病毒学杂志 3，1987
Virologica Sinica

柑桔传染性杂色花叶病（CVV）的茎尖嫁接脱毒*

郭志勇

（广东农业科学院果树研究所，广州）

A. Starrantino　　M. Davino

（意大利柑桔研究所，意大利）　（意大利Catania大学植物病理研究所，意大利）

提　要

通过茎尖嫁接，使4个被传染性杂色花叶病（CVV）侵染的柑桔品种脱毒。试验结果表明，ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）检测比指示植物接种诊断更为灵敏、快速。茎尖嫁接前，利用6-苄氨基嘌呤（BAP）或2.4-D处理茎尖和砧木切口，嫁接成活率可达86%--90%。

柑桔传染性杂色花叶病CVV（Citrus infectious variegation virus）为球状病毒，直径24—32毫微米，已报道有几种毒系[6]。被侵染的柑桔树表现皱叶，叶片窄长，叶缘不规则，甚至严重扭曲（见图1）；嫩叶尖弯曲，出现褪绿黄色污斑（见图2）或针孔状斑点，影响树势和产量。此病分布于全世界主要柑桔产区[3]。

1972年Murashige等设计了茎尖嫁接使柑桔病株脱去病毒的方案[7]后，1973年意大利Russo和Starrantino[9]也开始这方面的研究工作。

1983年Davino[5]利用ELISA普查证明意大利有9个栽培品种被CVV侵染，约70%的柠檬供试树带CVV病毒。本试验旨在利用茎尖嫁接法使这些带毒品种脱毒，试验过程使用ELISA方法快速鉴定脱毒效应。并探讨利用植物生长调节剂处理对茎尖嫁接成活率的影响。

材料与方法

（1）**茎尖嫁接**　1. 培育黄化砧木苗　本试验采用“特洛亚”枳橙 Citrange “Troyer”（*Citrus sinensis* L. Osb. × *Poncirus trifoliata* Raf.）作砧木。剥除

本文1986年6月13日收到。
*本文承华南农业大学范怀忠教授审阅，并提出宝贵意见，谨致谢意。
本试验于1984年7月至1985年11月在意大利柑桔研究所和Catania大学植物病理研究所进行。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

"特洛亚"枳橙种子的种皮，在25%次氯酸钠溶液（商品ACE的稀释浓度）中表面消毒15分钟，再用无菌水清洗三次。放入盛有M.S.琼脂培养基的培养管中（培养基含琼脂0.7%，pH5.7，经121°C高温灭菌20分钟）。然后，放在27°C暗室中培养15—20天，长出上胚轴约3厘米的黄化苗备用。

2.嫁接　在温室取经ELISA和指示植物诊断证明带CVV病毒的柑桔新梢（供试品种有"Adamo"柠檬、普通"Femminello"柠檬、"Femminello S. Teresa"柠檬、"Palermitano"柠檬和普通克里曼丁桔）。除去叶片，保留生长点，在10%次氯酸钠溶液（商品ACE的稀释浓度）中表面消毒15分钟，用无菌水清洗三次。

在双目解剖镜下，用解剖刀切除"特洛亚"枳橙黄化苗的顶芽和子叶，保留1.5—2厘米上胚轴，顶部切成倒T字形缺口。再用微型解剖刀切取已表面消毒的接穗生长点0.1—0.25毫米，移至倒T字型缺口上，使两者伤口接合。嫁接后，幼苗放入盛有M.S.液体培养基的25×150毫米培养管中（M.S.液体培养基除M.S.基本盐类外，还含肌醇100毫克/升，尼克酸1毫克/升，盐酸硫胺素0.2毫克/升，盐醇吡啶醇1毫克/升。蔗糖浓度8%）。培养管用胶膜密封，置于每天在1000 Lux下光照16小时，黑暗8小时，温度27°C±1°C的人工气候箱中培养。

3.温室移栽　为增强茎尖嫁接苗在移出试管后对环境的适应性，将在人工气候箱培养约45天并已长出三片叶时的幼苗的光照强度提高到2000 Lux。一周后，再提高至3000Lux一周。取出茎尖嫁接苗，切取茎上部（保留"特洛亚"砧木茎的一小部分）嫁接于1年半树龄的酸橙上，在25°C温室中培养。约4个月后，可取样品用ELISA或指示植物鉴定。

（2）**植物生长调节剂处理**　在上述茎尖嫁接过程中，还进行植物生长调节剂处理对茎尖嫁接成活率的影响的试验。处理方式，所使用的植物生长调节剂及浓度是：

1.处理方式：

1）嫁接前，用植物生长调节剂浸泡未切茎尖前的接穗10分钟；

2）嫁接前，用植物生长调节剂浸泡"Troyer"黄化砧木苗的切口10分钟；

3）嫁接前，利用植物生长调节剂浸泡未切茎尖前的接穗和"Troyer"黄化砧木苗的切口10分钟。

2.植物生长调节剂及使用浓度：

1）BAP（6-苄氨基嘌呤）0.5ppm或1 ppm；

2）2.4-D　10ppm或20ppm；

3）NAA（α-萘乙酸）0.5ppm或1 ppm。

试验以普通的茎尖嫁接方法作对照。嫁接2个月后，检查嫁接成活率。

（3）**ELISA检测**　1.抗血清来源　本试验所用CVV抗血清由美国佛罗里达园艺研究实验室S.M.Garnsey博士提供。

2.血清纯化γ-球旦白和酶结合γ-球旦白的制备方法　按Davino和Garnsey的方法[4]进行。借助饱和硫酸铵溶液使抗血清析出沉淀物，并经过0-（二乙胺基乙基）-纤维素柱（DEAE-cellulose）纯化得γ-球旦白。碱性磷酸酶（Sigma-type Ⅶ）和γ-球蛋白按2：1的比例，透析结合成酶结合γ-球蛋白。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.微皿板法ELISA检测试验

试验程序按 Bar-Joseph 等（1980）的柑桔衰退病（CTV）微皿法ELISA 检测之步骤[1]进行。每样品设二次重复。每微皿板设有健株抽提液、病株抽提液和缓冲液3种对照。

微皿板每小孔加200微升γ-球蛋白溶液（γ-球旦白：包被缓冲液＝1：1000），放在37°C恒温箱中5小时。清洗未吸附包被的抗体3次，每次5分钟。

每小孔加200微升试样抽提液〔剪取茎尖嫁接苗（移出培养管约4个月）的嫩叶和嫩树皮2克，加5毫升抽提缓冲液，经高速搅碎机搅碎，得样品抽提液〕，置于6°C，16小时。清洗未作用的抗原3次，每次5分钟。

每小孔加200微升酶结合γ-球蛋白溶液（酶结合γ-球蛋白：*conjugate*缓冲液＝1：1000），置于30°C，5小时。清洗未作用酶标抗体3次，每次5分钟。

每小孔加250微升显色培养基溶液〔每毫升培养基缓冲液加0.6—0.8毫克P-硝基苯磷酸二钠（Sigma 104—105）〕。在室温下，静置15—30分钟。加50微升3 mol/L NaOH终止反应。用波长405nm分光光度计测定，对照液为含P-硝基苯磷酸二钠的培养基。如样品测光密度为对照的二倍以上时，定为阳性反应。

（4）**指示植物诊断** 用“Femminello messina”柠檬珠心系作指示植物，切取茎尖嫁接苗树皮碎片，每株指示植物接种3—5块树皮碎片，截顶。每株茎尖嫁接苗用3株指示植物作诊断。在22—25°C温室中，约3个月后，每周检查一次结果。

试验结果

1.试验结果（见表1）表明，所有茎尖嫁接成活株的总脱毒率为66%。带侵染性杂色花叶病毒的5个柑桔供试品种，其中“Adamo”柠檬、普通“Femminello”柠檬、“Palermitano”柠檬和普通克里曼丁桔经茎尖嫁接获得脱毒。而“Femminello S. Teresa”柠檬却尚未脱毒。

2.病毒诊断过程中，经指示植物诊断表现阳性反应的材料，在ELISA检测时均表现阳性。但ELISA检测表现为阳性的材料，在指示植物上却不一定表现诊断症状（见表1）。

3.三种植物生长调节剂不同处理方式对茎尖嫁接成活率影响的试验结果（见表2）表明，生长调节剂只处理接穗或只处理砧木切口的茎尖嫁接成活率都低于同时处理接穗和砧木切口的嫁接成活率。嫁接前，利用6-苄氨基嘌呤0.5 ppm或2.4-D 10 ppm处理砧木切口和未切茎尖前的接穗10分钟，嫁接成活率分别为90%和85%，约为对照的二倍。利用α-萘乙酸处理的效果不佳，主要原因在于α-萘乙酸处理后，刺激砧木切口形成大量愈伤组织，复盖尚未发育的茎尖。

讨论

意大利的柠檬产量居世界第一位，但几乎所有的老系树均被侵染性杂色花叶病侵染，造成减产，影响果实品质，是生产中的一个突出的问题[2]。本试验通过茎尖嫁接所

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

获得的脱毒材料，可作为无CVV繁殖材料进入母本园。

试验结果还表明，ELISA检测较指示植物诊断更为灵敏、快速。ELISA检测过程除纯化γ-球蛋白和酶结合γ-球蛋白的制备外，一般只需2天就可完成60个样品的检测。尤其是用于茎尖嫁接脱毒效应的检测更加准确可靠，还能较大幅度地缩短茎尖嫁接苗进入母本园的时间。

通常，柑桔茎尖嫁接成活率为30—50%[8]，一些较微小的茎尖很难成活，而本试验在嫁接前，先利用6-苄氨基嘌呤或2.4-D处理接穗和砧木切口，嫁接成活率可提高到85—90%。尤其是较微小的茎尖更容易成活，脱毒可能性更大。

表1. 各品种茎尖嫁接脱毒（CVV）情况

Table 1. Elimination of CVV from different varieties by shoot-tip grafting

供试品种 Varieties tested	茎尖嫁接成活株数 Survival plants of shoot-tip grafting	ELISA试验阳性反应株数 Positive-reaction plants in ELISA	指示植物诊断阳性反应株数 Positive-reaction plants by indicator plants	脱毒株数 CVV-free plants
普通"Femminello"柠檬 *L.femminello* comune	16	5	2	11
"Femminello S. Teresa"柠檬 *L.femminello* S. Teresa	7	5	3	0
"Adamo"柠檬 *L.adamo*	20	8	5	12
"Palermitano"柠檬 *L. Palermitano*	7	2	0	5
普通克里曼丁桔 Clementine comune	30	7	4	23

表2. 植物生长调节剂处理对柑桔茎尖嫁接成活率的影响

Table 2. Influence of the treatment with plant growth regulators on the survival rate of citrus shoot-tip grafting

植物生长调节剂 Plant growth regulators	使用浓度 concentration (ppm)	处理接穗和砧木切口 Treatment of scions and rootstock cuts			处理接穗 Treatment of scions			处理砧木 Treatment of rootstock cuts		
		嫁接株数 Grafted plants	成活株数 Survival plants	成活率(%) Survival rate (%)	嫁接株数 Grafted plants	成活株数 Survival plants	成活率(%) Survival rate (%)	嫁接株数 Grafted plants	成活株数 Survival plants	成活率(%) Survival rate (%)
6-苄氨基嘌呤 BAP	0.5	60	54	90.0	60	39	65.0	60	31	51.7
	1	60	46	76.7	60	34	56.7	60	32	53.3
2.4—D	10	60	51	85.0	60	45	75.0	60	34	56.7
	20	60	40	66.7	60	33	55.0	60	29	48.3
α—萘乙酸 NAA	0.5	60	30	50.0	60	24	40.0	60	22	36.7
	1	60	29	48.3	60	25	41.7	60	22	36.7
空白对照 CK		60	26	43.3						

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图1. 被 CVV 侵染的病叶表现皱叶。
Fig.1. Crinkling of the leaves infected with CVV.

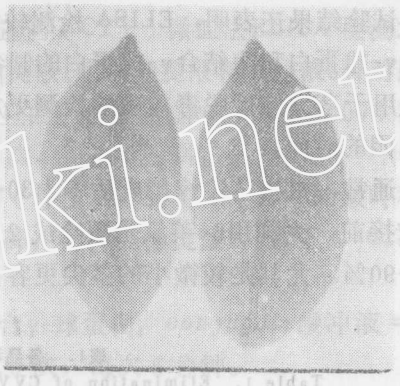

图2. 被CVV 侵染的病叶表现黄色污斑。
Fig.2. Translucent yellow flecks of leaves infected with CVV.

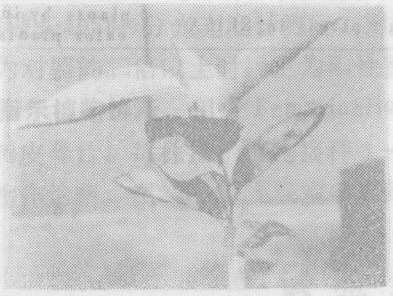

图3. 通过茎尖嫁接获得的脱毒柑桔苗。
Fig.3. The healthy plant were freed from CVV by shoot-tip grafting.

参 考 文 献

[1] Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Purcifull, D., 1980, Detection of citrus tristeza virus: I. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and SDS-immunodiffusion methods. In: *Proc. 8th Conf. IOCV, California, Riverside*: 1-8

[2] Cartia, G., Davino, M., 1983, L'informatori agrario. (6): 26557-26623.

[3] Catara, A., 1984, Informatore Fitopatologico, (3): 15-35.

[4] Davino, M. and Garnsey, S.M., 1984, Purification, Characterization and serology of a mild strain of citrus infections variegation virus from Florida. In: *Proc. 9th conf. IOCV, Riverside*: 196-203.

[5] Davino, M. and Rosa, La Rosa., 1984, Indagini sulla diffusione del virus della variegatura infctiva degli agrumi, Giornate Fitopatologiche, sorrento 26-29 marzo, 257-264.

[6] Garnsey, S.M., Baksh, N., Davino, M. and Agostini, J. P., 1984, A mild isolate of citrus variegation virus found in Florida citrus, In: *Proc. 9th Conf. IOCV. Riverside*: 188-195.

[7] Murnshige, T., Bitters, W.P. Rangan, T.S., Nauer, E.M., Roistacher, C.N. and Holliday, P.B., 1972, *Hort. Science* 7: 118-119.

[8] Navarro, L., Roistacher, C. N. and Murashige, T. 1975, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100 (5): 471-479.

[9] Russo, F. and Starrantino, A., 1973, *Ann. Ist. Sper. Agrume* 6: 209-222.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ELIMINATION OF CITRUS INFECTIOUS VARIEGATION VIRUS (CVV) BY SHOOT-TIP GRAFTING IN VITRO

Guo Zhi-yong
(*The Fruit Tree Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou*)

A. Starrantino
(*Experiment Institute of Citrus Culture, Italy*)

M. Davino
(*Institute of Plant Pathology, University of Catania, Italy*)

Four varieties of citrus infected with Citrus Infectious Variegation Virus (CVV) were freed from the virus by shoot-tip grafting in vitro. The tests carried out by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were faster and more sensitive than those made by graft-inoculation to indicator plants. The survival rate of grafting was up to 85-90% if shoot-tip and cut of rootstock were treated with 6-benylaminopurine (BAP) or 2,4-D before grafting.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net