

侵染兰花引起坏死斑症状的病毒种类鉴定*

王钰丽¹, 李凡^{1**}, 李正跃¹, 宸守鑫¹, 孙健¹, 赵瑞荣², 陈海如¹

(1. 云南农业大学, 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南昆明 650201;

2. 昆明金殿名胜区, 云南昆明 560224)

摘要: 在昆明市文心兰栽培基地发现了具有病毒病症状的感病文心兰和大花惠兰植株。感病文心兰和大花惠兰样品在电镜下可观察到长约 460~500 nm 的线状病毒粒体和长约 300 nm 的杆状病毒粒体, 它们分别与已报道的建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒粒体大小一致。利用 ELISA 技术在感病文心兰和大花惠兰样品可以检测到建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒。利用建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的特异性引物, 运用 RT-PCR 方法可以扩增到与引物设计预期大小一致的核酸条带。由此证明, 云南文心兰和大花惠兰病毒病由建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒中的一种或两种侵染引起。

关键词: 文心兰; 大花惠兰; 建兰花叶病毒; 齿兰环斑病毒; 坏死斑症状

中图分类号: S 436.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2007)02-0222-03

Identification of Viruses Causing Necrotic Spot on Orchid

WANG Yu-li¹, LI Fan¹, LI Zheng-yue², YI Shou-xin¹,

SUN Jian¹, ZHAO Rui-rong², CHEN Hai-ru¹

(1. Key Laboratory for Agricultural Biodiversity for Pest Management of China Education Ministry, Y A U, Kunming 650201, China; 2. Kunming Jindian Park, Kunming 650224, China)

Abstract: We find some *Oncidium* and *Cymbidium* with symptom of viral disease in Kunming. We discovered 460~500 nm line virus and 300 nm bacilliform virus in plant by electronic microscope. They size accord with *Odontoglossum* ringspot virus and *Cymbidium* mosaic virus. *Oncidium* and *Cymbidium* with symptom of viral disease affect with ORSV or CyMV by ELISA. Using primer of ORSV and CyMV, we amplified DNA fragments with expected sizes by RT-PCR. Cause of viral disease of *Oncidium* and *Cymbidium* is one or two of ORSV or CyMV in Yunnan.

Key words: *Oncidium*; *Cymbidium*; *Odontoglossum* ringspot virus; *Cymbidium* mosaic virus; necrotic spot

兰花是具有极高观赏和收藏价值的花卉植物, 兰花病毒病可造成植株叶斑、坏死以及花朵变色、畸形等症状, 严重影响其品质, 对兰花的生产造成了极大的危害^[1]。感染兰花的病毒种类有 27 种, 其中分布最广危害最大的是建兰花叶病毒 (*Cymbidium* mosaic virus, CyMV) 和齿兰环斑病毒 (*Odontoglossum* ringspot virus, ORSV)^[2]。这两种病毒常常复合侵染文心兰和大花惠兰, 引起叶片褪

绿斑驳、坏死等症状, 严重的导致植株生长不良、开花小而少, 花期缩短, 给兰花生产造成了极大危害, 并严重影响兰花的商品性和观赏性^[3,4]。2001 年郑平等对云南昆明、大理、丽江等地 300 多个兰花样本的检测, 未发现 ORSV 和 CyMV^[5]。然而, 随着云南兰花生产规模的不断扩大, 加之不规范的生产方式及种苗的无性繁殖使兰花病毒病的发生日趋严重, 病毒病已成为云南省兰花产业的一个主要

收稿日期: 2006-05-23

* 基金项目: 云南省科技攻关项目(2004NG09); 云南省自然科学基金重点项目(2004C0007Z)。

** 通讯作者

作者简介: 王钰丽(1980-), 女, 四川自贡人, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究。

限制因子。本研究通过多种植物病毒检测技术,对云南文心兰和大花惠兰病毒病的病原开展系统鉴定,探明发生危害的优势病毒种类,建立快速、灵敏的文心兰病毒病检测技术,为生产上病害的监测与防治提供理论依据。

1 材料与方 法

2004年在昆明市嵩明县采集16个有坏死斑症状的文心兰样品,12个有坏死斑症状的大花惠兰样品,在昆明市呈贡县采集2个斑驳并伴有坏死斑症状的大花惠兰样品。利用电镜负染技术^[6]、ELISA技术和RT-PCR技术对样品进行检测。ORSV和CyMV抗血清由厦门华侨亚热带植物引种园明艳林博士馈赠。分别根据已报道的ORSV、CyMV基因组全序列(序列号分别为AY571290、U62963)设计扩增ORSV和CyMV的引物:

ORSV5: 5' CACTTGGCTCTTATCATACATC3'
(与5197bp—5218bp相对应)

ORSV3: 5' GTTGACCACTCCTTACACGC3' (与6414bp—6433bp反向互补)

CyMV5: 5' AGATAAACTACTGTCCACCTA3'
(与5181bp—6227bp相对应)

Vial8: 5' GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTT
TTTTTTTTTTTTV3' (V=A,C或G)(检测CyMV的3'端引物)

Vial9: 5' GACCACGCGTATCGATGTCGAC3'
(检测CyMV的3'端引物)。

2 结果与分析

感病文心兰植株表现为系统侵染症状,叶片上出现褪绿黄化,在叶片正面或背面出现褐色或黑色的坏死斑点后褪绿不明显,坏死斑直径从0.2~1cm不等,部分坏死斑周围有褪绿的晕圈,有些坏死斑点处叶片凹陷。感病大花惠兰植株也表现为系统侵染症状,叶片上出现褪绿黄化或斑驳,叶片出现褐色或黑色的坏死斑,坏死斑会逐渐扩展在叶片上形成大片的坏死。植株症状表现与报道的ORSV和CyMV侵染兰花后植株症状表现相似(图1)。

利用负染技术在电子显微镜下可清楚观察到感病文心兰植株组织中含有线状病毒粒体,长约460~500nm,与已报道的CyMV的粒体大小一致。在部分感病的文心兰植株组织中可观察到杆状病



a: 感病文心兰; b: 感病大花惠兰
a: infected *Oncidium*;
b: infected *Cymbidium hybridus*

图1 感病兰花症状图

Fig. 1 The symptoms of infected Orchid plants

毒粒体,长约300nm,与已报道的ORSV的粒体大小一致(图2)。从电镜检测结果来看,大部分文心兰样品感染了460~500nm长的线状病毒,病毒含量较高;少数样品感染了300nm长的杆状病毒,且病毒含量极少;部分品种存在线状病毒和杆状病毒复合感染情况。在感病大花惠兰中可观察到线状病毒粒体,长约460~500nm,与已报道的CyMV的粒体大小一致。只在呈贡采集的一个样品中观察到杆状病毒粒体,长约300nm,与已报道的ORSV的粒体大小一致。

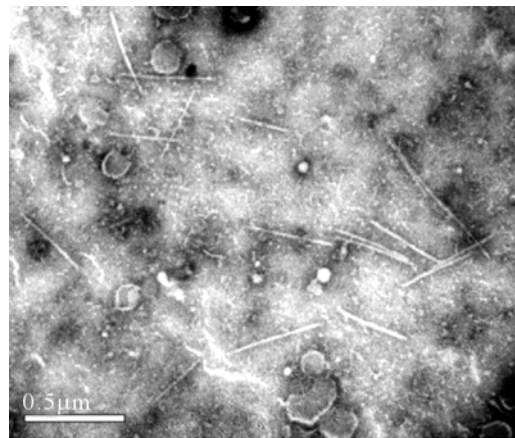


图2 电镜下观察到的CyMV和ORSV病毒粒体
Fig. 2 Virions of CyMV and ORSV observed
by electronic microscope

选取有代表性的感病文心兰和大花惠兰植株的叶片,分别用CyMV和ORSV抗血清进行ELISA检测,结果有23个样品含有CyMV,11个样品含有ORSV,其中有9个样品同时含有CyMV和ORSV,表明感病文心兰和大花惠兰中存在CyMV和ORSV复合侵染现象。在症状表现明显的文心兰植株病毒检出率为100%,大花惠兰样品病毒检出率也高达71%。

表 1 兰花感病植株 ELISA 检测结果
Tab. 1 Detected infected Orchid plants by ELISA

样品 sample	检测样品数 detected sample	感病样品数 infected sample		
		CyMV	ORSV	CyMV + ORSV
文心兰(嵩明) <i>Oncidium</i> (Songming)	16	13	10	8
大花惠兰(嵩明) <i>Cymbidium</i> (Songming)	12	8	0	0
大花惠兰(呈贡) <i>Cymbidium</i> (Chenggong)	2	2	1	1

提取嵩明县感病文心兰和大花惠兰植株叶片的总 RNA, 利用 CyMV 和 ORSV 的特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 在文心兰和大花惠兰植株均可扩增得到大小约 1 000 bp 的目的片段, 在文心兰植株中可以扩增到约 1 200 bp 的目的片段, 与引物设计预期大小一致, 表明在感病文心兰中检测到 CyMV 和 ORSV, 在感病大花惠兰植株中检测到 CyMV。对从文心兰中扩增到的目的片段进行了克隆测序(基因登录号分别为 AM055640 和 AM055643), 通过 NCBI 数据库比较进一步确定在感病文心兰中存在 CyMV 和 ORSV 侵染现象。

由于感染病毒病的文心兰和大花惠兰在叶片上主要引起坏死斑, 斑驳和褪绿症状往往不明显, 这与真菌引起的叶斑病症状相似, 有人认为是由真菌引起的病害, 但通过电镜检测、ELISA 检测和 RT-PCR 检测及病毒基因序列分析, 可以确定云南嵩明采集到的引起叶片褪绿斑驳、坏死等症状的文心兰植株感染了 CyMV 和 ORSV, 大花惠兰植株感染了 CyMV, 在呈贡采集到的感病大花惠兰植株中检测到了 CyMV 和 ORSV。在总共的 14 个大花惠

兰样品中仅检测到 1 个样品含有 ORSV, 检出率极低, 对于大花惠兰中是否存在 CyMV 和 ORSV 复合侵染现象还需要进一步的研究。对于云南文心兰和大花惠兰上是否还感染了黄瓜花叶病毒、建兰环斑病毒、番茄环斑病毒等兰花上常见的病毒, 还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 胡松华. 热带兰花[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002.
- [2] 张建军, 谢为龙. 兰花病毒病研究进展[J]. 动植物检疫, 1998, 27: 92-95.
- [3] 梁敏国, 刘光华. 广东兰花病毒病调查和病原检测[J]. 江西植保, 2004, 27(3): 97-100.
- [4] 刘仲健, 陈伟元, 张健勇, 等. 兰花病害调查初报[J]. 植物技术与推广, 1998, 18(1): 25-27.
- [5] 郑平, 刘荣维, 徐明全, 等. 国内两种主要兰花病毒病的综合普查研究[J]. 广东农业科学, 2001, (6): 37-40.
- [6] 林均安, 高锦梁. 实用生物电子显微术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989.