

# 国产蝴蝶兰种苗携带建兰花叶病毒(CymMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)的调查及脱毒的初步研究

丁 兰, 郭 艳, 董 刚, 杨 玲, 张 丽, 刘 国 安

(西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘 要:**采用双抗夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA)对国内不同蝴蝶兰种植场的 17 个蝴蝶兰分生苗品系种苗(22 个样本)携带的 2 种主要病毒(CymMV 和 ORSV)的情况进行了检测调查, 并采用茎尖培养和原球茎诱导的方式对携带病毒的 4 个蝴蝶兰品系进行了脱毒研究。结果表明:22 个样本中有 20 个样本复合感染 2 种病毒, 仅有 1 个样本显示了阴性结果。采用茎尖培养的‘R-2-2’和‘Y-4-2’品系, 其脱毒率分别为 22.7%(CymMV)和 19.1%(ORSV), 30.3%(CymMV)和 8.0%(ORSV); 采用原球茎脱毒的‘R-1-2’和‘R-11-1’品系, 其脱毒率分别为 25.4%(CymMV)和 1.4%(ORSV), 25.2%(CymMV)和 24.2%(ORSV)。茎尖培养和原球茎诱导方式均不能一次性彻底脱毒。

**关键词:**DAS-ELISA; 蝴蝶兰; 建兰花叶病毒; 齿兰环斑病毒; 脱毒

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)02-0137-04

兰科(Orchidaceae)植物种类极为丰富, 约有 750 个属 25 000 余种, 其分布非常广泛, 北自阿拉斯加, 南到阿根廷和智利南部, 均有野生分布<sup>[1]</sup>。蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)又名蝶兰, 属多年生草本植物, 原产我国台湾、菲律宾等热带亚洲地区<sup>[2]</sup>。蝴蝶兰以其品种丰富、花色艳丽、花姿优雅和花期长等特性赢得世人的青睐, 具有很高的观赏价值和经济价值, 在世界花卉产业中占有极其重要的地位<sup>[3]</sup>, 目前, 在盆花种类中还鲜有能与之争锋或取而代之的花卉种类<sup>[1]</sup>。

改革开放以来, 蝴蝶兰从台湾和日本等地引入我国沿海地区, 规模化养殖不断深入内地, 目前, 国内花卉公司的蝴蝶兰生产品系(包括红花、白花、黄花和杂花系列)已达到上百种之多, 其产量和市场份额也逐年增加。尽管通过有性繁殖的种子苗几乎不携带病毒, 且具有植株生长速度快等优势, 但由于其植株高低不齐及花色不一, 因而商品性状较差, 其生产数量逐年大幅降低。而通过组织培养技术(无性繁殖)生产的分生苗, 因其植株和花色高度一致, 逐渐替代种子苗, 目前已占据市场份额的 90%以上。但长期的无性繁殖必然导致病毒的积累, 致使品种日益退化, 品质下降。兰花病毒病一直是严重危害蝴蝶兰品质的一类重要病害, 其寄生范围广泛, 易传染, 防治困难。目前, 世界上已报导的兰花病毒有 25 种, 其中以建兰花叶病毒(CymMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)发生最为普遍, 危害也最为严重<sup>[4]</sup>。这两类

病毒能使蝴蝶兰叶片形成褪绿条纹、凹陷灰白斑或坏死环斑, 导致植株生长不良、花小而少, 花期缩短, 并且时常复合感染, 危害加剧, 使蝴蝶兰观赏价值和经济价值大幅下降<sup>[5-6]</sup>。

酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)是以免疫学反应为基础, 将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合的一种灵敏度很高的检测技术, 尤其是双抗体夹心 ELISA(Double antibody sandwich ELISA), 因其便利、快速和特异性强等优点已广泛应用于植物病毒检测<sup>[7-9]</sup>。同时, 研究表明, 该方法对兰科不同属类的 2 种主要病毒(CymMV 和 ORSV)的检测具有较高的精确度和稳定性<sup>[10-11]</sup>。

基于上述缘由, 现采用双抗体夹心 ELISA 方法, 对国产蝴蝶兰种苗主要来源地(广州、深圳、上海等)生产的不同蝴蝶兰品系的种苗携带 2 种主要病毒(CymMV 和 ORSV)的情况进行了检测调查, 以期了解国内蝴蝶兰生产用种苗携带病毒的真实状况; 同时, 该文还选择 4 种带病毒品系进行了初步的脱病毒研究, 取得了一定的进展。目前, 有关国内蝴蝶兰种苗携带病毒情况的专题报道以及脱病毒的相关研究极少<sup>[12]</sup>, 尤其未见样本量较多的测试报告。该文旨在为蝴蝶兰种植者的科学养殖以及完善蝴蝶兰脱毒技术提供参考和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

蝴蝶兰 17 个分生苗(自花梗腋芽无性繁殖而来)品系(22 个样本)于 2010 年采自广东、深圳、上海、兰州等 7 个大型兰场; 1 个种子苗品系为西北师范大学细胞工程实验室自制杂交种子苗(巨宝♀×V31♂), 共计 18 个受试样用于该试验的病毒调查; 同时, 从中选取红花品系“巨宝”和“梦幻天使”进行原球茎脱毒试验, 红花品系

**第一作者简介:**丁兰(1964-), 女, 四川德阳人, 博士, 教授, 现从事植物细胞工程及分子药理学研究工作。E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30960464); 西北师范大学知识与科技创新工程资助项目(NWNU-KJCXGC-03-65)。

**收稿日期:**2011-10-14

‘V31’和黄花品系“世华黄金”进行茎尖脱毒试验。

CymMV 和 ORSV 的 ELISA 检测试剂盒包括 General Extract Buffer、PBST Buffer、Carbonate Coating Buffer、ECI Buffer、PNP(4-硝基苯磷酸盐)、PNP Buffer、ORSV 及 CymMV 的阳性对照品等均购于美国 Agdia 公司。琼脂和其它组织培养药品均为分析纯,购自上海生物工程技术有限公司。

试验仪器与设备包括研钵、小型震荡器、酶联板、湿盒、酶标仪、恒温干燥箱、分析天平(感量为 0.0001 g)、离心机、实体解剖镜及超净工作台。

## 1.2 试验方法

1.2.1 病毒检测样品的制备 随机取生长时间约 60 d, 苗高约 3.0 cm 的种苗 3 个,精确称取 1.0 g 鲜重,用样品提取缓冲液于研钵中充分研磨,于 4℃ 保存备用<sup>[13]</sup>。

1.2.2 DAS-ELISA 方法 按照文献<sup>[14]</sup>及 Agdia 公司试剂盒提供操作程序,其步骤为:(1)以包被缓冲液稀释包被抗体(1:200);(2)在酶标板中每孔加入 100  $\mu$ L 稀释后包被抗体,置于湿盒中 37℃ 下保持 4 h;(3)用 PBS-Tween 洗(可使用洗板机)3 次,每次需浸泡 2 min,随后将酶标板倒扣在滤纸上,轻敲吸干;(4)在含有包被抗体的孔中加入 100  $\mu$ L 待测样品或阴性对照或阳性对照,置于湿盒中于 4℃ 下过夜;(5)重复步骤(3);(6)每孔加入 100  $\mu$ L 按 1:200 稀释后的 IgG-AP,置于湿盒中在 37℃ 下温育 2 h;(7)重复步骤(3);(8)每孔加入 100  $\mu$ L 用底物缓冲液配制的 4-硝基苯磷酸盐(1 mg/mL),室温下反应 5~6 min,置于酶标仪 405 nm 处测定吸光值。每次检测,其阴性对照、阳性对照及受试样品均设 3 个平行,并进行 3 次独立重复试验。

1.2.3 脱毒方法 该试验采用幼叶原球茎诱导和茎尖培养 2 种途径:(1)选取生长约 60 d 的组织培养幼苗第 2 片叶子,切取其叶基部分,大小约 1.0 cm $\times$ 0.5 cm,置于 1/2 MS+BA 8.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基中进行原球茎的诱导,原球茎分化培养基为 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L;(2)实体镜下挑取直径为 0.4~0.8 mm 幼苗茎尖,置于 1/2 MS+BA 8.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基中培养。培养条件:光照强度 1 000~2 000 lx;光周期 12 h;温度(25 $\pm$ 1)℃;湿度(60 $\pm$ 5)%;培养基 pH 为 5.8。

## 1.3 数据分析

根据 P/N 值对所测样品的带病毒情况进行评估。P/N<2.0 为阴性结果,P/N $\geq$ 2.0 视为阳性(染病)<sup>[7]</sup>,P/N>5 视为强阳性<sup>[10]</sup>。利用 SPASS 统计软件对脱毒试验中的数据进行差异显著性分析。P/N=样品孔 OD<sub>405</sub>/阴性对照 OD<sub>405</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DAS-ELISA 检测蝴蝶兰种苗 CymMV 和 ORSV

该试验选择了国内不同地域的较大型兰场的蝴蝶兰分生苗(无性繁殖种苗)17 个品系和 1 个杂交种子苗品系。这些样本包括 11 个红花品系、1 个白花品系、4 个黄花品系和 1 个杂花品系的分生苗,以及西北师范大学细胞工程实验室自制杂交种子苗(巨宝♀ $\times$ V31♂)样本 1 个。利用 DAS-ELISA 检测方法对这些蝴蝶兰品系携

带的 CymMV 和 ORSV 进行检测。

从表 1 可看出,根据受试样品与阴性对照的 OD 比值 P/N $\geq$ 2.0 即为阳性的标准,供试的 17 个分生苗品系(22 个样本)中仅有红花品系“内山姑娘”(R-6-1)为全阴性结果,即未携带 ORSV 和 CymMV;采自台湾的“新 V31”品系 ORSV 为阴性,但其 CymMV 为强阳性;而其余品系对 2 种病毒测试反应均表现为阳性,也就是说 17 个品系中有 15 个品系(20 个样本)复合感染了 2 种病毒。从表 1 还可以看出,大多数品系的建兰花叶病毒 P/N 远远高于 5,有 15 个品系表现为强阳性,其感染程度严重,仅有广州某兰场的“火鸟”种苗的建兰花叶病毒 P/N 为 2.4,为轻度带毒的品系。相对而言,受检样品的齿兰环斑病毒感染程度较轻,但为强阳性的品系也达到 14 个(19 个样本)。通过有性繁殖的种子苗(第 25 号样品)2 种病毒的 P/N 分别为 1.6 和 1.3,因此可判定为不携带所检测的 2 种病毒。

表 1 不同来源蝴蝶兰品系 CymMV 和 ORSV 的 DAS-ELISA 检测结果

Table 1 The detection results of the diffenert *Phalaenopsis* (CymMV and ORSV) by DAS-ELISA

| 序号 | 样品<br>编号 | 商品名        | CymMV |             | ORSV |             | CymMV+<br>ORSV<br>ELISA 特性 |
|----|----------|------------|-------|-------------|------|-------------|----------------------------|
|    |          |            | P/N   | ELISA<br>特性 | P/N  | ELISA<br>特性 |                            |
| 1  | NC       | —          | 1.0   | —           | 1.0  | —           | —                          |
| 2  | PC       | —          | 21.5  | ++          | 6.5  | ++          | ++++                       |
| 3  | R-1-1    | 巨宝(广州)     | 23.3  | ++          | 7.4  | ++          | ++++                       |
| 4  | R-1-2    | 巨宝(深圳)     | 22.7  | ++          | 6.2  | ++          | ++++                       |
| 5  | R-2-1    | V31(广州)    | 19.6  | ++          | 5.3  | ++          | ++++                       |
| 6  | R-2-2    | V31(深圳)    | 23.3  | ++          | 6.7  | ++          | ++++                       |
| 7  | R-2-3    | 新 V31(台湾)  | 24.7  | ++          | 1.7  | —           | ++                         |
| 8  | R-3-1    | 红龙(广州)     | 18.8  | ++          | 7.5  | ++          | ++++                       |
| 9  | R-4-1    | 火鸟(广州)     | 21.3  | ++          | 6.8  | ++          | ++++                       |
| 10 | R-4-2    | 火鸟(广州)     | 2.4   | +           | 5.8  | ++          | +++                        |
| 11 | R-5-1    | 大辣椒(广州)    | 21.5  | ++          | 7.6  | ++          | ++++                       |
| 12 | R-6-1    | 内山姑娘(广州)   | 1.4   | —           | 1.3  | —           | —                          |
| 13 | R-7-1    | 大朵红(深圳)    | 20.3  | ++          | 5.2  | ++          | ++++                       |
| 14 | R-8-1    | 大朵红(兰州)    | 21.7  | ++          | 8.1  | ++          | ++++                       |
| 15 | R-9-1    | 红玫瑰(广州)    | 20.9  | ++          | 5.2  | ++          | ++++                       |
| 16 | R-10-1   | 满天红(广州)    | 16.9  | ++          | 6.6  | ++          | ++++                       |
| 17 | R-11-1   | 梦幻天使(广州)   | 24.2  | ++          | 8.6  | ++          | ++++                       |
| 18 | W-1-1    | 白花红唇(广州)   | 16.7  | ++          | 6.4  | ++          | ++++                       |
| 19 | Y-1-1    | 萨拉黄(广州)    | 16.0  | ++          | 7.3  | ++          | ++++                       |
| 20 | Y-2-1    | 富乐夕阳(广州)   | 22.6  | ++          | 6.1  | ++          | ++++                       |
| 21 | Y-3-1    | 皇后(广州)     | 19.5  | ++          | 5.6  | ++          | ++++                       |
| 22 | Y-4-1    | 世华黄金(广州)   | 20.4  | ++          | 5.8  | ++          | ++++                       |
| 23 | Y-4-2    | 世华黄金(上海)   | 20.5  | ++          | 5.3  | ++          | ++++                       |
| 24 | H-1-1    | 兄弟姐妹(广州)   | 19.5  | ++          | 4.4  | +           | +++                        |
| 25 | R        | 巨宝与 V31 杂交 | 1.3   | —           | 1.3  | —           | —                          |

注:(1)P/N 为被测样品孔 OD 值与阴性对照孔 OD 值的平均值之比;PC 为阳性对照;NC 为阴性对照;“+”为阳性;“++”为强阳性;“++++”为复合强阳性;“—”为阴性;(2)表中样品编号中字母 R 表示红花品系、W 为白花品系、Y 为黄花品系、H 为杂花品系。

Note: (1)P/N indicates the average ratio of the OD value of the sample hole with the OD value of negative control hole;PC indicates positive control;NC indicates negative control;“+”indicates positive;“++” indicates strong positive;“++++” indicates strong positive with CymMV and ORSV;“—” indicates negative;(2)the sample number in the table letter R indicates “red”,W indicates “white”,Y indicates “yellow”,H indicates “variedness”.

## 2.2 蝴蝶兰感病毒种苗的脱毒研究

从上述 17 个品系中选择红花品系“巨宝”(R-1-2)和“梦幻天使”(R-11-1)进行了原球茎诱导的脱毒试验;选择了红花品系“V31”(R-2-2)和黄花品系“世华黄金”(Y-4-2)进行茎尖培养的脱毒试验。对原球茎分化后 16 周所得幼苗以及茎尖在培养 12 周后所得幼苗进行 CymMV 和 ORSV 的 DAS-ELISA 检测。

从图 1、2 可看出,经过一次茎尖培养和一次原球茎诱导均不能完全脱去 2 种兰花病毒,但有一定的脱毒效果。从图 1 可以看出,不管是经过茎尖培养还是原球茎诱导的品系,其 CymMV 含量与培养前比均有不同程度的降低,SPASS 软件分析结果显示均有极显著性差异( $P < 0.01$ );从图 2 可以看出,茎尖培养脱毒对 ORSV 效果甚微,尽管品系“R-2-2”和“Y-4-2”的 ORSV 含量在培养后有所降低,但无显著性差异;而经过原球茎诱导的“R-11-1”品系的 ORSV 含量却有降低,差异显著性分析为  $P < 0.01$ 。

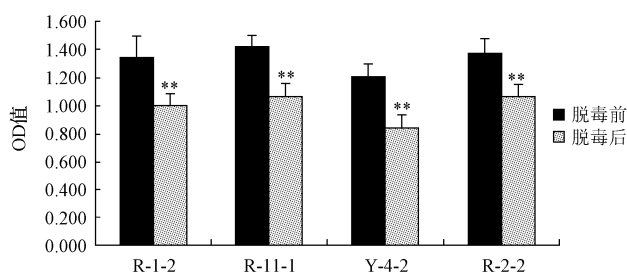


图 1 4 个品系蝴蝶兰 CymMV 脱毒

注:“\*”表示在  $P < 0.01$  水平上的差异显著性,短柱为标准差;R-1-2 和 R-11-1 为原球茎诱导脱毒;Y-4-2 和 R-2-2 为茎尖培养。

Fig. 1 The results of 4 *Phalaenopsis* by detoxification

Note:“\*” indicates significant difference at  $P < 0.01$ ; Bar indicate SD; R-1-2 and R-11-1 by protocorm inducing; Y-4-2 and R-2-2 by shoot-tip culture.

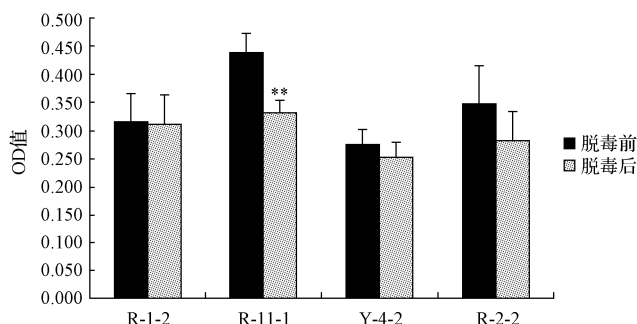


图 2 4 个品系蝴蝶兰 ORSV 脱毒

注:“\*”表示在  $P < 0.01$  水平上的差异显著性,短柱为标准差;R-1-2 和 R-11-1 为原球茎诱导脱毒;Y-4-2 和 R-2-2 为茎尖培养。

Fig. 2 The results of 4 *Phalaenopsis* by detoxification

Note:“\*” indicates significant difference at  $P < 0.01$ ; Bar indicate SD; R-1-2 and R-11-1 by protocorm inducing; Y-4-2 and R-2-2 by shoot-tip culture.

## 3 结论与讨论

该试验利用 DAS-ELISA 方法对国内一些较大型蝴蝶兰生产基地分生苗种苗的常规品系的 2 种主要病毒进行了调查。数据显示,受试品系中,有 94.1% 的品系携带病毒,并且呈强阳性反应。其中有 88.2% 的品系为复合感染(携带双病毒),仅有 5.9% 的品系携带单种病毒。结果表明,国内蝴蝶兰种苗品质不容乐观,各兰花基地种苗生产所面临的品种由于严重带毒而导致品质退化的问题应该给予足够的重视,脱毒研究引入生产环节势在必行。

1960 年法国人 Morel 从感染病毒的兰花植株上分离茎尖,培养出了去病毒的兰花植株,首创了茎尖组培脱毒的方法<sup>[15]</sup>。茎尖培养脱毒效果与茎尖大小密切相关<sup>[16]</sup>。庄子孝<sup>[17]</sup>在对草莓的脱毒培养中认为,其茎尖大小以 0.3~0.5 mm、包含 1 枚叶原基的材料较好。覃兰英等<sup>[18]</sup>用草莓茎尖培养用以脱毒,挑取 0.3 mm 以下的茎尖其脱毒率高,组培苗不带病毒,但成活率较低;0.5 mm 以上的成活率较高,能达到 66.67%。在试验中曾尝试挑取 0.4 mm 以下茎尖进行培养,但由于存活率太低而放弃,因此,该试验选用蝴蝶兰茎尖大小为 0.4~0.8 mm,其成活率达到 67.37%,但受检植株中没有完全脱毒的幼苗。经脱毒处理后,建兰花叶病毒的 P/N 下降约 25%,与脱毒处理前相比有极显著差异,而齿兰环斑病毒未显示脱毒效应。这表明,对于茎尖脱毒途径,不同的植物所需的茎尖大小也不同。从茎尖脱毒原理可知,茎尖生长速度越快(其细胞分裂速度越快)的植物其茎尖含病毒量越低,蝴蝶兰幼苗生长速度远远低于草莓等植物。从而,推测蝴蝶兰完全脱毒所需的茎尖直径应该比该试验所用茎尖直径更小,但由于更小直径的茎尖存活率极低,准确挑取的难度更大,分化率也极低。因此,蝴蝶兰要达到理想的脱毒效果需要探索其它途径。王仁睿等<sup>[19]</sup>利用茎尖培养结合病毒唑抑制病毒复制相结合的方法,茎尖直径为 0.5~1.0 mm,培养基病毒唑浓度为 20 mg/L,该方法能同时脱除 2 种病毒,成活率达 83.6%,脱毒率达 76.5%。有关蝴蝶兰脱毒的相关报道极少,目前能检索到的蝴蝶兰脱毒率最高的方法是王仁睿等采用的。

另外,该试验还尝试了利用幼苗叶基部进行原球茎的诱导从而达到脱毒的目的。结果显示,该途径取得的效果略好于茎尖培养途径,表现在除了建兰花叶病毒的 P/N 下降约 25%(与脱毒前相比具有极显著差异)之外,原球茎分化植株(R-11-1)的齿兰环斑病毒含量也有较为明显的降低(与脱毒前相比下降约 24%,呈极显著差异)。



近 2 a 的实践表明,通过 2 次脱毒甚至多次脱毒的方式也许是彻底脱除蝴蝶兰病毒的较好方法之一。由于蝴蝶兰幼苗培养周期较长,品种繁多导致培养技术难度加大,脱毒难度更高。不同方式的脱毒探索试验对于最终解决国产蝴蝶兰种苗品质问题具有重要意义。后续的 2 次脱毒、多次脱毒或与热处理相结合的脱毒试验尚在进行之中,旨在探索一条切实可行,并能应用于种苗生产的脱毒程序。

### 参考文献

- [1] 黄祯宏. 兰花浅介[M]. 台湾:台湾兰花产销发展协会,2004.
- [2] 杨少辉,季静,王昱,等. 蝴蝶兰组织培养及水培移栽技术[J]. 天津大学学报,2008(6):709-713.
- [3] 卜朝阳,李炳楠. 蝴蝶兰组培快繁商品化生产经济效益分析[J]. 中国农业大学学报,2007(1):77-81.
- [4] Khentrya Y,Paradornuwata A,Tantiwivatb S. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Dendrobium* spp. in Thailand[J]. Crop Protection,2006,25:926-932.
- [5] Zettle F W,Ko N J,Wisler G C. Viruses of orchids and their control [J]. Plant Disease,1990,74(9):621-626.
- [6] Hu J S,Ferreira S,Wang M. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, Tomato spotted wilt virus, and *Pityviruses* infecting orchids in Hawaii[J]. Plant Disease,1993,77:464-468.
- [7] 陈建军,李培睿,杨向英,等. DAS-ELISA 和 PAS-ELISA 检测 GFLV 的技术研究[J]. 河南农业科学,2004(11):48-51.
- [8] 杜平. 医用试验病毒学[M]. 北京:人民军医出版社,1985.
- [9] 吴石金,周建群. 运用 ELISA 快速检测 CPV 抗体方法的建立与均衡性研究[J]. 微生物学杂志,2002(7):14-16.
- [10] 柳爱春,刘超,赵芸,等. 利用 ELISA 检测两种兰花病毒的研究[J]. 浙江农业学报,2009,21(2):91-95.
- [11] 薛朝阳,周学平. 利用 DAS-ELISA 进行番茄花叶病毒的田间检测[J]. 植物病理学报,1999,29(2):157-162.
- [12] 李梅,明艳林,陈青,等. 蝴蝶兰病毒病的病原鉴定[J]. 福建农业科技,2001(6):11-12.
- [13] 陈青,余芳平,张江洪,等. 从进境的蝴蝶兰上检出齿兰环斑病毒[J]. 植物检疫,2003(3):144-145.
- [14] 王升吉,赵玖华,尚佑芬,等. 山东省葡萄几种主要病毒病调查及检测研究[J]. 北方园艺,2011(7):20-23.
- [15] 冷肖荀. 花卉茎尖培养脱毒与检测[J]. 生物学通报,2003,3(3):14.
- [16] 杨小春. 草莓花药培养以及草莓镶脉病毒检测技术研究[D]. 南京:南京农业大学,2006.
- [17] 庄子孝一. 草莓无病毒苗的培养[J]. 廖镜思,译. 福建农学院译丛(园艺植物组织培养专辑),1992(2):16-27.
- [18] 覃兰英,邓世秀,李青,等. 培育草莓脱毒苗方法的研究[J]. 园艺学报,1988,15(3):175-179.
- [19] 王仁睿,李明福. 蝴蝶兰化学处理结合茎尖培养脱除建兰花叶病毒(CymMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)的研究[C]//中国植物病理学会学术会论文集,2010:370-371.

## Investigation and Preliminary Study of Elimination of CymMV and ORSV from *Phalaenopsis* in China

DING Lan, GUO Yan, DONG Gang, YANG Ling, ZHANG Li, LIU Guo-an  
(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070)

**Abstract:** The study had detected two main virus, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) of seventeen strains (twenty two samples) of *Phalaenopsis* collected from different farms, with the method of double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA); Meanwhile, two ways were employed for Elimination of the viruses from four *Phalaenopsis*. The results showed that twenty samples were positive for two viruses (CymMV and ORSV), and only one sample was negative for two viruses (CymMV and ORSV). The virus-free rate of strain R-2-2 and strain Y-4-2 were 22.7% (CymMV) and 19.1% (ORSV), 30.3% (CymMV) and 8.0% (ORSV) after shoot-tip culture, respectively; the virus-free rate of strain R-1-2 and strain R-11-1 were 25.4% (CymMV) and 1.4% (ORSV), 25.2% (CymMV) and 24.2% (ORSV) by induction protocol, respectively. It indicated that the viruses from *Phalaenopsis* could not be eliminated thoroughly by shoot-tip culture or induction protocol for only one time.

**Key words:** DAS-ELISA; *Phalaenopsis*; *Cymbidium mosaic virus*; *Odontoglossum ringspot virus*; virus-free