

广东兰花病毒病的鉴定和检测研究

肖火根 郑冠标 张曙光 高乔婉

(华南农业大学植物病毒研究室, 广州, 510642)

摘要 用建立的 DAC-ELISA 法, 检测了来自广东省 7 市 18 个兰场或兰圃的 20 种兰共 159 个感病兰花样本。建兰花叶病毒 (CyMV) 和齿兰环斑病毒 (ORSV) 以及 CyMV 和 ORSV 复合感染分别在 40, 26 和 6 个样本中检测到, 分别占所检测样品的 25.2%, 16.4% 和 3.8%, 占所检测的 20 个兰种的 50%(10/20), 35%(7/20) 和 15%(3/20)。感染 CyMV 的兰种有墨兰、文心兰、大花惠兰 (组培苗)、惠兰、石斛兰、硬叶吊兰、卡特兰、秋兰和万代兰; 感染 ORSV 的兰种有墨兰、文心兰、大花惠兰 (组培苗)、蝴蝶兰、五唇兰、毛兰和万代兰; 混合感染 CyMV 和 ORSV 的兰种有文心兰、大花惠兰 (组培苗) 和万代兰。

关键词 兰花; 病毒病; 检测鉴定

中图分类号 S432.41

近年来, 伴随广东省兰花生产和进出口贸易的发展, 兰花病毒病普遍严重, 造成很大的经济损失。国外已报道的兰花病毒病有 25 种之多, 其中建兰花叶病毒 (CyMV) 和齿兰环斑病毒 (ORSV) 发生最普遍 (Zettler et al, 1990)。在我国朱本明等 (1983) 和沈淑琳等 (1990) 报道鉴定了 CyMV 和 ORSV 两种病毒。本研究对广东省主产区兰花病毒病的发生作了调查和鉴定, 并开展了兰花病毒病的检测工作。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 兰 花 样 本 从广州、番禺、南海、顺德、深圳和珠海等地兰花场, 采集墨兰、文心兰、大花惠兰、石斛兰和卡特兰等 20 个兰种共 179 个感病兰花样本。

1.1.2 抗血清 ORSV, CMV 和 PRV (番木瓜环斑病毒) 抗血清由作者制备, CyMV 抗血清由夏威夷大学胡晋生教授惠赠, 工作浓度分别为 1/800, 1/400, 1/600 和 1/800。

1.1.3 酶结合物 辣根过氧化物酶标记 A 蛋白 (SPA-HRP) 购于上海科欣生物技术研究所, 工作浓度为 1/40。

1.2 方 法

1.2.1 ELISA 方法 采用肖火根等 (1994) 报道的 Direct Antigen Coating ELISA (DAC-ELISA) 方法。在所有试验中, 酶标反应板的每个孔加入 100 μ L 兰花组织粗汁液。试验对照有样品制备缓冲液、健康兰花和已知感病兰花组织粗汁液。

1.2.2 样品制备 取 0.2 g 感病兰花叶组织, 加入 4 mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (内含 1% 铜试剂), 研磨后的溶液即为检测用的病叶粗汁液, 用同法制备健康叶粗汁液。

1995-04-13 收稿

2 结果与分析

2.1 ELISA 检测方法的建立

按样品制备方法分别制备感染了 CyMV 和 ORSV 的墨兰病叶粗汁液,按 1/10, 1/20, …… , 1/20480 进行梯度稀释后用 DAC-ELISA 法分别进行测定, 试验重复 3 次。

试验结果表明:用 DAC-ELISA 法检测 CyMV 和 ORSV 表现出特异性反应, 可检测到的粗汁液稀释度都为 1/10240。所以此法灵敏度高, 特异性强, 可有效地检测 ORSV 和 CyMV。

表 1 广东兰花病毒检测⁽¹⁾

兰 种	感病样品数/ 检测样数		
	CyMV	ORSV	CyMV+ORSV
墨兰 <i>Cymbidium sinense</i>	11/76	15/76	0/76
文心兰 <i>Oncidium sp.</i>	13/15	5/15	4/15
大花惠兰 <i>Cymbidium sp.</i>	0/14	0/14	0/14
大花惠兰 (组培苗) <i>Cymbidium sp.</i>	1/5	4/5	1/5
惠兰 <i>C. faberi</i>	1/1	0/1	0/1
下山兰 (墨兰)	1/3	0/3	0/3
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis sp.</i>	0/4	2/4	0/4
多花兰 <i>C. floribundum</i>	0/9	0/9	0/9
石斛兰 <i>Dendrobium sp.</i>	2/8	0/8	0/8
硬叶兰 <i>Cymbidium sp.</i>	0/1	0/1	0/1
硬叶吊兰 <i>Cymbidium pendulum</i>	1/1	0/1	0/1
卡特兰 <i>Cattleya</i>	4/6	0/6	0/6
吊兰 <i>Cymbidium sp.</i>	0/2	0/2	0/2
虎头兰 <i>C. hookerianum</i>	0/4	0/4	0/4
秋兰 <i>C. ensifolium</i>	1/1	0/1	0/1
五唇兰 <i>Doritis sp.</i>	0/1	1/1	0/1
万代兰 <i>Vanda sp.</i>	2/2	1/2	1/2
雷丽兰 <i>Laelia sp.</i>	0/1	0/1	0/1
毛兰 <i>Eria sp.</i>	0/1	1/1	0/1
兜兰 <i>Paphiopedium sp.</i>	0/1	0/1	0/1
玉兰 <i>Habenaria sp.</i>	0/1	0/1	0/1
美丽兜兰 <i>Paphiopedium sp.</i>	0/2	0/2	0/2
病株数/ 总株数	40/159	26/159	6/159
	25.2%	16.4%	3.8%
感病兰种/ 总兰种数	10/21	7/21	3/21
	47.6%	33.3%	14.3%

(1) 兰花样本采自广东省内兰场和兰圃, 用 DAC-ELISA 来检测 CyMV, ORSV, PRV 和 CMV。PRV 和 CMV 在供试样品中未检测到。

2.2 广东兰花病毒检测

检测结果(表1)表明:建兰花叶病毒(CyMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)以及CyMV ORSV复合感染分别在40,26和6个样本中检测到,分别占所检测样品的25.2%,16.4%和3.8%,占所检测的20个兰种的50%(10/20),35%(7/20)和15%(3/20)。感染CyMV的兰种有墨兰、文心兰、大花惠兰(组培兰)、惠兰、石斛兰、硬叶吊兰、卡特兰、秋兰和万代兰,感染ORSV的兰种有墨兰、文心兰、大花惠兰(组培兰)、蝴蝶兰、五唇兰、毛兰和万代兰,混合感染CyMV和ORSV的兰种有文心兰、大花惠兰(组培兰)和万代兰。统计检测样品较多的墨兰、文心兰、石斛兰和卡特兰的带毒率,其感染CyMV的分别为14.5%,86.7%,25%和66.7%,其感染ORSV的分别为20%,33.3%,0%和0%,其混合感染CyMV和ORSV的分别为0%,26.7%,0%和0%。大花惠兰组培苗感染CyMV,ORSV和CyMV+ORSV的百分率分别为20%(1/5),80%(4/5)和20%(1/5)。

经检测证明感染ORSV的兰株症状表现有白拉丝、黑斑、褪绿条纹、褪绿坏死斑等;感染CyMV的兰株表现有叶片褪绿条纹、褪绿斑块、叶面密集黑斑、干缩凹陷灰白斑、藓状斑和坏死圈斑等。

3 讨论

兰花病毒病的症状很复杂。感染ORSV的兰株表现有白拉丝、黑斑、褪绿条纹、褪绿坏死斑等,感染CyMV的兰株表现有叶片褪绿、黑斑、干缩凹陷灰白斑等。但是,有些兰株有类似的症状,有的甚至有明显的花叶或褪绿条纹,却检测不到病毒。其原因可能:一是供试抗血清种类较少;二是有些类似病毒病症状,不一定是病毒引起的。因此,兰株病毒病的有无,是感染了ORSV还是CyMV,抑或是其它病毒?仅仅从症状上来判断是极不准确的,需要采用ELISA、电镜和生物测定等方法才可靠。

生物测定法在适当条件下是可靠的,但它费时费工,还需要温室。ISEM也是一种灵敏、快速的检测方法(Hu et al,1993)。但它不便于用来检测很多样品。ELISA法的灵敏度高于ISEM和生物测定法(Hu et al,1993)。本试验表明DAC-ELISA法可有效地检测ORSV和CyMV。

广东兰花以墨兰居多,本研究表明墨兰中感染ORSV的百分率比感染CyMV的还要高些,这种情况与洋兰中以CyMV居多(Hu et al,1993; Zettler et al,1990)是不同的。这为广东兰花病毒病的防治工作提供了依据。

国外已报道的兰花病毒有25种之多,国内只报道有ORSV和CyMV两种。我们也只检测这两种病毒,是否还存在有其它病毒,有待于进一步研究解决。

兰花组织培养是兰花生产繁殖的重要途径。但是,我们在大花惠兰组培苗5个样品中却检测出4个样品带有ORSV,这表明组培苗还带有病毒病。因此,在兰花生产中对组培苗进行检疫检测是十分必要的。此外,本研究表明引进的洋兰(如文心兰、卡特兰)带毒率较高,这又表明加强对外检疫的重要性。

致谢 华南农业大学植物病毒研究室范怀忠教授审阅此文,植保系罗建军、欧阳海斌、梁敏国和任迅同学参加部分工作,广州兰圃、广东省农科院花卉研究所、深圳农科中心兰花组培研究室、广州植物园、芳村区农委、珠海光华园艺场和园艺研究所、南海动植检疫所平洲分所等单位为采样提供方便,谨此致谢!

参 考 文 献

- 朱本明, 陈作义, 张健如. 1993. 上海地区三种花卉病毒病. 自然杂志, 8: 639
- 肖火根, 范怀忠. 1994. 植物组织粗汁液里的番木瓜环斑病毒的 ELISA 检测技术. 中国病毒学, 10(3): 249 ~ 255
- 沈淑琳, 王树琴, 朱水芳, 等. 1990. 我国兰花主要病毒—建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的分离和鉴定. 植物检疫研究报告, 3: 1 ~ 12
- Hu J S, Ferreira S, Wang M, et al. 1993. Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. Plant Dis, 77: 464 ~ 468
- Zettler F W, Ko N-J, Wisler G C, et al. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Dis, 74: 621 ~ 626

STUDIES ON THE IDENTIFICATION AND DETECTION
OF ORCHIDS VIRUSES IN GUANGDONG PROVINCE

Xiao Huogen Zheng Guanbiao Zhang Shuguang Gao Qiaowan

(Lab of Plant Virology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

159 diseased orchid plant samples representing 20 species from 7 cities of Guangdong province were tested for cymbidium mosaic virus(CyMV), odontoglossum ringspot virus(ORSV), cucumber mosaic virus(CMV) and papaya ringspot virus(PRV) with direct antigen coating ELISA(DAC-ELISA). CyMV was detected in 40 samples and ORSV was detected in 26 samples, which represented 25.2% and 16.4% of total 159 samples surveyed, respectively. Mixed infections with both viruses occurred in 6 samples, representing 3.8% of the total samples surveyed. CyMV infections were detected in *Cymbidium sinense*, *C. sp.*, *C. faberi*, *C. pendulum*, *C. ensifolium*, *Vanda sp.*, *Oncidium*, *Dendrobium sp.*, *Cattleya*; ORSV infections were detected in *Cymbidium sinense*, *C. sp.*, *Vanda sp.*, *Doris sp.*, *Eria sp.*, *Phalaenopsis sp.*; double infections with both viruses occurred in *C. sp.*, *Oncidium sp.*, *Vanda sp.*

Key words orchids; viruses; identification and detection