

柑橘衰退病和碎叶病复合感染病原的脱毒研究

乔芬 祁鹏志 伏卉 张鹏 吴珊 姜玲

华中农业大学园艺林学学院/国家果树脱毒种质资源室内保存中心/
教育部园艺植物生物学重点实验室, 武汉 430070

摘要 以带毒柑橘品种为试材, 采用植物中药制剂处理与热处理结合、茎尖微芽嫁接与植物中药制剂处理结合, 用 RT-PCR 法检测病原带毒情况, 并在药剂处理后 1、3、5、7、9 d 取样, 检测抗性相关酶活性的含量变化, 结果表明: 采用板蓝根和黄芩混合中药制剂处理 8 次, 结合热处理, 在 PC 板制成的温室(白天 40 °C (6 h/d), 晚上 25 °C, 处理 50 d)中, 可有效地脱除试验苗木中柑橘衰退病和柑橘碎叶病复合感染病原; 对柑橘茎尖微芽嫁接苗进行板蓝根和黄芩混合中药制剂脱毒处理后苗木经 RT-PCR 法检测表明: 85.7% 植株可以脱除柑橘衰退病和柑橘碎叶病病毒; 药剂处理后 PPO、POD、SOD 酶活性与对照相比均有所提高。

关键词 中药制剂; 热处理; 茎尖微芽嫁接; 复合感染; 病原; RT-PCR

中图分类号 S 666; S 436. 661. 1⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0416-06

柑橘为多年生常绿果树, 通常采用无性繁殖的方法繁殖后代, 伴随着国内外品种引进和交流的频繁进行, 树体极易感染柑橘黄龙病(*Citrus Huanglongbing*)、柑橘衰退病(*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘碎叶病(*Citrus tatter leaf virus*, CTLV)等病害。柑橘黄龙病是目前柑橘生产上致命的病害。近些年来, 柑橘衰退病和柑橘碎叶病病原复合感染日趋严重。推行无病毒苗木繁育制度仍然是新时期柑橘品种结构调整和大规模基地建设的重要环节, 建立一套操作简便、成本低、效果好的脱除柑橘复合感染病原的程序十分必要。

传统的脱毒方法主要有茎尖微芽嫁接、热处理和珠心胚培养等。茎尖微芽嫁接可以脱除柑橘黄龙病病原^[1], 但不能完全脱除柑橘衰退病病原。热处理是一种操作简便且实用性强的脱除病毒的方法, 由 Grant 在 1967 年脱除衰退病和鳞皮病毒中首先提出, 后续的研究表明热处理还可以脱除柑橘囊胞病、黄龙病等, 但是包括裂皮病、碎叶病在内的病害在单独的热处理时不能脱除病毒^[2]。骆学海^[3]用 49 °C 的湿热空气处理 50~60 min, 或用 50 °C 的湿热空气处理 50 min, 都可使病树恢复健康, 但处理后

的苗木和接穗的成活率较低。宋瑞林等^[4]报道, 44 °C 下处理 16 h、30~34 °C 下处理 8 h, 交替处理 8~9 周, 可除去柑橘的茎陷点型衰退病毒。Muhammad 等^[5]通过 35/30 °C (白天 35 °C 16 h, 晚上 30 °C 8 h) 处理 2 周, 40/35 °C 处理 1 周, 然后 50/40 °C 处理 1 周, 成功脱除了 CTV, 但是有大约 50% 的柑橘苗在处理过程中死亡。上述方法单独使用难以彻底和安全地脱除柑橘衰退病毒与碎叶病复合感染病原, 脱毒方法面临着新的挑战。

前人研究表明, 来源于植物的抗病毒剂可以提高植株抗病性、抑制病毒的扩增繁殖、减少病毒的含量和病毒侵染。植物抗病毒剂因来源广泛、毒性低、无残留等优点而日益受到研究者的重视。第 1 个植物源病毒抑制物是 1914 年 Allard 报告的商陆属(*Phytolacca acinosa*) 植物叶子中存在的植物病毒抑制剂。此后, 为了寻找有效的植物源抗病毒剂, 研究人员进行了大量的研究^[6]。在烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus)、罗汉果花叶病毒(Luohanguo mosaic virus)、印度柑橘环斑病毒(India citrus ringspot virus)的防治中都取得了良好效果^[7]。朱水方等^[8]从 112 个材料中发现连翘(*Forsythia sus-*

收稿日期: 2010-08-04

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD61B04)、园艺作物种质资源研究与遗传改良创新研究群体项目(30921002)和柑橘黄龙病和溃疡病综合防控与示范项目(201003067)

乔芬, 硕士, 研究方向: 资源植物学. E-mail: qiaofen111@126.com

通讯作者: 姜玲, 博士, 教授, 研究方向: 园艺植物生物技术与育种、果树脱毒和检测. E-mail: jiangling@mail.hzau.edu.cn

pensa)、大黄(*Rheum officinale*)和板蓝根(*Isatis tinctoria*)对黄瓜花叶病毒引起的辣椒花叶病具有较好的防效。丁群等^[9]研究表明大黄酸和板蓝根乙醇提取物对TMV的抑制率可达51%和90%。刘学端等^[10]报道利用商陆、甘草、连翘等几种中草药自制复配MH11-4的可湿性粉剂,对TMV和CMV有较强体外钝化作用。林纬等^[11]在寻找有效防治罗马果花叶病毒病的方法中发现,板蓝根、贯众、大黄和黄芩的粗提取物的防治效果分别为73.10%、46.20%、46.20%和57.60%。

植物对自身的保护是通过酶催化的生理反应实现的,保护性酶与植物的抗病性具有密切联系,抗性相关酶活性的高低通常可以反映植物抗病性的强弱^[12]。本试验探讨中药抗病毒剂与热处理结合、微芽嫁接与中药抗病毒剂处理结合对柑橘衰退病和碎叶病病毒的脱毒效果,以期筛选到成本低、使用简便、安全的抗病毒剂,并观察中药处理后3种抗性相关酶的变化,旨在建立一套有效的脱毒程序,为柑橘优良品种的推广和规模化发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

引入的带毒柑橘品种有:处红柚(*Citrus grandis* Osback cv. *chuhong*)、翡翠柚(*Citrus grandis* Osback cv. *feicui*)、稻叶蜜柑(*Citrus unshiu* Marc. cv. *yinba*)、市文蜜柑(*Citrus unshiu* Marc. cv. *shibben*)、江西蜜柑(*Citrus unshiu* Marc.),在华中农业大学微生物农药国家工程中心院内隔离保存,材料经RT-PCR病毒检测。

植物中药处理柑橘材料为华中农业大学果树脱毒种质资源室内保存中心隔离间中保存的带毒母本材料:瓠柑(*Citrus suavissima* Hort. ex Tanaka)、江西蜜柑(*Citrus unshiu* Marc.)、芦柑(*Citrus reticulata* Blanco cv. *ponkan*)。阳性对照为检测并测序的瓠柑、江西蜜柑和芦柑带毒母本,阴性对照为试管中保存的健康的柑橘愈伤组织。中药抗病毒剂材料来源于板蓝根(*Isatis indigotica* Fort.)和黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)干燥的根,用粉碎机研成粉末,提取待用。

1.2 试剂和仪器

RT-PCR Kit(AMV) Ver 3.0 试剂盒(北京博大泰克生物有限公司)。主要仪器包括:超速冷冻离心机(BIO-RAD公司)、PCR仪(BIO-RAD公司)、

凝胶成像系统(Seqrte公司)、核酸蛋白检测仪(Amersham公司)、旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)、超声处理器(上海浦超超声波仪器设备有限公司)、控温加热器等。

1.3 抗病毒剂的提取程序

称取中药板蓝根粉末50g置于1000mL烧杯中,加入500mL水浸泡1h,分2次在480W微波条件下,将药材处理6min后过滤,再加400mL水在同样的条件下用微波处理,合并2次所得的滤液,在旋转蒸发器上减压浓缩,直至呈浸膏状,然后加入乙醇进行沉淀,将乙醇体积分数调节为80%,静置过夜、过滤,将沉淀减压浓缩,60℃恒温烘干成浸膏状,定容到250mL,即得中药制剂粗品I(1g/5mL)。

称取中药黄芩干燥根粉末50g,置于1000mL烧杯中,加500mL水,分别用40kHz 2500W超声波处理40min后过滤,再加约8倍水在同样的条件下处理,合并2次所得的滤液,滤液加盐酸调至pH1~2,80℃水浴保温0.5h,待黄色沉淀完全析出后过滤,沉淀用蒸馏水洗至中性,60℃干燥,定容到250mL,即得中药制剂粗品II(1g/5mL)。试验所用的水杨酸质量浓度为40mg/L。

1.4 热处理和中草药制剂处理结合脱毒

采用中药制剂I、II处理结合缓冲间热处理,其中缓冲间为PC板建成,处理时间为9月10日至10月30日,采用自然温度与控温器结合,白天40℃(6h/d),晚上最低温25℃,温度达不到要求时,用加热器补充热量,处理50d。

药剂处理方法设为4组:①药剂I处理,叶面喷施(0.3g中药粉提取的制剂I)和灌根(0.7g中药粉提取的制剂I);②药剂II处理,叶面喷施(0.3g中药粉提取的制剂II)和灌根(0.7g中药粉提取的制剂II);③药剂I与II各1g/株结合处理,叶面喷施(0.3g中药粉提取的制剂I+0.3g中药粉提取的制剂II)和灌根(0.7g中药提取的制剂I+0.7g中药提取的制剂II);④40mg/L水杨酸处理,每株喷施50mL,灌根100mL,每5d处理1次,共处理8次,从开始处理到取样时间为80d,提取柑橘叶片总RNA。

1.5 茎尖微芽嫁接与中草药制剂结合脱毒

对微芽嫁接柑橘苗,采用中药抗病毒剂I和II结合处理,药剂处理方法同本文“1.4”中③,共处理8次,处理后80d时,提取柑橘叶片总RNA,采用RT-PCR法进行病毒检测。

1.6 引物设计与合成

参考 Avijit 等^[12]的方法设计柑橘衰退病的检测引物(Q₃、Q₄),根据 CTV 的 p18 基因设计,预计扩增片段长度 511 bp。参考 Takao 等^[13]的方法设计引物(Q₇、Q₈),扩增 CTLV 基因序列中的 6 019~6 474 bp 片段,预计扩增长度为 456 bp,见表 1。所用引物均由上海生物工程有限公司合成。采用 RT-PCR 进行病毒检测。反转录的条件为:37 °C 孵育 2 h,95 °C 变性 5 min,5 °C 冷浴 5 min,-20 °C 保存或立即进行 PCR 反应;CTV 检测 PCR 循环条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,56 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 31 个循环。CTLV 病毒检测循环条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,59 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 33 个循环。PCR 反应结束后,用凝胶成像仪观察记录结果。每样品进行 3 次重复检测。

表 1 柑橘衰退病、碎叶病病毒检测所用引物

Table 1 The primers for the detection of CTV and CTLV with RT-PCR

病毒 Viruses	引物编号 Primer number	序列 Nucleotide sequence(5' to 3')	产物长度/ bp Product size
CTV	455-1(+)	cgtatctagagatgaagtgtgttcacgg	455
	455-2(-)	gctaggtaccaaacacgataagggcatcg	
	Q3(+)	atgtcaggcagcttgggaaatt	511
	Q4(-)	ttegtgtctaagtcrcgctaaaca	
CTLV	Q7(+)	tagaaaaaccacactaacccggaatgc	456
	Q8(-)	cctgaattgaaaccttgtctgccactt	

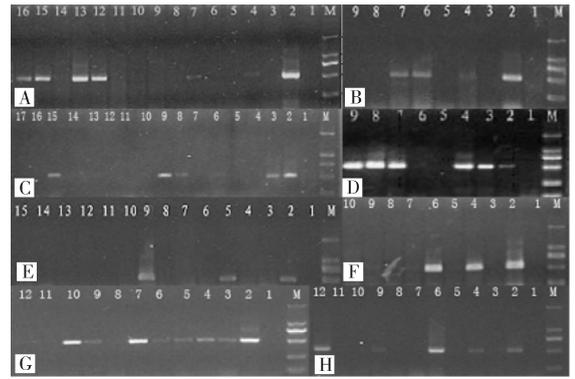
1.7 中药制剂处理对抗性相关酶 SOD、POD 和 PPO 活性的影响

取长势一致带病毒的瓯柑母本苗,统一修剪后,采用植物中草药与水杨酸处理,在第 8 次处理完成后的 1、3、5、7、9 d,自新发枝条顶端展开的第 3 片叶取样,测定 PPO、POD 和 SOD 酶活性,检测药剂处理对抗性相关酶活性的影响^[13]。

2 结果与分析

2.1 微芽嫁接对 CTV 的脱毒效果

对瓯柑、稻叶蜜柑、市文蜜柑、翡翠柚、处红柚等 6 个品种的母株和茎尖嫁接苗的 RT-PCR 检测结果(图 1)表明:所有样品的母株均扩增出了特异性条带;而 STG 嫁接苗的无毒率为 46.7%~61.1%(表 2),方差分析表明,品种间脱毒率差异不显著,说明茎尖嫁接方法并不能完全脱除柑橘衰退病病原(表 2)。



1. 阴性对照 Negative control; 2. 阳性对照 Positive control; A:3~6. 瓯柑 *Citrus suavisissima* Hort. ex Tanaka; 7~11. 翡翠柚 *Citrus grandis* Osback cv. *feicui*; 12~16. 稻叶蜜柑 *Citrus unshiu* Marc cv. *yniba*; B:3~9. 瓯柑 *Citrus suavisissima* Hort. ex Tanaka; C:3~17. 瓯柑 *Citrus suavisissima* Hort. ex Tanaka; D:3. 市文蜜柑 *Citrus unshiu* Marc. cv. *shibben*. 4~9. 稻叶蜜柑 *Citrus unshiu* Marc. cv. *yniba*; E:3~14. 市文蜜柑 *Citrus unshiu* Marc. cv. *shibben*; 11~15. 翡翠柚 *Citrus grandis* Osback cv. *feicui*; F: 3~5. 处红柚 *Citrus grandis* Osback cv. *chuhong*; 6~10. 市文蜜柑 *Citrus unshiu* Marc. cv. *shibben*; G:3~7. 翡翠柚 *Citrus grandis* Osback cv. *feicui*; 8~12. 处红柚 *Citrus grandis* Osback cv. *chuhong*; H:3~8. 稻叶蜜柑 *Citrus unshiu* Marc. cv. *yniba*; 9~12. 处红柚 *Citrus grandis* Osback cv. *chuhong*.

A-3, 5, 6, 8~11, 14, B-3, 5, 7, 9, C-4, 5, 7, 11, 12, 14, 17, D-5, 6, E-3, 4, 6~8, 10~15, F-3, 5, 7, 10, G-8, 11, H-3, 5, 7, 8, 10, 11 均未检测到特异扩增谱带 No special amplification band were detected.

图 1 茎尖微芽嫁接脱除 CTV 病原的效果

Fig. 1 Effect of eradicating the pathogen of CTV by shoot-tip grafting

表 2 茎尖嫁接苗的衰退病脱毒效果

Table 2 Effect of eradicating the pathogen of CTV by shoot-tip grafting

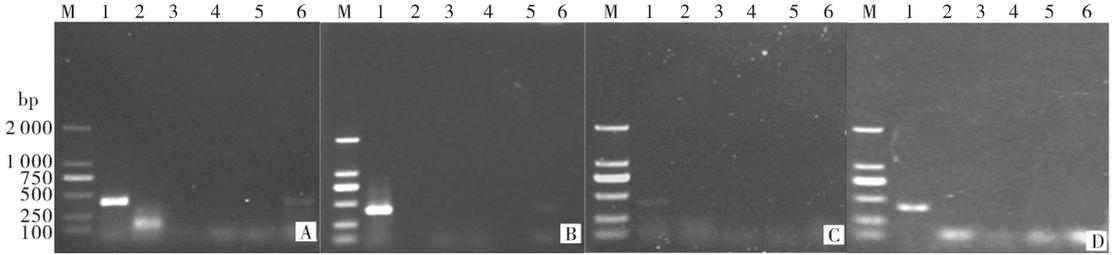
品种 Varieties	检测株数 Number of detected plants	脱毒株数 Number of free-virus plants	脱毒率/% Percentage of free-virus plants
瓯柑 <i>Citrus suavisissima</i> Hort. ex Tanaka	31	18	58.1
翡翠柚 <i>Citrus grandis</i> Osback cv. <i>feicui</i>	15	9	60.0
处红柚 <i>Citrus grandis</i> Osback cv. <i>chuhong</i>	12	7	58.3
稻叶蜜柑 <i>Citrus unshiu</i> Marc. cv. <i>yniba</i>	15	7	43.8
市文蜜柑 <i>Citrus unshiu</i> Marc. cv. <i>shibben</i>	18	11	61.1
平均 Average	91	52	57.1

2.2 药剂处理与热处理结合的脱毒结果

从 RT-PCR 检测结果可知(图 2):药剂处理 I、II、I + II 分别与热处理结合没有扩增到 CTV 的 455 bp 特异性条带,但是水杨酸处理与热处理结合后仍能扩增到 CTV 的 455 bp 的特异性条带,这表明,药剂 I 和 II 单独处理和组合处理与热处理结合可以脱除柑橘衰退病毒,水杨酸与热处理

结合可以降低病毒浓度,但是不能完全脱除柑橘衰退病毒。

对柑橘碎叶病检测结果表明,经中药制剂 I、II、I + II 处理与热处理结合,4 株瓯柑、4 株江西蜜柑均没有扩增到 CTLV 特异性条带 456 bp,表明药剂 I 和 II 单独处理和组合处理与热处理结合可以脱除柑橘碎叶病毒。



M: Marker(DL 2000); A:1. 阳性对照 455 bp CTV 特异性谱带被扩增 Positive control, the special CTV band of 455 bp was amplified; 2. 阴性对照 Negative control; 3~6. 瓯柑 *Citrus suavis* Hort. ex Tanaka; 3. 药剂 I + II 结合处理 Deal with Chinese medicine agent I and II; 4. 药剂 II 处理 Deal with agent II; 5. 药剂 I 处理 Deal with agent I; 6. 水杨酸处理,在 455 bp 扩增出 CTV 特异性谱带 Deal with salicylic acid; B:1. 阳性对照 Positive control; 2. 阴性对照 Negative control; 3~6. 江西蜜柑 *Citrus unshiu* Marc. cv. *jiangxi unshiu*. 3. 药剂 I 处理 Deal with agent I; 4. 药剂 II 处理 Deal with agent II; 5. 药剂 I + II 处理 Deal with agent I + II; 6. 水杨酸处理,在 455 bp 扩增出特异性谱带 455 bp band was amplified when the plant were deal with salicylic acid; C:1. 阳性对照 Positive control; 2. 阴性对照 Negative control; 3~5. 瓯柑 *Citrus suavis* Hort. ex Tanaka; 3. 药剂 I 处理 Deal with agent I; 4. 药剂 II 处理 Deal with agent II; 5. 药剂 I 和 II 处理 Deal with agent I and II. D:1. 阳性对照 Positive control; 2. 阴性对照 Negative control; 3~5. 江西蜜柑 *Citrus unshiu* Marc. cv. *jiangxi unshiu*; 3. 药剂 I 处理 Deal with agent I; 4. 药剂 II 处理 Deal with agent II; 5. 药剂 I 和 II 处理 Deal with agent I and II.

图 2 中药制剂处理与热处理相结合脱除衰退病毒和柑橘碎叶病的检测

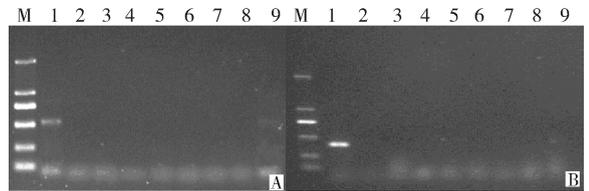
Fig.2 Detection on eliminating CTV virus from infected *Citrus* with both Chinese medicine and heat treatment

2.3 微芽嫁接与药剂处理相结合的脱毒效果

先进行茎尖微芽嫁接脱毒,当微芽嫁接苗移栽并长到 20~30 cm 后,采用中药制剂处理,检测结果显示(图 3):经药剂 I 和 II 处理后,被检测的 7 株芦柑微芽嫁接苗有 6 株没有扩增到 CTV 特异性条带 511 bp 和 CTLV 特异性条带 456 bp,1 株能扩增到 CTV 的 511 bp 特异性条带和碎叶病 456 bp 条带,表明微芽嫁接与药剂 I 和 II 组合处理对柑橘衰退病毒和碎叶病毒具有一定比例的脱除率,可达 85.7%。

2.4 中药制剂处理对柑橘 PPO、POD 和 SOD 酶活性的影响

酶活性分析结果显示(表 4):药剂处理后,柑橘叶片 PPO 活性先增加后降低,其中水杨酸处理活性在处理 1 d 后开始增加,药剂 I、II 和 I + II 处理在 3 d 开始增加,到 5 d 时达到最大值,之后开始降低,活性增加最高的是 I + II 结合处理组。药剂处理后,柑橘叶片 POD 活性都有增加趋势,3 d 达到最



M: Marker(DL 2000); A:CTV 的检测结果 Detection results of CTV; 1. 阳性对照 Positive control; 2. 阴性对照 Negative control; 3~9. 芦柑 Ponkan, A-9 扩增到特异的条带,其他样为没有扩增到特异的条带 511 bp band was amplified in A-9, the others were health. B: CTLV 的检测结果 Detection results of CTLV; 1. 阳性对照 Positive control; 2. 阴性对照 Negative control; 3~9. 芦柑 Ponka; B-9 扩增到特异的条带,其他样为健康植物,没有扩增到特异的条带 456 bp band was amplified in B-9, the others were health.

图 3 微芽嫁接与药剂处理结合脱除衰退病毒和碎叶病毒的 RT-PCR 检测

Fig.3 Eliminating virus from infected citrus by STG coupled with Chinese traditional medicine and detection CTV and CTLV with RT-PCR

表 3 处理后 PPO、POD 和 SOD 酶活性测定结果¹⁾

Table 3 The activity of the resistant relative enzyme PPO, POD and SOD after treatment

时间/d Time	酶活性/(U/g) Activity of enzymes	I	II	I + II	SA	CK
1	POD	450.89 a	437.50 a	428.57 a	441.96 a	437.50 a
	PPO	550.22 a	542.36 a	550.22 a	542.36 a	534.50 a
	SOD	778.38 a	792.79 a	785.59 a	792.79 a	778.38 a
3	POD	808.04 a	758.93 a	821.43 a	732.14 a	361.61 b
	PPO	652.40 b	636.68 b	644.54 b	935.37 a	597.38 b
	SOD	1 088.29 b	821.62 c	1 261.26 a	980.18 bc	785.59 c
5	POD	758.93 b	696.43 c	816.96 a	620.54 d	330.36 e
	PPO	1 438.43 b	1 147.60 c	1 517.03 a	1 179.04 c	573.80 d
	SOD	1 023.42 b	720.72 d	1 210.81 a	843.24 c	713.51 d
7	POD	549.11 a	517.86 a	571.43 a	455.36 b	232.14 c
	PPO	896.07 b	620.96 c	1 013.97 a	636.68 c	455.90 d
	SOD	792.79 b	821.62 b	1 282.88 a	691.89 c	468.47 d
9	POD	321.43 a	321.43 a	325.89 a	325.89 a	250.00 b
	PPO	644.54 a	652.40 a	683.84 a	660.26 a	534.50 b
	SOD	792.79 a	857.66 a	864.86 a	706.31 b	641.44 c

1)表中的数值为平均值,具有不同字母的数据无显著性差异($P < 0.05$),下同。The mean values within followed by the different letters are significantly different ($P < 0.05$). The same as below.

大值,保持最高活性水平一段时间,到 5 d 后开始下降,活性增加最高的是 I + II 结合处理组。药剂处理后第 3 天,柑橘叶片的 SOD 活性都有增加,活性增加最高的是 I + II 结合处理组。药剂 I 和 II 处理 SOD 活性分别在 7 d 降低, I + II 处理组 SOD 活性在 9 d 时降低。方差分析表明:2 种中药抗病毒剂分别处理和混合处理后 5 h 时,PPO、POD 酶活性比对照有显著差异($P < 0.05$);处理 7 h 时,SOD 活性比对照都有显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

将中药抗病毒剂和热处理结合,能有效去除柑橘衰退病和碎叶病病原。前人发展了热处理脱毒方法,认为合适的温度使病毒的生长、运动、繁殖受到抑制,而植物体的正常生长不受大的影响。近几年研究表明:温度能显著影响植物与病毒之间的相互作用,这种作用是通过影响 RNA 沉默来实现的,在低温条件下,病毒介导的和转基因引发的基因沉默都受到抑制,植株对于病毒的敏感性较强,相反升高温度可以相应增加植物体内 siRNAs 的量,从而激活 RNA 沉默,使病毒侵染受到抑制。同时,通过热处理使病毒 RNA 沉默抑制子功能降低,增强 RNA 沉默,植物体内病毒浓度相应降低^[14-16],提高植物的抗病能力。本研究结果表明,抗病毒剂处理可以升高植物体内抗病相关酶的活性。在热处理和抗病毒剂的双重作用之下,病毒得到有效控制。

本试验使用板蓝根、黄芩和特定条件的热处理后,利用 RT-PCR 没有检测到柑橘衰退病和碎叶病

病毒,但病原与药物有效成分的作用方式还有待进一步研究。多酚氧化酶,过氧化物酶和超氧化物歧化酶是植物体抗病性相关的主要酶类,其活性的高低反映了植株的抗病性强弱^[11],本试验在药剂处理完成后,测定了抗病相关酶 PPO、POD、SOD 活性,结果显示酶活性与对照组相比均升高,其中药剂 I + II 结合处理组效果最明显,酶活性增加最高,说明 2 种药剂结合是最理想的处理方法。但本研究对中药抗病毒制剂抗柑橘病毒的具体机制没有深入研究,没有确定具体的活性成分;关于中药抗病毒制剂对柑橘衰退病、碎叶病病毒的影响机制还缺乏了解,还需要做更深入的研究。

本研究是在湖北省武市于 9—10 月进行的,只需要稍加温,便可达到最佳的节能效果和脱毒效果。在气温较低的季节,需要提供室内玻璃温室配合加温装置辅助加温,以达到良好的脱毒效果。因此,在武汉的气候条件下,5—10 月均能方便地进行脱毒操作。茎尖微芽嫁接具有一定的脱毒效果,但需要植物组织培养的全套设备和技术,且嫁接成活率有限,茎尖材料还受到季节的影响,如果省去茎尖微芽嫁接程序,可以简化操作,提高工作效率。热处理和抗病毒剂结合的方法对于苗期感病植株的脱毒是行之有效的方法,但对于成年树的治疗效果还有待进一步证实。

参 考 文 献

- [1] NAVARRO L, CIVEROLO E L, JUAREZ J, et al. Improving therapy methods for citrus germplasm exchange: proceedings

- of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)[C]. Riverside: University of California, 1991.
- [2] SCHWARZ R E, GREEN G C. Heat requirement for symptom suppression and inactivation of the greening pathogen; proceedings of 5th Conf. Intl. Organ. Citrus[C]. Gainesville: University of Florida Press, 1972.
- [3] 骆学海. 柑橘黄龙病热水间歇消毒试验[J]. 华南农业大学学报, 1983, 4(1): 97-103.
- [4] 宋瑞琳, 吴如健, 柯冲. 茎尖嫁接脱除柑橘主要病原的研究[J]. 植物病理学报, 1999, 29(3): 275-279.
- [5] MUHAMMAD A, MUHAMMAD I, ATTIQUE A, et al. Elimination of *Citrus tristeza* closterovirus from citrus budwood through thermotherapy[J]. Pak J Bot, 2005, 37(2): 423-430.
- [6] 吴艳兵, 颜振敏, 谢荔岩, 等. 天然抗烟草花叶病毒大分子物质研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1096-1101.
- [7] 林伟, 蒙姣荣, 朱彬, 等. 药用植物粗提物对罗汉果花叶病毒病的防治作用研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(4): 1629-1630, 1640.
- [8] 朱水方, 裴维蕃. 几种中草药抽提物对黄瓜花叶病毒引起的辣椒花叶病治疗作用初步研究[J]. 植物病理学报, 1989, 19(2): 123-128.
- [9] 丁群, 费菁, 李重九. 大黄、板蓝根中有效成分对植物病毒病的防治作用[J]. 北京大学学报, 1992, 18(3): 298.
- [10] 刘学端, 朱宏志, 何昆, 等. 植物源农药防治烟草花叶病试验[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26: 193-195.
- [11] 张树生, 胡蕾, 刘忠良, 等. 植物体内抗病相关酶与抗病性的关系[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(13): 48-49.
- [12] AVIJIT R, BRLANSKY R H. Population dynamics of a Florida *Citrus tristeza* virus isolate and aphid-transmitted subisolates; identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission[J]. Virology, 2009, 99(11): 1297-1306.
- [13] TAKAO I, HIROYUKI I, KATSUMI O. Simultaneous detection of six citrus viroids and apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction[J]. Journal of Virological Methods, 2002, 106: 235-239.
- [14] LU R, FOLOMONOV A, SHINTAKU M. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 202 kb viral RNA genome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 15742-15747.
- [15] CHELLAPPAN P, ANITHARANI V R, OGBE F. Effect of temperature on geminivirus induced RNA silencing in plant[J]. Plant Physiology, 2005, 138: 1828-1841.
- [16] 阮小蕾, 王加峰, 李华平. VIGS介导的转复制酶基因番木瓜对 PRSV 的抗性[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 418-422.

Eradicating double infected pathogen of CTV and CTLV in *Citrus*

QIAO Fen QI Peng-zhi FU Hui ZHANG Peng WU Shan JIANG Ling

*College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University/
National Indoor Conservation Center of Virus-free Gemplasm of Fruit Crops/
Ministry of Education Key Laboratory of Plant Biology, Wuhan 430070, China*

Abstract A new method for eradicating the double infected pathogen of CTV and CTLV in citrus was explored in this experiment. The citrus plants were selected from those conserved in net greenhouse of National Indoor Conservation Center of Virus-free Germplasm of Fruit Crops, Huazhong Agricultural University. The infection of pathogen was detected with reverse transcripts PCR (RT-PCR). Results showed that the suitable protocol was using the treatment of the antiviral medicament with Chinese medicines (eight times) and combined with heat treatment of the highest temperature at 40 °C during the day(6 h/d), the temperature at 25 °C in the evening kept for fifty days in the PC made greenhouse. The protocol mentioned above was proved to completely eradicate double infected pathogen of CTV and CTLV; Furthermore, the combined treatment of shoot-tip grafting and the antiviral Chinese medicines was identified 85.7% eradication of the double pathogen. In above experiments, the leaves were sampled at 1, 3, 5, 7, 9 d after the Chinese medicines treatment. The results showed that the activity of the resistance related enzymes PPO, POD, SOD were increased compared with the control.

Key words Chinese medicines; heat treatment; shoot-tip grafting (STG); complex infected; pathogen; RT-PCR

(责任编辑:张志钰)