

仙客来种子带毒率及其脱毒方法的研究

周履谦 夏秀琴 孙富林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武昌)

Study on Percentage of Virus in Seed of *Cyclamen persicum* and its Removing Method

Zhou Lu-qian Xia Xiu-qin Sun Fu-lin

(Wuhan Institute of Virology, Academic Sisica, Wuhan)

仙客来 (*Cyclamen persicum* will) 是一种重要花卉, 是圣诞节和春节期间人们喜爱的观赏盆花。近年来, 因病害而严重影响观赏和出口。自西德1977年报道仙客来病毒病以来, 国内外未见报道^[1]。在国内, 我们于1982年首次从仙客来病株中分离出病毒^[2], 经鉴定为黄瓜花叶病毒^[3]。为了改良品种, 有关部门不断从国外引进仙客来种子, 因此有必要对种子进行检疫以防病毒扩散。本文报道仙客来种子的带毒率及其脱毒方法。

材料与方法

(一) 材料: 仙客来种子由天津市园林绿化研究所提供。黄瓜花叶病毒抗血清由中国农业科学院油料作物研究所提供。辣根过氧化酶标记羊抗兔结合物为市售。

(二) 仙客来种子脱毒方法: 取仙客来种子经75%酒精浸泡1分钟, 0.1%升汞浸泡1.5分钟, 10%磷酸三钠浸泡15分钟, 取出后经蒸馏水冲洗, 置35℃水中孵育24小时, 然后播种在无菌土中。

(三) 检测病毒采用ELISA间接法^[4]

1. 在塑料微孔板上, 每孔加仙客来种子提取液200微升, 用阴性血清作阴性对照; 37℃孵育2小时, 于4℃冰箱过夜, 然后用pH7.4P.B.S-吐温20洗涤液洗3次, 每次5分钟。

2. 1毫升保温液加50微升黄瓜花叶病毒抗血清, 摆匀。在微孔板上, 每孔加稀释血清200微升, 37℃孵育2小时, 用上述洗涤液洗3次, 每次5分钟。

3. 每瓶辣根过氧化酶标记羊抗兔结合物, 加双蒸水0.5毫升, 加保温液24.5毫升, 摆匀。在微孔板上, 每孔加稀释结合物200微升, 37℃孵育2小时, 用上述洗涤液洗3次, 每次5分钟。

本文于1987年7月3日收到。

4. 在微孔板上，每孔加邻苯二胺底物溶液200微升，于室温下，反应20分钟，呈微黄色后，加2mol/L H₂SO₄50微升以终止反应。用GXM—201型酶标光度计在波长492毫微米处测OD值。

结果判断：

当P/N≥2.1时为阳性结果。P代表待测样品OD值。N代表阴性样品OD值。

结 果 与 讨 论

(一) 黄瓜花叶病毒抗血清的最适浓度：固定样品提取液的浓度和酶标记抗体的浓度，用阳性和阴性样品在492毫微米处吸收值之比最高、差距最大的方法，得出黄瓜花叶病毒抗血清的最适浓度为5微克/毫升。

(二) 酶标记抗体的最适浓度：固定样品的浓度和黄瓜花叶病毒抗血清的浓度，用上述同样方法，得出酶标记抗体的最适浓度为4.5微克/毫升。

(三) 用ELISA间接法检测脱毒与未脱毒仙客来种子的结果见表1。

表 1 ELISA 检测结果
Table 1 Effect of the experiment of ELISA

实验处理	测定种子数(粒)	不带毒数(粒)	带毒数(粒)	带毒率(%)	脱毒率(%)
未脱毒种子	100	14	86	86	
已脱毒种子	100	78	22	22	74.4

注：脱毒率(%) = $\frac{\text{未脱毒种子(带毒数)} - \text{已脱毒种子(带毒数)}}{\text{未脱毒种子(带毒数)}} \times 100\%$

从上述结果说明，仙客来种子带有黄瓜花叶病毒，其带毒率为86%。为了不使病毒广泛传播。国家在进口种子时，一定加强检疫，及时处理，以防后患。

仙客来种子的脱毒方法，经实验证明是有效的，其脱毒率为74.4%。本方法经济有效，便于推广。

植物病毒病难于防治，用种子脱毒技术，虽在一定程度上可以解决仙客来病毒病的防治问题，但为了更有效的对该病毒进行综合防治，应与媒介蚜虫控制以及营养管理等其他措施配合。

我们建议在有条件的地方建立仙客来种苗繁育中心，提高仙客来品质，以满足社会和花圃的需求。

参 考 文 献

- [1] 张健如, 沈淑琳等, 1984, 花卉病毒鉴定手册, p79。
- [2] 孙富林, 周履谦等, 1983, 自然, 6(10): 799—800。
- [3] 周履谦, 孙富林等, 1986, 病毒学杂志, 1(2): 50—53。
- [4] Van-Regenmortel, M.H.V., 1982, Serology and Immunochimistry of plant Viruses, Academic press Inc; p82—97。