

# 苹果脱毒方法及其病毒检测技术研究进展

高昌勇

(菏泽学院生命科学系, 山东 菏泽 274015)

**摘要:** 介绍了热处理、化学处理和茎尖培养等苹果脱毒方法, 以及指示植物法、电镜技术、酶联免疫技术和分子生物学技术等几种苹果病毒检测技术的研究进展。

**关键词:** 苹果病毒; 脱毒; 病毒检测

**中图分类号:** S436.611.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2006)09-0019-03

我国苹果栽培面积和总产量都居世界第一, 但单产低、品质差, 病毒病是造成这一现象的重要原因之一<sup>[1]</sup>。目前, 我国已发现的苹果病毒有非潜隐性病毒中的苹果锈果类病毒(ASSV)、苹果花叶病毒(APMV)和苹果绿皱果病毒(ACCV), 还有潜隐性病毒中的褪绿叶斑病毒(CLSV)、茎沟病毒(SGV)和茎痘病毒(SPV)。非潜隐性病毒引起的病害对病树本身来说是毁灭性的, 但由于只是零星发生, 而且症状明显, 容易识别, 可采取刨除病树的简单方法解决病毒的传染和危害, 所以对整个苹果的生产危害较小。而潜隐病毒分布广, 侵染率在栽培苹果中达 50%~80%<sup>[2]</sup>, 侵染苹果树后, 一般无明显症状但会导致树势衰退, 产量锐减, 品质变劣, 对果树生产危害极大。

## 1 苹果脱毒方法

苹果病毒病与细菌病害和真菌病害不同, 目前还没有有效的化学药剂防治, 一旦感染上病毒, 就很难

防治。苹果病毒是通过嫁接传染, 无传毒介体, 所以栽培无病毒苗木, 是防治的主要途径。早在 20 世纪 60 年代, 世界先进国家和地区的苹果生产就开始推广苹果无毒化栽培。采用无病毒栽培具有树势强、新梢生长量大、萌芽率高, 早花、早果、丰产, 果品品质优良等优点<sup>[3,4]</sup>。

### 1.1 热处理和化学处理

热处理脱毒的依据是病毒和寄主细胞对高温忍耐性不同, 选择适当的温度和处理时间, 可抑制病毒繁殖、延缓其扩散速度, 使寄主细胞的生长速度超过病毒扩散速度。从而在这一高温下长出的新植株、器官或组织都有可能不带有病毒<sup>[5]</sup>。热处理是脱出病毒的常规方法, 处理方式分为恒温 and 昼夜高低变温方式, 而处理材料一般分为盆栽和组培苗 2 种。为了避免对植株的伤害, 组培苗可采用昼夜高低温变温方式。但脱毒率较低, 脱毒不彻底。常与茎尖培养或嫁接结合使用, 为其提供处理原料。

收稿日期: 2006-03-22

作者简介: 高昌勇(1976-), 男, 山西汾阳人, 讲师, 硕士, 主要从事生物技术与应用。

- [9] MacArthur R H. The Theory of the Niche, Syracuse Univ [M]. Press Syracuse, New York, 1968. 169-176.
- [10] 王刚, 赵松岭, 张鹏云. 关于生态位定义探讨及生态位重叠计测公式改进研究[J]. 生态学报, 1984, 4(2): 119-126.
- [11] 张金屯. 植物数量生态学方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995. 92-96.
- [12] 郭水良, 李扬汉. 金华地区晚稻田杂草种间生态相似关系分析[J]. 浙江师大学报(自然科学版), 1998, 21(1): 52-58.
- [13] 郭水良, 李扬汉. 南京地区非农田早春杂草生态位研究[J]. 杂草科学, 1997(4): 2-5.
- [14] 郭水良, 李扬汉. 农田杂草生态位研究的意义及方法探讨[J]. 生态学报, 1998, 18(5): 496-503.
- [15] 郭水良, 李扬汉. 浙江金华地区小麦田杂草群落研究[J]. 武汉植物学研究, 1993, 11(3): 239-246.
- [16] 郭水良. 农田杂草生态位研究方法 with 计算程序[J]. 浙江师大学报(自然科学版), 1998, 21(3): 76-79.
- [17] 郭水良, 李扬汉, 赵铁桥. 浙江金华地区小麦一杂草群落中杂草生态位的研究[J]. 植物生态学报, 1998, 22(1): 76-84.
- [18] 肖红, 周启星, 曹莹, 等. 沈阳地区水田主要杂草种群的消长动态及生态位分析[J]. 农村生态环境, 2003, 19(3): 9-13.
- [19] 诸建军, 王庆亚, 李扬汉. 苘草生态位的研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20(1): 18-21, 33.

抑制植物病毒的活性化学物质包括代谢拮抗物质、植物生长调节物质等。其中一些已用于植物脱毒研究,病毒唑是广谱性抗病毒药物,在 20 世纪 70 年代末和 80 年代初,国外一些科学家应用这种抗病毒药成功地脱去了马铃薯 X 病毒、黄瓜花叶病毒和苜蓿花叶病毒等<sup>[9]</sup>。在 MS 培养基中,加入病毒抑制剂茶蓆子毒素,培养苹果新梢顶尖,8 周后,可脱除苹果褪绿叶斑病毒<sup>[7]</sup>。国内有研究者将中药板蓝根和西药三氮唑核苷分别加入 MS 培养基中,培养苹果茎尖,发现板蓝根和三氮唑核苷对苹果褪绿叶斑病毒、茎沟病毒均有很好的脱除作用<sup>[8]</sup>。这种方法脱毒可获得较大的茎尖用于组培,操作简单,但病毒抑制剂易导致后代变异。

### 1.2 茎尖组培脱毒法

茎尖脱毒的依据是病毒在其体内分布并不均匀,某些器官或组织如茎尖等不带或少带病毒的特点。其一,病毒在植物体内是通过微管系统传播的,而分生组织内部不存在微管系统;其二,分生组织内源生长激素含量较高,对病毒有钝化作用;其三,分生组织细胞分裂速度超过病毒的繁殖速度。因此,通过茎尖分生组织组培可以获得脱毒苗,在苹果的生产中利用这种方式获得了较好的脱毒效果<sup>[9,10]</sup>。对于茎尖组培脱毒,一般认为,所取茎尖大小与脱毒率成反相关,茎尖越小脱毒率越高,但是所取茎尖越小,操作难度越大,且突变率增大。有研究表明,采用 2 次取尖的方法获得了比常规茎尖组培脱毒脱毒率高的效果,并且实验操作难度降低<sup>[11]</sup>。

近年来研究证明,用热处理和茎尖培养相结合的方法培育苹果无病毒苗效果较好,采用这种方法可以增加脱出病毒的种类和脱毒率<sup>[12]</sup>,而且省去了热处理后嫩梢嫁接的环节,茎尖大小可切到 1 mm,易分化出苗,降低操作难度,从理论上可以减少后代变异的发生率。据报道,该方法的脱毒率可达到 50%~83.3%<sup>[13]</sup>。

## 2 苹果病毒检测技术

采用各种脱毒方法获得的脱毒苗,必须经过严格检测确定脱毒才能推广应用。目前,常用的苹果病毒检测方法有指示植物法、电镜技术、酶联免疫技术和分子生物学技术等。

### 2.1 指示植物法

病毒的病症常因寄主植物的不同而有差异,指示植物法就是利用一套指示植物(或称鉴别寄主)进行一些植物病毒的检测。生产上常用的木本指示植物

有:弗吉尼亚小苹果(Virginia crab)、斯派 227(Spy227)、光辉(Radiant)和苏俄苹果(R12740~7A),草本指示植物有:昆诺藜和心叶烟等。在弗吉尼亚小苹果上可检测到茎痘病毒和茎沟病毒;斯派 227 和光辉可检测出茎痘病毒;苏俄苹果可用于检测褪绿叶斑病毒<sup>[14,15]</sup>。利用昆诺藜和心叶烟可检测褪绿叶斑病毒和茎沟病毒<sup>[16]</sup>。指示植物检测苹果病毒可在大田或温室进行,也可采用试管嫁接方法。指示植物法虽然简单,但检测速度很慢,而且灵敏度也较低。

### 2.2 电镜技术

电子显微镜广泛应用于植物病毒的检测和研究,它能直接观察到病毒粒子的形态特征,其优点就是快速、直观。在电子显微镜下可以直接观察到苹果病毒粒子呈现不同形状<sup>[17,18]</sup>。但由于电镜技术需用电子显微镜,而且样品的制备费用较高。所以电子显微镜的应用受到一定的限制。

### 2.3 酶联免疫技术

酶联免疫吸附测定法(ELISA)是当前生产中应用最广泛的病毒检测方法,它是 20 世纪 70 年代在荧光抗体和组织化学基础上发展起来的一种新的免疫测定技术,是在不影响酶活性和免疫球蛋白分子的反应条件下,使酶分子和免疫球蛋白分子共价结合成酶标记抗体。酶标记抗体可直接或通过免疫桥与包被在固相支持物上待测定的抗原或抗体特异性结合,来特异的定性、定量的检测病毒的存在。由于标记酶的酶促反应的放大作用,其灵敏度高达 ng 甚至 pg 水平<sup>[19]</sup>,这一技术现已成为植物病毒诊断的标准方法。目前,ELISA 可以检测多种苹果病毒<sup>[20~22]</sup>,我国已制得了褪绿叶斑病毒、茎沟病毒抗血清,可利用 ELISA 快速检测这 2 种病毒<sup>[17,18]</sup>。

### 2.4 分子生物学技术

分子生物学技术是通过检测病毒核酸来证实病毒的存在,其灵敏度比 ELISA 高,特异性强,检测快速,并可用于大量样品的检测,适用范围广,检测对象可以是 RNA 病毒、DNA 病毒和类病毒。目前,常用的分子生物学技术包括核酸分子杂交技术、双链 RNA 电泳技术、反转录 PCR(RT-PCR)技术等。RT-PCR 技术已用于检测多种植物病毒,在苹果上利用 RT-PCR 技术已经可以检测多种病毒<sup>[23,24]</sup>。将 RT-PCR 技术与分子杂交技术相结合,其检测灵敏度更高<sup>[25]</sup>。近来,国内研究者通过设计特异引物检测了苹果褪绿叶斑病毒、苹果茎沟病毒和苹果茎痘病毒<sup>[26,27]</sup>。用 RT-PCR 技术检测苹果病毒无放射性危险,可以检测到飞克(fg, 10~15 g)数量级的植物病

毒及大规模的样品。所以分子生物学技术特别是 RT—PCR 技术在苹果病毒检测方面将会有更广阔的应用前景。

参考文献:

[ 1 ] 廖明安, 冷怀琼. 病毒对苹果生理生化及生长结果的影响[ J ]. 果树科学, 1999, 16( 1 ): 4—8.

[ 2 ] 王焕玉. 苹果病毒的研究[ J ]. 中国果树, 1991( 4 ): 15—17.

[ 3 ] 朱守卫, 戴华国, 李慎福, 等. 无病毒苹果栽培技术[ J ]. 长江果树, 2003( 4 ): 12—14.

[ 4 ] 王际轩, 柳枝, 谢秀华, 等. 苹果无病毒的生长和结果表现[ J ]. 园艺学报, 2000, 27( 3 ): 157—160.

[ 5 ] 覃兰英, 李青, 邓世秀, 等. 核果类病毒识别鉴定及脱毒技术[ J ]. 北京农业科学, 1997( 10 ): 23—28.

[ 6 ] 王蓓, 陆妙康. 香石竹斑驳病毒三种脱毒方法比较[ J ]. 植物生理通讯, 1994, 6( 4 ): 341—346.

[ 7 ] M L Edwards, J I Copper. Plant virus detection using a new form of indirect ELISA[ J ]. Journal of Virological Methods, 1985( 11 ): 309—319.

[ 8 ] 陈超, 张梅, 王桂兰, 等. 茎尖培养中利用中、西药剂脱除苹果病毒的研究[ J ]. 华北农学报, 1997, 12( 4 ): 130—133.

[ 9 ] 朱文勇, 赵玉军, 郭黄平, 等. 苹果优良砧 S18、S20 微茎尖脱毒组织培养技术研究[ J ]. 果树科学, 1995, 12( 4 ): 25—218.

[ 10 ] 董淑英, 孙静, 潘忠强, 等. 苹果茎尖脱毒技术研究[ J ]. 河北农业科学, 2001, 5( 2 ): 30—35.

[ 11 ] 董淑英, 李梅, 于秋华, 等. 二次取尖提高苹果脱毒率研究[ J ]. 河北农业科学, 2001, 5( 3 ): 43—46.

[ 12 ] 董淑英, 位绍文, 孙静, 等. 苹果脱毒方法的比较研究. 莱阳农学院学报, 2002, 19( 2 ): 112—115.

[ 13 ] 王国平. 苹果脱毒技术的研究与应用[ J ]. 中国农业科学, 1996, 29( 3 ): 41—48.

[ 14 ] 杨永生, 刘巨元, 南玉恒, 等. 苹果病毒检测技术应用

[ J ]. 内蒙古农业科技, 1998( 6 ): 31—32.

[ 15 ] 阮小凤, 谯有光, 魏慧雷, 等. 苹果潜隐病毒的快速鉴定试验[ J ]. 陕西农业科学, 1993( 5 ): 25—26.

[ 16 ] 谢晓亮, 高延厅, 温春秀, 等. 苹果潜隐病毒使用检测技术[ J ]. 河北林业科技, 1994( 2 ): 38—39.

[ 17 ] 洪霓, 王国平. 苹果褪绿叶斑病毒提纯及抗血清制备技术研究[ J ]. 中国果树, 1999( 1 ): 15—18.

[ 18 ] 王小凤, 黄谊, 王文慧, 等. 苹果茎沟病毒的提纯和检测[ J ]. 微生物学报, 1997, 37( 4 ): 258—264.

[ 19 ] 孙伟, 焦奎. 酶联免疫吸附分析法在植物病毒检测中的应用[ J ]. 化学研究与应用, 2002, ( 14 ) 5: 511—515.

[ 20 ] 杨传贵, 田视亭, 罗晓芳. 苹果潜隐病毒快速检测[ J ]. 北京林业大学学报, 1997, 19( 4 ): 87—88.

[ 21 ] 洪霓, 王国平, 于济民. 苹果花叶病学清学快速诊断技术[ J ]. 中国果树, 1994( 4 ): 7—8.

[ 22 ] E Knap, A da Camara Machado, H Pühringer, *et al.* Localization of fruit tree viruses by immuno—tissue printing in infected shoots of Malus sp. and Prunus sp[ J ]. Journal of Virological Methods, 1995, 55( 2 ): 157—173.

[ 23 ] W Menzel, W Jelkmann, E Maiss. Detection of four apple viruses by multiplex RT—PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control[ J ]. Journal of Virological Methods, 2002( 1 ): 81—92.

[ 24 ] T Ito, H Ieki, K Ozaki. Simultaneous detection of six citrus viroids and apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction[ J ]. Journal of Virological Methods, 2002 ( 2 ): 253—259.

[ 25 ] MA Salmon, M Vendramo, J Kummer, *et al.* Detection of apple chlorotic leaf spot virus using a 5′ nuclease assay with a fluorescent 3′ minor groove binder—DNA probe[ J ]. Journal of Virological Methods, 2002, 1: 99—106.

[ 26 ] 张开春, 侯义龙, 胡文玉, 等. 采用 RT—PCR 技术检测苹果病毒[ J ]. 果树学报, 2001, 18( 6 ): 370—371.

[ 27 ] 侯义龙, 张开春, 胡文玉, 等. 逆转录—聚合酶链式反应检测果树 RNA 病毒[ J ]. 病毒学报, 2002, 18( 3 ): 71—73.

本刊常用单位符号及换算

依据国家标准, 本刊在刊发稿件中一律使用法定计量单位, 为便于读者阅读, 现将本刊常用单位符号及其换算方法介绍如下:

- 1 长度单位: km= 公里、千米, m= 米, cm= 厘米, mm= 毫米; 换算: 1 km= 1 000 m, 1 m= 100 cm= 3 尺, 1 cm= 10 mm
- 2 重量单位: t= 吨或 1 000 kg, kg= 公斤、千克, g= 克, mg= 毫克; 换算: 1 t= 1 000 kg, 1 kg= 1 000 g, 1 g= 1 000 mg, 500 g= 1 市斤, 50 g= 1 两
- 3 面积单位: m<sup>2</sup>= 平方米, hm<sup>2</sup>= 公顷, cm<sup>2</sup>= 平方厘米; 换算: 1 hm<sup>2</sup>= 10 000 m<sup>2</sup>= 15 亩, 1 亩= 667 m<sup>2</sup>
- 4 浓度单位: 1 mg/ kg, mg/ L 或 mg, kg<sup>-1</sup>, mg, L<sup>-1</sup>, μL, L<sup>-1</sup>= 1× 10<sup>-6</sup>= 1 ppm, 即百万分之一, 不用 ppm 和 1× 10<sup>-6</sup>表示
- 5 时间单位: “天、小时、分钟、秒”分别用“d、h、min、s”表示

(本刊编辑部)