



山東農業大學
SHANDONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

植物脫毒原理與技術

山东农业大学生命科学学院

脱毒有关说明

- ◆ 脱毒操作的对象:植物、动物、微生物等。
- ◆ 脱毒通常是指脱除真菌、细菌、病毒等微生物，也可以是其它生物体（或形式）等。
- ◆ 医学或实验上根据需要也可以是脱除毒素等有害物质。
- ◆ 可以是完整生物体，也可以是其一部分。

植

真 菌

物

细 菌

脱

病 毒

毒

其 它

- 1952年，法国培养大丽花茎尖获得第一株植物脱毒苗。



花语：象征大方、富丽，大吉大利，雍容华贵、富丽堂皇。
法国人花语：感激、新鲜、新颖、新意。

原产墨西哥高原，花形同牡丹相似，色彩绚丽多彩，非常惹人喜爱，是世界名花之一。有大方富贵、大吉大利的美好寓意。墨西哥人视为大方、富丽的象征，尊为国花。

咏 大 丽 花 诗 词

- 红柳《咏大丽花》

艳色逢秋，独未改，经霜绽放嫣红。
疏枝摇曳通从容。蕊寒香冷，依旧伴西风。

- 咏大丽花

绚丽多彩姿多娇，此花绽放别花萧；
不与百卉争艳色，敢和牡丹试比高。

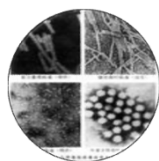
- 大丽花

一品芳菲万象容，漂洋过海嫁东风，
娇姿追美牡丹艳，媚态逼真芍药浓；
莲瓣吟春玄有趣，菊丝舞夏妙无穷，
惧霜畏雪红颜渺，酣梦苕根躲冷冬。

- 马铃薯脱毒

- →世界情况：

- 1955年，获得了土豆脱毒苗。
- 1970年，很多国家在生产中使用这一技术。
- 1975年，用于生产土豆脱毒种薯。



- → 我国的情况
- 1974年，中国科学院植物所等，开展土豆茎尖培养脱毒技术研究及应用。
- 1980年，脱毒薯进入生产阶段。
- 1990年，脱毒薯覆盖了我我国大部分土豆产区，创造了可观经济效益和社会效益。

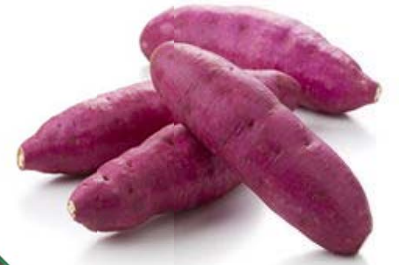


- 大蒜脱毒
- 1971年，获首例大蒜茎尖培养脱毒苗。法国率先将脱毒蒜用于生产，出口澳大利亚等。
- 1980年，我国获大蒜脱毒苗。
- 1988年，山东农科院探明了侵染我国大蒜主要病毒种类，提出脱毒蒜快繁技术，提高繁殖系数10倍，缩短繁种周期，降低生产成本，脱毒蒜在我国大面积应用。



- 甘薯脱毒
- 1960年，我国和非洲国家开始脱毒甘薯研究。
- 1970年，我国江苏等进行脱毒甘薯研究和推广。
- 1988年，山东农科院进行甘薯病毒病调查和毒源鉴定（明确侵染甘薯病毒种类、传毒介体及传播途径），形成了茎尖培养、病毒检测、脱毒种快繁与应用技术体系。





脱毒地瓜大王



其他植物脱毒

- 山药、芋头、大姜等脱毒种在我国、泰国等已投放市场
- 蔬菜、果树、林木等植物的脱毒快繁已形成工厂化产业
- 观赏、药用、种质资源、濒危珍稀植物等的脱毒快繁。

植物脱毒研究应用迅速发展

第1节 植物病毒的为害和脱毒机理

- 植物病毒是危害农业生产的三大病原物之一。

- 已感染病毒的植物群体：

- ①如仍存在未被侵染的不带毒植株，可筛选出来快繁。

- ②如果

- 无毒植株无法或难筛选出来
 - 所有植株都已染毒

，就要针对目标病毒脱毒进

行脱毒，获得脱毒植株。

一、植物病毒分布和为害

(一) 植物病毒的地理分布

- 不同地理范围分布情况差别很大。

- ①不同地区能导致同一种植物感病的病毒种类和优势株系也不同。

- ②在同一种植物群体中，由于毒源随机性、病毒转移多样性等，病毒分布也不均匀。

- ③不同个体间，感染病毒的机会和受感染的程度差异较大。

下面以大蒜为例，说明病毒的分布

- 侵染大蒜主要病毒

- 洋葱黄矮病毒
- 韭葱黄条斑病毒
- 香葱潜病毒
- 大蒜普通潜病毒
- 洋葱蛱传潜病毒等10余种。



- ①洋葱黄矮病毒在五大洲蒜区广泛传播，感病率欧洲52%，亚洲86%。

洋葱黄矮病毒 (onion yellow dwarf virus, OYDV); 韭葱黄条斑病毒 (leek yellow stripe potyvirus, LYSV); 香葱潜病毒 (shallot latent carlavirus, SLV); 大蒜普通潜病毒 (garlic common latent carlavirus, GCLV); 洋葱蛱传潜病毒 (onion mite-transmitted latent potyvirus, OMBLV)

- ②来自法国、印度、埃及、澳大利亚、中国、阿根廷等国的大蒜，均感染韭葱黄条斑病毒，感染率约20%。
- ③香葱潜病毒仅存在于亚洲和欧洲的一些国家，如印度尼西亚、中国、荷兰、法国、德国。
- ④大蒜普通潜病毒在世界范围内传播，但在中国台湾和泰国大蒜中至今未发现。
- ⑤洋葱蛱传潜病毒也在世界范围内传播，如德国、法国、荷兰及俄罗斯均发现。

世界大蒜主要生产分布



• ⑥我国大蒜主产区主栽品种和品系感染上述病毒的情况：

◆ 韭葱黄条斑病毒	28%
◆ 洋葱蛱传丝状病毒	25%
◆ 洋葱黄矮病毒	22%
◆ 大蒜普通潜病毒	3%
◆ 香葱潜病毒	12%

各种病毒的感染率

- ①韭葱黄条斑病毒75%~85%
- ②洋葱黄矮病毒50%~63%
- ③洋葱蛱传丝状病毒50%~75%
- ④大蒜普通潜病毒27%~75% (中高纬度地区发病率偏高)
- ⑤香葱潜病毒0~50% (低纬度地区样品中未检出)

(二) 病毒在植物体内的分布

- 植物病毒具有系统侵染特点，植物体中除生长点等分生组织外的各个部位均可能带毒，但不同器官、组织、部位带毒量差别较大。
- 植物病毒在寄主体内呈不均匀分布。
- 感毒植株体内病毒含量在不同品系间、同品系不同单株间、同一单株不同鳞芽间均有较大差异。
- 对6个品种大蒜体内的洋葱黄矮病毒、大蒜普通潜病毒和韭葱黄条斑病毒三种病毒的系统检测表明，有的单株中鳞芽感染100%，有的仅67%或无感染。

(三) 病毒对植物的为害

1. 植物病毒的种类

- 植物病毒分类主要依据病毒的基本性质：

① 构成病毒基因组的核酸类型 (DNA或RNA)。

脱氧与
不脱氧

② 核酸是单链还是双链。

③ 病毒粒体是否存在脂蛋白包膜。

④ 病毒形态。

⑤ 核酸分段状况 (即多分体现象) 等。

单链核糖核酸

多分体现象为植物病毒所特有，并仅存在于+ssRNA病毒中。

- 多分体现象

- 指病毒的基因组分布在不同的核酸链上，分别包装在**不同的病毒粒体**里。
- 由于遗传信息分开了，单独一个粒体不能侵染，必需是一组几个粒体同时侵染才能全部表达遗传特性。这种分段的基因组被称为**多组分基因组**。
- 含多组分基因组的病毒被称为**多分体病毒**。

- 多分体病毒粒体是球形或长条形。
- 一般球形多分体病毒粒体的外形大小相同，只是因其中的核酸不同而重量不同。
- 长条形多分体病毒常因核酸长度不同而粒体的长度和重量都不同。
- 根据基因组分离和侵染所必需的状况可将正单链RNA病毒分为**单分体病毒、双分体病毒和三分体病毒**。

- 单分体病毒 整个**遗传信息**存在于一条核酸链上、包被在一种粒体中的病毒，
如烟草花叶病毒属、马铃薯X病毒属和马铃薯Y病毒属。
- 双分体病毒 **遗传信息**为双组分基因组包被在两种粒体里的病毒，如烟草脆裂病毒属和蠕传病毒属。
- 三分体病毒 **核酸**包被在三种粒体中的病毒。如黄瓜花叶病毒属和苜蓿花叶病毒属均有四条核酸链，但被包装在三种或四种粒体中。基因组分离和多分体病毒的产生对植物病毒的遗传及进化有重要的作用。

2. 植物病毒病的主要症状

- ①内部症状

- 指植物组织和细胞的病变，如增生肥大、细胞和筛管坏死及各种类型内含体等的出现。

- ②外部症状

- 植物正常生理代谢受干扰，叶绿素、花青素及激素等改变，使植株表现异常。

⇒生长变化：植株矮小、分蘖及枝芽增加；

⇒色泽变化：叶片失绿或变色；

⇒形态变化：果、叶畸形等。

3. 感染病毒对植物生长和经济性状的影响

植物病害在全世界引起的年均损失约千亿美元。

植物病毒病害仅次于真菌病害位列第二。

植株感染病毒后正常生理代谢受阻，出现花叶、黄化等症状，影响光合作用等，导致减产。

植物病毒还可引起毁灭性的病害。

- ①1978年, 大麦黄矮病毒大发生, 使加拿大小麦损失约1700万美元;
- ②1951-1960年, 大麦黄矮病毒造成美国大麦损失6 000多万美元;
- ③椰子死亡类病毒在约40年间毁坏了3 000多万株椰子树, 而且每年继续损失约 50万株。

• 几点说明

- ①植物品种(系)间对病毒侵染的敏感性差异显著
- ②选择耐病毒品系(种)进行脱毒，可延长脱毒蒜种应用年限，降低生产成本。
- ③有的症状明显但对产量影响不大，脱毒后大田种植多年，仍保持生长优势，该类品种可能具有抗病性。
- ④有的脱毒蒜开放种植7年后，虽然病毒病症状明显但与其未脱毒对照比，仍有明显生长优势和增产效果。
- ⑤也有些品种开放种植3年，生长势显著变弱，甚至低于对照。

二、植物病毒的传播方式

（一）植物病毒的定义及一般特性

- 传播 植物病毒从一个植株转移或扩散到其它植株，是病毒在植物群体中的转移。
- 病毒是**专性寄生物**，在自然界生存发展必须在寄主间转移。
- 根据自然传播方式不同，可分为：**介体传播和非介体传播**。

- ①介体传播
- 病毒依附在其它生物体上，借其它生物体的活动而传播及侵染(包括动物性介体和植物性介体两类)。
- 严格地说，种子和无性繁殖材料的带毒不能归在植物介体中，因为它们只是从母体被动地接受了病毒，使自身发病，它们携带的病毒要通过其它传播方式才能到达其它植物或植株。

- ②非介体传播

- 在病毒传递中没有其他有机体介入，包括汁液接触传播、嫁接传播、花粉传播、种子和无性繁殖材料传带。
- 病毒不同于真菌，体外存活期一般较短，没有主动侵入寄主无伤组织的能力，侵染不像真菌那样主动有效，只是被动传播。

- 植物病毒近距离主要靠活体接触摩擦有效传播，远距离则靠繁殖材料和介体传带。
- 有些病毒只有一种常规传播方式，但许多病毒则不只一种方式。



相邻烟草植株的叶片接触摩擦病毒即可由一个植株传到另一个植株

- 任何一种方式均可能在流行中起重要作用，对传播模式的了解是植物病毒学的基础工作。
- 了解植物病毒的自然传播方式，对病害的控制、植物病毒的鉴定和分类具有很高的价值。
- 不同科、属的病毒传播方式存在明显差异，有的病毒有多种传播方式或途径。
- 机械传播和蚜虫传播的病毒属最多，在10个以上。
- 种子、叶蝉、叶甲、线虫、真菌传播的属5~8个。
- 飞虱、粉虱、蓟马、螨类和花粉传播的属较少，在3个以下。



- 不同传播方式之间存在一定的关系。
- 甲虫可传的病毒都可以机械传播。
- 蚜传病毒大多也可以机械传播。
- 叶蝉、飞虱、粉虱、蓟马可传的病毒大多没有其他传播方式。
- 花粉可传播的病毒均可种传。



(二) 介体传播

植物病毒介体种类多，主要有昆虫、螨类、线虫、真菌、菟丝子等，其中昆虫最重要。

- 已知昆虫介体400多种，其中约200种属蚜虫类，130多种属叶蝉类；昆虫介体中 70%为同翅目的蚜虫、叶蝉和飞虱，其中以蚜虫为主。
- 大部分昆虫传毒的资料来源于蚜虫。

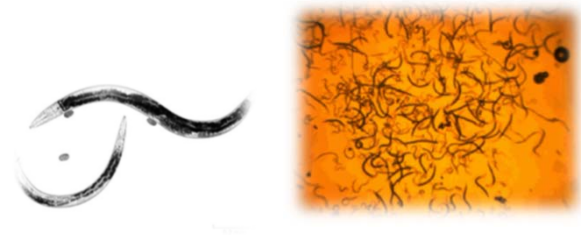
- ①蚜虫
- 约200种蚜虫可传160多种植物病毒，有的只能传2～3种病毒，有的可传40～50种病毒如蚕豆蚜和马铃薯蚜。
- 桃蚜可以传播100种以上病毒。
- 在这160多种植物病毒中，有的只由一种蚜虫传播，有的可由多种蚜虫传播。
- 黄瓜花叶病毒可由75种蚜虫传播。

- 蚜虫传播的植物病毒主要包括马铃薯Y病毒属、花椰菜花叶病毒属、黄瓜花叶病毒属、苜蓿花叶病毒属等病毒。
- 这些病毒很容易用汁液摩擦传播(或接种)，病毒基本上存在于薄壁细胞中，特别是表皮细胞、下表皮细胞和栅状组织细胞内，很少在韧皮组织内。

- ②叶蝉和飞虱

- 叶蝉亚目约2 000个属15 000种叶蝉中，只有21个属中的49种是病毒传播介体。
- 飞虱有20个科，但仅飞虱亚目中存在植物病毒介体。
- 介体的寄主主要是禾本科植物，重要的作物病害有水稻矮缩病、小麦丛矮病和玉米粗缩病等。

- ③土壤中的介体
- 土壤本身并不传毒，主要是土壤中的线虫或真菌传播病毒。
- 已知5个属 38种线虫传播80种植物病毒或其不同的株系，其中，多数属于蠕传病毒属和烟草脆裂病毒属的病毒，少数为其他球状病毒。



- 蠕传病毒属52种病毒或株系分别由12种长针线虫、11种剑线虫和1种拟长线虫传播。
- 烟草脆裂病毒属28种病毒或株系分别由5种毛刺线虫、9种拟毛刺线虫传播。
- 线虫在土壤中移动很慢，传播距离有限，每年仅30～50cm。
- 这些病毒远距离传播主要靠苗木，其中多数可通过感病杂草带毒种子传播。

- 传毒真菌主要是壶菌目和根肿菌目真菌。
- 壶菌目的油壶菌可传12种病毒，如烟草坏死病毒、莴苣巨脉病毒、黄瓜坏死病毒。
- 根肿菌目真菌可传17种病毒，如多黏菌传递甜菜坏死黄脉病毒和麦类黄花叶病毒。

（三）非介体传播

①机械传播

- 指田间的接触或室内的摩擦接种传播病毒。
- 田间主要由植株间接触、农事操作、农机具及修剪工具污染、人和动物活动等造成病毒的传播。在教学科研中，经常人工操作接种传播病毒。
- 机械传播对某些病毒很重要（如烟草花叶病毒属和马铃薯X病毒属只有此种传播方式）。
- 蠕传病毒属常经果树修剪传播。

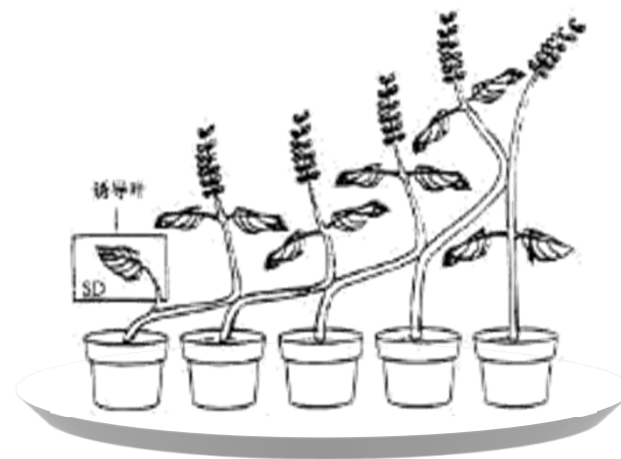
- 有些病毒在特殊条件下易传播，如黄瓜花叶病毒在温室蔬菜花卉中易接触传播。这类病毒存在于表皮细胞、浓度高稳定性强。
- 引起花叶症状病毒或由蚜虫线虫传播病毒易机械传播。
- 引起黄化型症状的病毒和存在于韧皮部的病毒难以或不能机械传播。

- ②无性繁殖材料传播

- 病毒在植物体内，除生长点外各部位均可带毒，因此，这种传播方式在以球茎、块根、接穗芽为无性繁殖材料的作物中特别重要，如马铃薯、大蒜、郁金香、苹果树等，如母株受侵染则无一幸免。这些无性繁殖材料都可带毒，故成为重要的检疫对象。

- ③嫁接传播

- 嫁接可以传播任何种类的病毒、植物菌原体和类病毒病害。砧木与接穗之间可以相互传染。



- ④种子传播

- 随着研究及检测技术提高，发现的种传病毒及其寄主植物种类增加，约1/5已知病毒可种传。
- 种子带毒可在早期形成侵染和远距离传播早期侵染提供初侵染来源，在田间形成发病中心，尤其是和蚜虫非持久性传毒方式结合极有可能造成严重为害。

- 如：莴苣花叶病毒种子带毒率虽不足0.1%，但加上蚜虫传播则可造成绝收。
- 带毒种子随调运还会远距离传播，可在种子中长期存活的病毒则更危险，是检疫的重要对象，如烟草环斑病毒可在豆科种子中存活 5 年以上，剪秋罗环斑病毒在种子中最长存活14年。



- 种子还可能成为病毒越冬的场所，如CMV可在多种杂草种子中越冬。
- 种传病毒的寄主以豆科、葫芦科、菊科植物为多，茄科植物很少。



- 病毒种传主要特点：
- 母株早期受侵染病毒才能侵染花器，病毒进入种胚才能产生带毒种子，而仅种皮或胚乳带毒常不能种传。
- 但TMV污染种皮可传毒为例外。TMV具有极强侵染力和体外存活能力，体外存活期可长达几年；种子表面所带TMV可在种子萌发时通过伤口侵染。
- 种胚内带毒并不一定种传，父母本均受侵染时种子带毒可能性大。

- 种子带毒比例差别很大，如BSMV可达100%，CMV可达50%。
- 种传病毒大多可以机械传播，症状常为花叶。如蚜传则为非持久性的。
- 随着种子逐渐成熟，其带毒率逐渐降低。刚采收的种子带毒率高，经过贮存逐渐降低。

- ⑤花粉传播

- 由花粉直接传播的病毒数量并不多，已知有十几种，多数是木本寄主。
- 为害樱桃 的桃环斑病毒、樱桃卷叶病毒。
- 为害悬钩子的悬钩子环斑病毒、黑悬钩子潜隐病毒、悬钩子丛矮病毒以及酸樱桃黄化病毒等。
- 这些花粉也可以由蜜蜂携带传播。

三、植物脱病毒的机理

- 植物病毒在植物体内的分布是不均匀的，在茎尖中呈梯度分布。在受浸染的植株中茎的顶端分生组织无毒或带毒机率极低。较老组织含毒量随着与茎的顶端分生组织距离的加大而增加。茎的顶端分生组织无毒或带毒机率极低的原因多种。

(一) 造成不均匀分布的原因

- ①植物病毒自身不具有主动转移能力，在植株间和组织内，病毒移动都是被动的。
- 在植物体内，病毒可通过维管束组织系统长距离大量转移，转移速度较快，而分生组织中不存在维管束。
- 病毒也可通过胞间连丝在细胞间移动，但速度很慢，难以追赶上活跃生长的茎的顶端分生组织。

- ②在旺盛分裂的细胞中，代谢活性很高，使病毒无法进行复制。
- ③在植物体内可能存在着病毒钝化系统，它在分生组织中比其他任何区域具有更高的活性。
- ④在茎尖中存在高水平内源生长素，可抑制病毒的增殖。茎尖培养主要用于消除病毒以及类病毒、类菌质体、细菌和真菌等病原物。

（二）几点说明

植物细胞和病毒繁殖之间存在竞争。旺盛分裂细胞中植物核蛋白合成占优势，细胞伸长生长期间病毒核蛋白合成占优势，加速细胞分裂能获得脱病毒植株。

病毒核酸随植物细胞DNA一起复制。

热处理不能杀死病毒，只能钝化病毒使增殖减缓或停止，失去侵染能力。

热处理可加速植物细胞分裂，使其在与病毒繁殖竞争中取胜。

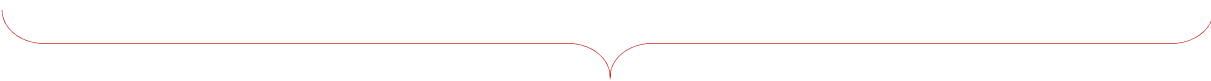
四、植物脱病毒的意义

(一) 脱毒的重要性

- 我国许多优良传统品种尤其无性繁殖作物因长期栽培导致病毒病日益严重，难以控制，成为生产上的严重问题。
- 病毒可经带毒无性繁殖材料传播，逐代积累导致种性退化。主要作物病毒病防治和种质安全保存是科研和生产上的重要问题。

- 对病毒病目前还缺乏有效的防治药剂。
- 使用农药可以防治真菌、细菌性病害，却不能防治病毒病。
- 不少化学物质可抑制病毒复制，如：

硫尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤和某些蛋白质、核酸制剂。



病毒与寄主代谢关系密切及其本身生物学特点，上述制剂在抑制病毒增殖的同时，也不同程度毒害寄主。

- 施用某些植物生长促进剂、增施肥料仅能暂时抑制病毒病症状减轻或隐蔽，不能解决根本问题，且增加生产成本。
- 高温处理可以使某些病毒失活，但对主要为害植物的病毒种类，如线状或杆状病毒无作用。
- 某些有性繁殖的作物可以通过种子繁殖排除大多数病毒，但无性繁殖作物如薯芋类等则不能用这种方法。

- 目前生产中缺乏对病毒高抗或免疫的抗原材料，野生马铃薯具有对马铃薯X病毒、马铃薯Y病毒和马铃薯卷叶病毒免疫或高抗的基因，可用于抗病毒基因工程育种，但投入生产应用的品种甚少。
- 应用组织培养技术获得脱毒植株，进而扩繁应用于生产，是目前有效的防治病毒病的方法。

(二) 脱毒的经济意义

①植物脱毒可使品种复壮，明显提高作物产量品质，生长势增强，产量提高幅度最高可达300%

- 脱毒大蒜

- 植株生长繁茂，株高茎粗明显增加，叶面积增加，叶色浓绿且叶绿素增加，蒜薹蒜头增产，优质大蒜头率显著增加，消除了病毒感染引起的褪绿斑点。

- 脱毒甘薯
- 营养生长旺盛，分枝多叶面积大，光合速率高，薯块膨大早且快，早结薯多，薯块整齐皮色鲜艳，大薯率高，商品价值高，增产幅度为160%。
- 脱毒马铃薯
- 株高增加190%，叶面积增加260%，茎粗增加180%，生长旺盛，结薯期提前，产量增加60%。

- 其它植物
- **大姜、芋头、草莓**脱毒后都表现明显的植株生长优势，个头增大，色泽鲜艳，产量显著提高。
- **苹果**脱毒苗生长快，结果早，结果大，产量高。
- **香蕉、柑橘、番木瓜**脱毒后，提高了产量品质，增加了繁殖系数。
- **康乃馨、菊花**等脱毒后，叶片浓绿、茎秆粗壮、挺拔，花色纯正鲜艳，硕大喜人。

- ②应用植物脱毒技术可促进农产品出口。
- ③植物脱毒苗木不仅去除了病毒，还去除多种真菌、细菌及线虫病害，使种性得以恢复。
- ④植株健壮，需肥量减少，抗逆性强。减少化肥农药用量，降低生产成本，减少环境污染，形成生态良性循环。
- ⑤脱毒苗木生产属技术与劳力密集型生产活动，增加社会就业。

第2节 植物脱毒的基本方法

一、物理方法

1. 热处理脱毒法(即热疗法)

- 高温可以钝化病毒，抑制病毒粒子的增殖，通过热处理受病毒侵染的植物个体、器官、组织或组织培养物，可获得脱毒植株。

2. 基本原理

- 适当高温可部分或完全钝化植物组织中的病毒，但很少或不伤害寄主细胞。

3. 热处理方法的选用

- ◆热水处理 对休眠芽效果较好。
- ◆热空气处理 即把旺盛生长植物移入热疗室中，35~40℃处理(几分钟到数周不等，对活跃生长茎尖效果较好)。

4. 热处理脱毒注意事项

- ①热处理后应立即把茎尖切下嫁接于无病砧木或进行组织培养。
- ②热处理的最初几天，空气温度应逐步升高，直到要求温度为止。
- ③连续高温处理会伤害寄主细胞，可采用高低温交替处理，保持适当湿度和光照，但仍只有部分植株能存活。

- ④接受热处理的植株需含丰富碳水化合物，可在事前对植株进行修剪，增加植株的热耐受力。
- ⑤高温或延长处理时间可能钝化寄主植物组织中的抗性因子，降低处理效果。
- ⑥并非所有病毒都对热处理敏感，对于不能由单独热处理消除的病毒，可通过热处理与茎尖培养相结合，或单独茎尖培养来消除。

- ⑦热处理温度和持续时间很重要
- ◆菊花热处理时间由 10d增加到 30d，脱毒率由 9%增加到 90%，处理40d或更长时间则不能再增加脱毒率，却会显著减少能形成植株的茎尖数。



- ◆为消除马铃薯芽眼中的马铃薯卷叶病毒，须采用40℃、4h和20℃、20h两种温度交替处理，连续40℃高温会杀死芽眼。
- ◆为钝化黄花烟草中的CMV而又不伤害寄主，最好是40℃、16h和22℃、8h或者是40℃、48h和35℃、48h交替处理。



二、化学方法

- 在组织培养消除病毒的过程中培养条件也能起某些作用。如200 μm 长烟草茎尖带有 CMV，但此外植体却常再生脱毒植株，可能是由于培养基中生长调节物质的作用。
- 在黄花烟草茎尖培养中，生长调节物质能减少组织中病毒的浓度，但不能全部消除。

- 化疗不能消除整株中的病毒，但对离体组织和原生质体可产生良好效果。
- 在培养基中加入100 $\mu\text{g/L}$ 2-硫尿嘧啶，可消除烟草愈伤组织中的PVY，但由这些愈伤组织不能再生出烟草植株。
- 用齿舌兰环斑病毒抗血清预处理兰花的离体分生组织，可增加脱毒植株的频率。

- 一种抗病毒制剂--Virazole对多种动物DNA和RNA病毒有效，可消除烟草原生质体再生植株的PVX。
- 放线菌酮和放线菌素-D也能抑制原生质体中病毒复制。

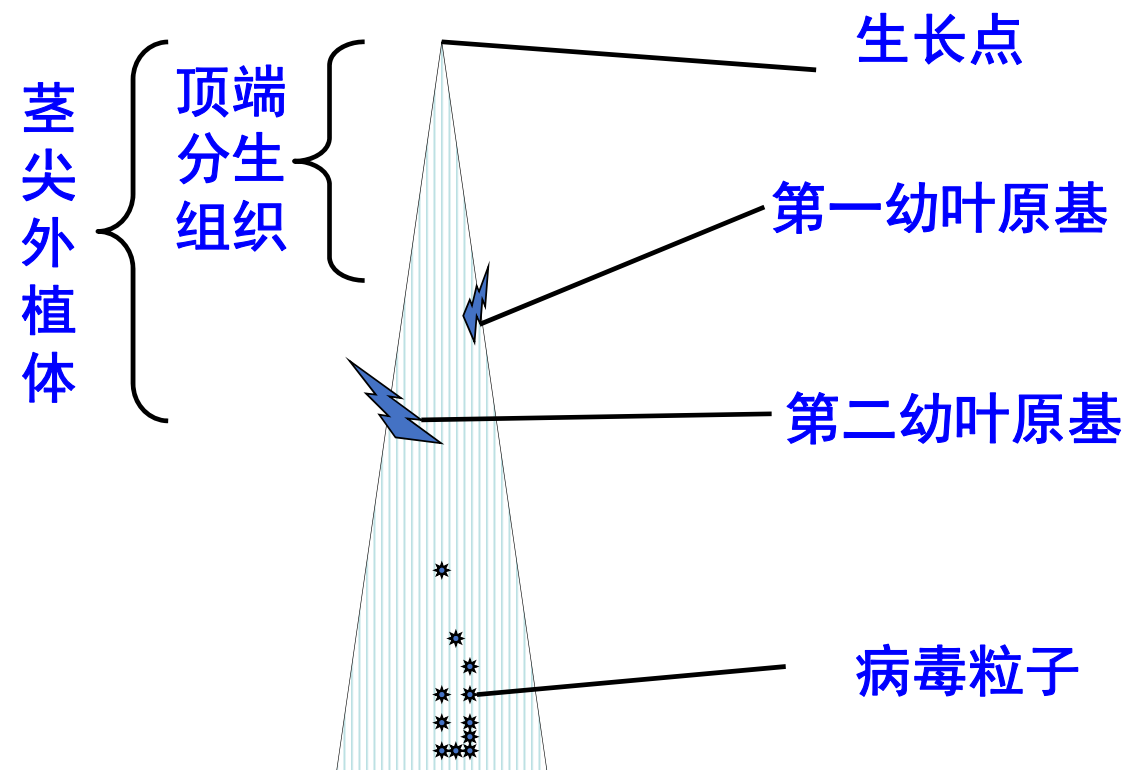


三、生物学的方法

(一) 茎尖组织培养脱毒法

1. 外植体

- 培养茎尖外植体或茎的顶端分生组织可获得脱毒植株用于生产。
- 茎顶端分生组织 指茎的最幼龄叶原基上方的部分，最大直径约100 μm ，最大长度约250 μm 。
- 顶端分生组织培养脱毒率高，但多数脱毒植株是培养茎尖得到的。



植物病毒在植物茎尖中的梯度分布

- **茎尖外植体**

- 在植物茎尖组培脱毒中，从植物体上取下来用于接种培养的茎的顶端分生组织及其下方的1~2个幼叶原基。
- 为降低材料自然带毒，把供体种在温室无菌盆土中，采取保护栽培管理措施，如将水直接浇在土壤上而不浇在叶片上，定期喷施内吸性杀菌剂等。
- 田间材料可取其插条在营养液中培养，其腋芽长成的枝条比田间直接取材污染少。

- 茎尖外植体应是无菌的，在切取外植体前需对茎芽表面消毒：叶片包被紧实的芽(如菊花、兰花等)用75% 酒精浸蘸一下即可。叶片包被松散的芽(如蒜、香石竹、马铃薯等)要用 0.1%次氯酸钠表面消毒10min。
- 应灵活运用各种消毒方法，如大蒜茎尖培养，先把小鳞茎在 95% 酒精中浸蘸一下，再烧掉酒精，解剖出无菌芽。

2. 操作方法

- 在超净工作台上借助实体解剖镜切取适当大小的茎尖外植体，要防止由于超净工作台的气流和解剖镜上钨灯的散热使茎尖变干，可使用冷光源，茎尖暴露的时间应尽量短，或在衬有湿滤纸的无菌培养皿内进行解剖，防止外植体变干。

- 在切取茎尖时，把茎芽置于解剖镜下，用镊子、解剖针等将叶片和叶原基剥掉，当半圆球形顶端分生组织暴露后，将其切下接种于培养基上，可带或不带叶原基。
- 切下的茎尖外植体不能与芽的较老部分或解剖镜台或持芽的镊子接触，尤其是当芽未曾进行过表面消毒时更需如此。
- 长出的新茎进行生根诱导，不能生根的可嫁接到健康砧木上，获得脱毒植株。

3. 影响茎尖培养脱毒效果的因素

培养基

外植体

热处理

培养条件

- 1) 培养基
- 合适的培养基有利于由茎尖培养获得完整植株。
- ①较大的茎尖外植体 (大于500 μm) 在不含生长调节物质的培养基中也能产生完整植株，但加入少量 (0.1~0.5mg / L) 生长素或细胞分裂素或二者兼有常常是有利的。

- ②被子植物的茎尖分生区不是生长素的来源，生长素可能是由第二对幼叶原基形成，因此在分生组织培养中所需生长素不能自给，要成功地培养不带任何叶原基的胡萝卜、烟草等植物分生组织外植体，外源激素必不可少。
- ③只需生长素的植物可能其分生组织中内源细胞分裂素的水平较高。

- ④选用生长素应避免使用2, 4-D，它常能诱导外植体形成愈伤组织。
0.1mg/LGA₃能抑制大丽花愈伤组织形成，有助于生长分化。但有报道认为 GA₃没显著促生长和分化的作用，高浓度时有抑制效应。
- ⑤茎尖培养一般使用固体培养基，但在固体培养基能诱导外植体愈伤化的情况下可进行滤纸桥液体培养，滤纸桥两臂浸入培养基中，桥面悬于培养基上，外植体放在桥面上。

- 2) 外植体
- ①茎尖外植体的大小与存活率
- 在最适培养条件下，外植体的大小决定茎尖外植体接种的存活率。
如木薯茎尖长 200 μm 时，能形成完整植株，小的茎尖则形成愈伤组织或只能生根。小的外植体也不利于茎的生根。

- ②茎尖外植体的大小与脱毒率
- 茎尖外植体的大小与脱毒率呈负相关。
- 1964年，Hollings等切取香石竹不同大小的芽，将其汁液稀释至500倍，接种到荆芥(敏感植物)上，调查茎尖大小与脱毒株数间的关系。

- ③茎尖外植体大小的确定
- ●同一种病毒在不同植物体内分布部位不同。
- 1970年，通过荧光反应观察到：
 - 烟草第1～4幼叶原基中未见TMV特异荧光。
 - 撞羽矮牵牛第1～2幼叶原基中未见TMV特异荧光，而在第3～4幼叶原基中可见TMV荧光。
 - 番茄第1幼叶原基中未见TMV特异荧光。

- 茎尖培养脱毒时，必须确定病毒在植物茎尖中的分布部位，然后确定培养茎尖的大小。
- 番茄只能取生长锥或仅带1个幼叶原基的茎尖外植体进行培养。
- 撞羽矮丰牛可取生长锥或带1~2个幼叶原基的茎尖外植体进行培养。
- 烟草可取带4个幼叶原基的茎尖外植体进行培养。

- ●不同种类的病毒在同一种植物中的分布部位不同。
- →甘薯斑纹花叶病毒、缩叶花叶病毒分布于1.0~2.0mm以内的茎尖中。
- →甘薯羽毛状花叶病毒分布于0.3~1.0mm以内茎尖中。
- →马铃薯卷叶病毒和Y病毒分布于1.0~3.0mm以内的茎尖中。
- →马铃薯X病毒分布于0.1~0.5mm以内的茎尖中。
- →马铃薯S病毒分布于0.2mm以下的茎尖中。

- ●培养不同大小的茎尖外植体，所能脱除的病毒种类不同。
- →不同的植物茎尖大小是不相同。
- →同一种植物，栽培条件不同，茎尖大小不同。
- →脱除同一种病毒不同植物所需茎尖外植体大小不同。

- ●同一植物要脱去不同病毒所需茎尖外植体大小不同。
- ●茎尖外植体的大小应小到足以脱除目标病毒，大到足以发育成一个完整的植株。
- ●茎尖外植体越小，其内含营养、水分越难长时间维持，成功率越低，对培养基和剥离技术的要求也越高。
- ●茎尖外植体越大，接种越易成活，但脱毒率会降低。

- ④叶原基的作用

- 叶原基影响培养茎尖形成植株的能力。培养大黄离体顶端分生组织时，须带2~3个叶原基。
- 叶原基可能向分生组织提供生长分化所必需的生长素和细胞分裂素。在含必要生长调节物质的培养基中，离体顶端分生组织能迅速形成双极性轴。
- 重复切取茎尖培养也是一种获得脱病毒苗的手段，重复切取茎尖次数越多脱毒效果越好，但所需时间较长。

- ⑤叶原基数目与茎尖大小相关性
- 茎尖培养脱除病毒时，要找出茎原基所带叶原基的数目与茎尖大小的相关性，以方便取材，如：
 - 苹果茎原基为0.05~0.08mm。
 - 茎原基带2个幼叶原基为0.1~0.2mm。
 - 茎原基带4个幼叶原基为0.3~0.4mm。
 - 茎原基带6个幼叶原基为0.6~0.8mm。

- 3) 培养条件

- ① 茎尖光培养效果比暗培养好
- 6000 lx光照培养59%多花黑麦草茎尖能再生植株，暗培养只有34%。
- ② 某些植物茎尖培养不同阶段对光需求不同, 有的需要一定时期暗培养
- 马铃薯茎尖培养初期最适光强是1000 lx，4周后是2000 lx，茎长1cm时是4000 lx。
- 天竺葵茎尖培养需要一个完全黑暗的时期(可能有助于减少酚类物质的抑制作用)。
- ③ 茎尖培养的温度一般为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

- **4) 外植体的生理状态**

- 茎尖最好取自生长活跃的芽上。
- 培养菊花的顶芽茎尖比培养腋芽尖效果好，但每个枝条上只有一个顶芽，为增加脱毒植株总数，即使腋芽比顶芽表现较差，也可采用腋芽。取芽的时间很重要，表现周期性生长习性的树木更是如此。

- 温带树植株生长只限于短暂春季，此后很长时间茎尖处休眠状态，直到低温或光打破休眠为止。
- 在这种情况下，茎尖培养应在春季进行。
- 若要在休眠期进行，则须采取适当处理。如李属植物取芽之前需把茎保存在4℃下近6个月。

- 茎尖培养效率取决于外植体存活率、茎的发育程度、茎的生根能力及脱毒程度。
- 冬季培养的麝香石竹茎尖产生的茎最易生根而夏季得到无毒植株的频率最高。
- 多数马铃薯品种在春季和初夏采集的茎尖比在较晚季节采集的易生根。

(二) 愈伤组织培养脱毒法

带毒外植体也可能存在着不带毒细胞，即便是细胞都带毒的外植体，经脱分化诱导产生的愈伤组织，也并非所有愈伤组织的细胞都带毒。

- 用机械法由感染TMV的烟草愈伤组织分离出的单个细胞，只有40%带毒，可再生出很多不含TMV的植株。

- 受病毒侵染的愈伤组织中的某些细胞不带病毒，可能是病毒的复制速度落后于细胞的增殖速度，或有些细胞通过突变获得了抗病毒特性，或抗病毒侵染的细胞可能与敏感型细胞一起存在于母体组织中。
- 感染TMV烟草叶片暗绿色组织不含毒或含毒很低，取其外植体培养，50%再生植株无毒。
- 马铃薯茎尖愈伤组织再生植株46%不含马铃薯X病毒，比由茎尖直接产生的植株高。

(三) 微体嫁接脱毒法

1. 微体嫁接脱毒及意义

- 微体嫁接是1970年发展起来的一种培养无病毒苗木的方法。

把极小 ($<0.2\text{mm}$) 的茎尖接穗嫁接到实生苗砧木上 (种子实生苗不带毒), 然后连同砧木一起在培养基上培养。

- 接穗在砧木的哺育下很容易成活, 可培养很小的茎尖, 易于消除病毒。

- 微体嫁接法已在柑橘、苹果上获得成功。
- 培养小于0.2mm的茎尖才能脱除苹果茎陷病毒，但小于0.2mm的茎尖对培养基要求高，培养难度大。SGV用热处理也难以脱除。
- 1980年，用微体嫁接法获得了无SGV的脱毒植株。
- 做法如下：

- ①砧木种子低温层积处理后灭菌，把种胚接种在MS固体培养基，25℃暗培养15d，发芽。
- ②将发芽的上胚轴切下(带2片子叶)，插入带滤纸桥(滤纸桥中间有孔，使上胚轴通过小孔而固定)的试管中，试管中放MS液体培养基，适于茎尖(接穗)生长。
- ③接穗为Griffith品种0.2mm大小的茎尖分生组织，采用劈接法将接穗插入两片子叶中间的组织中，接穗在砧木的哺育下生长发育。
苹果微体嫁接成活率和茎尖大小的关系基本上呈现出正相关。

2. 微体嫁接脱毒的关键

- ①要求剥离技术高，嫁接成活率与接穗大小呈正相关，脱毒率与接穗大小呈负相关。
- 一般取小于0.2mm茎尖嫁接可脱除多数病毒，脱除病毒的效果和茎尖剥离技术密切相关。
- ②培养基筛选不困难，但必须考虑到砧木和接穗对营养组成的不同要求才能收到良好效果。
- ③接穗的取材季节密切相关，不同的取材季节嫁接成活率不同，如苹果4~6月取材嫁接成活率较高，10月到次年3月前取材成活率低。

(四) 珠心组织培养脱毒法

1976年，培养柑橘、葡萄的珠心组织获得无病毒植株。

- 植物病毒主要是通过维管组织（或系统）移动的，珠心组织与维管组织没有直接联系，一般不带或很少带毒，培养珠心组织可获得脱毒植株。

四、综合脱毒方法

(一) 茎尖培养结合热处理脱毒法

TMV、PVX和CMV等病毒能侵染茎尖分生区域，如由300~600um长的菊花茎尖愈伤组织再生植株都带毒。

- 在这种情况下，需将茎尖培养与热疗法相结合。热处理可在脱毒前的母株上或在茎尖培养期间进行。
- 热处理(36℃，6周)与茎尖培养相结合，比单独茎尖培养更易于消除草莓温性黄边病菌，热处理可提高多数草莓品种植株的生长速率。

- PVS和PVX是两种常见的马铃薯病毒，单独热疗或单独茎尖培养都不易消除，PVS比PVX更难消除。然而，培养热处理植株上的茎尖就很容易消除这两种病毒。
- 35℃热处理大蒜鳞茎4周，剥离带2~3个叶原基的茎尖培养，脱毒率比未经热处理的提高25%，与不经热处理只带1个叶原基的茎尖相当，且成苗率提高35%。
- 32~35℃处理马铃薯块茎3~13周，可提高脱率33% (PVX) ~83% (PVS)。
- 热处理时要注意材料保湿和通风，以免过于干燥和腐烂。

- 当茎尖外植体是取自未受或只受过短时间热处理的植株时，外植体的大小对实验的成败很关键，但经充分热疗的植株情况就不一样。
- 经8周和18周热处理马铃薯品种白玫瑰， 不带PVX的外植体频率分别为50%和100%。但在最好的条件下，不带PVS的植株也只有15%。
- 某些难以消除的病毒，可经多个周期的热处理，再进行茎尖培养可脱除仅靠茎尖培养脱除不掉的病毒。
- 如马铃薯块茎35℃热处理4~8周，再进行茎尖培养，可除去一般培养难以脱除的马铃薯纺锤形块茎类病毒。

(二) 茎尖培养结合病毒钝化剂处理脱毒法

培养基中加入碱性孔雀绿、2, 4-D及硫尿嘧啶等病毒抑制剂能显著提高茎尖培养苗的脱毒率。

- 由于不同植物对病毒抑制剂的反应不同，该方法不常应用于生产。

第3节 脱毒植株的检测和保存

- 经过脱毒处理产生的脱毒植株，用作脱毒原原种使用前，**须针对特定的病毒**进行检测，以确保脱毒苗的质量。
- 培养物中很多病毒具有**延迟复苏**特性，常在最初的一两次病毒检测中呈阴性，因此前18个月需对植株进行多次检验。

- **脱毒植株可重新感染**，繁殖过程必须进行重复检验，最简单的是检验该种病毒特有的可见症状。
- 有时感病植物需相当长的时间才能表现可见症状，在这种情况下可采用**指示植物法、血清法、核酸分析法、电镜法**进行病毒检测。
- 生产上广泛使用**酶联免疫吸附法** (ELISA)。

一、脱病毒植株的检测

（一）直接测定法

脱毒苗叶色浓绿均匀一致长势好。

带毒株长势弱，叶片褪绿、扭曲、植株矮化、花叶或明脉、卷叶、矮缩等。表现出病毒病症状植株可初定为病株。

症状诊断要区分病毒病症状与生理障碍、机械损伤、虫害及药害等。如难分辨需结合其他鉴定方法。

(二) 指示植物法

指示植物

接种病毒后能快速表现特征症状的寄主植物。

- 主要有苋色藜、昆诺阿藜、灰藜、巴西牵牛、千日红等。
- 有些植物如甘薯，需通过嫁接接种巴西牵牛上。
- 有些病毒如马铃薯卷叶病毒，需用蚜虫接种。
- 如果植株带毒，指示寄主即出现带毒症状。

- GCLV在昆诺阿藜上表现局部褪绿或中部坏死的绿色环斑、在大灰藜上表现局部坏死斑、在苋色藜上表现绿色环斑。
- 甘薯羽状斑驳病毒 (SPFMV) 和甘薯潜病毒 (SwPLV) 在巴西牵牛上表现皱缩花叶或明脉、在苋色藜上或昆诺阿藜上表现枯斑。
- PVX在千日红上表现出红色环斑等。

- **实验操作：**
- ①取受检植株叶片，置等容积 (W/V) 缓冲液的研钵中研碎。
- ②在指示植物叶片上撒少许金钢砂，将受检叶汁轻涂其上，适当用力摩擦，使叶片表面细胞受侵染但又不致损伤，约5min后水洗去掉残余汁液。
- ③将接种过的指示植物置于温室内，株间及与其他植物间都要隔开一定距离。
- 显症时间一般6~8d或更长，取决于病毒性质、接种量、指示植物、环境条件等因素。

指示植物法操作流程



(三) 血清鉴定方法

血清学反应

抗原和抗体在实验条件下产生的特异性反应 (特异性强, 灵敏度高, 操作简便)。

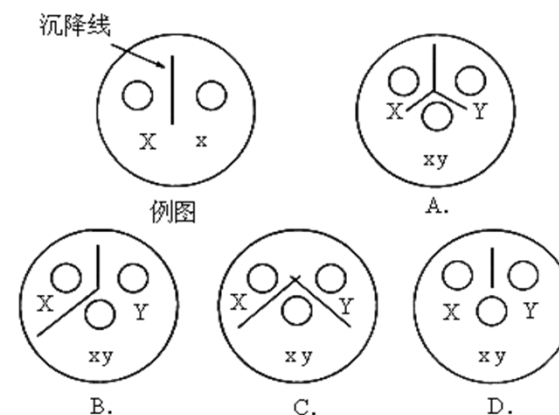
- **抗原和抗体体外结合产生特异性沉淀** (试管沉淀、微量沉淀、凝胶扩散), **应用荧光素、酶标记** (荧光抗体、酶联免疫吸附) **或免疫电镜** (在电镜下直接观察抗原和抗体结合) **等方法提高反应灵敏度。**

- 血清学检测法关键在于有高效价抗血清、高效率试验体系和高精度仪器。
- 抗血清制备专业要求高，但有商品 (或试剂盒)，使血清学检测易于操作。
- 利用植物病毒衣壳蛋白的抗原特性，用纯化植物病毒注射小动物制备特异性抗血清。
- 抗血清制备关键是病毒纯化，高纯度病毒才能获得特异性强的抗血清。

- 植物病毒与其抗血清反应有多种，原理都是抗原与抗体特异性结合。
- 常见的有琼脂双扩散法、酶联免疫吸附法、斑点酶联免疫吸附检测法、双抗体夹心酶联免疫吸附法、双向电泳检测法。
- 最常用的是琼脂双扩散法和酶联免疫吸附法。

1. 琼脂双扩散法

- 在一定浓度琼脂凝胶中，抗体和抗原互相扩散，在适当位置形成沉淀。沉淀线形状说明抗原和抗体相互关系。
- ①说明两种抗原相同。都与已知的抗血清反应；
- ②说明两种抗原有一定亲缘关系，但不完全相同
- ③说明抗血清不专比，含有两种以上的抗体。
- 免疫双扩散试验操作如下：



- (1) 试验准备

- 选择健康家兔2~3只，年龄6个月以上，体重2~3kg。
- 准备好注射器、研钵、电泳仪等。
- 采购并配置所需要的相关药品。
- 制备病毒等抗原。
- 需配制下列试剂：
- ①福氏不完全佐剂：羊毛脂：液体石蜡=1:4或1:2 (W/W)；

- ②福氏完全佐剂

- 在不完全佐剂中，加入一定量死卡介苗(将活卡介苗置56℃30min灭活)即为福氏完全佐剂。
- 一般分别取卡介苗、羊毛脂和液体石蜡 30mg、1g和4g。死卡介苗用量一般为每只兔30mg或每毫升注射剂4mg。
- 配制时，先将羊毛脂和液体石蜡混合灭菌。使用时先将佐剂置研钵内，再将死卡介苗、抗原溶液逐滴加入佐剂，顺一个方向研磨成乳剂。用前在无菌条件下配制。

- ③1%~1.5%离子琼脂糖 称取1~1.5g琼脂糖，用离子强度为0.03、pH8.3巴比妥缓冲液配制。先加入适量溶液加热溶化后补水至100mL，再使其充分溶化。
- ④离子强度0.06、pH8.6巴比妥缓冲液 称取10.3R巴比妥钠、1.84g巴比妥酸溶于水，稀释至1 000mL。配制离子琼脂时可将其稀释1倍，使离子强度为0.03。
- ⑤0.05%氨基黑10B染色液 称取0.5g氨基黑10B，溶于500mL 1M乙酸及500mL 0.1M乙酸钠溶液中。
- ⑥0.9%生理盐溶液。
- ⑦5%乙酸脱色液。
- ⑧10%甘油。

- (2) 抗血清的制备
- ①对选择的家兔编号、标记
- ②血清(抗原)乳剂制备
- 将抗原加等体积完全佐剂，按照配制佐剂的研磨法，在无菌条件下制成乳白色黏稠的油包水乳剂
- 制成的乳剂是否为油包水乳剂直接影响到免疫的效果，因此必须进行鉴定。
- 将制得的佐剂抗原乳剂滴一滴于冷水表面应保持完整而不分散，否则需重新制备。

- ③免疫

- 剪去兔子四足掌处兔毛，经碘酒消毒，酒精脱碘后，皮内注射0.5mL抗原—福氏完全佐剂乳剂。
- 以后每隔7~10d于两肩后侧及两髁附近皮下多点注射抗原—不完全佐剂乳剂总量2mL，共2~3次，初步测效价。
- 初步测出效价后，再进行一次加强免疫，即从耳缘静脉注射抗原0.1~0.2mL，1周后放血。

- ④抗血清的收集

- 待收集于三角瓶或离心管内的血液凝固。
- 用干净平头玻棒沿瓶壁或管壁剥离血块，置室温2~3h后，在4℃下过夜。
- 随着血液凝块的收缩，血清即析出，再用离心方法使血清完全析出。
- 用滴管吸出血清，加少量0.002mg/L叠氮钠防腐，分装小瓶，封存于低温冰箱备用。

- **(3) 制备离子琼脂板**

- 量取4ml融化的纯净离子琼脂，趁热倒在玻璃板上 (7.5cm×2.5cm)，待冷却凝固后按一定比例打孔。
- 孔的直径为4mm，周围孔与中央孔之间的距离为 5mm左右。
- 打完孔后，用注射器针头将琼脂挑出，在酒精灯上烘烤背面，使琼脂与玻璃板贴紧。

- **(4) 稀释抗原或抗体**

- 采用二倍稀释法，将抗原或抗体按2的等比级数 (即 $2^0, 2^1, 2^2, 2^3 \dots$ 方式) 连续稀释。
- 具体方法：取数支试管，分别加入1份生理盐水，再于第一管中加抗原或抗体1份，用吹吸法混匀两种溶液后取出1份，加入第二管中，依次进行至最后一管，各管稀释倍数依次为1:2、1:4、1:8、1:16、1: 32、1:64……稀释度视抗体的效价而定。

- (5) 加样

- 将稀释抗原或抗体依次加入外周孔内，分别为原浓度1:2、1:4、1:8、1:16、1:32（记录顺序），向中心孔加入相应的抗原或抗体，抗原、抗体加入量以与琼脂表面持平为宜。
- 加样后置大培养皿内，在37℃或室温下扩散24~48h。为避免琼脂干燥，可在培养皿内加入少量水或湿滤纸，保持一定湿度。

- **(6) 结果观察**

- 观察沉淀线，并以出现沉淀线且抗原或抗体稀释倍数最高的一孔的稀释度为被测抗体的效价。
- 经染色后可提高沉淀线的可见度，便于确定其效价。

- (7) 染色及保存

- ①漂洗琼脂板 琼脂板置0.9%生理盐水浸泡2d，除去残留抗原抗体等。其间更换生理盐水3~4次。
用蒸馏水浸泡1d，换水2次。
- ②干燥 取出琼脂板、覆盖滤纸，自然干燥(亦可吹干或37℃烘干)。
- ③染色 将琼脂板浸入染色液约30min。
- ④脱色 将琼脂板在5%乙酸中漂洗，去掉多余染料，至胶板背景无色为止。
- ⑤保存 将胶板浸泡于10%甘油中3~4h，其间不断摇动凝胶很易与玻璃板分开。浸入一块比凝胶板略大的玻璃纸，小心将凝胶平托起来。置于另一块与玻璃纸大小相似的玻璃板上，再用另一块经水浸湿的玻璃纸覆盖在凝胶上面，使琼脂胶板夹在两张玻璃纸之间，室温下晾干，即可长期保存。

2. 酶联免疫吸附法 (ELISA)

- 该法利用酶的放大作用，免疫检测灵敏度大大提高。其优点：
- ①灵敏度高，检测浓度可达 $1\sim 10\text{ng/mL}$ ；
- ②快速，结果可在几个小时内得到；
- ③专化性强，重复性好；

- ④检测对象广，可用于粗汁液或提纯液，对完整的和降解的病毒颗粒都可检测，一般不受抗原形态的影响；
- ⑤适用于处理大批样品，所用基本仪器简单，试剂价格较低，且可较长期保存：
- ⑥ELISA具有自动化及试剂盒的发展潜力，是最好的检测手段之一。
- ELISA试验操作过程包括以下步骤：

- (1) 试验准备

- 酶联免疫测定仪、聚苯乙烯微量反应板(40孔)、吸液器、恒温箱等仪器准备。制备抗原、抗体、酶标记第二抗体，配制下列试剂：

- ①包被缓冲液(0.05M, pH9.6碳酸盐缓冲液) Na_2CO_3 (无水) 1.50g、 NaHCO_3 2.98g用无离子水溶解后，定容至1000mL。
- ②洗涤液(pH7.4磷酸盐缓冲液-吐温20) NaH_2PO_4 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 NaCl 8.0g、 KCl 0.2g、吐温20 0.5mL。用无离子水溶解后定容至1000mL。
- ③稀释液 取动物血清10mL(非测定动物的血清)，加入洗涤液90mL，配成10%浓度血清，或用洗涤液配制1%的牛血清蛋白溶液代替。

- ④pH5.0的磷酸盐-柠檬酸缓冲液 甲液：柠檬酸19.28，溶解于无离子水，最后定容为1000mL。乙液： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.39g用无离子水溶解后，定容为1000mL。取甲液28.0mL，加入乙液22.0mL，用无离子水定容至100mL。
- ⑤底物试剂 邻苯二胺10mg溶解于pH5.0的磷酸盐-柠檬酸溶液25mL中，再加入30% H_2O_2 0.4mL（每次使用前临时配制）。
- ⑥终止液(2M H_2SO_4) 取浓 H_2SO_4 (95%) 22.2mL慢慢加于水中，冷却后定容至200mL。

- (2) 操作步骤

- ①包被 取洗净干燥的聚苯乙烯板，用包被液将所用抗原稀释至所需浓度 (X mg/mL，预先测定后确定)，于聚苯乙烯板每孔内加入200 μ L，盖好，置4 $^{\circ}$ C过夜。
- ②洗涤 次日除去孔内抗原溶液，用洗涤液冲洗孔3~4次，每次3min，然后去净洗涤液。
- ③加入待测抗体(第一抗体) 将待测抗体用稀释液做不同倍数稀释，然后每孔内分别依次加入抗体稀释液200 μ L，置37 $^{\circ}$ C温箱保温2~3h或6 $^{\circ}$ C过夜。

- ④洗涤 反应完毕用洗涤液冲洗孔3次，每次3min，去净洗涤液。
- ⑤加入酶标第二抗体 用稀释液将酶标第二抗体稀释至所需浓度，每孔中加入200 μ L，置37 $^{\circ}$ C温箱保温15min。反应完毕，如前所述洗涤平板。
- ⑥加入底物试剂 在冲洗好的平板每孔中加入底物试剂200 μ L，将平板置于37 $^{\circ}$ C温箱保温15min。
- ⑦终止反应 每孔加入50 μ L终止液，终止反应。
- ⑧测定 用酶标比色计(波长510nm)读取各孔溶液的光密度。

（四）核酸分析法

血清学技术利用的是病毒衣壳蛋白的抗原性，检测的目标是蛋白。

由于核酸才是有侵染性的，仅检测到蛋白并不能肯定病毒有无生物活性(如豆类、玉米种子中的病毒大多失去侵染活性，但保持血清学阳性反应)。

- 核酸检测是鉴定植物病毒更可靠方法，核酸杂交和PCR方法比较常用。

1. 核酸杂交

- 核酸杂交主要在DNA和RNA之间进行，RNA与互补的DNA之间存在着碱基互补关系，在一定条件下RNA-DNA形成异质双链。
- 用分离纯化或合成的已知核酸序列片段制作探针，因多数植物病毒核酸是RNA，其探针为互补DNA，也称cDNA探针。
- 核酸检测不仅可检测到目标病毒核酸，还可检测出相近病毒(或核酸)间的同源程度。

- **2. PCR技术**

- PCR是在短时间内大量扩增核酸的有效方法，用于扩增位于两段已知序列之间的DNA区段。
- 从已知序列合成两段寡聚核苷酸作为反应的引物，它们分别与模板DNA两条链上的各一段序列互补且位于待扩增DNA区段的两侧。反应时，首先在过量的两种引物及4种dNTP参与下对模板DNA进行加热变性：随之将反应混合液冷却至某一温度，使引物与其靶序列发生退火。此后退火引物在耐热的DNA聚合酶作用下得以延伸。

- 如此反复进行变性、退火和DNA合成这一循环。每完成一循环，理论上就使目的DNA产物增加1倍，在正常反应条件下，经25~30个循环扩增倍数可达百万。
- PCR在检测标本中病原的核酸序列、由少量RNA生成cDNA文库、生成大量DNA以进行序列测定、突变的分析等方面已经得到广泛的应用。

（五） 电子显微镜鉴定法

1. 超薄切片技术

- 植物病毒基因组的翻译产物较少，这些产物包括病毒编码的复制酶、病毒的衣壳蛋白、运动蛋白、传播辅助蛋白、蛋白酶等。
- 有些产物会与病毒的核酸、寄主的蛋白等物质聚集起来，形成一定的大小和形状，称为内含体。
- 内含体可以分为核内含体和细胞质内含体两类。

- 核内含体可在核质、核仁或者核膜之间。
- 核质内含体一般是由蛋白或病毒粒体构成的晶体结构，少有纤维状的内含体。
- 核仁的内含体多为不定形或晶体状。
- 在核膜间病毒或病毒诱导的物质积累导致核围内含体的产生，这种内含体通常是短暂出现的。

- 细胞质内含体在形状、大小、组成和结构差异很大，大的光镜可见，小的只能在电镜下观察。
- 主要分为不定形内含体、定形内含体、假晶体、晶体内含体和风轮状内含体等。
- 不同属植物病毒产生类型形状不同内含体。

2. 负染色技术

- 负染是指通过重金属盐在样品四周堆积而加强样品外围电子密度，使样品显示负的反差，衬托出样品的形态和大小。
- 与超薄切片(正染色)技术比，负染快速简易，分辨率高，用于生物大分子、细菌、原生动物、亚细胞碎片、细胞器、蛋白晶体的观察及免疫学和细胞化学的研究，是病毒快速鉴定及结构研究必不可少的技术。

3. 免疫电镜技术

- 将免疫学中抗原抗体反应的特异性与电镜高分辨能力和放大本领结合在一起，可区别形态相似的不同病毒。在超微结构和分子水平上研究病毒等病原物的形态、结构和性质。配合免疫胶体金标记还可进行细胞内抗原的定位研究，从而将细胞亚显微结构与其机能代谢、形态等各方面研究紧密结合起来。

二、脱病毒植株的保存与应用

（一）脱病毒植株的保存

脱毒操作并未赋予脱毒植株以新的生物学形状和遗传学特性。脱毒植株并不具备额外的抗病性，可被重新感染，一般应种在温室或防虫罩内的灭菌土壤中。在生产上原原种和原种生产须在专用防虫纱网温室中，严禁脱毒植株再次感染。



- 建造防虫纱网棚室或温室的目的是防止蚜虫等介体昆虫的浸入而导致病毒的传播，这是繁殖以脱毒为目的的无毒苗木所必需的设备，防虫网棚室或温室以35~400目尼龙网作为覆盖物或窗纱，耐用质轻。因此，防虫网棚的骨架比常规塑料薄膜大棚温室承重小，建造成本低。



- 可在田间隔离区内大规模繁育生产用种，以减少或消除重新感染的机会，经检验的脱毒植株可通过离体培养扩繁和保存。
- 由茎尖培养得到的植株一般很少或没有遗传变异，但仍要检查其种性和遗传稳定性。
- 脱毒苗遗传稳定性主要有3种鉴定方法：
 - ▶ 农艺性状观察
 - ▶ 染色体镜检
 - ▶ 随机扩增多态性 (RAPD) 分析

(二) 脱病毒植株繁殖应用

1. 脱病毒植株的快速繁殖

- ①脱病毒植株的继代培养快繁
- 主要有愈伤组织、不定芽和丛生芽三条途径。
- 愈伤组织繁殖最快，但后代遗传性不稳定。
- 通过促生液芽不存在变异危险，但许多植物在开始培养时产生腋芽的数量不多，速度较慢，但后期产生腋芽数目快速增加，这种方法采用较多。

- 通过不定芽繁殖速度较快，但有形成嵌合体的现象，性状不稳定、表现不一致。
- 根据选取的快繁途径，设计筛选出适宜的培养基，建立优化的快繁体系。
- 将无菌苗按要求方式，或分割，或切段后接种在继代培养基上，置23~28℃、光照10~16h/d、光强1500~3000lx培养室内培养增殖。

- ②生根及微型鳞茎(或小薯、原球茎)培养
- 将生长至1cm以上的无菌苗按茎节切段，接种到筛选好的生根或微型鳞茎(微型小薯、原球茎)培养基上，大蒜快繁簇生芽整丛移栽效果更好。
- 把芽蘸上生根剂(常是 NAA、IBA等与滑石粉混合)直接插入经灭菌处理的栽培基质中，减少无菌操作步骤，降低成本，效果好。

2. 脱毒植株的应用

- 脱毒植株可用于研究特定病毒对寄主的影响。

把某一特定病毒接种于脱毒植株并比较同一个无性系的感病植株和脱毒植株的表现，可精确统计其产量损失。

如通过茎尖培养可由一个水仙的品种中获得无阿拉伯花叶病毒和水仙退化病毒的无性系其鳞茎比普通原种长得快，生活力强，每个茎的花多，花大且颜色丰富。

- 脱毒植株可恢复种性，用于种质保存和良种生产
- 脱毒马铃薯制种是典型脱毒苗应用实例。
- 马铃薯脱毒主要针对PVX、PVY、PVS、PLRV和PSTVd对产量品质影响大的病毒。
- 病毒检测方法：双抗体夹心酶联免疫吸附法、指示植物法、往返电泳或反转录—聚合链反应（RT-PCR）法。
- 检测抽样数量及方法、病毒植株允许率应符合国家规定。

- 马铃薯脱毒种制种过程：

- ①脱毒苗的培育

- 在实验条件下，通过茎尖培养获得经严格检测确认的脱毒苗作为核心材料。将脱毒苗进行快繁，扩繁苗随机抽检1%~2%。

- ②原原种的生产

- 在严格防护条件下，用脱毒苗在适当容器内生产的微型薯和在防虫温室、网室条件下生产的符合质量标准的种薯或小薯，即称为原原种。

- 初次获得脱毒组培苗 → 经检测 → 脱毒苗 → 原原种



- ③原种生产

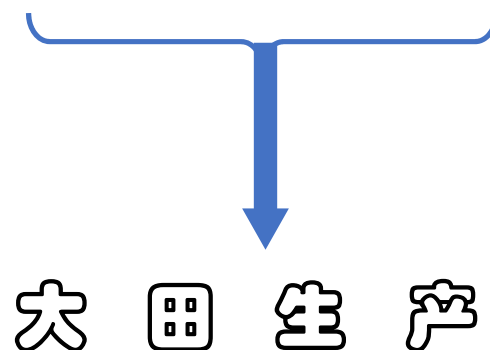
- 在良好的隔离条件下，用原原种生产的符合质量标准的种薯。

- 原原种 → 一级原种 → 二级原种 → 三级原种

- ④种薯生产

- 在开放隔离条件下，用原种生产的符合质量标准的种薯。

- 三级原种 → 一级种薯 → 二级薯 → 三级种薯



土豆脱毒种制种技术流程



脱毒苗的培育



一级原原种生产



二级原原种生产



三级原原种生产



一级原种生产



二级原种生产



三级原种生产



一级种薯生产



二级种薯生产



三级种薯生产



大田种植

实验技术阶段

原原种的制种
条件极其严格

原种制种阶段
条件要求严格

生产用种阶段
自然的隔离区

