

墨兰组织培养结合化学处理脱除建兰花叶病毒 (CymMv) 的研究

姜玲¹ 张明涛¹ 陈泽雄¹ 马国华²

(¹华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 国家果树种质资源脱毒室内保存中心, 武汉 430070; ²中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 对墨兰原球茎顶端分生组织培养结合化学处理脱除建兰花叶病毒 (CymMv) 病原的效果进行了研究。取 1~2 mm 大小的墨兰原球茎顶端分生组织, 经 0, 20 和 40 mg · L⁻¹ 的三氮唑核苷浸泡 15 min 处理和继代培养, 诱导再生植株。RT-PCR 检测表明: 从带病叶样提取的 RNA 经反向转录和 PCR 扩增反应, 在琼脂糖凝胶电泳中检测到长为 767 bp 的 CymMv 病原特异扩增产物, 而健康墨兰叶样中未检测到该扩增产物。单纯利用原球茎顶端分生组织培养获得的试管苗, 脱毒率为 72.9%; 原球茎顶端分生组织经过 20 mg · L⁻¹ 的三氮唑核苷处理, 可以获得 100% 的无病毒苗。虽然三氮唑核苷处理造成原球茎顶端分生组织细胞一定程度的伤害, 但经过 5~6 个月的培养, 分生组织能恢复生长, 不定芽能有效地增殖, 并获得了再生植株。当三氮唑核苷处理浓度为 40 mg · L⁻¹ 时, 原球茎的顶端分生组织出现透明和褐变现象, 细胞活力难以恢复。

关键词: 墨兰; 建兰花叶病毒; 三氮唑核苷; RT-PCR

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-1056-05

Eradication of CymMv from Tissue Cultures of *Cymbidium sinense* with Chemotherapy

Jiang Ling¹, Zhang Mingtao¹, Chen Zexiong¹, and Ma Guohua²

(¹Department of Horticulture, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, National Indoor Conservation Center of Virus-free Gemplasm of Fruit Crops, Wuhan 430070, China; ²Huanan Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Meristem-tip of protocols of *Cymbidium sinense* was employed to study eradication of CymMv by combining tissue culture and chemotherapy. Meristem-tip of protocols about 1 - 2 mm in length were excised and immersed separately with 0, 20 and 40 mg · L⁻¹ of antiviral agent, ribavirin for 15 mins, followed by the sub-culture, the regenerated plantlets were achieved. Above materials were determined for virus infection by RT-PCR assay. Experiment indicated that RNA of virus-infected samples were determined and the amplified 767 bp specific fragments of CymMv could be visible clearly in agarose gel electrophoresis, and no product appeared in the health control; only 72.9% of the plantlets obtained merely by meristem of protocols culture were virus-free, while the percentage was 100% for plantlets regenerated from meristem of protocols, ever treated by 20 mg · L⁻¹ of ribavirin, though the chemical injured tissue to certain extents, which were still recovered, efficient proliferation of adventitious buds were achieved, and plantlets were regenerated subsequently after 5 - 6 months. When treated with 40 mg · L⁻¹ of ribavirin following above-mentioned method, meristem of protocols became transparent and browned, and the cell vigor could not be recovered.

Key words: *Cymbidium sinense* (Andr.) Willd.; CymMv (Cymbidium mosaic virus); Ribavirin; RT-PCR

病毒病的侵害一直影响着兰花工业的正常发展。据统计, 目前兰花受到 27 种病毒的侵染, 最主要的是建兰花叶病毒 (Cymbidium mosaic virus, CymMv) 和齿兰环斑病毒 (Odontoglossum ringspot, ORSV)^[1]。CymMv 的普遍发生与无性繁殖方式有着密切的关系, 人工繁殖时造成的机械伤口, 可导

收稿日期: 2004 - 12 - 17; 修回日期: 2005 - 03 - 07

基金项目: 回国留学人员启动基金资助项目 (200306)

致病毒的传播。随着国内外兰花品种交流的增加和贸易迅猛增长, 也给病毒病的传播和蔓延提供了更多的机会。

研究和建立一种既能保持品种优良特性和较高的繁殖系数, 又能脱除培养材料中的病毒病原的有效方法, 对于防止病毒的进一步扩散, 减少种植者的风险具有重要的现实意义。

获得无病毒苗的主要途径有茎尖培养、热处理和化学处理^[2~7]。茎尖培养应用最广, 但脱毒效果常受茎尖大小的影响; 热处理可抑制病毒的复制和运动蛋白的合成, 使多种病毒失活^[7], 但处理时间长, 成活率易受影响, Stone等^[8]研究证明热处理不能从兰花中脱除 CymMV病原; 抗病毒剂处理先后在马铃薯、甘蔗等植物上获得成功^[2,7], Lin等在兰花 (Mokara Char Kuan 'Pink') 上, Toussaint等在 *Cymbidium* Sw. 上作过成功的尝试^[10,11]。虽然墨兰组织培养研究先后有一些报道^[9,12,13], 但利用组织培养技术进行病毒病的脱毒研究未见报道。RT-PCR^[14]分子鉴定技术能在 pg水平上更精确地检测出病毒病原, 也为墨兰脱毒工作提供了良好的检测手段。

本研究旨在将原球茎顶端分生组织培养与抗病毒剂处理相结合, 对脱毒前后材料进行 RT-PCR 检测, 从而为墨兰无病毒苗的工厂化生产提供技术保证。

1 材料与方法

1.1 植物材料的准备

从中国科学院华南植物园采集叶片上带有不规则褪绿斑纹的墨兰植株, 以健康的墨兰作对照。去叶后的茎尖分生组织作为初代培养材料。带病的和健康的叶片用液氮处理后贮存在 -70℃ 超低温冰箱中, 待检测用。

1.2 外植体消毒及培养条件

将墨兰植株外围几枚叶片去掉, 保留中心分生组织, 将茎尖分生组织材料用自来水冲洗 30 min 后, 放入 70%乙醇中浸泡 5 s。在无菌烧杯中滴入 2滴吐温 40, 并加入用无菌水配制的 2%次氯酸钠消毒液 (有效氯浓度为 50 000 mg·L⁻¹)。外植体材料在次氯酸钠溶液中浸泡 30 min, 边浸泡边搅拌, 在无菌水中清洗 4~5次, 接种到诱导愈伤组织和原球茎的培养基中。培养室温度 (25±1)℃, 光照强度 40~50 μmol·m⁻²·s⁻¹, 14 h/d, 相对湿度 70%~80%。

1.3 愈伤组织诱导及原球茎增殖分化

在 MS+6-BA 4 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+蔗糖 20 g·L⁻¹培养基 (pH 5.5) 上诱导愈伤组织和原球茎。初代培养时, 用牛皮纸覆盖容器, 使材料在弱光条件下培养 3~4周, 此后在培养室正常光照条件下进行培养。经过 1~2次继代培养, 获得绿色、紧实的愈伤组织和原球茎, 在 MS+6-BA 1 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 20 g·L⁻¹培养基上诱导原球茎分化芽。生根培养基为 1/2MS+NAA 2 mg·L⁻¹+香蕉泥 100 g·L⁻¹+蔗糖 20 g·L⁻¹+0.5%活性炭。

1.4 脱毒处理及墨兰植株再生

切取大小为 1~2 mm的原球茎顶端分生组织, 分别放入含有 0、20和 40 mg·L⁻¹三氮唑核苷的无菌离心管中浸泡 15 min, 然后将上述材料分别接种到含相应浓度的三氮唑核苷的培养基中暗培养 4周, 再转入不含抗病毒剂的培养基中诱导愈伤组织和原球茎增殖。每浓度处理 50个原球茎分生组织小块, 重复 3次。继代培养 2~3个月后, 诱导出新生原球茎并分化出芽。从基部切下新芽, 接种到生根培养基中, 获得再生植株, 收集叶片用于病毒检测。

1.5 墨兰脱毒前后的 RT-PCR检测

按照异硫氰酸胍法^[14]提取墨兰健康株、带病株及脱毒前后培养材料中的 RNA, 根据 Ajikuttira等^[15]的方法设计能扩增 CymMV的特异性引物, 用于 RT-PCR 试验。引物由上海生工生物技术公司合成, 用于 CymMV扩增的引物序列为 (+) 5'-TAGCTAGGCCCTGGC-3'和 (-) 5'-CTTTAGAAAACCA-CACGC-3'。RT-PCR扩增反应在 PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) 热循环仪中进行。采用

TaKaRa One step RNA PCR Kit (AMV) 进行 RT-PCR反应。经试验采用的最佳反转录和扩增条件为：48 保温 45 min，94 变性 30 s，从 60 开始，每个循环递减 0.5 ，退火 30 s，72 延伸 2 min，进行 10个循环，94 变性 30 s，55 退火 30 s，72 延伸 2 min，进行 21个循环，72 再延伸 7 min。PCR扩增产物经 2%的琼脂糖凝胶 (Mersco)，在 60 V电压下电泳 50 min，溴化乙锭染色，然后在凝胶成像系统中进行观察。

2 结果与分析

2.1 墨兰脱毒苗的培养

在含有相应浓度三氮唑核苷的诱导培养基上，经 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氮唑核苷处理后的分生组织约 1/4 出现褐变，生长处于停滞状态，转入新的诱导培养基后，分生组织块需要近 4周的缓解过程，生活力才逐渐恢复，随后细胞不断分裂和生长。隔 30 d继代 1次，继代培养 2次后，愈伤组织块逐渐增大，形成小突起，其表面有时还产生不定芽和白色毛状物，切分这些芽继续培养 110~120 d时，原球茎陆续长出。完成脱毒和植株再生程序需要 5~6个月 (图版，1~3)。在 $40\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氮唑核苷中处理的材料，分生组织出现严重的透明和褐变现象 (图版，4)，细胞生活力很难恢复，未获得再生植株。

未经化学处理的分生组织，前 4周开始变化不大，当继续培养时，愈伤组织细胞不断分裂，形成小突起，原球茎不断增殖。观察发现，试管苗上并无典型的 CymVv症状。将原球茎分化出的芽从基部切分下来，接种到生根培养基中，25~30 d后每株可长出 3~4条健壮的根。

2.2 脱毒苗的 RT-PCR检测

试验表明，带病症的墨兰叶样 (图版，5) 的 RNA 经反转录反应，获得了 cDNA，在 CymVv特异性引物作用下扩增的 PCR 产物，经琼脂糖凝胶电泳，在约 767 bp处有明显的扩增带产生，阴性对照没有特异扩增带 (图 1)。根据外观症状判断和 RT-PCR 鉴定，母本植株中带有 CymVv病原。RT-PCR 分析显示，经 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氮唑核苷处理后诱导的再生植株，其 RNA 经提取分析，所有被检的脱毒苗没有发现 CymVv特异扩增产物。而直接切取的原球茎分生组织再生的植株，有 27.1%仍带有 CymVv病原 (表 1)，即脱毒率达到 72.9%。经两个样本百分数的均数差异显著性测验， $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氮唑核苷处理与不加三氮唑核苷处理的被检测植株的带毒率呈极显著的差异 ($P < 0.01$)。

表 1 三氮唑核苷处理对墨兰 CymVv脱毒效果影响

Table 1 Effect on eradication of CymVv from Cymbidium sinense with ribavirin treatment

处理 Treatment	RT-PCR *	带毒百分率 Ratio of virus-infected (%)
$0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ribavirin	13/48	27.1A
$20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ribavirin	0/38	0B
$40\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ribavirin **	-	-
阳性对照 Positive control	6/6	100
阴性对照 Negative control	0/6	0

注：*分子为 RT-PCR 检测到特异扩增带的样品数，分母为被检样品数；**褐变，未出苗。

Note: * Numerator expressed that the number of samples were determined with specific amplified fragments, and denominator was total number of samples, which were determined; ** Became brown and plantlet did not formed

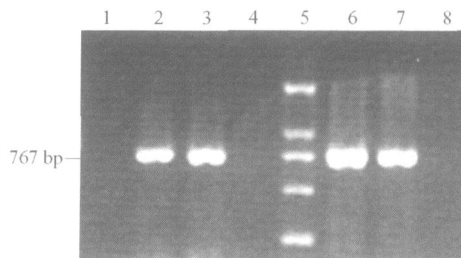


图 1 墨兰脱毒苗的 RT-PCR检测

1. 从原球茎获得再生植株；2 未经化学处理，通过原球茎获得的再生植株；3 脱毒前从紧实的愈伤组织提取 RNA；4 经 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氮唑核苷处理获得的脱毒苗；5. DL2000 marker；6. 阳性对照；7. 用于初代培养的 0.5 cm 大小的顶端分生组织；8. 健康对照。

Fig. 1 RT-PCR assays for the plantlets of eradication virus

1. Regenerated plantlets induced from protocorm were achieved; 2. The sample was not treated with ribavirin, regenerated plantlets from protocorm with invisible symptom were achieved, and the specific 767 bp fragments appeared; 3. Before eradication the virus, RNA extracted from tight callus, the specific 767 bp fragments appeared; 4. Treated with $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of ribavirin, the sample could not amplified CymVv specific fragment; 5. DL2000 marker; 6. Positive control; 7. Meristem-tip of 0.5 cm in size for initiation culture, RT-PCR assay expressed CymVv specific fragment; 8. Negative control

3 讨论

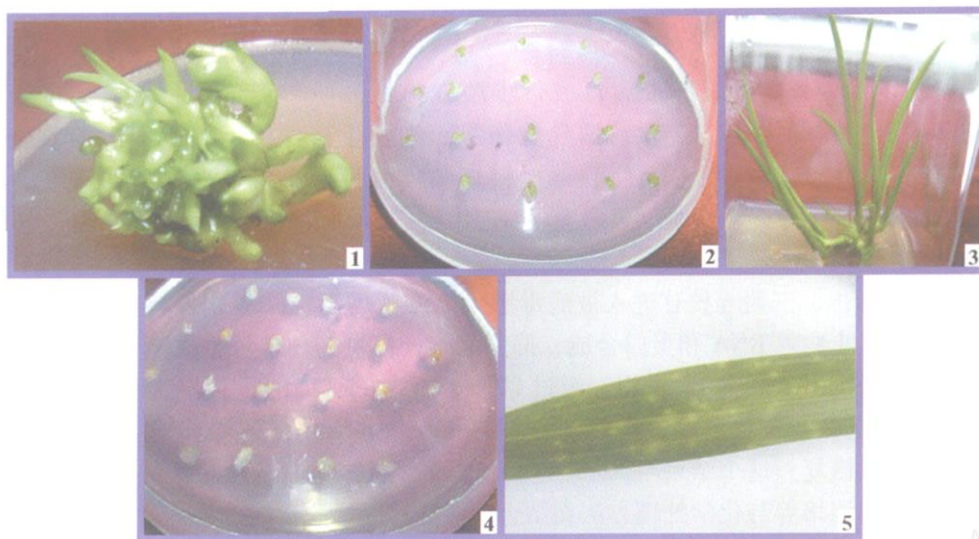
从理论上讲, 茎尖分生组织不带病毒或带毒浓度很低, 使茎尖培养脱毒成为可能。考虑到脱毒取用的茎尖分生组织太小, 会导致诱导愈伤组织和再生植株的困难。本试验取原球茎的顶端分生组织 (1~2 mm) 进行培养, 使脱毒材料来源丰富且减小了植株再生的难度, 但直接培养获得的脱毒率只有 72.9%。由此可见, 单纯使用 1~2 mm 大小的分生组织培养, 不能达到理想的脱毒目的。

Lin 等^[10]研究指出, 三氮唑核苷进入被病毒感染的细胞后迅速磷酸化, 其产物作为病毒合成酶的竞争性抑制剂, 阻止病毒 RNA 和蛋白合成, 抑制病毒的复制与传播。本试验证明, 三氮唑核苷在墨兰上表现出明显的抗 CymMV 病毒作用。经过 20 mg·L⁻¹ 的三氮唑核苷浸泡和继代培养, 能获得 100% 无病毒苗, 但三氮唑核苷浓度过高时, 易造成植物细胞严重的伤害, 产生透明状和褐变现象, 甚至导致生命力无法恢复。这个结果与 Klein 等^[12]在马铃薯上的研究有类似的表现。

本研究将分生组织培养与化学处理方法相结合, 明显提高了脱毒的效果。这种方法在墨兰脱毒处理上尚未见过报道。本试验结果在墨兰无病毒苗培育方面具有实际参考价值, 但控制好三氮唑核苷的浓度和处理时间至关重要。

参考文献:

- 1 Zettler F W, Ko N J, Wisler G C. Virus of orchid and their control. *Plant Disease*, 1990, 74: 621~626
- 2 Klein R E, Livingston C H. Eradication of potato virus X and S from potato shoot-tip cultures with ribavirin. *Phytopathology*, 1983, 73 (7): 1049~1050
- 3 Manganaris G A, Economou A S, Boubourakas I N, Katis N I. Elimination of PPV and PNRSV through chemotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports*, 2003, 22: 195~200
- 4 Mellor F C, Stace-Smith R. Virus-free potatoes by tissue culture. In: Reinert J, Bajaj Y P S. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ cultured*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1977. 616~635
- 5 Navarro L. Application of shoot-tip grafting in vitro to woody species. *Acta Hort*, 1988, 227: 43~55
- 6 Shu W, Timon B. Preliminary studies on the methods of getting virus-free peach plantlets in vitro. *Acta Hort*, 1993, 374: 191~194
- 7 Yogesh P, Asha S. Elimination of sugarcane yellow leaf virus and sugarcane bacilliform virus by tissue culture. *Food and Agricultural Research Council, Reunion Mauritius AMAS*, 2001. 127~133
- 8 Stone O M. The elimination of four viruses from *Ullucus tuberosa* by meristem-tip culture and chemotherapy. *Annals of Applied Biology*, 1982, 101: 79~83
- 9 陈 丽, 潘瑞琦, 陈汝民. 墨兰原球茎生长的研究. *热带亚热带植物学报*, 1999, 7 (1): 59~64
Chen L, Pan R C, Chen R M. Effects of media, growth regulators and dividing on the growth of *Cymbidium sinense* protocorms cultured in vitro. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 1999, 7 (1): 59~64 (in Chinese)
- 10 Lin S T, Wong S M, Goh C J. Elimination of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy. *Annals of Applied Biology*, 1993, 122: 289~297
- 11 Toussaint A J, Kummert C, Maroquin A, Lebrun A, Roggemans J. Use of V RAZOLE to eradicate odontoglossum ringspot virus from in vitro cultures of *Cymbidium Sw*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1993, 32: 303~309
- 12 曾宋君, 程式君, 张京丽, 赵逢畔, 黄向力. 墨兰及其杂种的组织培养与快速繁殖. *广西植物*, 1998, 18 (2): 153~156
Zeng S J, Cheng S J, Zhang J L, Zhao F B, Huang X L. A study on tissue and rapid propagation of *Cymbidium sinense* and its hybrids in vitro. *Guihaia*, 1998, 18 (2): 153~156 (in Chinese)
- 13 项 艳, 於凤安, 彭镇华. 墨兰离体快速繁殖. *林业科学研究*, 2003, 16 (4): 434~438
Xiang Y, Yu F A, Peng Z H. Tissue culture of *Cymbidium sinensis*. *Forest Research*, 2003, 16 (4): 434~438 (in Chinese)
- 14 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002. 518~521, 636~643
Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd ed. Translate by Huang P T. Beijing: Science Press, 2002. 518~521, 636~643 (in Chinese)
- 15 Ajjikuttira P A, Lin-Ho C L, Woon M H, Rgu K H, Chang C A, Loh C S, Wong S M. Genetic variability in the coat protein genes of two orchid viruses: Cymvidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus. *Archives of Virology*, 2002, 147: 1943~1954



图版说明：墨兰原球茎培养及抗病毒剂处理脱毒 1. 利用墨兰顶端分生组织诱导原球茎和不定芽产生；2. 切取 1~2 mm 大小的原球茎顶端分生组织，经 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氮唑核苷处理后，接种在含相应浓度的三氮唑核苷培养基上，原球茎顶端分生组织表现绿色；3. 诱导植株再生；4. 经 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氮唑核苷处理后，接种在含相应浓度的三氮唑核苷培养基上，原球茎顶端分生组织出现透明和褐变；5. 墨兰带病叶片上有不规则褪绿斑块。

Explanation of plates: Eradicate the CymMV by protocorms culture and antiviral treatment in *Cymbidium sinense* 1. Formation of protocorms and adventitious buds from meristem tip of *Cymbidium sinense*; 2. Meristem of protocorms about 1 - 2 mm were peeled off and treated by $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of antiviral agent ribavirin, and sub-cultured in medium containing corresponding ribavirin, which expressed green; 3. Induction regeneration of the plantlets; 4. Treated by $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of antiviral agent ribavirin inoculated in medium containing corresponding ribavirin, protocorms expressed transparent and brown; 5. Anomalous, yellowish mottle symptom appeared in virus-infected leaf of *Cymbidium sinense*.

新书推荐

《中国果树病虫原色图谱》(第二版) 吕佩珂主编

《中国果树病虫原色图谱》(第二版) 含彩版 144 页, 彩色生态照片 1 152 幅, 文字 120 万, 包括落叶果树病害 305 种, 害虫 338 种; 常绿及热带亚热带果树病害 195 种, 害虫 160 种, 全书介绍果树病虫害近千种, 较原图谱图片和病虫数量增加了 50%, 成为中国果树病虫识别与防治大全。该书图文并茂、内容新颖、信息量大, 既突出了无公害和生物防治, 也介绍了综合防治方法, 以适应入关后南北方生产无公害果品防治病虫的需要。可供全国果树站、植保站、果林科技人员、广大果农、农资系统、农林院校师生参考。定价: 101 元 (含邮资)。

《中国蔬菜病虫原色图谱》(第三版·无公害)

《中国蔬菜病虫原色图谱》第三版包括南北方瓜类、茄果类、豆类、葱蒜类、绿叶蔬菜类、多年生及水生蔬菜等病虫害 521 种, 其中蔬菜病害 389 种, 虫害 134 种, 彩图 680 幅、文字 55 万, 该书图文并茂, 内容新颖。第三版防治方法定位在无公害蔬菜生产上, 除充实大量生物防治法外, 还介绍了综合防治技术和方法, 药剂防治中删去了蔬菜上不得使用 and 限制使用的农药, 重点选择使用全国农业技术推广服务中心推荐的无公害农药及高效、低毒、低残留的新品种, 以适应加入世贸组织后, 全国实施新阶段“菜篮子”工程生产无公害蔬菜的防治病虫害的需要。可供蔬菜站、植保站、农技站、农资系统、庄稼医院、农业院校师生、有关农业企业和科技人员参考。定价: 69 元 (含邮资)。

购书者请汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。