

天南星科植物病毒的 分子诊断和半夏研究

陈集双 主编



35.672
56.1



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大學出版社

S435.672
C456.1

天南星科植物病毒的分子诊断 和半夏研究

陈集双 主编

会委编

浙江大學出版社
Zhejiang University Press

图书在版编目(CIP)数据

天南星科植物病毒的分子诊断和半夏研究/陈集双

主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2006. 8

ISBN 7-308-04827-6

I. 天... II. 陈... III. ①天南星科—药用植物—植物病毒—研究②半夏—植物病毒—研究
IV. S435.672

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 081710 号

编委会

主编 陈集双

编委 高永生 单洪波 张杰 徐涛

秘书 陈海敏

策划组稿 王 镨

责任编辑 王 镨

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(E-mail: zupress@mail. hz. zj. cn)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

经 销 浙江省新华书店

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 德清县第二印刷厂

开 本 787mm×960mm 1/16

印 张 13.5

字 数 350 千字

版 印 次 2006 年 8 月第 1 版 2006 年 8 月第 1 次

书 号 ISBN 7-308-04827-6/S·031

定 价 35.00 元

序

天南星科(Araceae)是一个世界性分布的大科,含105属约3750种单子叶植物,与浮萍科组成1个目。天南星科中的88属为热带分布,温带分布的仅有17属,分别占全科属数的83.8%和16.2%。热带亚洲和热带美洲为天南星科植物的两大分化中心。我国现已记载28属210余种,虽种、属数量都不多,但不少属如*Pinellia*、*Arisaema*、*Remasatia*和*Colocasia*等都是以中国为分化中心的。天南星科植物的一些种类生命力强,形态变化多端,叶片彩斑艳丽、丰富,如龟背竹(*Monstera*)、喜林芋(*Philodendron*)、合果芋(*Syngonium*)、藤芋(*Scindapsus*)、亮丝草(*Aglaonema*)、花叶芋(*Caladium*)、花叶万年青(*Dieffenbachia*)、海芋(*Alocasia*)、马蹄莲(*Zantedeschia*)、花烛(*Anthurium*)和苞叶芋(*Spathiphyllum*)等属植物为常见的观赏植物,三叶半夏(*Pinellia ternata*)和掌叶半夏(*Pinellia cordata*)为我国传统药用植物,芋(*Colocasia esculenta*)和魔芋(*Amorophallus sinesis*)为重要的经济作物。

相继有许多学者对侵染天南星科植物的病毒进行了研究,但除个别病毒已测定基因组全序列外,侵染该科植物的绝大多数病毒尚无相关的分子生物学研究资料。就现有研究而言,天南星科植物上已被鉴定和分离的病毒相对较少,且研究方法大多还囿于传统生物学方法,一些病毒可能为同物异名。到目前为止,在侵染天南星科植物的病毒中,芋花叶病毒(dasheen mosaic virus, DsMV)和黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)是确定在天南星科植物上发生最普遍和危害最严重的病毒病原,另有番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TosWV)、拟南芥花叶病毒(arabis mosaic virus, ArMV)等球状病毒也已被确认。芋瘦小病毒(colocasia bobone disease virus, CBDV)、芋羽状斑驳病毒(taro feathery mottle virus, TFMoV)、芋绿脉斑病毒(taro chlorotic vein virus, TCVV)、魔芋花叶病毒(konjak mosaic-poty virus, KoMV)

在文献中也有报道,但没有被国际病毒分类与命名委员会(ICTV)接受。

导致检测鉴定天南星科病毒研究困难的一个重要原因是该科植物材料的特点,例如: DsMV 侵染该科植物寄主后表现的症状随季节而变化甚或不表现症状,而 CBDV 侵染寄主后的症状会自然消失,这使得传统的目测法无用武之地。另外,由于该科植物的多糖含量较高,黏稠度较大,使其病毒颗粒的提取难度增大,加上由所提纯的病毒制备的多抗的特异性不高,在组织浓度低的情况下,往往使当下主要的血清学检测方法达不到预期的效果。而在我国的生产实际中,一些重要的天南星科作物往往是以无性繁殖的方式生产的,这更便于病毒的长期积累和大规模传播,造成资源丧失、种质退化。检测技术研究的相对滞后,也使得通过各种脱毒手段获得的脱毒种苗的确认难以实现,进而限制了脱毒快繁技术的应用。

随着分子检测技术的发展、相关信息资料的积累,核酸扩增技术、核酸分析技术、核酸杂交技术、核酸芯片技术等已在植物病毒检测领域应用,并表现出强大的应用前景。配合这些技术,利用组织培养手段进行农作物种质复壮、脱毒快繁的研究和应用,也就能建立在一个可信的基础之上。

在近 20 年中,我们对天南星科植物病毒及其检测作了研究,尤其是在国家“863”项目(批准编号 2002AA24112A)支持下,以半夏为主要材料做了病毒检测、离体块茎诱导、体细胞培养体系构建,以及有关带毒半夏与脱毒半夏光合作用效用的比较等系列研究,获得了一些结果,也积累了一些资料。在此基础上,应浙江大学出版社之约,我们编撰了这本小书,把我们的心得体会整理出来,供同行们批评、参考。

本书有关病毒及其检测以及光合作用的影响等方面的内容,主要依据陈集双、申屠苏苏、高永生等的工作撰写;有关半夏离体块茎诱导、体细胞培养体系构建的内容,依据王海丽、单洪波等人的工作基础,结合相关资料,由单洪波执笔撰写;徐涛、张杰编写了半夏种质资源、化学成分及药理作用的相关章节,张杰提供了他利用 AFLP 技术构建的半夏指纹图谱;浙江大学出版社王锴博士对全书作了统一编排、审校。另外,陈海敏为全书材料的汇集付出了辛勤的劳动。本书得以顺利完稿,是与上述同志的辛勤劳动分不开的,在此表示衷心的感谢!

本书在编撰过程中参阅了众多的资料,其中相当部分的内容已被

引用于历届的硕、博士论文中,未作一一核校。为此,特将体现我们研究工作及承担国家“863”项目(批准编号 2002AA24112A)所作总结报告中的部分已成稿的研究论文作为附录编于书后。不当之处,请予谅解!

限于水平,本书定有许多不足甚至错误,希望读者给予批评指正!

陈集双

2006 年 7 月

目 录

序	1
第一章 前言：天南星科植物及其病害	1
第一节 天南星科植物典型属种的病毒	6
第二节 天南星科植物病毒的传播及危害	8
第二章 天南星科植物病毒的研究	13
第一节 侵染天南星科植物的两种主要病毒的生物学特征	13
一、芋花叶病毒的生物学特征	13
二、黄瓜花叶病毒的生物学特征	14
第二节 侵染天南星科植物的 DsMV 和 CMV 的调查	15
一、天南星科植物病毒的总体发生和消长情况	19
二、天南星科植物病毒不同地点的发生情况	19
三、天南星科芋属作物病毒的发生情况	19
第三章 天南星科植物病毒的诊断	21
第一节 天南星科植物病毒的常规检测方法	21
一、寄主生物学测定法	21
二、细胞病理学方法	22
三、血清学方法	23
第二节 天南星科植物病毒的分子检测法	24
一、PCR 和 RT-PCR 检测技术	25
二、dsRNA 检测技术	27
三、核酸杂交检测技术	28
四、PCR 微量板杂交法	32

第四章 半夏光合特征及叶绿素荧光参数的分析	34
第一节 病毒侵染半夏的光合特征及叶绿素荧光参数的分析	34
一、病毒侵染对半夏叶片光合—光强和光合—CO ₂ 响应曲线的影响	35
二、病毒侵染对半夏叶片 F_v/F_o 、 F_v/F_m 、 F_o/F_m 和 F_v 的影响	37
三、病毒侵染对半夏叶片光系统 II 荧光参数光曲线的影响	39
第二节 高温胁迫对半夏光合效率的影响	41
一、30℃持续高温下三叶半夏长势的变化	43
二、30℃持续高温下半夏叶片中丙二醛(MDA)含量的变化	43
三、高温胁迫对半夏叶片抗氧化酶类活性的影响	43
四、高温胁迫对半夏 PS II 最大光化学效率的影响	44
五、高温对半夏叶片光合速率的影响	45
六、高温胁迫下半夏叶片激发能分配的变化	45
第三节 强光胁迫对半夏光合效率的影响	48
一、半夏植株光合诱导过程的研究	48
二、光强对半夏光合作用及叶绿素荧光参数的影响	52
第四节 不同生态型半夏光合效率的比较	58
第五章 半夏体细胞培养体系的构建	67
第一节 半夏的生物学特性	68
一、半夏的繁殖生物学	68
二、半夏的倒苗	69
三、半夏的度夏与越冬	70
四、半夏的杂草性	70
第二节 半夏体细胞培养的研究进展	70
一、组织培养	71

二、细胞培养	71
三、原生质体培养	72
四、植物体细胞培养技术的优势	72
五、脱病毒组培	73
第三节 半夏体细胞培养体系	81
一、半夏脱毒组培苗的获得	81
二、半夏组培扩繁技术的改进	86
三、半夏叶不同部位的培养	91
四、半夏悬浮细胞培养的研究	94
五、三叶半夏原生质体分离及活力检测的研究	105
第六章 半夏种质资源收集及分子鉴定	114
第一节 半夏药用历史与种质资源	114
一、药用历史	114
二、当前半夏资源与生产的现状	115
三、品种鉴定方法	117
第二节 半夏种质的 AFLP 鉴别研究	119
第七章 半夏化学成分与药理作用	125
第一节 半夏的化学成分	125
一、半夏的化学成分	125
二、半夏的化学成分提取及利用	128
三、栽培半夏与野生半夏的成分对比分析	129
三、半夏培养物与人工栽培半夏生物碱类成分对比分析	130
第二节 半夏的药理作用	130
一、半夏的药理作用	130
二、半夏的药材加工——炮制	132
第三节 半夏的功效	134
附录 部分已成稿的研究论文	139

第一章 前言：天南星科植物及其病害

天南星科(Araceae)是一个世界性分布的大科,分布区由赤道至寒温带的各个生态地带,散布于世界的各大陆块,仅在海岛地区和南美大陆有较多空白点。据Thomas(1998)报道,天南星科含 105 属约 3750 种单子叶植物(表 1.1),与浮萍科

表 1.1 天南星科植物科属分类

亚科(Subfamily)	族(Tribe)	属(Genus)
I. Acoroideae		<i>Acorus</i> *
		<i>Gymnostachys</i>
II. Pothoideae	1. Potheae	<i>Pothos</i> *
		<i>Pedicellarum</i>
		<i>Pothoidium</i> *
	2. Heteropsidaeae	<i>Heteropsis</i>
	3. Anthurieae	<i>Anthurium</i> ⁺
III. Monsteroideae	1. Anadendreae	<i>Anadendrum</i> *
	2. Monstereae	<i>Amydrium</i> *
		<i>Rhaphidophora</i> *
		<i>Epipremnum</i> *
		<i>Scindapsus</i> *
		<i>Alloschemone</i>
		<i>Stenospermation</i>
		<i>Rhodopatha</i>
		<i>Monstera</i> ⁺
	3. Spathiphyllaeae	<i>Spathiphyllum</i>
		<i>Holochlamys</i>

续 表

亚科(Subfamily)	族(Tribe)	属(Genus)
IV. Calloideae	1. Orontieae	<i>Lysichiton</i>
		<i>Symplocarpus</i> *
		<i>Orontium</i>
	2. Calleae	<i>Calla</i> *
V. Lasioideae	Lasieae	<i>Cyrtosperma</i> *
		<i>Lasia</i> *
	Subtribe 1. Dracontinae	<i>Anaphyllum</i>
		<i>Podolasia</i>
		<i>Urospatha</i>
		<i>Dracontioides</i>
		<i>Dracontium</i>
		<i>Pycnospatha</i>
	Subtribe 2. Pycnopathinae	<i>Zamioculcas</i>
		<i>Gonatopus</i>
	3. Thomsonieae	<i>Amorphophallus</i> *
	4. Culcasieae	<i>Culcasia</i>
	5. Callopsideae	<i>Callopsis</i>
	6. Nephthytideae	<i>Pseudohydrosme</i>
		<i>Anchomanes</i>
		<i>Nepthytis</i>
		<i>Cercestis</i>
	7. Montrichardieae	<i>Montrichardia</i>

续 表

亚科(Subfamily)	族(Tribe)	属(Genus)
VI. Philodendroideae	1. Philodendreae	<i>Homalomena</i> *
		<i>Fortadoa</i>
		<i>Schismatoglottis</i> *
		<i>Piptospatha</i>
		<i>Hottarum</i>
		<i>Bucephalandra</i>
		<i>Phymatarum</i>
		<i>Aridarum</i>
		<i>Heteroaridarum</i>
		<i>Philodendron</i> ⁺
	2. Anubiadeae	<i>Anubias</i>
	3. Bognereae	<i>Bognera</i>
	4. Aglaonemateae	<i>Aglaonema</i> *
		<i>Aglaodorum</i>
	5. Dieffenbachieae	<i>Dieffenbachia</i> ⁺
	6. Zantedeschieae	<i>Zantedeschia</i> ⁺
	7. Typhonodoreae	<i>Typhonodorum</i>
	8. Peltandreae	<i>Peltandra</i>
VII. Colocasioideae	1. Caladieae	<i>Xanthosoma</i>
VIII. Colocasioideae	1. Caladieae	<i>Caladium</i> ⁺
		<i>Scaphispatha</i>
		<i>Aphyllarum</i>
		<i>Chlorospatha</i>
		<i>Jasarum</i>

续 表

亚科(Subfamily)	族(Tribe)	属(Genus)
VIII. Colocasioideae	2. Steudnereae	<i>Steudnera</i> *
		<i>Remusatia</i> *
		<i>Gonatanthus</i> *
		<i>Hapaline</i> *
	3. Protareae	<i>Protarum</i>
	4. Colocasieae	<i>Colocasia</i> *
		<i>Alocasia</i> *
		<i>Xenophya</i>
5. Syngonieae	<i>Syngonium</i>	
6. Ariopsidaeae	<i>Ariopsis</i>	
IX. Aroideae	1. Stylochitoneae	<i>Stylochilton</i>
	2. Arophyteae	<i>Carlephyton</i>
		<i>Colletogyne</i>
		<i>Arophyton</i>
	3. Spathicarpeae	<i>Mangonia</i>
		<i>Taccarum</i>
		<i>Asterostigma</i>
		<i>Gorgonidium</i>
		<i>Synandropadix</i>
		<i>Genarum</i>
		<i>Spathanthium</i>
		<i>Spathicarpa</i>
		4. Zomicarpeae
	<i>Zomicarpella</i>	
<i>Filarum</i>		
<i>Ulearum</i>		

续 表

亚科(Subfamily)	族(Tribe)		属(Genus)
IX. Aroideae	5. Areae	Subtribe 1. Arinae	<i>Arum</i> *
			<i>Dracunculus</i>
			<i>Helicodiceros</i>
			<i>Theriophonum</i>
			<i>Typhonium</i> *
			<i>Sauromatum</i>
			<i>Eminium</i>
			<i>Biarum</i>
		Subtribe 2. Arisarinae	<i>Arisarum</i>
		Subtribe 3. Arisaematinae	<i>Arisaema</i>
		Subtribe 4. Atheruninae	<i>Pinellia</i> *
			<i>Ambrosina</i>
			<i>Lagenandra</i>
			<i>Cryptocoryne</i> *
X. Pistioideae			<i>Pistia</i> *

* 中国分布属；+中国引种属

** Genera occurring in China; +Genera introduced in China

组成 1 个目。我国现已记载 28 属 210 余种(李恒, 1996), 种属数量不多, 但不少属如 *Pinellia*、*Arisaema*、*Remasatia* 和 *Colocasia* 等都是以中国为分化中心的。其中一些种类生命力强, 形态变化多端, 色彩艳丽、丰富, 有的还有重要的经济价值, 如龟背竹(*Monstera*)、喜林芋(*Philodendron*)、合果芋(*Syngonium*)、藤芋(*Scindapsus*)、亮丝草(*Aglaonema*)、花叶芋(*Caladium*)、花叶万年青(*Dieffenbachia*)、海芋(*Alocasia*)、马蹄莲(*Zantedeschia*)、花烛(*Anthurium*)和苞叶芋(*Spathiphyllum*)等属植物为常见的观赏植物; 半夏(*Pinellia ternata*)和掌叶半夏(*Pinellia cordata*)为我国传统药用植物; 芋(*Colocasia esculenta*)和魔芋(*Amorophallus sinesis*)为重要的经济作物。

天南星科植物中有 88 属为热带分布, 温带分布的仅有 17 属, 分别占全科属数的 83.8% 和 16.2%。因此, 从整体上说, 天南星科是一个热带植物科。热带

亚洲和热带美洲为天南星科的两大分化中心。热带亚洲属的分化程度高(34个特有属),但种的多样性相对较低。热带美洲属的分化程度较低,但种的多样性达到了高度繁荣。由于热带美洲天南星科种类很多,但原始种类缺少,而热带亚洲有最为原始的菖蒲亚科和比较原始的石柑亚科,因此推测热带亚洲应是天南星科的起源地。天南星科中有3个亚科为水生植物,菖蒲亚科中的原始属 *Acorus* 的种主要生活在湖沼江河的浅水地;单种单属的 *Pistia stratiotes* 是泛热带的飘浮植物,生长在平静的淡水水域;水芋亚科 *Calloideae* 栖息在泥炭沼泽、池塘边,林下溪旁或潮湿草地和林地上。其他几个亚科中的7个属,如 *Hottarun* 等也是河生植物。天南星科中70%以上的种是热带潮湿原始森林的定居者。根据这些事实可推测,天南星科的始祖类型应首先出现在热带森林地区的淡水环境中(李恒,1996)。

第一节 天南星科植物典型属种的病毒

天南星科植物上已经分离和鉴定的病毒相对较少,除了个别病毒已知其基因组全序列外,侵染该科植物的绝大多数病毒至今尚无足够的分子生物学研究相关资料。迄今,已有文献报道的侵染天南星科植物的病毒有23种(详见表1.2),病毒粒子有球状、线状、杆状、弹状等多种形态。重要的有8种:芋花叶病毒(dasheen mosaic virus, DsMV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)、番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TosWV)、拟南芥菜花叶病毒(arabis mosaic virus, ArMV)、芋瘦小病毒(colocasia bobone disease virus, CBDV)、芋羽状斑驳病毒(taro feathery mottle virus, TFMoV)、taro chlorotic vein virus (TCVV)、魔芋花叶病毒(konjak mosaic potyvirus, KoMV)(Lovisolo & Conti, 1969; Tomkins & Severin, 1950; James et al., 1973; Gollifer et al., 1977; Jackson, 1980; Pearson et al., 1999; Shimoyama et al., 1992)。其中,芋花叶病毒是确定在天南星科植物上发生最普遍和危害最严重的病毒病原。

DsMV为世界性分布的RNA病毒(Brunt et al., 1990),特别是在热带和亚热带地区的植物中分布尤为广泛。DsMV最早于1970年由Zettler等在美国发现,随后其他国家相继报告有所发生(Abo El-Nil et al., 1977; Gollifer et al., 1977; Jackson et al., 1982; Perason et al., 1998)。现已证明,该病毒是天南星科植物的最主要病毒病原。

表 1.2 已报道的侵染天南星科植物的病毒

病 毒 文	文 献
芋花叶病毒 Dasheen mosaic virus, DsMV	Abo El-Nil et al. (1977); 陈集双等(1993); 陈集双等(1996); Li et al. (1998); Li et al. (1999); Chen et al. (2001); Ram et al. (2003) 等
黄瓜花叶病毒 Cucumber mosaic virus, CMV	陈集双等(1994); 刘文洪等(2004); Mokra et al. (1994)
番茄斑萎病毒 Tomato spotted wilt virus, TSWV	Mertelik et al. (1998); Mavric et al. (2001); Pham et al. (2002)
拟南芥菜花叶病毒 Arabis mosaic virus, ArMV	Pham et al. (2002)
芋瘦小病毒 Colocasia bobone disease virus, CBDV	James et al. (1973); Jackson(1980); Gollifer(1977)
芋羽状斑驳病毒 Taro feathery mottle virus, TFMoV	Matthews et al. (1996)
芋羽脉褪绿病毒 Taro vein chlorosis virus, TaVCV	Revill et al. (2005); Pearson et al. (1999)
芋杆状病毒 Taro bacilliform virus, TaBV	James et al. (1973); Jackson(1980); Gollifer(1977)
魔芋花叶病毒 Konjac mosaic potyvirus, KoMV	Shimoyama(1992a); Shimoyama(1992b)
马蹄莲花叶病毒 Zantedeschia mosaic virus, ZaMV	Kwon et al. (2002); Shi, et al. (2005)
马蹄莲轻花叶病毒 Zantedeschia mosaic mild virus, ZaMMV	Huang & Chang. (2005)
马蹄莲褪绿斑病毒 Calla lily chlorotic spot virus, CLCSV	Chen et al. (2005)
麝香石竹环斑病毒 Carnation mottle virus, CarMV	Chen et al. (2003)
鸭跖草花叶病毒 Commelina mosaic virus, ComMV	Baker & Zettler(1988); Morales & Zettler(1977)
芜菁花叶病毒 Turnip mosaic virus, TuMV	Chen et al. (2003)
菜豆黄花叶病毒 Bean yellow mosaic virus, BYMV	Pham et al. (2002)

续表

病 毒	文 献
类似于大豆花叶病毒的分离物 Virus related Soybean mosaic virus, SMV	Chen et al. (2003); Shi, et al. (2005)
苜蓿花叶病毒 Alfalfa mosaic virus, AMV	Pham et al. (2002)
马铃薯 X 病毒 Potato virus X, PVX	Pham et al. (2002)
烟草脆裂病毒 Tobacco rattle virus, TRV	Pham et al. (2002)
凤仙花坏死环斑病毒 Impatiens necrotic spot virus, INSV	Pham et al. (2002)
薯蓣潜隐病毒 Dioscorea latent virus, DLV	Hearon et al. (1978); Phillips and Brunt (1988); Phillips et al. (1986); Phillips et al. (1986)
马蹄莲潜隐病毒 Calla lily latent virus, CLLV	Chen et al. (2004)
香蕉束顶病毒 Banana bunchy top virus, BBTV	Rodoni et al. (1984)

第二节 天南星科植物病毒的传播及危害

凡天南星科植物病毒,均能通过无性繁殖体传播。一些主要病毒还通过蚜虫以非持续性方式传播和人为以病株汁液摩擦接种传播,譬如,DSMV 通过 *Myzus persicae*, *Aphis craccivora* 和 *Aphis gossypii* 等蚜虫传播 (Morales & Zettler, 1977; Gollifer et al., 1977); CBDV 能通过 *Tarophagus proserpina* 和 *Delphacididae* spp. 等蚜虫传播 (James et al. 1973)。

在自然状态下,DSMV 主要通过寄主植物的无性繁殖传播和蚜虫传播。在实验室人工接种条件下,该病毒可以通过汁液摩擦接种传播,但不能通过植株接触、种子和花粉传播 (Hartman et al., 1972; Zettler & Abo El-Nil, 1978)。DSMV 在天南星科植物上侵染后,植株表现为系统花叶、皱缩、沿脉羽化、明脉等症状,但迄今尚未发现除天南星科植物以外的寄主。在常规植物病毒指示植物如烟草、心叶烟、豇豆以及小白菜等非天南星科植物上,该病毒表现不侵染。

CMV 可以由 60 多种蚜虫以非持续性方式传播,在 19 种植物上可以种传,在