

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2021.02.003

口岸植物检疫脱毒处理技术研究进展

张丽杰¹, 刘娟², 郑春生^{1*}, 王妮辰², 姜涛², 魏亚东²

¹中国海关科学技术研究中心, 北京 100026; ²天津海关动植物与食品检测中心, 天津 300461

摘要: 植物病毒影响植物的生长和发育, 尤其是植物病毒的传染性及其增殖性对一种或者一类植物的危害巨大。为了防范植物病毒随寄主贸易跨境传播危害, 本文阐述了茎尖培养脱毒、热处理脱毒、热处理结合茎尖脱毒、离体微型嫁接、化学处理结合茎尖脱毒和低温疗法等脱毒技术, 对应用于口岸检疫性病毒的不同脱毒方法进行了综述和分析, 同时对今后植物检疫脱毒研究方向进行了展望。

关键词: 植物病毒; 脱毒处理; 口岸



开放科学标识码
(OSID 码)

Advances on plant quarantine virus elimination research at port

ZHANG Lijie¹, LIU Juan², ZHENG Chunsheng^{1*}, WANG Weichen², JIANG Tao², WEI Yadong²

¹Science and Technical Research Center of China Customs, Beijing 100026, China;

²Animals, Plants and Food Testing Center of Tianjin Customs District of P. R. China, Tianjin 300461, China

Abstract: Plant viruses affect the growth and development of plants. The strength of infectivity and proliferation of plant viruses can vary among plant species. To prevent the spread of plant virus along with imported host, this paper describes basic techniques for obtaining virus-free plants, including meristem tip culture, heat treatment, heat treatment combined with meristem tip, micro-grafting *in vitro*, chemical treatment combined with meristem tip, and chemotherapy. Virus-free plant techniques were tested at entry port.

Key words: plant virus; virus-free plants; port

随着世界贸易的不断发展,我国深度参与到频繁的国际农业贸易中,如种苗、花卉、水果、蔬菜等植物及其产品的贸易往来和世界园艺博览会等园艺展览活动。上述农业贸易的发展,在带动国内农业产业发展的同时,也极大地提升了包括植物病毒在内的有害生物的传入风险。经中国检验检疫科学研究院动植物检疫信息资源共享服务平台(<http://info.apqchina.org/>)查询,近年来我国多次在进境植物及其产品中检出检疫性病毒,例如:2017年2月,天津口岸首次在澳大利亚进境的燕麦 *Avena sativa* L.干草中检出小麦线条花叶病毒(*Wheat streak mosaic virus*, WSMV);2017年5月,福州口岸首次从荷兰进境花卉种球中检出虎眼万年青花叶病毒(*Ornithogalum mosaic virus*, OrMV);同年12月,厦门口岸首次从旅客进境携带的行李中截获了携带

朱顶红花叶病毒(*Hippeastrum mosaic virus*, HiMV)和尼润潜隐病毒(*Nerine latent virus*, NeLV)的花卉种子。仅2017、2018年,我国进境植物及其产品检出检疫性病毒近600余批次,植物病毒疫情高发严重威胁我国生物安全。

目前,由于缺乏有效的病毒脱除技术,口岸对截获的携带检疫性病毒的货物一般做退运或销毁处理。但是,实际工作中,对于价值较高的货物或从国外引进的一些稀有种质资源、优质种苗在发现携带病毒后直接销毁处理,不管从经济价值还是科研应用价值考虑都不够理想,不能满足行业发展的需要。因此,研究植物检疫脱毒处理技术,在保证我国生物安全的前提下,将更多的优质种质资源和植物及其产品引入国内,对于促进我国经济贸易和种业生态多样化发展具有重要意义。本文对现有

收稿日期(Received): 2020-10-14 接受日期(Accepted): 2020-12-29

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFF0210204)

作者简介: 张丽杰,女,高级农艺师。研究方向: 植物检疫。E-mail: zhanglijie8820@163.com

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: subflee@126.com

的植物病毒脱毒技术进行了简要介绍,重点对不同种类货物可采用的检疫脱毒处理技术进行总结,以期植物检疫脱毒处理技术的研究与应用提供相关依据。

1 植物脱毒处理技术概述

植物脱毒处理是指应用物理、化学、生物学等方法,去除植物所感染的病毒,使之无害化的过程(国家认证认可监督管理委员会,2010)。目前,常用的植物脱毒处理的方法包括茎尖培养脱毒、热处理脱毒、化学处理脱毒、低温疗法脱毒、其他脱毒处理和组合技术应用。

1.1 茎尖培养脱毒

植物茎尖脱毒是利用病毒在植物茎尖或生长点分布含量最低或者几乎无病毒的现象,通过切取茎尖组织进行培养得到无病毒苗的方法。其原理是:病毒的复制和传播需借助维管束和胞间连丝,然而维管束一般存在于植物茎、叶等器官中,茎尖中只有胞间连丝,病毒被复制的速度远低于细胞生长速度,且大多数病毒还需要借助运动蛋白来对细胞之间连丝进行修饰,才可能使病毒核酸顺利通过,因此该区域不可能带有病毒(朱新生和朱玉贤,1997),可利用这种方法进行茎尖培养脱毒。

1.2 热处理脱毒

热处理脱毒是利用病毒对高温的忍耐性和敏感性差异,通过一段时间的高温处理,达到杀灭病毒的方法。热处理脱毒技术的原理是:高温可以断裂病毒的 RNA,使病毒颗粒钝化;病毒内部酶的裂解造成病毒颗粒破坏;一些辅助酶,如特定的 RNA 聚合酶的钝化导致病毒 RNA 停止合成;在高温下,病毒外壳蛋白构型发生变化,病毒包装受阻(詹康英,2018)。

1.3 化学处理脱毒

化学处理脱毒法是指将相应的抗病毒药剂添加于培养基(培养基中为茎尖外植体离体培养环境)中,得到无病毒苗的方法。其原理是:抗病毒药剂在三磷酸状态下会阻止病毒 RNA 帽子结构形成,同时抑制病毒核酸合成,从而抑制病毒复制,达到除去病毒的目的(王超,2014)。许多化学药品(包括嘌呤、嘧啶类似物、氨基酸和抗菌素等)对离体组织和原生质体具有脱毒效果,如三氮唑核苷(病毒唑)、5-二氢尿嘧啶(DHT)、双乙酰-氢-5-氮尿嘧啶(DA-DHT)、8-氮鸟嘌呤、2-硫脲嘧啶、放线菌

素、庆大霉素、碱性孔雀绿及环乙酰胺等。

1.4 低温疗法脱毒

低温疗法脱毒技术是指将植物的细胞、组织或器官置于极低温度条件下(通常用液氮, -196°C)的保存技术(Bustam *et al.*, 2016)。其原理是:基于超低温保存对细胞的选择性破坏,将组织培养和病毒检测技术相结合以达到脱毒的目的。从理论上来说,超低温处理条件下,易感染病毒的大细胞内含水量较大,处理过程中易受冷冻危害死亡,而顶部分生组织水分较少,细胞质地浓,小茎尖容易成活,分化成小芽,长成脱毒苗(赵习武等,2013),这样处理后可得到无毒的植物苗。

1.5 其他脱毒处理方法

除上述几种脱毒处理方法外,目前的植物脱毒处理方法还包括离体微型嫁接、雾化脱毒、基因抗病毒方法等。离体微型嫁接是在超净工作台上将植物的茎尖切取下来嫁接到组培砧木上,以达到脱除病毒的方法(张卉等,2003)。雾化脱毒是将植物根系组织放置在避光的容器里,通过雾化营养液对其定期喷洒,植物根系可以借此获得营养,满足生长过程中所需的营养和水分,脱去病毒。基因抗病毒是对病毒进行基因介导抗性。Liu *et al.* (2007)将6个侵染核果类病毒李痘病毒(*Plum pox virus*, PPV)、李矮缩病毒(*Prune dwarf virus*, PDV)、李属坏死环斑病毒(*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV)、番茄环斑病毒(*Tomato ringspot virus*, ToRSV)、美国李线纹病毒(*American plum line pattern virus*, APLPV)、桃花叶病毒(*Peach mosaic virus*, PMV)的部分片段融合为400~500 bp大小的嵌合基因,构建RNAi载体,接种转基因本生烟 *Nicotiana benthamiana* 植株后获得PDV、PPV和ToRSV抗性转基因株系。

1.6 组合技术脱毒

根据植物感染病毒种、寄主耐受性以及病毒浓度等,使用多种脱毒技术组合的方法进行植物脱毒。组合技术脱毒主要采用茎尖培养与其他脱毒技术组合的方式,如热处理结合茎尖培养脱毒,热处理脱毒周期长,脱毒率较低,而茎尖培养脱毒效果好,但植株或繁殖材料存活率较低,将2种脱毒方法相结合以达到更好的脱毒效果。此外,化学药剂结合茎尖培养、热处理脱毒技术,不但可以降低茎尖培养的难度,还可以降低化学药剂的浓度或减

少化学药剂的使用。

2 进境植物及产品的检疫脱毒主要技术应用

根据我国进境的植物及其产品主要种类及其可能传带的检疫性病毒,本文归纳总结了不同种类货物检疫性病毒的脱毒处理技术,旨在为口岸植物病毒的脱毒处理提供参考。

2.1 种球及苗木

我国为花卉种球进口大国,主要进口的花卉种球有郁金香 *Tulipa gesneriana* L.、百合 *Lilium brownii* var. *viridulum* Baker、水仙 *Narcissus* spp.、风信子 *Hyacinthus orientalis* L.等。此外,还进口苹果 *Malus pumila* Mill.、葡萄 *Vitis vinifera* L.树苗等多种苗木。种球和苗木可传带多种检疫性病毒,如果没有有效的检疫脱毒处理技术,将严重影响种苗的扩繁和相关种植业的发展。目前,国内外对种球和苗木中传带的检疫性病毒,主要采用热处理结合茎尖培养组合处理方法,该方法可有效脱除此类货物中传带的检疫性病毒,得到无病毒种苗,用于扩繁和种植。

高慧卿等(2010)将携带百合无症病毒(*Lily symptomless virus*, LSV)的百合切去0.2~0.5 mm茎尖进行组织培养,结果发现,单独进行茎尖培养与30 min热处理后进行茎尖培养比较,脱毒率由63.89%提高到74.65%。刘博(2009)采用剥茎尖(约2 mm)结合高温变温(白天38℃、10 h,夜间32℃、14 h)对东方百合“Tiber”携带LSV商品球进行全暗培养,持续处理一个月后,脱毒率达100%。郑荔丹等(2018)研究证明,对蝴蝶兰 *Phalaenopsis aphrodite* Rchb. f.中的齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV),采用热处理和茎尖培养相结合的方法进行无病毒苗木的培育,所取茎尖大小一般为0.5~2.0 mm,热处理结合茎尖培养可将脱毒率提高30%~40%。

Zhao et al.(2018)使用茎尖培养脱毒技术对苹果茎沟病毒(*Apple stem grooving virus*, ASGV)进行脱毒,发现在1.5 mm的茎尖内,含有4~5个叶原基的茎尖成活率能达到100%。研究表明,将离体的苹果试管苗在恒温39℃热处理6 d后,切取一定大小的茎尖培养,可完全脱出“Idared”苹果中的病毒(Papstein et al., 2008)。将“金冠”“红星”和“国光”3个苹果品种在(37±1)℃条件下恒温热处理,15~28 d后进行茎尖培养,苹果茎痘病毒(*Apple stem pitting virus*, ASPV)、ASGV和苹果褪绿叶斑病

毒(*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV)脱除率达100%(Papstein et al., 2009; Paunovic & Jevremovic, 2006)。

2.2 植物种子

我国每年大量进口各类植物种子,包括如黄瓜 *Cucumis sativus* L.、甜菜 *Beta vulgaris* L.、菠菜 *Spinacia oleracea* L.、辣椒 *Capsicum annuum* L.、苦瓜 *Momordica charantia* L.、萝卜 *Raphanus sativus* L.、芫荽 *Coriandrum sativum* L.、胡萝卜 *Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm.、番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill.、生菜 *Lactuca sativa* L. var. *ramosa* Hort.等蔬菜种子以及草种、花种,部分种子中也检出多种病毒,如从印度尼西亚辣椒种子中截获ToRSV,从俄罗斯进境的黄瓜种子中截获黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV),从意大利和丹麦进境的菠菜种子中截获藜草花叶病毒(*Sowbane mosaic Sobemovirus*, SoMV)。目前,蔬菜种子中含有的检疫性病毒可采用化学药剂处理结合茎尖培养方式进行脱毒处理,得到无毒种子。该方法在口岸种子脱毒中的应用目前还未见报道。

早在20世纪20年代Duggar & Armstrong(1925)就从商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb中得到了具有抗烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)的活性物质。Schuster et al.(1990)从化学合成的物质中筛选出DHT(2,4-二氧六氢-1,3,5-三嗪)能够对马铃薯X病毒(*Potato virus X*, PVX)、马铃薯Y病毒(*Potato virus Y*, PVY)、马铃薯A病毒(*Potato virus A*, PVA)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)和烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)有一定的抑制作用。曲岐凡等(1999)进一步研究发现,合成的1,3,5-三(氯乙酸)-三乙基DHT的酯类化合物,对TMV的抑制率可达90%。谢嘉华和袁建军(2002)证明,三氮唑核苷对CMV、PVX、TMV等多种病毒生长具有抑制作用,用添加三氮唑核苷的培养基培养带毒植株一段时间后,取萌发的顶芽移植到不含三氮唑核苷的培养基中继代培养,可增加产生无病毒后代植株的百分率。目前,应用于植物病毒病的新药剂还包括植病灵乳剂,其对小麦 *Triticum aestivum* L.、蔬菜及烟草的花叶病 *Chrysanthemum virus B*、蕨菜病有良好的抑制效果,对番茄花叶病和矮缩病的抑制率在85%以

上。83 增抗剂能降低病毒在植物体内的扩散速度。弱毒疫苗 N14 和卫星核糖核酸 S52 能够抑制花叶病毒。此外,结合口岸实际处理情况,应用于热处理方式脱除种子病毒的研究较多,效果更为理想。

2.3 粮谷等大宗散货

粮谷、饲草等大宗散货是植物病毒传带的主要载体,在进境饲草中检出小麦线条花叶病毒(*Wheat streak mosaic virus*, WSMV),我国口岸在进境大豆中检出菜豆荚斑驳病毒(*Bean pod mottle virus*, BPMV)等。

除借助接穗、种子或块茎间摩擦传染外,植物病毒主要通过节肢动物、线虫、真菌在寄主表皮形成伤口的方式进行传播。数据表明,在 700 多种植物病毒中,76% 的病毒被证明或怀疑是由节肢动物、线虫或真菌传播,这些植物病毒有 1/4 侵染植物并可造成生物学上的病害(Francki *et al.*, 1991)。由于传毒介体具有自主移动性,因此,它比寄主植物具有更强的传毒能力。

在口岸植物检验检疫中,应考虑来自检疫性病毒高发地区的进境寄主植物。进境检疫时未检出病毒,但是检出了易传播病毒的介体生物,应对其进行检疫处理,以防止检疫性病毒在我国境内传播、扩散。我国 32 种进境植物检疫性病毒中,能够传毒的介体类群主要包括昆虫(23 种病毒)、螨(2 种病毒)、线虫(8 种病毒)和真菌(3 种病毒),其中以昆虫(蚜虫、粉虱、粉蚧、叶甲和蓟马等)传播的病毒种类数最多(马骏等,2015)。昆虫是传播植物病毒的主要介体,以同翅目类昆虫传毒最多,其中 242 种蚜虫传染病毒,约占介体传播病毒种类的 50%;其次是蓟马类、甲虫类、潜叶蝇、螨类等。

对粮谷、饲草等大宗散货可能传带检疫性病毒的处理,口岸一般采用定点加工和加强后续监管等管理措施进行控制,确保植物病毒疫情无扩散。目前对于此类货物的植物病毒检疫应用最为成熟的是化学处理方法。化学药剂能够实现对病毒的抑制,同时起到杀灭传毒介体昆虫的效果。为防止加工或后续监管过程中的植物病毒随介体昆虫或媒介生物进行远距离传播,对于蚜虫等,可采用化学杀虫剂进行喷杀,对于货物中可能发生的昆虫、螨类等节肢动物可采用化学熏蒸进行处理,防止植物病毒疫情通过传毒介体生物扩散。

3 小结与展望

植物病毒的多样性和传染性对农业、林业及花卉养殖的危害巨大。在我国进境植物检疫性有害生物名录中(中华人民共和国农业农村部,2007),对于病毒和类病毒的规定已达 39 种(截至 2017 年 6 月),口岸检验能够将植物病毒进行拦截,防止病毒进入我国国境。运用适宜的植物脱毒技术对这些病毒进行无害化处理是目前研究的重要方向。

植物脱毒技术的运用,对于减少经济损失,避免带毒植物对我国生态环境产生危害都具有重要意义。研究植物脱毒方法时应结合实际考虑:一是考虑不同病毒的脱毒方法差异,二是考虑对植物本身是否有影响。在目前已应用的脱毒处理方法中,具体选择使用热处理脱毒,还是化学药剂处理脱毒或者其他的脱毒方式,需根据待处理的货物属性来确定。对花卉种苗、水果进行处理时一般采用热处理结合茎尖培养的脱毒方法,效果较好且操作方便;化学药剂、低温疗法与茎尖培养处理相结合也能有效地对一些病毒进行脱除。蔬菜种子的脱毒,可以利用隔离温室培育种苗,然后切取外植体或茎尖添加化学药剂进行脱毒处理。粮谷、饲草类货物的脱毒,考虑到此类货物病毒或者潜在病毒传毒介体的影响,可以采用化学熏蒸和杀虫剂喷杀的方式进行脱毒处理。这些都需要在处理前考虑病毒植株及繁殖材料的抗性及其耐受性。现行检疫处理标准中植物脱毒主要是低温法操作,对其他综合高效脱毒方法的规定较少。

本文通过对不同寄主植物携带的不同病毒进行脱毒技术分析比较,特别是检疫性病毒高发地引进的寄主植物的病毒脱毒技术,为口岸植物病毒的无害化处理工作提供了一些基本参考。笔者认为,即使未检测出病毒,也需对传毒介体进行处理,以保证不携带病毒进入我国境内。随着技术的发展与研究的深入,口岸植物检疫脱毒技术的方法和应用也会进一步创新和完善。

参考文献

- 高慧卿,樊兰瑛,王秀红,高宏樟,2010. 茎尖培养及热处理技术在百合脱毒中的应用研究. 山西农业大学学报(自然科学版), 30(6): 528-532.
- 刘博,2009. 百合、水仙病毒分子检测及脱毒技术研究. 硕士学位论文. 北京:中国农业科学院.

- 马骏, 冯黎霞, 赵立荣, 林莉, 王卫芳, 胡学难, 朱水芳, 何日荣, 武目涛, 2015. 植物检疫性病毒传毒介体的传毒特征及检疫防控策略. *植物检疫*, 29(1): 1-7.
- 曲凡歧, 戴志群, 陈洪, 苏新梅, 肖春华, 1999. 植物病毒病化学防治剂的探寻 XI: 三羧酸乙基 DHT 酯的合成及抗病毒活性. *武汉大学学报(自然科学版)*, 45(2): 143-146.
- 王超, 2014. 苹果品种及砧木脱毒和快繁体系建立. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.
- 谢嘉华, 袁建军, 2002. 中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinese*)的组织培养. *生物学杂志*, 19(3): 30, 36.
- 詹康英, 2018. 欧美杨 107 茎尖脱毒及组培快繁研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.
- 张卉, 赵廷昌, 李景富, 孙福在, 刘学敏, 回文广, 张涛涛, 2003. PCR 技术检测种传植病细菌研究进展. *植物检疫*, 17(6): 358-362.
- 赵习武, 王晨静, 杨丹丹, 郭迪, 陆国权, 2013. 园艺植物脱毒技术方法研究进展. *安徽农业科学*, 41(16): 7074-7076.
- 郑荔丹, 张宏宇, 江曠如, 倪天泽, 胡锐峰, 黄玺, 侯义龙, 2018. 蝴蝶兰脱毒技术研究进展与展望. *分子植物育种*, 16(2): 541-545.
- 中华人民共和国农业农村部, 2007. 中华人民共和国农业部公告第 862 号. (2007-06-20) [2020-09-02]. http://www.moa.gov.cn/nybg/b/2007/dliuq/201806/t20180613_6151927.htm.
- 朱新生, 朱玉贤, 1997. 抗虫植物基因工程研究进展. *植物学报*, 39(3): 282-288.
- 国家认证认可监督管理委员会, 2010. 植物病毒脱除处理规程: SN/T 2485—2010. 北京: 中国标准出版社.
- BUSTAM B M, DIXON K, BUNN E, 2016. A cryopreservation protocol for ex situ, conservation of terrestrial orchids using symbiotic primary and secondary (adventitious) protocorms. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 52(2): 185-195.
- DUGGAR B M, ARMSTRONG J K, 1925. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 12(4): 359-366.
- FRANCKI R I B, FAUQUET C M, KNUDSON D L, BROWN F, 1991. *Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on the taxonomy of viruses*. New York: Springer-Verlag.
- LIU Z R, SCORZA R, HILY J M, SCOTT S W, JAMES D, 2007. Engineering resistance to multiple prunus fruit viruses through expression of chimeric hairpins. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(3): 407-414.
- PAPRŠTEIN F, SEDLÁK J, TALÁCKO L, SVOBODOVÁL, POLÁK J, ZEMAN P, 2009. Elimination of pome fruit viruses by thermotherapy and *in vitro* culture. *Vědecké Práce Ovocnářské*, 21: 109-116.
- PAPRSTEIN F, SEDLAK J, POLAK J, SVOBODOVA L, HASSAN M, BRYXIOVA M, 2008. Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(3): 347-352.
- PAUNOVIC S, JEVREMOVIC D, 2006. Elimination of viruses from the infected apple cv Fuji Naga-Fu 2 by thermotherapy. *Vocarstvo*, 40(3): 189-197.
- SCHUSTER G, VOIGT B, MULLER H, 1990. The influence of a combined treatment with 2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazine (=DHT) and lipophilic fractions from the yeast Candida-maltosa IMET-H 128 on virus symptoms and tuber mass of identical potato eye cutting plants. *Ztschrift Fur Pflanzenkrankhten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, 97(1): 84-86.
- ZHAO L, WANG M R, CUI Z H, CHEN L, VOLK G, WANG Q C, 2018. Combining thermotherapy with cryotherapy for efficient eradication of *Apple stem grooving virus* from infected *in vitro*-cultured apple shoots. *Plant Disease*, 102(8): 1574-1580.

(责任编辑:郑珊珊)