唑(virazole)或硫尿嘧啶(2—thiouracil),钝化病毒,获得无毒苗。Kim—JY(1994)采用不同的病毒唑浓度 20 和 100 mg/L(毫克/升)分别获得了两个百合品种“*Georgia*”和“*Connecticut King*”的无毒苗。Xu—PinSan(1999)在鳞片诱导培养基中加 50 mg/L(毫克/升)的病毒唑和硫尿嘧啶,获得 80% 无毒百合植株。此外,一些植物生长激素如 NAA、BAP 对降低百合外植体中病毒浓度也有一定效果(Chavdarov 1995)。

3.4 综合方法

单一的脱毒处理技术或难以完全脱除病毒,或需要较长的时间,2 种或 3 种脱毒技术的组合使用逐渐成为生产无毒百合种苗的首选。Blom—Barnhoorn(1985)采用茎尖脱毒+40mM 病毒唑处理的方法,将百合品种“*Arai*”带毒率从 61% 降为 35%。Xu—PinSan(1999)对鳞片在 35 ℃下处理 4 周,然后在含 5 mg/L(毫克/升)病毒唑的培养基中诱导珠芽,最终 70% 的“*Georgia*”和 94% “*Casablanca*”珠芽病毒检测呈阴性。

此外,还有采用花药培养(Niimi—Y2001)、花芽组培(Zhola—I 1992)获得无毒百合植株的报道。

经过脱毒处理,病毒检测呈阴性,仍不能保证百合植株不再带毒。Xu—PinSan(1999)证实经组培脱毒并通过检测的百合籽球在温室中种植 6 个月后 100% 的 *Georgia* 和 44% 的 *Casablanca* 被检测出带毒。其可能的原因是:脱毒处理后,病毒浓度很低。LSV、LMoV 要在 15 ℃下浓度才最高,而脱毒植株需在较高温度(25 ℃)下组培扩繁,所以高温造成病毒含量下降,使检测出现假阴性。常用的脱毒苗检测方法 ELISA 难以检测出低浓度的病毒。因此,脱毒种苗需在移栽后进行 3 次病毒检测,且每次检测间隔 3 个月,才能保证真正脱毒(熊丽 2003)。

4 百合病毒的检测技术

4.1 指示植物法

指示植物鉴定是病毒鉴定的主要方法之一,也是应用最早的方法之一。根据病毒的不同,用于百合病毒检测的常见指示植物有苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)、墙藜(*C. murale*)、台湾百合(*Lilium formosanum*)、麝香百合(*Llongiflorum*)、克利夫兰氏烟(*N. clevelandii*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、番杏(*Tetragonia expansa*)、郁金香(*Tulipa gesneriana* cv. *Clara Butt* or *Rose Copland*)等。

4.2 光学显微镜诊断法

通过染料如 AzureA 或 Orange—Green 对组织染色、酒精脱色、固定及封片,采用光学显微镜观察百合病组织中内涵体类型、形态、组成以及位置,可判断病害是否由病毒引起,并且可在初步鉴定病毒种类。杨佐琦(1993)总结了百合主要病毒的光学显微诊断法;LSV: 在感染的百合表皮细胞和鳞片表皮细胞中形成长披针状的拟结晶形内含体或胞状内含体;LMoV: 在感染的百合表皮细胞中形成细丝状的细胞质内含体;LVX: 在感染的百合表皮细胞中形成纺锤状拟结晶形内含体;CMV: 在感染的百合表皮细胞中形成六角形或多角形的结晶状内含体,染色时内含体常中空透化。此方法优点是所需设备简单、操作容易、可快速得到结果,缺点是需要长期经验积累才可得到可靠结果。

4.3 电子显微技术

电子显微技术(EM)的主要方法包括负染色法、超薄切片法、免疫电镜法和胶体金免疫电镜等。负染色法是因其快速、简单、直接的优点,在百合病毒检测和鉴定研究得到广泛运用。超薄切片法是将植物组织经脱水包埋、切片、染色后,在电镜下观察,可确定病毒在细胞中的存在状态。采用超薄切片法观察百合叶片细胞中有无风轮状、束状内含物,是作为诊断 LMoV 存在的重要依据(洪健 2001)。免疫电镜(ISEM)是应用特异性抗血清与相应病毒产生免疫反应,经负染后,使病毒粒子的电镜下更容易观察。ISEM 不仅可大大提高了检测敏感性,并可以准确地确定病毒的种类。Bertaccini(1982)用 ISEM 对感病百合组织中的两种长度分别为 640 nm 和 740 nm 的病毒进行鉴定,证实了这两种病毒分别为 LSV 和 LMoV。现在欧洲已将 ISEM 作为百合种球 LSV、LVX 等病毒推荐检测方法之一,在检疫及百合生产中广泛采用。胶体金法也是一种常用的 EM 检测技术,此法是先将样品与特异免疫球蛋白反应,再用蛋白 A—胶体金标记,经负染后用电镜进行观察(陈剑平 1993)。由于胶体金的附着,在电镜下很容易检测出病毒粒子的存在。杨佐琦(1993)的研究表明,采用蛋白 A—胶体金法检测 LSV,只需在低倍率的电镜下即能观测到病毒,检测效果远比免疫电镜法更佳。

4.4 血清学方法

血清学方法以其快速、准确、适于批量检测的优点,已成为当前国内外检测百合病毒的常用技术。血清学是利用抗原抗体的免疫学反应检测植物是否带病毒,目前检测百合病毒的血清测定方法主要有:

4.4.1 DAS—ELISA, 即双抗体夹心 ELISA 法(DAS—ELISA) 比其它 ELISA 法, DAS—ELISA 具有更高的敏感性,能检测出 2 μg 百合病组织中的 LSV,非常适用于常规检测大量百合样品(Kimura—S1990)。

4.4.2 DBIA, 即点免疫结合测试技术 DBIA 用硝酸纤维素

膜代替酶标板,使检测更为简便、快速、经济,在百合种球规模化病毒检测方面具有良好的前景。DBIA广泛地应用于百合病毒CMV、LSV、LIMV的检测与调查(Niimi-Y1999, Kim JaeYeong1996)。DBIA检测CMV的灵敏度可达 $1.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ (钱秀红1994),检测提纯LSV粒子的敏感度是间接ELISA的16~32倍(Hsu-HT1995),检测百合组织中LSV是间接ELISA的2~4倍,可检测出低浓度病毒的存在(Kim-JaeYeong1995)。

4.4.3 TBIA,即组织印迹法 TBIA是在DIBA法基础上进行改进,它直接把感病组织切片固定硝酸纤维膜上,然后利用抗原抗体特异反应来检测植物病毒。TBIA与ELISA和DIBA相比,不需要提取病毒的粗提液,除简便、快速、灵敏、准确外,DIBA在百合病毒检测上最主要的应用就是检测病毒在百合植株中的空间分布。Kim-JaeYeong(1995)、Lawson(1996)对不同百合材料切片进行TBIA,搞清了百合植株、种球、鳞片、叶片等不同部位的病毒含量变化规律,同时还证实,TBIA更灵敏,比DBIA和ELISA有更高的病毒检出率。

此外,Agdia等针对田间病毒快速检测需求,开发了一种植物病毒的诊断技术:快速免疫试纸鉴定法(ImmunoStrip)。此法不需要仪器,可实地检测,其销售的CMV、TSWV等的检测试纸,只需20min(分钟)即可得到定性结果。

血清学方法不需要昂贵设备、操作简单、结果准确,较前几种方法更适用于病毒检测,然而其使用亦受到以下几个方面的限制:其检测病毒的基础是利用病毒外壳蛋白的抗原性,但有些植物病毒在抗原性较差,而类病毒则没有外壳蛋白,使该法无效。不同生长时期的不确定变化问题常阻碍阳性与阴性样品的区分。Derks(1997)研究表明,对于贮藏于 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至少2~3周的种球,采ELISA检测LMOV是不准确的。Cohen(1996)的研究也表明,对高温季节(5月中旬至9月底)的田间百合样品进行ELISA检测,结果并不可靠。病毒在感染百合植株上不均匀分布影响ELISA检测结果。ELISA法的检测对象受抗体特征限制,往往会漏检某种病毒或病毒株系。ELISA的灵敏度不够高,无法确定较低含量病毒的存在。如采用ELISA很难检测出组织小籽球中的少量病毒(Cohen1996, Xu-PinSan1999)。血清保质期仅有半年至一年,也不利于对百合病毒长期进行跟踪检测。

4.5 分子生物学检测

4.5.1 双链RNA(dsRNA)技术 大约90%的植物病毒基因组为单链RNA(ssRNA),当此种病毒侵染植物后,首先以单链RNA为模板合成与其互补的链,配对成双链RNA(dsRNA)。只要植物组织中存在病毒,就存在有dsRNA,而正常的植物组织中不产生这种产分子量的RNA。所以通过对植物组织中dsRNA的分析,可用于植病毒的检测和诊断。此法已用于一些病毒组如马铃薯Y病毒属、黄瓜花叶病毒属的分类研究(袁小环2001)。

4.5.2 反转录聚合酶链式反应 1990年以来,国外逐渐开展了针对百合病毒的RT-PCR检测技术研究。Langeveld(1991)根据LMOV 3'端的序列设计引物,成功进行了LMOV

的PCR检测。Joung-YoungHee(1996)根据LSV的CP基因序列设计了PCR引物,对韩国多个百合品种上的LSV进行快速检测。Kaminska(2002)用PCR检测出百合中植原体(Phytoplasma)的存在。RT-PCR比ELISA具有更高的检测灵敏度,可检测出微量的病毒。Niimi-Y(2003)用RT-PCR和ELISA检测同一批样品,RT-PCR的检出率为81%,而ELISA为18%,表明RT-PCR比ELISA更灵敏。Kim-Su-Jeong(2001)改进了PCR检测技术,研究了一步RT-PCR用于百合病毒的检测,大大缩短了检测时间。

4.5.2.1 简并引物PCR技术 特异引物RT-PCR只能特异地检测某种病毒,在检测多种病毒时,需要采用不同引物,进行多次PCR不仅降低了检测速度,也增加了检测成本。而简并引物PCR技术具有一次可检测多种病毒的优点,逐渐被生产采用。简并引物PCR技术是根据同一病毒属或种的外壳蛋白CP基因和复制酶基因存在相同保守序列,设计简并引物,用于鉴定或检测同属不同种或同种的不同株系的病毒。Langeveld(1991)设计的Potyvirus简并引物,可检测LMOV、BYMV、IMMV等Potyvirus病毒。Maroon(2002)设计的Tobamovirus属和Carlavirus属的简并引物,可成功地检测这两个属的所有种,检测灵敏度是ELISA的10倍。Sato H(2002)报道的简并引物PCR检测技术,可以快速检测LMOV和TBV。

4.5.2.2 免疫捕捉PCR技术 免疫捕捉PCR技术是Jenson等结合免疫学方法和PCR技术发展起来的一项病毒检测技术。这种方法在进行RT-PCR前,利用病毒专化性抗体与病毒抗原相结合的原理,将目标病毒固定在微管或微板等固相上,经洗涤、洗脱处理,富集病毒,再进行RT-PCR反应。王继华等(2003)用这种方法检测了百合无症病毒LSV。

4.5.2.3 复合RT-PCR 复合RT-PCR是在同一PCR反应体系中用几对不同的引物同时检测多个目的片段,可节约时间和试剂。由于百合易多种病毒复合侵染,因此复合RT-PCR对检测百合病毒最为有利。目前未见用此方法检测百合病毒报道,但在其它作物上有成功的例子。Nassuth等(2000)应用复合RT-PCR同时检测葡萄藤提取物中的4种病毒。Nie等(2000)也应用复合RT-PCR技术同时检测了马铃薯的5种病毒和1种类病毒。

参考文献:

- [1] Bellardi MG, Nanni G, Bertaccini A, et al. Old and new viruses of lily in Italy [J]. Acta Horticulturae, 2002, 568: 215~220.
- [2] Niimi Y, Han DongSheng, Fujisaki M et al. Production of virus-free plantlets by anther culture of Lilium X 'Enchantment' [J]. Scientia Horticulturae, 2001, 90: 325~334.
- [3] 袁小环,李青.血清学方法和分子生物学方法检测植物病毒病研究进展[J].热带农业科学,2001,94(6):63~68.
- [4] 王继华,瞿素萍,孔宝华等.百合无症病毒的RT-PCR检测[J].云南农业大学学报,2003,6.
- [5] 赵祥云,程廉,邢尤美等.百合珠芽组培及脱毒研究[J].园艺学报,199320(3):284~288.