

谢林娜,苏梦芸,朱明明,等.不同品种蝴蝶兰2种病毒的ELISA检测及其症状表现[J].江苏农业科学,2017,45(3):80-83.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.022

不同品种蝴蝶兰2种病毒的ELISA检测及其症状表现

谢林娜,苏梦芸,朱明明,贡宏涛,朱丽梅,徐敏,张波,甘黎明,罗凤霞

(金陵科技学院园艺学院,江苏南京 210036)

摘要:采用酶联免疫法对来源于国内不同蝴蝶兰种植场9个蝴蝶兰品种的45个样本携带建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的情况进行检测调查。结果表明:(1)9个蝴蝶兰品种的45株苗中共有9株感染建兰花叶病毒,感染率为20%,强阳性概率为2.2%;9个品种中均有样本检测出齿兰环斑病毒,45株苗中有32株感染齿兰病毒病,感染率为71.1%,强阳性率为37.8%;另有8株苗发生复合感染,感染率为17.8%,蝴蝶兰中齿兰环斑病毒的发生情况要明显重于建兰花叶病毒。不同品种蝴蝶兰植株感染病毒后,在叶片上的病毒病症状初期主要表现为叶片上有明显的褪绿、黄化现象,但有的病株不仅表现出黄化、褪绿,还形成了明显的黄色斑点、斑纹以及疱状结构,尤其是感染齿兰环斑病毒和复合感染2种病毒病株均发现发病的叶片后期会出现黑色向内凹陷的坏死斑,部分品种的花也出现了异常症状,如红色花瓣黄化和花瓣出现坏死斑。

关键词:蝴蝶兰;建兰花叶病毒;齿兰环斑病毒;ELISA检测

中图分类号:S436.8⁺¹ **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)03-0080-03

蝴蝶兰是兰科蝴蝶兰属(*Phalaenopsis*)中重要的观赏植物,兰花病毒病一直是严重危害蝴蝶兰品质的一类重要病害,目前世界上已报道的兰花病毒有25种,寄主范围广泛、易传染、防治困难。其中发生最广、危害最严重的是建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaie potexvirus*, CymMV)和齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot to - bamovirus*, ORSV),且经常发生复合感染的情况。这2种病毒能使兰花叶片形成褪色斑、坏死斑、花叶斑等症状,致使蝴蝶兰植株生长不良、叶片无光泽、花朵质量下降,甚至植株死亡,降低了蝴蝶兰的观赏价值和经济价值,给蝴蝶兰的生产企业带来严重的经济损失^[1-3]。目前国际上对蝴蝶兰病毒病还未有防治的有效药剂,因此对病毒病的早期发现,早期隔离处理病株非常有必要,但蝴蝶兰病株早期通常只有轻微的症状表现,或根本不表现病症,通过单纯的症状观察已经无法确认,必须利用病毒检测技术鉴定后才能确定是否染病并筛选无毒苗供进一步无性繁殖试管苗,所以病毒检测技术也是进行植物脱除病毒工作的前提必备条件,通过病毒检测技术鉴定出哪些植株携带有规定病毒,才能确定脱毒试验的研究对象^[4-5]。

酶联免疫吸附法(ELISA)是目前国内外检测兰花病毒应用范围最广的检测技术,与传统方法相比具有检测灵敏度高、特异性高以及检测速度快的优点,其中双抗体夹心ELISA和三抗体夹心ELISA应用最为广泛。有研究表明,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,目前是兰花病毒检测的常规手段^[6-9]。基于上述缘由,本研究采用双抗体夹心ELISA和三抗体夹心ELISA对国产蝴蝶兰种苗主要来源地(广东省、江苏省等基地)生产的9个蝴蝶兰品种试管苗携带2种主要病毒的情况进行检测调查,以期了解国内蝴蝶兰生产用苗携带病毒的真实状况,同时本研究还对不同花系感染2种病毒后的症状进行了比较和分析,以期对蝴蝶兰的种植及兰花病毒病害防治提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蝴蝶兰检测样本为从广东省、江苏省等蝴蝶兰种植基地购买的试管苗,一共3个色系9个品种,其中红色花系包括巨宝、汕农凤凰、超群九号、香妃4个品种,样品编号分别为247、359、257、363;粉色花系包括芝娃娃、五彩珍珠,样品编号分别为207、732;黄色花系包括万花筒、黄金男孩、幻想曲,样品编号分别为369、890、743。

样品提取缓冲液、包被缓冲液、PBST缓冲液、ECI缓冲液、PNP缓冲液、包被用的抗体(CymMV和ORSV)、碱性磷酸酶标记物(CymMV和ORSV),还有96孔微孔板,阳性对照品等购自上海必优生物公司,其余药品均为分析纯,购自生物工程(上海)技术服务有限公司。

1.2 试验方法

本试验对温室中不同品种的蝴蝶兰植株进行标记,每个品种5株成熟植株作为检测样本,采取样本叶片作为检测材料,运用ELISA血清法进行病毒检测,统计阳性率。

本试验采用ELISA血清学检测方法,分别对样品建兰花叶病毒(CymMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)2种兰花病毒进行独立互不干扰的病毒检测工作,由于2种病毒的检测操作方法基本相同,所以以下试验步骤均适用于2种病毒的检测。

收稿日期:2015-12-28

基金项目:江苏省大学生创业创新计划(编号:201513573029Y);江苏省南京市江宁区科技发展计划(编号:2015Ed01)。

作者简介:谢林娜(1993—),女,江苏徐州人,主要从事蝴蝶兰病毒检测研究。E-mail:492205674@qq.com。

通信作者:朱丽梅,博士,教授,主要从事园艺植物病虫害及防治的教学与科研工作。E-mail:910703164@qq.com。

1.2.1 DAS-ELISA 方法检测 ORSV 的步骤

1.2.1.1 包被酶标板和孵育 每孔加抗体溶液 100 μL , 将酶标板置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜(但不要长于 24 h)。孵育结束后, 将反应孔中的试剂倒出, 再加入 250 μL PBST 缓冲液, 之后快速倒出, 2 次以上。洗好后将微孔板倒扣在吸水纸上以弄干孔中残留液体。

1.2.1.2 样品的提取及点样孵育 本试验以蝴蝶兰植株的叶片作 ELISA 试验的检测样品, 将叶片剪碎后, 再用研钵将其研磨至绿色汁液全部浸出, 在每份样品提取后彻底清洗研钵, 以免造成样品间的相互污染。样品研磨后, 按 1:10[样品质量(g):提取缓冲液体积(mL)]的比例在提取缓冲液中研磨样品。根据试验设计图表, 取 100 μL 样品提取稀释液于各样品孔中, 取 100 μL 样品提取缓冲液于阴性对照孔中, 取 100 μL 阳性质控物溶液于阳性对照孔中。之后将微孔板放在恒湿箱中, 置于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜。

1.2.1.3 酶标记物的制备 点样孵育时间结束后即进行洗板, 将反应孔中的试剂倒出, 再加入 250 μL PBST 缓冲液, 之后快速倒出, 重复 7 次。之后在各反应孔中加入 100 μL 酶标记物稀释液, 在恒湿箱中室温(25 $^{\circ}\text{C}$)下孵育 2 h。

1.2.1.4 显色与读数 酶标记物孵育结束后进行洗板, 步骤同“1.2.1.3”节, 重复 8 次。之后在各反应孔中加入 100 μL PNP 底物溶液, 在恒湿箱中避光孵育 60 min。出现颜色反应后, 以 2 mol/L NaOH 溶液终止反应, 在酶标仪上以波长 405 nm 读数。

1.2.2 TAS-ELISA 方法检测 CyMV 的步骤 除加入的包被抗体和酶标抗体不一样, 操作步骤与“1.2.1”节所述相同。“1.2.1”节中的包被抗体是兔抗 ORSV, 酶标抗体是碱性磷酸酶标记兔抗 ORSV, 本法中的包被抗体是鼠抗 CymMV 和酶标抗体是碱性磷酸酶标记兔抗-鼠抗 CymMV。

1.2.3 数据分析 根据 P/N 值对所测样品的带毒情况进行评估, 其中 $P/N < 2$ 视为阴性, $P/N \geq 2$ 视为阳性(染病), $P/N > 5$ 视为强阳性。利用 SPSS 软件对脱毒试验中的数据进行显著差异性分析, $P/N = \text{样品孔 } D_{405 \text{ nm}} / \text{阴性孔 } D_{405 \text{ nm}}$ 。

2 结果与分析

2.1 不同品种蝴蝶兰 2 种病毒的 ELISA 检测结果

由表 1 可知, 9 个蝴蝶兰品种的 45 株苗中共有 9 株感染建兰花叶病毒病, 感染率为 20%, 强阳性概率为 2.2%, 其中 247、369、890 号这 3 个品种的样本中均没检测出建兰花叶病毒, 743 号品种样本的感染率最高, 为 60%, 其次为 363 号品种, 感染率为 40%。所检测的 9 个品种均有样本检测出齿兰环斑病毒, 被检测的 45 个样本中, 32 株感染齿兰病毒病, 总计感染率为 71.1%, 强阳性率为 37.8%。另有 8 株苗发生复合感染, 感染率为 17.8%, 其中 743、359、207 号的感染率最高, 达到 100%, 3 个品种的强阳性率也分别达到 40%、80%、20%, 其次为 890, 5 个样本中有 4 个阳性, 369 品种病毒的感染率最低, 为 20.0%, 这 45 个样本 2 种病毒检测结果说明蝴蝶兰齿兰环斑病毒的感染情况要明显重于建兰花叶病毒。

表 1 不同品种蝴蝶兰中 2 种病毒的 ELISA 检测结果

品种花系	品种编号	品种名称	品种特点	建兰花叶病毒				齿兰环斑病毒				复合感染率 (%)
				阳性样品平均 P/N 值	阳性概率 (%)	强阳性样品平均 P/N 值	强阳性概率 (%)	阳性样品平均 P/N 值	阳性概率 (%)	强阳性样品平均 P/N 值	强阳性概率 (%)	
红色系列	247	巨宝	中粉花	—	0.0	—	0.0	2.5	40.0	—	40.0	0.0
	359	汕农凤凰	小粉线条花	3.5	20.0	—	0.0	5.9	100.0	6.6	80.0	20.0
	257	超群九号	中大红色花	3.5	20.0	—	0.0	5.9	80.0	6.8	60.0	20.0
	363	香妃	小红花	3.4	40.0	—	0.0	4.6	60.0	5.2	20.0	40.0
粉色系列	207	芝娃娃	粉色花	5.2	20.0	5.2	20.0	4.1	100.0	5.3	20.0	20.0
	732	五彩珍珠	大斑点花	2.8	20.0	—	0.0	2.8	60.0	—	0.0	0.0
黄色系列	369	万花筒	小腊质橙色花	—	0.0	—	0.0	12.1	20.0	12.1	20.0	0.0
	890	黄金男孩	小绿花	—	0.0	—	0.0	6.0	80.0	6.8	60.0	0.0
	743	幻想曲	中大黄色花	3.3	60.0	—	0.0	4.5	100.0	7.4	40.0	60.0
总计				—	20.0	—	2.2	—	71.1	—	37.8	17.8

2.2 不同品种蝴蝶兰病毒病的症状观察

所检测的 9 个蝴蝶兰品种, 无论是感染建兰花叶病毒还是感染齿兰环斑病毒或者复合感染, 病株营养生长初期在叶片上表现出明显的褪绿、黄化(图 1-2、图 2-1、图 2-2、图 3-2、图 4-1、图 5-1、图 6-1、图 7-1), 有的病株在初期不仅表现出黄化, 还形成了明显的黄色斑点、斑纹等花叶症状(图 1-1、图 3-1、图 6-2、图 6-3、图 7-1、图 7-2、图 8-1、图 8-2、图 9-1、图 9-2、图 9-3), 感染齿兰环斑病毒和复合感染的病株发病叶片上出现明显的坏死斑, 也有的病株样本叶片出现大量、小的坏死凹陷斑, 如 890 号复合感染的病叶(图 6-3), 207 号单独感染齿兰环斑病毒的病叶(图 3-3、图 3-5), 其余病株样本则出现较大的、黑色凹陷病斑(图 3-6、图 4-3、图 5-2、图 7-2、图 9-4), 部分品种的花也出

现了症状, 如开红花的 247、257 号花瓣明显黄化(图 1-3、图 7-3), 207、743 号花瓣出现坏死斑(图 3-4、图 3-5、图 9-5)。

3 结论与讨论

本试验利用 ELISA 法对国内一些较大型蝴蝶兰生产基地常规品种的试管苗进行 2 种主要兰花病毒的检测和调查。数据显示, 9 个蝴蝶兰品种的 45 株苗中共有 9 株感染建兰花叶病毒病, 感染率为 20.0%, 强阳性概率为 2.2%, 32 株感染齿兰病毒病, 感染率为 71.1%, 另有 8 株苗发生复合感染, 感染率为 17.8%。其中 743、359、207 号的感染率最高, 达到 100.0%, 3 个品种的强阳性率也分别达到 40.0%、80.0%、20.0%, 说明我国生产蝴蝶兰种苗品质不容乐观, 各兰花基地



图1 247号蝴蝶兰样本症状



图2 359号蝴蝶兰样本症状

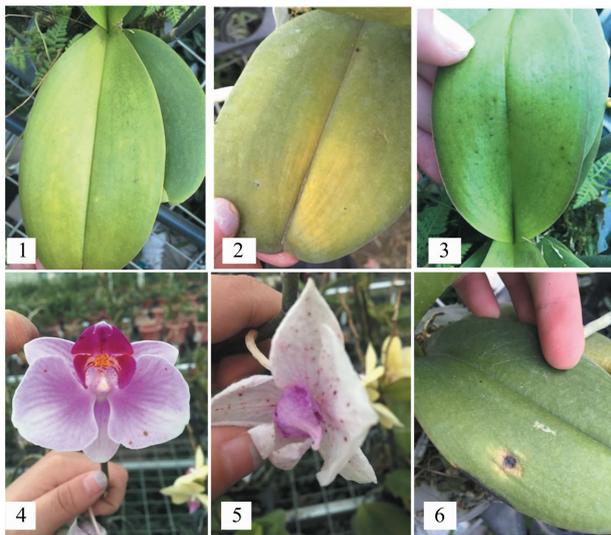


图3 207号蝴蝶兰样本症状



图4 732号蝴蝶兰样本症状



图5 369号蝴蝶兰样本症状



图6 890号蝴蝶兰样本症状



图7 257号蝴蝶兰样本症状



图8 363号蝴蝶兰样本症状

种苗生产所面临的品种由于严重带毒而导致品质退化。

据报道,兰花病毒病的症状极其复杂,不同病毒病在不同时期侵染相同品种的兰花,其症状各异;同种病毒侵染相同品种的兰花,其症状也不尽相同。在栽培过程中,品种、栽培环境、季节、本身营养条件等都会影响症状的表现。本研究发
发现,无论是红花品种还是黄花品种,不同品种蝴蝶兰植株感染病毒后,在叶片上都会形成明显的病毒病症状,所检测的9个品种无论是感染建兰花叶病毒还是齿兰环斑病毒或者复合感染,在营养生长初期病株的叶片上表现出明显的褪绿、黄化症状,感染齿兰环斑病毒和复合感染的病株发病时叶片上出现



图9 743号蝴蝶兰样本症状

金娜,卢修亮,刘倩,等.红灰链霉菌 HDZ-9-47 防治小麦全蚀病的效果[J].江苏农业科学,2017,45(3):83-86.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.023

红灰链霉菌 HDZ-9-47 防治小麦全蚀病的效果

金娜,卢修亮,刘倩,简恒

(中国农业大学植物病理系,北京 100193)

摘要:通过室内及盆栽试验测定红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液对小麦全蚀病的防治效果。室内试验结果表明,红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵滤液可抑制小麦全蚀病的菌丝生长,稀释 5、10、20、50、70、100、150、200 倍的发酵滤液对菌丝生长抑制率分别为 100%、95%、88%、77%、51%、40%、38%、28%。红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液浸种 3 h 对小麦发芽率无影响。盆栽试验结果表明,发酵液 2 次灌根处理可防治小麦全蚀病,在 2012—2013 年 2 次盆栽试验中的防效分别为 55% 和 41%。说明红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液对小麦全蚀病有较好的防治效果,具有开发为生物防治剂的潜力。

关键词:红灰链霉菌;小麦全蚀病;生物防治;防治效果

中图分类号: S435.121.4⁺⁹ **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0083-04

小麦全蚀病是由禾顶囊壳小麦变种 (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) 侵染引起的一种毁灭性病害,在世界范围内广泛分布^[1]。我国 20 世纪 30 年代首次在浙江省发现该病,近年来该病的发病面积和危害日益加重,已蔓延至华东、华北、西北地区的 19 个省,其中河南、山东和安徽等省份发生尤为严重。全蚀病从小麦苗期开始危害,造成苗期叶片发黄,麦苗生长缓慢,在成熟期引起植株大片枯死,造成小麦减产 20%~50%,甚至绝收^[2-3]。目前,抗小麦全蚀病的品种较少,轮作倒茬在小麦大面积种植区的应用存在局限性,化学防治易造成抗药性且污染环境^[4]。因此,筛选有效防治小麦全蚀病的生物防治剂势在必行。

自从 1934 年美国 and 英国发现小麦全蚀病的抑制性土壤以来,生物防治便成为防治该病的一项重要措施^[5]。研究发

现,小麦根际的荧光假单胞杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 通过产生抗生素 (2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG) 在小麦全蚀病自然衰退土壤中发挥着主要作用^[6]。目前国内外都在开发利用荧光假单胞杆菌来防治小麦全蚀病, Yang 等从河南省和江苏省的小麦根际土壤中分离得到 105 株对小麦全蚀病具有抑制效果的假单胞菌^[7]。除了荧光假单胞菌外,研究人员还发现芽孢杆菌 (*Bacillus*)、木霉菌 (*Trichoderma*)、青霉菌 (*Penicillium*) 和芽枝霉 (*Cladosporium*) 等对小麦全蚀病有抑制作用^[8],但这些生防菌易受环境影响,防效不稳定,大规模应用很少,因此目前亟需筛选受环境因素影响小的生防因子^[9]。放线菌中的链霉菌因其可以产生大量生命力强的孢子来抵御外界环境影响,而被广泛应用于农业病害防治。目前放线菌的活体制剂 Mycostop (*Streptomyces griseovirdis* K61) 和 Actinovate Soluble (*Streptomyces lydicus* strain WYEC 108) 等已被登记注册为生物农药,用于防治镰刀菌属 (*Fusarium*)、腐霉菌属 (*Pythium*)、疫霉菌属 (*Phytophthora*) 等多种常见土传病害^[10],但应用链霉菌防治小麦全蚀病却鲜有研究报道。本研究评价了红灰链霉菌 (*S. rubrogriseus*) HDZ-9-47 对小麦全蚀病的防治效果,以期对小麦全蚀病的生物防治提

收稿日期:2016-01-11

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201503114)。

作者简介:金娜(1985—),女,黑龙江哈尔滨人,博士研究生,主要

从事南方根结线虫生防菌研究。E-mail:heidakingner@126.com。

通信作者:简恒,教授,博士生导师,主要从事植物病原线虫研究。

Tel:(010)62731102;E-mail:hengjian@cau.edu.cn。

明显的坏死斑。因此,兰花植株是否有病毒病,是感染了建兰花叶病毒还是齿兰环斑病毒,或是其他病害,仅仅从症状上判断是很不准确的,仍然须要通过 ELISA 等方法测定才能确诊,因此蝴蝶兰的早期检测以及脱毒研究引入生产环节势在必行。

参考文献:

- [1] Khentry Y, Paradoruwat A, Tantiwivat S, et al. Incidence of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus in *Dendrobium* spp. in Thailand[J]. *Crop Protection*, 2006, 25(9): 926-932.
- [2] Hu J S, Ferreira S. Detection of *Cymbidium* mosaic virus, *Odontoglossum* ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyvirus infecting orchids in Hawaii[J]. *Plant Disease*, 1993, 77(5): 464-467.

- [3] 沛然. CymMV 及 ORSV 在蝴蝶兰上的症状表现及高温对其影响[D]. 北京:北京林业大学, 2009.
- [4] 靖晶. 蝴蝶兰组织培养与脱除病毒技术研究[D]. 北京:北京林业大学, 2011.
- [5] 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.
- [6] 宋海超, 张勇, 邢波, 等. 热带兰花两种病毒的 ELISA 检测[J]. *热带生物学报*, 2011, 2(2): 148-152.
- [7] 高焕利. 齐茄黑环病毒和建兰花叶病毒检测方法的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2007.
- [8] 潘俊松, 刘志昕. 建兰花叶病毒的分离、鉴定及检测研究[J]. *热带作物学报*, 1997, 18(1): 63-70.
- [9] 明艳林, 李梅, 郑国华. RT-PCR 检测齿兰环斑病毒技术的建立[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2003, 32(3): 345-347.