

大蒜病毒病原的鉴定及组培脱毒研究

魏宁生 吴云峰

(西北农业大学植物病理研究所, 陕西杨陵·712100)

摘 要 系统鉴定的结果表明, 为害大蒜的病毒有 GLV, GMV 和 TMV. GMV 引起大蒜花叶及条纹花叶, 而 GLV 在大蒜上表现潜隐症状. GLV 的紫外吸收峰最低在 245.2 nm, 最高在 275.7 nm, 其 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.36. GLV 和 GMV 粒子大小分别为 548~700 × 13 nm 和 750~773 × 13 nm. 德国 GLV 抗血清仅与 GLV 有阳性反应. 采用 0.10~0.25 mm 生长点能完全脱除病毒, 而用 0.30~0.70 mm 有部分脱毒效果.

关键词 大蒜病毒病害, 病毒鉴定, 脱毒组织培养, 大蒜, 病害

中图分类号 S436.33

大蒜(*Allium sativum*)是一种重要的调味品, 不仅可以食用, 而且还能入药. 然而由于大蒜长期进行无性繁殖, 导致病毒病的普遍发生, 给生产造成极大的损失. 美国、西班牙和日本等国栽培的大蒜自然发病率均为 100%^[1,2]. 在我国, 1981 年谢浩等人在新疆大蒜上分离到一种褪绿条斑病毒^[3], 随后赵顺庆等对广东省大蒜病毒病进行了研究报告^[4]. 1988 年春我们对陕西关中地区大蒜病毒病进行了调查研究, 田间发病率均为 100%, 感病植株最初表现为花叶及条纹花叶, 继之叶片发生扭曲, 发病严重时植株矮缩. 植株感病后其蒜头一般退化变小, 使产量品质大大降低, 给生产消费和出口创汇带来了严重的障碍.

关于大蒜脱毒的研究, 1964 年 Marrou 和 Clement 采用热水处理大蒜鳞茎^[5], 但未达到脱毒的目的. 到 1972 年 Mori 和 Havranek 等分别用茎尖培养的方法才得到无毒植株. 在我国相继也有一些成功的报道^[6,7], 但由于大蒜无毒苗繁殖和复壮需要 3 年以上的時間, 且繁殖系数低, 同时在此期间又易经蚜虫传毒而重复感染. 因此, 目前国内开展的工作还处于实验探索阶段, 尚未批量投入生产. 但笔者认为, 只要通过大量摸索试验, 提高组培繁殖系数, 无毒苗将会在生产上发挥重要作用.

1 材料与方 法

1.1 病毒的分离、寄主范围和体外抗性测定

将采集发病的大蒜植株移栽在温室内, 然后汁液磨擦接种心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)、蚕豆(*Vicia faba*)、千日红(*Gomphrena globosa*)、普通烟(*N. tabacum*)和昆诺藜(*Chenopodium quinoa*). 待症状出现后, 选单斑纯化并增殖, 再接种 38 种寄主以测定病毒的寄主范围. 采用常规方法测定了病毒的致死温度(TDP), 稀释限点(DEP)和体外保毒期(L).

1.2 蚜虫传毒特性的测定

用4种无毒蚜虫,桃蚜(*Myzus persicae*)、甘蓝蚜(*Brevicoryne brassicae*)、麦长管蚜(*Macrosiphum avenae*)及禾谷缢蚜(*Rhopalosiphum padi*)饥饿3h后转至毒源植物上饲毒10~12h后,转接到蚕豆和大葱(*Allium fistulosum*)上接毒12h后立即毒杀。每株接种5~8头,每处理20株,重复3次。

1.3 电镜观察

分别用蚕豆、千日红和大蒜病叶采用浸渍法制备铜网,2%PTA(pH7.2)负染5min,待干后在电镜下观察并拍照。

1.4 大蒜病毒的提纯

当蚕豆长到10cm高(约6~8片叶)时接种毒原G₁,20d后采收病叶,放入-60℃冰柜中保存备用。G₁毒原的提纯参照Langenberg W. G(1973)的提纯程序^[8]。

1.5 抗血清的制备及血清学测定

用G₁病毒制剂作抗原,加等量不完全佐剂充分乳化后,对体重约2kg的健康公兔做静脉注射,每周1次,每次2mL,共注射3次。待最末一次注射后15d采血。在收集的抗血清中加入少量25%NaN₃保存。采用琼脂双扩散法测定血清效价,并选用烟草花叶病毒(TMV)、西德GLV抗血清对G₁、G₂和G₃三种病毒进行了血清反应测定。

1.6 大蒜茎尖组培脱毒研究

1.6.1 培养基的配制 以MS培养基为基本培养基,按脱分化和分化时期的需要附加2, -D, NAA, IAA和BA(mg/L)。

1.6.2 材料的消毒与接种 取萌芽的大蒜苗切取茎尖,放入75%酒精中浸泡20s后,放入0.1%HgCl₂液中10min,取出后用无菌水冲洗3次。在解剖镜下分别切取0.10、0.20、0.25、0.30、0.40、0.45、0.50、0.60、0.70和0.80mm的切段,接种在培养基上进行培养。以上操作过程均在无菌条件下进行。保持室温在25±2℃,光强为1500~2000lx,每日光照时间分为10和24h。

1.6.3 脱毒效果的检测 用血清学并结合接种鉴别寄主,对试管苗进行了脱毒效果的检测。

2 结果

2.1 病毒的寄主范围和症状反应

经过四年对近150多个大蒜病株的分离鉴定,现已查明大蒜除主要受G₁和G₂两种病毒的为害外,个别植株还被G₃所侵染。

人工接种时,G₁在昆诺藜、蚕豆和番杏(*Tetragonia expansa*)叶片产生枯斑;而G₂在昆诺藜、蚕豆和番杏上不表现症状,仅在千日红叶片产生枯斑;G₃能引起心叶烟出现局部枯斑,白烟(*N. tabacum White Burley*)表现花叶。此外,接种试验还表明:G₁不能使以下寄主表现症状,番茄(*Lycopersicon esculentum*)、三生烟(*N. tabacum cv. Samsun*)、黄花烟(*N. rustica*)、曼陀萝(*Datura stramonium*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、萝卜(*Raphanus sativus*)、秃疮花(*Dicranostigma platycarpa*)、矢车菊(*Centaurea*

cyamus)、金盏花(*Colendula officinalis*)和豌豆(*Pisum sativus*)。接种 G_1 和 G_2 后无症状的植物还有矮牵牛(*Petunia hybrida*)、大白菜(*Brassica pekinensis*)、百日草(*Zinnia elegans*)、哈密瓜(*Cucumis melo* cv. *Hami*)、白芷(*Angelica dahurica*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、车前(*Plantago asiatica*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)和燕麦(*Avena sativa*)。

2.2 病毒体外抗性测定结果

将大蒜毒原 G_1 和 G_2 分别接种蚕豆和千日红, 结果测得 G_1 和 G_2 的 TDP 分别为 60~75℃ 和 55~60℃, DEP 各为 10^{-4} 和 10^{-3} , L 则依次为 6~8 和 3 d。

2.3 蚜虫传毒结果

经试验证实桃蚜(*Myzus persicae*)在分别饲毒 10 h 后按 G_1 和 G_2 分别接种蚕豆和大葱, 两周后表现症状, 其传毒率 G_1 和 G_2 分别为 47.1% 和 53.3%。按同样方法测定时, 甘蓝蚜(*Brevicoryne brassicae*)、麦长管蚜(*Macrosiphum avenae*)和禾谷缢蚜(*Rhopalosiphum padi*)均不能传播大蒜病毒。

2.4 电镜观察结果

经蚕豆枯斑分离得到的 G_1 毒原, 在电镜下呈线状, 长度为 $548 \sim 700 \times 13$ nm(图 1-1), 经千日红枯斑分离得到的 G_2 毒原, 其大小为 $750 \sim 773 \times 13$ nm(图 1-2)。此外从一种深绿色条纹的大蒜病株中还观察到另外一种长度为 $294 \sim 300 \times 15$ nm 的杆状粒子。

2.5 血清学测定结果

用烟草花叶病毒(TMV)和来源于西德的大蒜潜隐病毒(GLV)抗血清分别与大蒜毒原 G_1 、 G_2 和 G_3 进行琼脂双扩散, 结果西德 GLV 抗血清仅与 G_1 有明显的沉淀线产生(图 1-3), TMV 抗血清仅与 G_3 呈阳性反应。

根据以上鉴定结果, 我们可以将大蒜毒原 G_1 、 G_2 和 G_3 分别确认为大蒜潜隐病毒(Garlic latent virus)、大蒜花叶病毒(Garlic mosaic virus)和 TMV。

2.6 GLV 的提纯及其紫外吸收特性的测定

用蚕豆寄主提纯的 GLV 经紫外扫描分析, 最大吸收峰在 257.7 nm, 最小吸收峰在 245.2 nm, 其 $A_{260} / A_{280} = 1.36$ (图 2)。用该病毒制备的抗血清, 经琼脂双扩散法测得的效价为 1:512。

2.7 大蒜品种抗病性的调查

在陕西目前生产上应用的栽培品种主要有白皮大蒜、紫皮大蒜和火蒜 3 个品种。经抽样鉴定三者都受到大蒜病毒的普遍侵染, 但受害程度差异较大。调查结果表明, 受害最重的为火蒜, 其次为紫皮大蒜, 而最轻的为白皮大蒜并表现较强的抗(耐)病性。

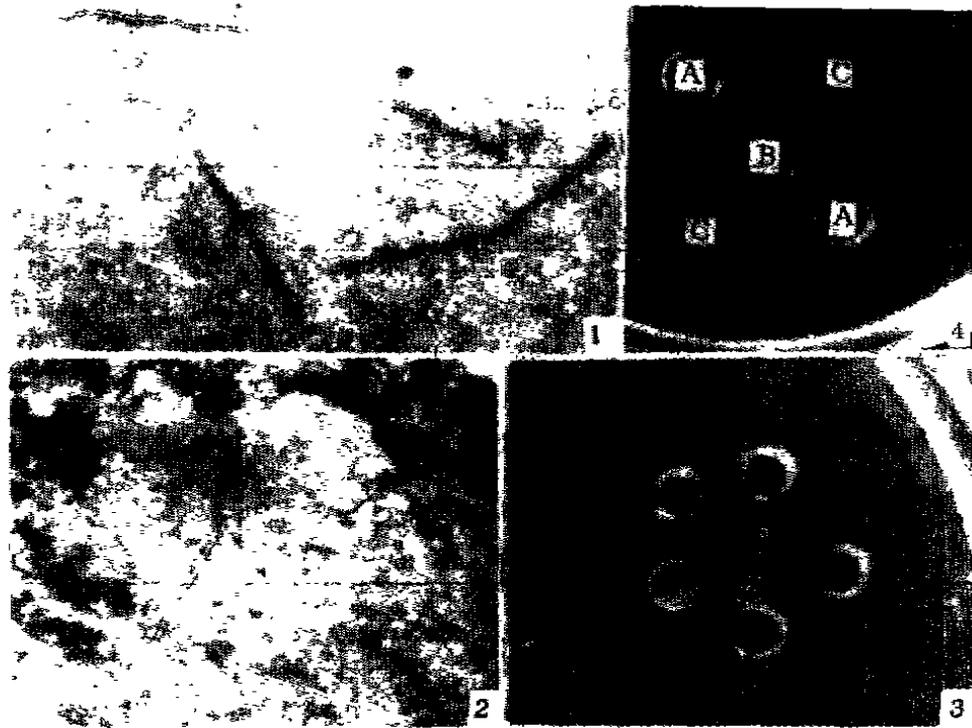


图1 大蒜病毒粒子的特性图版

1.大蒜潜隐病毒粒子(29 000 \times); 2.大蒜花叶病毒粒子(48 000 \times); 3.西德 GLV 抗血清(中间)与提纯 GLV(周围)的血清学反应; 4.试管苗的血清学检测结果,A 为 0.80 mm 茎尖试管苗,B 为 GLV 抗血清, C 为 0.25 mm 茎尖试管苗

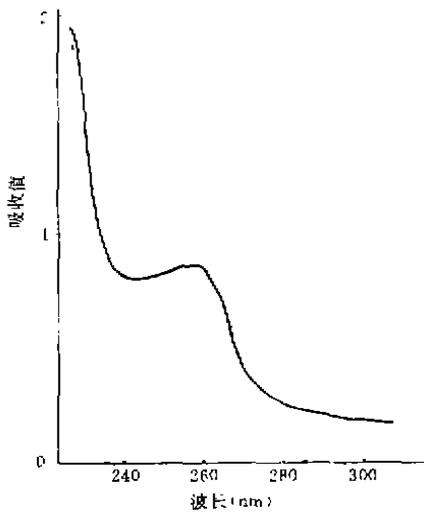


图2 GLV 紫外吸收曲线

血清学并结合汁液摩擦接种千日红、大葱等指示植物, 对大蒜试管苗的脱毒效果进行了

2.8 大蒜的茎尖组培脱毒

2.8.1 激素对愈伤组织诱导的效果

试验结果表明 2, 4-D, IAA 和 NAA 对大蒜愈伤组织的形成起主导效应, 其中以 2, 4-D 的诱导效果最为显著。而只含 BA 的培养基中愈伤组织长势缓慢, 而且成活率明显降低(附表)。

2.8.2 BA 对幼苗分化的诱导作用

大蒜茎尖在愈伤培养基上生长 20~30 d 后可诱导出大量的愈伤组织, 然后转入分化培养基, 结果发现当 BA 浓度提高时有利于芽的分化, 但浓度过高时却抑制根的形成(表 1)。

2.8.3 茎端切段大小与脱毒的关系

大蒜试管苗移栽在纱棚中正常生长后, 我们用

测定, 结果表明采用 0.10~0.25 mm 长的茎端培养可以完全脱除大蒜病毒, 用 0.30~0.70 mm 之间的切段也有一定的脱毒效果, 而使用 0.80 mm 则不能脱去病毒(图 1-4)。从图 5 中还可以看出, 虽然茎尖愈小脱毒率提高, 但成活率降低, 且操作困难。另外, 我们用 50 和 52℃ 温水处理鳞茎各 30 min, 然后进行茎尖培养明显地提高了脱毒效果。

附表 大蒜茎尖组织培养

愈伤培养基	成活率 (%)	分化培养基	分化芽数 愈伤块数	发根数 (个)
MS+2, 4-D ₂ +BA ₁	26.8	MS+2, 4-D ₁ +BA ₃	2/11	1
	28.2	MS+2, 4-D _{0.5} +BA ₃	3/14	2
MS+IAA _{0.5} +BA ₁	15.0	MS+2, 4-D _{0.5} +BA ₁	1/14	1
	16.3	MS+2, 4-D _{0.5} +BA ₅	5/15	0
MS+NAA _{0.5} +BAA ₁	15.2	MS+IAA _{0.5} +BA ₁	4/11	6
	18.0	MS+IAA _{0.5} +BA ₃	2/13	2
MS+BA ₁	7.7	MS+NAA _{0.5} +BA ₃	1/15	0
	6.1	MS+NAA _{0.5} +BA ₁	0/15	0

3 讨 论

通过对陕西境内白皮大蒜、紫皮大蒜和火蒜发生的病毒病的普查及鉴定, 分离到 G₁ 和 G₂ 两种主要毒原, G₁ 和 G₂ 分别与李龙雨等人报道的 GLV 和 GMV 的寄主范围和粒子长度基本一致⁽¹⁾, 而与赵顺庆等人鉴定的 GLV 和 GMV 寄主反应稍有差异⁽⁴⁾, G₁ 与西德 GLV 有血清学关系。因此, 我们可以将 G₁ 和 G₂ 分别确认为 GLV 和 GMV。在个别大蒜病株中检测到的 G₃ 毒原, 经过寄主症状反应、电子显微镜观察和血清学测定, 被鉴定为 TMV。对抽样调查的大蒜病株经生物学和血清学检测发现大蒜基本上受到 GLV 和 GMV 混合侵染, 发病率为 100%, 所以采用大蒜茎尖组培脱毒获得无毒大蒜显得更加重要。

参 考 文 献

- 1 李龙雨, 山崎升三, 尾崎武司等. 大蒜上的两种线状病毒——大蒜潜隐病毒和大蒜花叶病毒. 日植病报, 1979; 45(5): 727~734
- 2 Cadihae B. Garlic mosaic virus. *Ann Phytopathol.* 1976; 8: 165~172
- 3 谢 浩, 李国玄, 裴美云. 由新疆大蒜上分离到的一种褪绿条斑病毒. 植物病理学报, 1981; 11(3): 57~59
- 4 赵顺庆, 范怀忠, 高乔婉等. 广东大蒜花叶病原病毒病的鉴定. 病毒学杂志, 1987; 2(2): 75~86
- 5 王纪方, 金 波, 高秀云等. 蔬菜组织培养. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 39~64
- 6 周桂珍, 曹鸣庆, 裘季燕等. 京郊大蒜病毒病的研究及其鳞茎中病毒的脱除. 植物病理学报, 1989; 19(3): 145~149
- 7 赵顺庆, 李鹏飞, 范怀忠等. 大蒜茎尖组培脱毒研究. 华南农业大学学报, 1987; 8(4): 1~7
- 8 Langenberg W G Serology, physical properties and purification of unaggregated infectious maize dwarf mosaic

virus. phytopathology, 1973: 63: 149~154

On Identification and Virus-free Meristem Culture of Garlic Virus Diseases

Wei Ningsheng Wu Yunfeng

(*Plant Pathology Lab. Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100*)

Abstract The results from systematical identification showed that the viruses infecting garlic include garlic latent virus (GLV), garlic mosaic virus (GMV) and tobacco mosaic virus (TMV). GMV causes common mosaic and stripe mosaic in leaves; GLV showed latent symptoms in the infected garlic. The purified preparation of GLV showed that the ultra-violet absorption was 245.2 nm at minimum and 257.7 nm at maximum whose $A_{260} / 280$ was 1.36. Particles of GLV and GMV were $548 \sim 700 \times 13$ nm and $750 \sim 773 \times 13$ nm. Germany GLV antiserum is related only to GLV. According to virus-free meristem cultural experiment, virus-free garlics can be completely successful using 0.10~0.25 mm long meristems but partially by 0.30~0.70 mm long meristems.

Key words garlic virus disease, identification, virus-free tissue culture