

兰花病毒检测与脱毒技术研究进展

黎文敏, 薛铭, 谢利, 郭和蓉, 张志胜, 曾瑞珍* (华南农业大学林学与风景园林学院, 广东广州 510642)

摘要 兰花病毒病是制约兰花产业发展的重要因素, 其中由建兰花叶病毒(cymbidium mosaic virus, CymMV)和齿兰环斑病毒(odontoglossum ring spot virus, ORSV)引起的病毒病在全球范围内影响广泛且危害严重。目前兰花病毒病尚无特效药可以防治, 加强检疫、及时销毁染病植株以及采用无病毒种苗是病毒病防治的有效措施。因此, 对引起兰花病毒病的主要病毒、病毒检测方法和脱毒技术研究进展进行综述, 以期对兰花脱毒技术的深入研究和脱毒苗工厂化生产提供参考。

关键词 兰花; CymMV; ORSV; 检测方法; 脱毒技术

中图分类号 S436.8 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)03-0008-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.03.002



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress on Technology of Virus Detection and Virus-removing in Orchids

LI Wen-min, XUE Min, XIE Li et al (College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract Orchid virus disease is an important factor restricting the development of orchid industry, among which causing by Cymbidium mosaic virus (CymMV) and Odontoglossum ring spot virus (ORSV) are widespread and harmful orchid virus diseases in the world. At present, there are no chemical pesticides for effective prevention and control of the diseases, therefore, strengthening quarantine of the viruses, destroying infected plants in time and adopting virus-free seedlings for cultivation are effective prevention and control measures in production. Therefore, focuses on advancements on the kinds of orchid viruses identified, the technologies of detection and virus-removing of the main virus in orchid, in order to provide reference for further studying on virus-removing techniques and production of virus-free seedling in orchid.

Key words Orchid; CymMV; ORSV; Detection method; Virus-removing technology

兰花是兰科植物(Orchidaceae)的总称, 约有 763 个属, 28 000 种^[1]。兰花株型优美、花型独特、花期多样, 深受各国人民喜爱, 市场前景广阔。近年来, 随着国内外贸易和种质资源交换的增加以及兰花种植规模的扩大, 兰花病毒病危害日趋严重, 对兰花产业发展构成了严重威胁^[2]。目前, 国内外尚无特效药防治兰花病毒病, 加强检疫、及时销毁染病植株和采用无病毒种苗生产是减少病毒病发生和危害的有效措施^[3-4]。该研究综述侵染兰花的主要病毒、病毒检测方法和脱毒苗生产技术, 对未来脱毒技术的研究和应用进行了讨论, 以期为更好开展兰花脱毒苗生产, 促进兰花产业发展提供参考。

1 侵染兰花的主要病毒

1943 年, 澳大利亚 Magee 首次报道了建兰上的一种“黑病”, 后被证实为建兰花叶病毒(cymbidium mosaic virus, CymMV)引起的病毒病^[5-6]。此后, 国内外关于引起兰花病毒病的病毒种类报道逐渐增多。据 Lee 等^[7]统计, 全球范围内能侵染兰花的病毒有 57 种, 主要包括齿兰环斑病毒(ORSV)、建兰花叶病毒(CymMV)、辣椒褪绿病毒(capsicum chlorosis virus, CaCV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)、凤仙花坏死斑病毒(impatiens necrotic spot virus, INSV)、兰花斑点病毒(orchid fleck virus, OFV)、落葵皱纹花叶病毒(basella rugose mosaic virus, BaRMV)、菜豆黄花叶病毒(bean

yellow mosaic virus, BYMV)、烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)等。

建兰花叶病毒(CymMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)是世界范围内对兰花影响广泛、造成经济损失严重的 2 种兰花病毒^[1,8]。建兰花叶病毒(CymMV)属于马铃薯 X 病毒属(*Potexvirus*), 病毒颗粒呈线状, 能使建兰叶子表面产生褪绿色斑点和局部坏死斑、树兰(*Epidendrum*)产生花叶症, 卡特兰(*Cattleya*)产生局部坏死等^[9]。齿兰环斑病毒(ORSV)属于烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*), 病毒颗粒呈直杆状, 侵染兰花后的主要症状表现为叶子表面出现黄化条纹或不规则褪绿斑块、坏死斑、黑斑等, 黄化部位有时出现凹陷, 有些花朵上产生褪色斑、花朵畸形等^[10]。肖火根等^[11]在感病的墨兰(*Cymbidium sinense*)、文心兰(*Oncidium*)、大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)等兰花样品中检出 CymMV 与 ORSV。丁元明等^[12]从云南省兰花基地可疑感病兰株中检测出 CymMV 和 INSV 复合感染。Sudha 等^[13]在万代兰(*Vanda*)中检测出 CymMV、ORSV、番茄斑点枯萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)和 Poty virus 复合感染。说明多种病毒可以同时侵染兰花, 这种复合感染比单一病毒感染危害更严重, 可导致叶片坏死或产生坏死斑, 花朵畸形或花瓣碎色, 植株矮小、黄化或萎蔫等。

2 兰花病毒检测技术研究进展

病毒检测是兰花脱毒苗生产和病毒病防控的关键环节之一^[14]。早期病毒病诊断采用症状观察法^[15], 目前在兰花生产依然采用该方法初步判别兰花是否感染病毒, 但由于兰花品种多, 症状表现影响因素多, 有时存在隐症及多重感染等现象, 因此该方法较难对侵染病毒进行精确鉴定。为了更快、更准确、更简便地对兰花病毒进行鉴定, 研究者开发出多

基金项目 广州市农业农村局项目(19100210, 20101396); 广东省现代农业产业技术体系花卉创新团队项目(2021KJ1121); 清远市科技计划项目(2021DZX021); 英德市科技计划项目(英科字[2021]19号-10)。

作者简介 黎文敏(1997—), 女, 广西梧州人, 硕士研究生, 研究方向: 花卉遗传育种。* 通信作者, 副研究员, 硕士, 从事花卉遗传育种研究。

收稿日期 2021-09-28

种病毒检测方法(表1),主要包括指示植物法^[16]、电镜观察法^[17]、血清学检测法^[18-20]、分子生物学检测法^[21-23]等。采用

这些方法可以对 CymMV、ORSV、CMV、TMV、BYMV、CaCV、OFV、BaRMV 等病毒进行准确检测^[16-23]。

表1 兰花病毒检测技术研究进展

Table 1 Research progress on technology of virus detection in orchid

序号 No.	检测技术 Testing technology	检测技术优缺点 Advantages and disadvantages of the detection technology	参考文献 References
1	指示植物法	操作简单、成本低,但操作环境条件要求严格、显症时间长、检测速度慢	[16]
2	电镜观察	取样简便、检测时间短、直观性强、准确性高,但制片复杂、技术要求高、仪器设备受限	[17]
3	血清学	操作简单、检测速度快、灵敏度高、特异性强、易于标准化、适用于大批量检测,但特异性抗体制备过程复杂、成本高、存在假阳性	[18-20]
4	分子生物学	操作简便、灵敏度比血清学高、特异性强、检测速度快、可进行微量病毒及多种病毒同时检测、适用于大批量检测,但技术和仪器设备要求高、检测成本高	[21-23]
5	液相色谱/质谱分析和激光解吸-离子化质谱分析法	操作简便、检测速度快、准确性和灵敏度高、可多样品检测,但技术和仪器设备要求高、检测成本高	[24]
6	石英晶体微天平免疫传感器	检测速度比 ELISA 快、特异性强,但技术要求高	[25]
7	磁还原测定法	操作简单、只使用一种抗体、准确性和灵敏度高、可定量测量生物分子的浓度,但操作技术要求高	[26]
8	光学相干断层扫描	检测快速、准确性高、不破坏样品组织,但技术和仪器设备要求高、检测成本高	[27]
9	光纤粒子等离子体共振免疫传感器	检测速度快、灵敏度比 ELISA 高、可定量分析病毒感染程度,但技术和仪器设备要求高、检测成本高	[28]
10	微/纳米混合结构免疫-电化学生物传感器	无标记检测、使用更少的抗体和样本组织、检测时间短、线性检测范围更广,但技术和仪器设备要求高、检测成本高	[29]

指示植物法是将携带有病毒的兰花汁液通过摩擦接种至特定的指示植物上,通过观察寄主植物的病症表现来诊断感染兰株病毒种类的方法^[16]。指示植物检测方法是国内外早期检测兰花病毒的传统方法之一,具有操作简单、成本低的优点,但其对操作环境条件要求严格,检测速度慢,显症时间长,常与其他检测方法配合使用^[30]。

电镜检测法通过观察植物病毒颗粒大小、形状、内含体组成和染色组织超微结构等方面的特征来鉴定病毒种类的方法^[17]。该方法检测速度较快,准确性比指示植物法高,但由于该方法制片过程复杂,仪器设备和人员技术要求高,不适用于大批量检测^[17]。近几年,国内在生产中较少使用该方法,国外常与其他检测方法配合使用进行少量样本检测^[31-32]。

血清学检测法是利用病毒蛋白与特异性抗体相结合的原理对病毒进行检测的方法^[18-20],主要包括酶联免疫吸附检测法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[33]、快速免疫滤纸测定法(rapid immunofilter paper assay, RIPA)^[34]、免疫毛细区带电泳法(immuno-capillary zone electrophoresis, I-CZE)^[35]和免疫胶体金技术^[36-37]。其中酶联免疫吸附检测法(ELISA)是血清学中应用最广泛的检测方法,为了缩短检测时间、提高检测的准确性和灵敏度,研究者以 ELISA 为基础开发出了双抗体夹心酶联免疫(DAS-ELISA)^[36,38]、斑点酶联免疫(Dot-ELISA)^[39]和三抗体夹心酶联免疫(TAS-ELISA)等技术^[40]。

分子生物学方法是通过检测病毒核酸来鉴别病毒种类的方法^[21-23],主要包括核酸杂交技术(nucleic acid hybridization)^[41]、分子信标技术(molecular beacons)^[42]、反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)^[43]、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[44-45]和微阵列芯片检测技术^[46-47]等。

其中 RT-PCR 操作简便、检测快速,是分子生物学中应用最广泛的病毒检测方法^[48]。

为建立更快速、更简便、特异性和灵敏度更高的兰花病毒检测方法,有研究者分别在电镜技术、血清学和分子生物学等已有的检测方法基础上进行创新,建立了液相色谱/质谱联用(liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS)和激光解吸-离子化质谱分析法(matrix-assisted laser desorption-ionization, MALDI)^[24]、石英晶体微天平(quartz crystal microbalance, QCM)免疫传感器^[25]、磁还原测定法(magnetoreduction assays, MRA)^[26]、光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)^[27]、光纤粒子等离子体共振(fiber optic particle plasmon resonance, FOPPR)免疫传感器^[28]、微/纳米混合结构免疫-电化学生物传感器(micro/nano hybrid-structured immuno-electrochemical biosensor)^[29]等检测新技术,由于这些技术对仪器设备要求高、专业技术性强、迄今并未大量应用于生产实际。

3 兰花脱毒技术研究进展

自 Morel^[49]于1960年采用茎尖培养进行兰花脱毒苗生产以来,兰花脱毒技术研究取得了明显进展。迄今为止,已开发出茎尖培养脱毒^[49-60]、化学处理脱毒^[54-55,61-65]、热处理脱毒^[54-55,66]、病毒 A 处理结合花梗组织培养脱毒^[67]和超低温处理脱毒^[68-70]等技术,建立了卡特兰、文心兰、大花蕙兰、石斛兰、蝴蝶兰、杂交兰、虎雪兰等兰花脱毒苗生产技术体系(表2)。

茎尖培养脱毒是根据植物顶端分生组织缺少成熟的维管束与其他部分相连接,从而减缓病毒向顶端移动,导致该部位较少含有或不含病毒,因此通过茎尖培养生产脱毒苗的方法^[49-60]。茎尖培养脱毒是兰花脱毒苗生产中常用的技术,其脱毒效果与兰花种类、茎尖大小等关系密切。朱根发

等^[51-52]采用茎尖培养成功生产出文心兰和大花蕙兰的无病毒种苗。丁兰等^[56]切取大小为 0.40~0.80 mm 的蝴蝶兰茎尖进行培养,其成活率达到 67.37%,但没有培养出完全脱除

CymMV 和 ORSV 的脱毒苗。景维杰等^[57]研究发现,采用带 1 个叶原基,大小为 0.20~0.40 mm 的蝴蝶兰茎尖进行培养,能生产出完全脱除 CymMV 和 ORSV 的脱毒苗。

表 2 兰花脱毒技术研究进展

Table 2 Advancement on technology of virus-removing in orchid

序号 No.	脱毒技术 Virus-removing technology	兰花种类 Kinds of orchid	脱毒效果 Effect of virus-removing	参考文献 References
1	茎尖培养	兰花	成功脱除 CymMV	[49]
2	茎尖培养	卡特兰	CymMV 脱除率 75%、ORSV 为 0	[50]
3	茎尖培养	文心兰	TMV、CMV、CymMV 和 ORSV 脱除率 100%	[51]
4	茎尖培养	大花蕙兰	TMV、CMV、CymMV 和 ORSV 脱除率 25%	[52]
5	茎尖培养	金钗石斛	脱除率 88%	[53]
6	茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 脱除率 66.67%	[54]
7	茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 和 ORSV 脱除率 80%	[55]
8	茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 脱除率 22.70%、ORSV 为 19.10%	[56]
9	茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 和 ORSV 脱除率 20%	[57]
10	茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 和 ORSV 脱除率 100%	[58]
11	茎尖培养	纹瓣兰	CymMV 脱除率 100%	[59]
12	茎尖培养	蝴蝶兰	ORSV 脱除率 40%	[60]
13	化学处理结合茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 脱除率 73.33%	[54]
14	化学处理结合茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 脱除率 83.3%、ORSV 脱除率 81.2%	[55]
15	化学处理结合茎尖培养	兰花	CymMV 和 ORSV 脱除率 95%	[61]
16	化学处理结合茎尖培养	大花蕙兰	CymMV 脱除率 30%、ORSV 为 10%	[62]
17	化学处理结合茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 脱除率 83.33%、ORSV 为 66.67%	[63]
18	化学处理结合原球茎薄层组织培养	杂交兰“Pink”	CymMV 脱除率 54%、ORSV 为 40%	[64]
19	化学处理结合类原球茎培养	石斛兰	CymMV 脱除率 100%	[65]
20	热处理	兰花	脱除 CymMV 和 ORSV 失败	[66]
21	热处理结合茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 脱除率 46.67%	[54]
22	热处理结合茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 和 ORSV 脱除率 71.40%	[55]
23	热和化学处理结合茎尖培养	蝴蝶兰	CymMV 和 ORSV 脱除率 100%	[55]
24	病毒 A 处理结合花梗组织培养	文心兰	CymMV 和 ORSV 脱除率 75.30%	[67]
25	包埋玻璃化超低温保存法	杂交兰	CymMV 和 ORSV 脱除率 100%	[68]
26	玻璃化超低温法	虎雪兰	CymMV 和 ORSV 脱除率 97%	[69]
27	小滴玻璃化超低温法	蝴蝶兰	CymMV 脱除率 50%	[70]

化学处理脱毒是将甲基鸟嘌呤、2-硫尿嘧啶、叠氮胸苷、三氮唑核苷、DHT 和病毒唑等化学物质加入培养基中或直接处理培养材料,杀死病毒或抑制培养材料内病毒的复制,从而达到脱毒目的的方法^[54-55,61-65]。化学处理结合茎尖培养能提高兰花脱毒率,比单独使用茎尖培养脱毒效果好,也有研究者同时采用化学处理和热处理结合茎尖培养进行兰花病毒的脱除,脱毒率高达 100.00%^[55]。

热处理脱毒是应用最早的植物脱毒方法之一,它是利用病毒不耐高温的特点,通过热处理使病毒钝化,从而实现去除植物体内病毒的方法^[54-55,66]。Stone^[66]研究表明,单一热处理对脱去兰花 CymMV 和 ORSV 效果不明显。贺嘉^[54]采用 38/32 ℃ 变温热处理蝴蝶兰试管苗 35 d,结合 2.00 mm 茎尖培养进行脱毒,CymMV 脱毒率为 46.67%。靖晶^[55]对蝴蝶兰试管苗进行 36 ℃ 热处理 15 d 后,结合 3.00 mm 茎尖培养进行脱毒,结果显示 CymMV 与 ORSV 的脱毒率均为 71.40%。目前对外植体材料进行热处理后结合茎尖培养已成为兰花脱毒苗生产的有效方法。

超低温处理脱毒是近几年来发展的兰花脱毒新技术,原

理是利用超低温(-196 ℃)选择性将病毒杀死,从而脱去植物中的病毒^[68-70]。李涵等^[68]以携带 CymMV 与 ORSV 的杂交兰根状茎为材料,经过低温炼苗 21 d 后,采用包埋玻璃化超低温保存法结合茎尖培养,成功脱除病毒,脱毒率为 100.00%。王玉英等^[69]、王仁睿等^[70]等应用玻璃化超低温法对虎雪兰、蝴蝶兰进行脱毒培养,成功脱除 CymMV 与 ORSV 和 CymMV。由于超低温处理脱毒法对温度控制要求苛刻,操作繁杂,使用不当容易致死植物,目前尚未在脱毒苗生产中广泛采用。

4 结语

病毒病是兰花的“癌症”,显著影响兰花产量和质量,是制约兰花产业可持续发展的重要因素。兰花病毒病防控可以采用培育抗病毒品种^[1,71]、建立有效防控技术、采用脱毒苗等手段进行。由于病毒变异速度快,而抗病毒品种选育需要时间长,因此目前采用选育抗病毒品种的方法防控兰花病毒病在生产实际中应用较少,在没有有效防治病毒病技术的情况下,采用脱毒苗就成为减少病毒病危害的重要手段。

自 20 世纪 60 年代建立兰花茎端分生组织培养脱毒技

术以来,兰花脱毒技术和病毒检测方法取得了一定进展,但脱毒苗在兰花生产上应用并不广泛,主要原因是脱毒技术难度大,脱毒苗在生产应用中因二次感染导致实际效果不明显等。因此要推动脱毒苗在生产上的广泛应用,今后应加强以下几个方面的工作:①进一步加强脱毒技术研究,建立简便稳定高效的脱毒技术体系,这是生产上利用脱毒苗减少病毒病造成损失的关键;②深入研究单一病毒和多种病毒对兰花的危害,为制定有效脱毒方案提供指导;③建立更多兰花病毒的检测和脱毒技术体系,为脱毒苗生产提供技术支持;④加强防止脱毒苗二次感染技术研究,确保脱毒苗应用的效果。

参考文献

- [1] CHEN T Y, PAI H, HOU L Y, et al. Dual resistance of transgenic plants against *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* [J]. *Scientific reports*, 2019, 9: 1-12.
- [2] 王一椒. 国内 2 种主要兰花病毒病的发生与防控[J]. *中国园艺文摘*, 2017, 33(9): 120-122.
- [3] 张建军, 谢为龙. 兰花病毒病研究进展[J]. *植物检疫*, 1999, 13(2): 109-111.
- [4] TAŞKIN H, BAKTEMUR G, KURUL M, et al. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR[J]. *Scientific world journal*, 2013, 2013: 1-5.
- [5] JENSEN D D. Virus diseases of orchids: Transmission of the virus and observation of leaf and other symptoms reveal rare diseases in California[J]. *California agriculture*, 1951, 6(2): 7, 15-16.
- [6] 范成明, 李枝林, 何月秋. 兰花病害研究现状[J]. *农业与技术*, 2004, 24(2): 61-63.
- [7] LEE C H, ZHENG Y X, JAN F J. The orchid-infecting viruses found in the 21st century [C]// CHEN W H, CHEN H H. *Orchid biotechnology III*. Singapore: World Scientific Publishing, 2015: 145-164.
- [8] 吴竹妍, 黎园, 何晓盈, 等. 广东兰花两种主要病毒的检测[J]. *广东农业科学*, 2011, 38(11): 14-16.
- [9] 明艳林, 李梅, 郑国华. 建兰花叶病毒研究进展[J]. *福建农业学报*, 2005, 20(1): 30-33.
- [10] 明艳林, 郑国华. 齿兰环斑病毒的研究进展[J]. *云南农业大学学报*, 2003, 18(4): 152-156.
- [11] 肖火根, 郑冠标, 张曙光, 等. 广东兰花病毒病的鉴定和检测研究[J]. *华南农业大学学报*, 1996, 17(1): 21-24.
- [12] 丁元明, 张巧萍, 王云月, 等. 兰上凤仙花环死斑病毒和建兰花叶病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *植物检疫*, 2009, 23(4): 32-33.
- [13] SUDHA D R, RANI G U. Detection, diagnosis of orchid virus and inactivation of *Cymbidium mosaic virus* (CYMV) on plants [J]. *International journal of plant sciences*, 2016, 11(2): 302-306.
- [14] 曾燕君, 王健华, 余志金, 等. 3 种热带兰感染 2 种病毒的症状探讨[J]. *热带农业科学*, 2011, 31(3): 20-23.
- [15] 沈淑琳. 兰花病毒的种类、检验和防治[J]. *植物检疫*, 1988(2): 144-150.
- [16] 杨翠云, 于翠, 郑建中, 等. 建兰花叶病毒检测标准方法的建立[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2006, 24(3): 250-255.
- [17] 施农衣, 徐莺, 王慧中, 等. 复合感染建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的兰花超微结构观察及病原物快速鉴定[J]. *分子细胞生物学报*, 2007, 40(2): 153-163.
- [18] 李明福. 青霉素酶、辣根过氧化物酶对进口兰花病毒酶联检测的比较分析[J]. *植物检疫*, 1993, 7(1): 13-15.
- [19] 林志楷, 郭莺, 刘黎卿. 兰花病毒检测技术研究进展[J]. *亚热带植物科学*, 2010, 39(3): 87-92.
- [20] 谢林娜, 苏梦芸, 朱明明, 等. 不同品种蝴蝶兰 2 种病毒的 ELISA 检测及其症状表现[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(3): 80-83.
- [21] 潘俊松, 刘志昕, 郑学勤. 建兰花叶病毒的分离、鉴定及检测研究[J]. *热带作物学报*, 1997, 18(1): 63-70.
- [22] 周国辉, 陈晓琴, 李梅辉, 等. 双重一步法 RT-PCR 同时检测兰花上的两种主要病毒[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(6): 743-744.
- [23] 沈阳, 洪旭, 吕文刚, 等. 侵染广东顺德 2 种兰花的辣椒褪绿病毒分子鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(4): 117-119, 139.
- [24] TAN S W L, WONG S M, KINI R M. Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC-and/or MALDI-mass spectrometry[J]. *Journal of virological methods*, 2000, 85(1/2): 93-99.
- [25] EUN A J C, HUANG L Q, CHEW F T, et al. Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance-based DNA biosensors[J]. *Phytopathology*, 2002, 92(6): 654-658.
- [26] YANG S Y, JIAN Z F, CHIEH J J, et al. Wash-free, antibody-assisted magnetoreduction assays of orchid viruses[J]. *Journal of virological methods*, 2008, 149(2): 334-337.
- [27] CHOW T H, TAN K M E, NG B K, et al. Diagnosis of virus infection in orchid plants with high-resolution optical coherence tomography[J]. *Journal of biomedical optics*, 2009, 14(1): 014006 [2021-03-25]. <https://doi.org/10.1117/1.3066900>.
- [28] LIN H Y, HUANG C H, LU S H, et al. Direct detection of orchid viruses using nanorod-based fiber optic particle plasmon resonance immunosensor [J]. *Biosensors and bioelectronics*, 2014, 51: 371-378.
- [29] WANG W J, LEE C H, LI C W, et al. Orchid virus detection from orchid leaves using micro/nano hybrid-structured immuno-electrochemical biosensor [J]. *Journal of the electrochemical society*, 2020, 167(2): 1-7.
- [30] 明艳林, 郑国华, 李梅. 齿兰环斑病毒的鉴定及其抗血清的制备与应用[J]. *中国病毒学*, 2006, 21(1): 64-67.
- [31] BRATSCHE S A, OLSZEWSKI N, LOCKHART B. Incidence of cymbidium mosaic, odontoglossum ringspot, and orchid fleck virus in orchids in Minnesota and production of antibodies for use in ELISA to detect orchid fleck virus [J]. *European journal of plant pathology*, 2021, 159(3): 543-554.
- [32] OTERO-COLINA G, RAMOS-GONZÁLEA P L, CHABI-JESUS C, et al. First detection of orchid fleck virus in orchids in Mexico [J]. *Virus Disease*, 2021, 32(1): 167-172.
- [33] CLARK M F, ADAMS A N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses [J]. *Journal of general virology*, 1977, 34(3): 475-483.
- [34] TSUDA S, KAMEYA-IWAKI M, HANADA K, et al. A novel detection and identification technique for plant viruses: Rapid immunofilter paper assay (RIPA) [J]. *Plant disease*, 1992, 76(5): 466-469.
- [35] EUN A J C, WONG S M. Detection of *Cymbidium mosaic* potyvirus and *Odontoglossum ringspot* tobamovirus using immuno-capillary zone electrophoresis [J]. *Phytopathology*, 1999, 89(6): 522-528.
- [36] 魏梅生, 黄冲. A 蛋白斑点免疫金染色和双抗体夹心酶联检测齿兰环斑病毒的比较[J]. *植物检疫*, 2000, 14(6): 344-346.
- [37] 于子翔, 李丽, 俞禄珍, 等. 建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒联合免疫胶体金试纸条的研制及应用[J]. *植物保护*, 2017, 43(6): 139-143.
- [38] 阮锐, 魏永路, 朱根发, 等. 广东省国兰病毒病害调查及 CymMV 和 ORSV 基于 cp 基因的系统进化分析[J]. *植物保护学报*, 2020, 47(2): 372-383.
- [39] 陈良华, 郑国华, 明艳林. 检测兰花病毒的斑点酶联法的建立[J]. *植物检疫*, 2007, 21(6): 347-348.
- [40] 柳爱春, 刘超, 赵芸, 等. 利用 ELISA 检测两种兰花病毒的研究[J]. *浙江农业学报*, 2009, 21(2): 91-95.
- [41] CHIA T F, CHAN Y S, CHUA N H. Characterization of *Cymbidium mosaic virus* coat protein gene and its expression in transgenic tobacco plants [J]. *Plant molecular biology*, 1992, 18(6): 1091-1099.
- [42] EUN A J, WONG S M. Molecular beacons: A new approach to plant virus detection [J]. *Phytopathology*, 2000, 90(3): 269-275.
- [43] RYU K H, YOON K E, PARK W M. Detection by RT-PCR of *Cymbidium mosaic virus* in orchids [J]. *Journal of phytopathology*, 1995, 143(11/12): 643-646.
- [44] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic acids research*, 2000, 28(12): 1-7.
- [45] 许春英, 李逢慧, 罗超. 环介导等温扩增技术检测建兰花叶病毒[J]. *现代农业科技*, 2009(8): 11-12, 14.
- [46] BAI S L, ZHAO J Y, ZHANG Y C, et al. Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film biosensor chips [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010, 86(3): 983-990.
- [47] 谭建锡, 周慧平, 莫瑾, 等. 兰花 5 种病毒可视化基因芯片检测方法建立[J]. *植物病理学报*, 2017, 47(5): 654-660.
- [48] 涂小云, 董小艳, 郭春梅, 等. 多重 RT-PCR 检测蝴蝶兰 3 种病毒 CymMV、ORSV 和 CMV [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(5): 91-93.
- [49] MOREL G M. Producing virus-free *Cymbidiums* [J]. *American orchid society bulletin*, 1960, 29: 495-497.

- 4170.
- [3] 蒋艳红, 吴宇轩. CRISPR/Cas9 系统: 开启基因编辑新时代——2020 年诺贝尔化学奖简介[J]. 自然杂志, 2020, 42(6): 456-462.
- [4] 常雯茹, 段利芳, 杨乐, 等. 伪狂犬病病毒在 NF- κ B 家族 p65 基因敲除细胞系的复制规律研究[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(1): 83-92.
- [5] 朱奕骋. CRISPR/Cas9 技术的研究进展及其在肺癌研究中的应用[J]. 科技传播, 2020, 12(14): 172-174.
- [6] TANG Y D, GUO J C, WANG T Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated 2-sgRNA cleavage facilitates pseudorabies virus editing[J]. FASEB journal, 2018, 32(8): 4293-4301.
- [7] ALTAVILLA D, SAIITTA A, SQUADRITO G, et al. Evidence for a role of nuclear factor- κ B in acute hypovolemic hemorrhagic shock[J]. Surgery, 2002, 131(1): 50-58.
- [8] 欧阳乐军, 李莉梅, 马铭赛, 等. CRISPR/Cas9 技术发展及其应用进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(10): 34-40.
- [9] ZHANG Y, SHOWALTER A M. CRISPR/Cas9 genome editing technology: A valuable tool for understanding plant cell wall biosynthesis and function[J]. Frontiers in plant science, 2020, 11: 1-14.
- [10] 李晓开, 龙科任, 麦苗苗, 等. CRISPR-Cas9 技术的原理及其在猪研究中的应用[J]. 生命科学, 2018, 30(6): 690-700.
- [11] MANGHWAR H, LINDSEY K, ZHANG X L, et al. CRISPR/cas system: Recent advances and future prospects for genome editing[J]. Trends in plant science, 2019, 24(12): 1102-1125.
- [12] 白祥慧. CRISPR/Cas9 基因敲除研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2021(1): 90-92.
- [13] WANG K K, OUYANG H S, XIE Z, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system[J]. Scientific reports, 2015, 5: 1-11.
- [14] 张婷婷, 杨漫漫, 魏强, 等. CRISPR/Cas9 介导人 *HBB* 基因突变体在猪成纤维细胞的靶向敲入[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 779-787.
- [15] 许金蔓, 徐磊, 彭明晗, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建猪 *PFKM* 基因定点突变细胞株[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2020, 41(4): 36-39.
- [16] 曹兴林, 恽君雯, 陈丽, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统的 MDCK 细胞 IFN- β 1 编码序列的敲除[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(7): 59-65.
- [17] 李忠慧. CRISPR/cas9 基因编辑技术在羊毛品质改良中的应用[J]. 饲料博览, 2020(11): 32-34.
- [18] 陈赢男, 陆静. CRISPR/Cas9 系统在林木基因编辑中的应用[J]. 遗传, 2020, 42(7): 657-668.
- [19] 张宗飞, 刘媛媛, 欧阳解秀, 等. 水稻 *OsFRK1* 与 *OsFRK2* 基因 CRISPR 敲除突变体的构建[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 679-685, 741.
- [20] 李孟珠, 王高鹏, 巫月, 等. 水稻蔗糖转运蛋白 *OsSUT4* 参与蔗糖转运的功能研究[J]. 中国水稻科学, 2020, 34(6): 491-498.
- [21] 李星坤, 潘慧, 李攀, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统的拟南芥 *ugt84a1/ugt84a2* 双突变体制作及突变位点分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(20): 49-55.
- [22] 李鹏. 利用 CRISPR/Cas9 系统编辑拟南芥 *ILR3* 基因及功能验证[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 78-82.
- [23] BADHNA S, BALL A S, MANTRI N. First report of CRISPR/Cas9 mediated DNA-free editing of and *4CL* and *RVE7* genes in chickpea protoplasts[J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(1): 1-15.
- [24] 张昆, 陈景超, 李祎, 等. CRISPR/Cas9 技术在微生物研究中的应用进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 451-464.
- [25] 富国文, 单春兰, 敖平星, 等. 应用 CRISPR/Cas9 系统构建大肠埃希氏菌 *irp2* 基因缺失株[J]. 动物医学进展, 2021, 42(1): 50-55.
- [26] 刘磊, 李娜, 姜雪雍, 等. CRISPR/Cas9 技术敲除酿酒酵母 *gpd2* 基因对产 2,3-丁二醇的影响[J]. 中国农学通报, 2020, 36(29): 69-77.
- [27] 李梦琦, 张可心, 郑飞云, 等. Lager 酵母中 CRISPR-Cas9 基因敲除系统的构建[J]. 东北农业大学学报, 2020, 51(3): 36-44, 96.
- [28] 胡婧, 冯金荣. 整合型 CRISPR/Cas9 系统构建白念珠菌 *MTQ2* 基因缺失株及其表型分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(9): 993-996, 1004.
- [29] HUANG W P, DU Y J, YANG Y, et al. Two CRISPR/Cas9 systems developed in *Thermomyces dupontii* and characterization of key gene functions in thermolide biosynthesis and fungal adaptation[J/OL]. Applied and environmental microbiology, 2020, 86(20) [2020-11-17]. <https://doi.org/10.1128/AEM.101486-20>.
- [30] 李凤丽, 石素华, 李爱芹, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术研究进展[J]. 山东农业科学, 2020, 52(4): 164-172.
- [31] 田甜, 周小明. 基于 CRISPR/Cas9 的基因分析方法研究进展[J]. 激光生物学报, 2020, 29(1): 18-25.
- [32] 信欣, 陈雨杰, 薛闯. CRISPR-Cas9 技术在细菌中的研究进展及应用[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(6): 97-102.

(上接第 11 页)

- [50] ISHII M. Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explant culture[J]. Acta horticulturae, 1974, 36: 229-234.
- [51] 朱根发, 王怀宇, 陈明莉, 等. 文心兰脱毒快繁技术研究[J]. 广东农业科学, 1997(4): 27-28.
- [52] 朱根发, 王怀宇, 陈明莉, 等. 大花蕙兰的脱毒快繁技术研究[C]//侯喜林, 常有宏. 园艺学进展(第 2 辑). 南京: 东南大学出版社, 1998: 727-730.
- [53] 王素英, 宋锡全, 聂璐, 等. 金钗石斛茎尖培养脱毒和检测[J]. 种子, 2007, 26(5): 1-3.
- [54] 贺嘉. 蝴蝶兰(*Phalaenopsis*) 脱毒快繁关键技术及其生理基础的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [55] 靖晶. 蝴蝶兰组织培养与脱除病毒技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [56] 丁兰, 郭艳, 董刚, 等. 国产蝴蝶兰种苗携带建兰花叶病毒(CymMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)的调查及脱毒的初步研究[J]. 北方园艺, 2012(2): 137-140.
- [57] 景维杰, 黄容清, 蒋明殿, 等. 蝴蝶兰茎尖培养脱病毒技术初步研究[J]. 中国园艺文摘, 2013, 29(4): 13-16.
- [58] CHIEN K W, AGRAWAL D C, TSAY H S, et al. Elimination of mixed '*Odontoglossum ringspot*' and '*Cymbidium mosaic*' viruses from *Phalaenopsis* hybrid 'V3' through shoot-tip culture and protocorm-like body selection[J]. Crop protection, 2015, 67: 1-6.
- [59] PRADHAN S, REGMI T, RANJIT M, et al. Production of virus-free orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. by various tissue culture techniques[J/OL]. Heliyon, 2016, 2(10) [2021-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00176>.
- [60] 朱娇, 马蕾, 刘芳, 等. 蝴蝶兰茎尖脱毒再生体系建立与优化[J]. 山东农业科学, 2017, 49(6): 60-63.
- [61] ALBOUY J, FLOUZAT C, KUSIAK C, et al. Eradication of orchid viruses by chemotherapy from *in-vitro* cultures of *Cymbidium* [J]. Acta horticulturae, 1988, 234: 413-420.
- [62] 许传俊, 黄碧梅, 曾碧玉, 等. 病毒唑对大花蕙兰 CyMV 及 ORSV 脱毒效果初探[J]. 亚热带植物科学, 2012, 41(1): 7-9.
- [63] 李正民. 蝴蝶兰无毒苗组培快繁技术研究[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [64] LIM S T, WONG S M, GOH C J. Elimination of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy[J]. Annals of applied biology, 1993, 122(2): 289-297.
- [65] PORTER K G, KUEHNLE A R. Using dithiouracil and ribavirin to eliminate *Cymbidium mosaic virus* during micropropagation of 'Uniwai Mist' dendrobium orchid[J]. HortTechnology, 1997, 7(2): 161-164.
- [66] STONE O M. The elimination of four viruses from *Ullucus tuberosa* by meristem-tip culture and chemotherapy[J]. Annals of applied biology, 1982, 101(1): 79-83.
- [67] 刘福秀, 王安石, 韩玉春, 等. 文心兰 2 种主要病毒的快速检测及其组培脱毒方法[J]. 热带作物学报, 2014, 35(1): 147-151.
- [68] 李涵, 陆琳, 瞿素萍, 等. 杂交兰种苗超低温脱毒技术研究[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(1): 147-153.
- [69] 王玉英, 王琴, 李枝林, 等. 虎舌兰玻璃化超低温脱毒技术的研究[J]. 北方园艺, 2020(5): 61-66.
- [70] 王仁睿, 汤玲莉, 苏仕林, 等. 小滴玻璃化法脱除蝴蝶兰种苗建兰花叶病毒的研究[J]. 植物研究, 2021, 41(4): 514-521.
- [71] 明艳林, 郑金龙, 郑国华, 等. 兰花抗病毒基因工程研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(1): 92-96.