

2004.05武汉

# 植物保护和农药学 研究进展

Research Progress in Plant Protection  
and Pesticide Sciences

第三届湖北湖南植保农药学术研讨会论文集

Proceedings of the 3<sup>rd</sup> symposium of Hubei and Hunan  
provinces on plant protection and pesticide sciences

湖北省植物保护学会  
湖北省化学化工学会农药专业委员会  
湖南省植物保护学会  
湖南省化学化工学会农药专业委员会

编

中国农业出版社

# 植物保护和农药学研究进展

## Research Progress in Plant Protection and Pesticide Sciences

第三届湖北湖南植保农药学术研讨会论文集

Proceedings of the 3<sup>rd</sup> symposium of Hubei and Hunan  
provinces on plant protection and pesticide sciences.

2004.05 武汉

湖北省植物保护学会  
湖北省化学化工学会农药专业委员会  
湖南省植物保护学会  
湖南省化学化工学会农药专业委员会

编

中国农业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

植物保护和农药学研究进展：第三届湖北湖南植保农  
药学术研讨会论文集/湖北省植物保护学会等编. —北  
京：中国农业出版社，2004

ISBN 7-109-09086-8

I. 植... II. 湖... III. ①植物保护-学术会议-  
文集②农药-学术会议-文集 IV. S4-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 040974 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人：傅玉祥

责任编辑 杨天桥

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2004 年 5 月第 1 版 2004 年 5 月北京第 1 次印刷

开本：787mm×1092mm 1/16 印张：25.75

字数：597 千字 印数：1~300 册

定价：98.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误，请向出版社发行部调换)

## 内容提要

---

《植物保护和农药学研究进展（第三届湖北湖南植保农药学术研讨会论文集）》共收录了 86 篇论文，其中专题综述 19 篇、植物病害及其防治 20 篇、植物虫害及其防治 18 篇、杂草鼠害防治及其他 3 篇、农药合成加工检测和应用 26 篇。这些论文内容涉及到植物保护学和农药学的新进展、新动态及学科发展趋势，农作物病、虫、草、鼠害发生规律及其综合治理与新技术开发，农药合成研制、新农药创制、生物测定、应用技术、残留检测分析和制剂加工生产等。该书可供植保和农药科技人员、相关学科大学本科生和研究生以及农药生产企业的管理和技术人员参考。

# 《植物保护和农药学研究进展》

## 编 委 会

### 主 编：

- 王国平 湖北省植物保护学会理事长，华中农业大学教授  
贺红武 湖北省化学化工学会农药专业委员会主任委员，华中师范大学教授  
刘建华 湖南省植物保护学会理事长，湖南省农科院研究员  
刘卫东 湖南省化学化工学会农药专业委员会主任委员，湖南省化工研究院研究员

### 副主编：

- 李国庆 华中农业大学教授  
石德清 华中师范大学教授  
李建洪 华中农业大学副教授

### 主 审：

- 邓望喜 华中农业大学教授  
刘钊杰 华中师范大学教授

# 前 言

正值中央和各级地方政府高度重视我国“三农”问题和第十五届国际植物保护大会在我国召开之际，由湖北省植物保护学会、湖北省化工化学学会农药专业委员会、湖南省植物保护学会和湖南省化工化学学会农药专业委员会共同举办的第三届湖北湖南植保农药学术研讨会在江城武汉隆重举行。为了开好这次会议，我们广泛征集了相关论文，得到了广大教学和科技工作者、技术推广和企业管理人员的积极响应，表现了极高的参与热情和对新形势下植物保护与农药科学和技术发展的关注。收到的论文内容涉及到植物保护学和农药学的新进展、新动态及学科发展趋势，农作物病、虫、草、鼠害发生规律及其综合治理与新技术开发，农药的合成研制、新农药创制、生物测定、应用技术、残留的检测分析和制剂加工生产等方面。经有关专家认真编审和修改，由中国农业出版社出版了这本《植物保护和农药学研究进展》论文集。

由于时间关系，在编审的过程中难免出现错误和遗漏，恳望广大读者及同行批评指正。希望本论文集为第三届湖北湖南植保农药学术研讨会增光添彩，为促进我国植物保护和农药科技进步和学科发展，提高湖北湖南两省有害生物防治水平和农药创制能力与应用效果，推动“三农”问题的解决和农业生产与农村经济的发展起到重要作用。

最后，对论文集中各位作者的积极参与、编审人员的辛勤劳动和中国农业出版社的大力支持表示诚挚的感谢。

编 者

2004年5月

# 目 录

## 专题综述

1. 落叶果树病毒病及其研究进展 ..... 王国平 (1)
2. The Occurrence and Research Progress of Fruit Tree Viroid Diseases in China ..... Wang Guoping, Hong Ni (12)
3. 粮食储藏的生态保护及其技术体系 ..... 邓望喜 李绍勤 华红霞 (17)
4. 芜菁花叶病毒研究进展 ..... 蔡丽 许泽永 陈坤荣等 (25)
5. 湖北省森林病虫害发生现状、趋势及综合控制对策 ... 罗治建 闵水发 陈京元 (34)
6. 昆虫内共生菌及其传病毒相关 GroEL 蛋白 ..... 谭周进 肖启明 谢丙炎等 (39)
7. 长沙市农作物有害生物发生发展新特点与综合控防对策 ..... 王闯 严小兵 王冲勇 (49)
8. 温室花卉病害综合防治技术综述 ..... 洪海林 (53)
9. 蔬菜公害的成因及其控制技术的研究现状 ..... 欧阳本友 刘阳华 何玉英 (59)
10. 专家系统及其在植物保护中的应用 ..... 刘树玲 赵纯森 (64)
11. 高新技术在农作物病虫害预测预报上的应用 ..... 罗汉钢 (69)
12. 新型丙酮酸脱氢酶系抑制剂类除草剂 HW02 的创制与开发 ..... 贺红武 袁均林 谭效松等 (76)
13. Strobilurin 类杀菌剂研究新进展 ..... 刘卫东 王晓光 高必达 (77)
14. 创制新农药的研究现状及其可持续发展 ..... 欧晓明 (85)
15. 具有生物活性的噻唑环化合物的合成 ..... 刘建超 贺红武 (94)
16. 三位取代吡啶含磷化合物的研究进展 ..... 刘漪 魏佳 石德清 (101)
17. 杀虫剂混剂的增效机理研究进展 ..... 朱福兴 王沫 曾水云 (106)
18. 小菜蛾抗药性研究进展 ..... 赵锋 李建洪 (110)
19. 在遵循产品准入法规与满足农业生产需求中不断取得技术进步的农药科学 ..... 郭井泉 (118)

## 植物病害及其防治

20. 我国葡萄卷叶病病原病毒的初步分析 ..... 洪霓 王国平 李海等 (120)
21. 噬菌体对水稻细菌性条斑病的防治效果研究 ..... 成国英 涂立超 何云蔚等 (126)
22. 基因枪介导的花生条纹病毒壳蛋白基因  
转化花生研究 ..... 陈坤荣 许泽永 晏立英等 (133)
23. 植物源农药 0.4%低聚糖素水剂防治小麦赤霉病试验研究 ... 彭超美 孙光忠 (139)
24. 笔柏根腐病病原及病原菌的寄生木霉研究 ..... 吴大椿 刘宝花 (142)
25. 核盘菌重寄生菌盾壳霉降解草酸毒素的研究 ..... 任莉 胡燕梅 李国庆 (148)
26. 应用 PCR 及 Nested-PCR 技术检测柑橘黄龙  
病病原研究 ..... 丁芳 易千军 王国平 (155)
27. 应用改进的 RT-PCR 检测砂梨 ACLSV 和  
ASGV 病毒 ..... 邓晓云 洪霓 胡红菊等 (161)
28. 魔芋不同外植体愈伤组织形成的初步研究 ..... 顾玉成 吴金平 万进等 (167)
29. 拮抗细菌防治水稻纹枯病田间应用研究 ..... 肖宏英 兰时乐 陈海荣等 (172)
30. 稀土元素在魔芋栽培中的应用研究 ..... 陈浩 刘汉兰 李庆等 (176)
31. 水稻潜根线虫病的危害损失和药剂防治研究 ..... 王义成 金晨钟 (180)
32. 虎杖的提取物 P3D 对稻瘟菌侵染过程的影响 ..... 杨小军 杨立军 王少南 (182)
33. 草坪型高羊茅弯孢霉叶斑病病原鉴定及  
生物学特性研究 ..... 黄俊斌 T. Hsiang 郑莉 (184)
34. 11 种植物粗提物防治烟草赤星病的效果 ..... 王少南 杨立军 杨小军等 (185)
35. 从油菜根际分离得到一种有效拮抗油菜菌核病菌的  
枯草芽孢杆菌 ..... 晏立英 周乐聪 谈宇俊等 (187)
36. 湖北恩施松树萎蔫病病原线虫的特性 ..... 肖炎农 谢帮志 王明祖 (189)
37. 我国魔芋病害防治研究新进展 ..... 费甫华 杨廷芳 张明海等 (193)
38. 转基因油菜外源基因飘逸及其影响因素研究 ..... 刘胜毅 周必文 胡小加等 (198)
39. 油菜菌核病生防细菌功能基因的克隆和转基因  
油菜的抗病性 ..... 郭学兰 胡小加 董彩华等 (200)

## 植物虫害及其防治

40. 转 Xa21 基因稻田节肢动物群落结构研究 ..... 陈其志 张舒 郭俊等 (202)



41. 黄石市水稻种植区水稻螟虫的发生及防治 ..... 张经纶 张大明 艾玲等 (210)
42. 荆州市稻飞虱发生规律及防治 ..... 吴涛 姜卫红 王玲等 (214)
43. 孝感市水稻纵卷叶螟发生特点及防治策略 ..... 刘华林 刘梦泽 李星洲 (218)
44. 频振式杀虫灯在绿色稻米生产中控害效果初报 ... 李元文 张育鹏 谢支勇等 (223)
45. 佳多牌 220VPS—15 II 光控虫情测报灯诱虫  
效果研究 ..... 刘华林 周书文 李望军 (227)
46. 荆州市棉铃虫发生程度减轻的原因探讨 ..... 齐立 李大勇 邓俊俊 (230)
47. 转基因棉对主要病虫害发生的影响及综合防治对策 ..... 李明福 马呈瑞 (233)
48. 不同豆类对绿豆象生长发育的影响 ..... 华红霞 李绍勤 邓望喜 (236)
49. 湖北梁子湖畔藨(薹)田病虫害发生与  
危害初报 ..... 胡浩纹 邓望喜 杨石城等 (240)
50. 刺足根螨在藨头(薹)上的发生危害及  
防治研究 ..... 胡浩纹 邓望喜 朱福兴等 (243)
51. 大冶市食根金花虫的发生为害及防治对策 ..... 胡定汉 潘熙曙 罗文辉等 (247)
52. 2%高渗吡虫啉 WP 防治梨木虱试验 ..... 孙光忠 彭超美 (250)
53. 高海拔山区春结球甘蓝上的昆虫种群动态研究 ..... 李绍勤 黄丁民 邓望喜 (252)
54. 几种药剂对甘蓝蚜虫防效的比较 ..... 黄民松 陈飞 吴金萍 (258)
55. “绿色威雷”防治杨树云斑天牛和桑天  
牛试验研究 ..... 罗治建 陈京元 吴高云等 (262)
56. 湖北省无公害茶叶生产技术 ..... 刘明炎 (268)
57. 几种植物粗提物对橘小实蝇的引诱作用研究 ..... 付佑胜 王沫 潘建平等 (275)

### 杂草、鼠害防治及其他

58. 荆州市农村害鼠发生概况及灭鼠技术 ..... 齐立 李大勇 姜卫红等 (281)
59. 棉田土壤处理防除杂草试验研究 ..... 刘雪源 刘都才 成燕清等 (285)
60. 水稻低温冷害和高温热害的发生特点及  
预防措施 ..... 潘熙曙 胡定汉 龚德祥等 (290)

### 农药合成、加工、检测和应用

61. 杀虫植物——苦皮藤种子的研究 ..... 柯治国 南玉生 梁琼 (294)

62. 多汁乳菇粗提液对甜菜夜蛾生物活性研究 ..... 郭彩霞 王沫 (301)
63. 2-氧代-2-(2-氯-5-吡啶甲氨基)-4-取代苯基-5,5-二甲基-1,3,2-二氧磷杂环己烷的合成 ..... 刘漪 A. D. Feras 石德清 (306)
64. N-酰基吡唑衍生物的合成及生物活性研究 ..... 周宝晗 王宏青 曹宏等 (308)
65.  $\alpha$ -甲氧亚胺基-2-甲基苯乙酸酯的合成 ..... 陈灿 毛春晖 柳爱平等 (310)
66.  $\alpha$ -羟基磷酸酯的不对称合成 ..... 李丽艳 关金涛 余广鳌等 (314)
67. 吡螨胺的合成与应用 ..... 陶贤鉴 庞怀林 杨剑波等 (316)
68. 不对称催化反应在手性农药合成中的一些应用 ..... 任勇 关金涛 余广鳌等 (321)
69. 氟嘧磺隆的化学合成与田间除草试验 ..... 黄明智 (323)
70. 含芳环吡唑脲酯类化合物的合成 ..... 杨丽敏 王宏青 刘钊杰 (327)
71. 减压柱层析的操作及在纯化新化合物中的应用 ..... 刘兴平 柳爱平 陈灿 (329)
72. 邻二甲氧基苯的合成 ..... 杨剑波 庞怀林 (333)
73. 新型杀虫剂 HNPC-A00073 的创制研究 ..... 柳爱平 王晓光 欧晓明等 (338)
74. 杀菌剂烯酰吗啉的合成 ..... 庞怀林 杨建湘 杨剑波 (344)
75. 新型含吡唑并嘧啶芳氧苯氧丙酸酯类化合物的合成与除草活性 ..... 刘惠 王宏青 刘钊杰 (348)
76. 新型咪唑啉酮类 Schiff 碱的合成及生物活性 ..... 王英 刘钊杰 (350)
77. 改善克福酮玉米种衣剂悬浮稳定性的研究 ..... 王英超 彭海霞 (353)
78. 2,4-D 异辛酯对蛋白核小球藻生长的急性效应研究 ..... 雷满香 欧晓明 刘光辉等 (357)
79. 3%啉虫脒乳油对麦长管蚜的生物测定及药效试验 ..... 李儒海 褚世海 朱文达 (361)
80. HPLC/MS 法测定除草剂异噁草酮原药中的杂质 ..... 黄路 张立杰 黄明智 (365)
81. 草除灵中微量杂质的分析 ..... 张立杰 黄路 黄明智 (369)
82. 气相色谱法测定多种有机磷农药在蔬菜中的残留 ..... 曾水云 王沫 朱福兴等 (373)
83. 咪唑烟酸在土壤表面的光解动力学及深度研究 ..... 王学东 梁生英 周红斌 (377)
84. 敌·三唑乳油含量的气相色谱法测定 ..... 陈力华 陈九星 梁骥等 (385)
85. 75%百阔净水剂防除水稻抛秧田杂草效果评价 ..... 金晨钟 王义成 (389)
86. 高效液相色谱法测定灭多威·杀虫双水剂中的活性成分 ..... 陈九星 陈力华 杨晓明 (395)

# 专题综述

## 落叶果树病毒病及其研究进展

王国平

(华中农业大学植科院 武汉 430070)

落叶果树为多年生作物，在其长期的无性繁殖过程中，各类果树均积累感染了多种病毒 (virus)、类病毒 (viroid)、卫星病毒 (satellite)、植原体 (phytoplasma)、螺原体 (spiroplasma) 及类似病毒病害 (virus-like disease)。这些病毒类病害不仅削弱树势，导致产量降低，果实品质下降，严重时甚至引起果树急剧衰退，提早枯死，而致绝产。病毒均可通过嫁接传染，随无性繁殖材料远距离传播，有些病毒还可由昆虫、螨类和线虫等生物介体扩展蔓延。此外，一些病毒其寄主除果树外，还有许多野生植物，侵染源极为复杂。而在当今技术水平下，病毒病害还不能像真菌或细菌病害那样，用药剂进行有效的防治。因此，果树的病毒病害在国内外都由于其为害的严重性和长期性以及防治的困难性，一直是世界上植物病理学者和果树生产者所关注的一个重要问题。

### 1. 落叶果树病毒病

#### 1.1 发生危害特点

病毒病的发生和危害与果树的其它病害不同，具有以下特点：①落叶果树是多年生植物，长期以来以营养繁殖或嫁接繁殖为主，会导致病毒侵染逐年积累增多。果树一旦感染病毒，就会终生带毒，持久受害。在目前的技术条件下，尚无有效的救治办法。②嫁接是果树病毒传播的主要途径。随着接穗、砧木和苗木远距离扩散，会加快病毒的传播速率，扩大危害范围。③病毒病害不同于真菌病害和细菌病害，迄今目前，尚难以应用化学药剂或生物制品进行有效的防治。④病毒对果树进行系统侵染，一旦感染，会使植株各个部位都带有病毒，破坏树体的正常生理机能，导致树势衰退，产量下降，品质变劣，甚至整株死亡。

落叶果树病毒按其危害特点，可分为非潜隐病毒 (Non-latent virus) 和潜隐病毒 (Latent virus) 两大类。前者侵染果树后，大部分栽培品种都有明显病状，病树容易识

别, 无需特殊鉴定, 只根据症状特点即可辨认。后者在栽培品种上不表现明显病状, 必须经过检测才能明确果树的带毒状况。非潜隐病毒侵染果树后, 除少数引起减产外 (如花叶病等), 大多数都使病树丧失栽培价值, 但病树较少, 一般为零星发生而且病树容易识别, 在明确其传染方式之后, 及时刨除病树, 便可解决病毒的侵染和防治问题。这类病毒的绝大多数, 目前还不能分离提纯, 有关病毒的性质、特性还不清楚, 研究进展缓慢。潜隐病毒虽不表现症状, 但对果树的园艺性状和生产性能有显著影响, 一般生长量减少 50%~80%, 产量降低 20%~60%, 而且发生普遍, 田间带毒株率一般在 60%~80%。世界各国自上世纪 50 年代后期以来, 对这类病毒的研究和防治, 都极为重视, 并已取得了突破性进展和成功的经验。

## 1.2 主要病毒种类

19 世纪 50 年代以来, 欧美各国就对落叶果树病毒及其类似病害, 开始进行调查鉴定和试验观察, 取得了卓越的成绩。截至 2003 年, 世界各地已报道的 14 种主要落叶果树病毒及其类似病害, 有 315 种, 其中病毒及类似病毒病害 284 种、类病毒 5 种, 卫星病毒 3 种、植原体 2 种、螺原体 3 种 (表 1)。我国鉴定明确的有 27 种, 其中苹果病毒和类病毒 6 种, 梨病毒 4 种、核果类果树病毒和植原体 6 种、葡萄病毒和类病毒 6 种、草莓病毒 4 种、柿螺原体 1 种 (表 2)。不难设想, 随着研究工作的发展和多渠道从国外引种, 有可能发现或从国外引进新病毒, 造成防治上的更大困难。

表 1 世界各地报道的主要落叶果树病毒种类数 (2003)

树 种	病毒及类似病害	类病毒	卫星病毒	植原体	螺原体	小 计
仁果类	69	2	0	4	0	75
苹果	40	1	0	3	0	44
梨	21	1	0	1	0	23
榲桲	7	0	0	0	0	7
山楂	1	0	0	0	0	1
核果类	150	1	0	10	1	162
桃	35	1	0	4	1	41
李	31	0	0	1	0	32
杏	18	0	0	2	0	20
樱桃	66	0	0	2	0	68
枣	0	0	0	1	0	1
浆果类	59	2	3	4	2	70
葡萄	37	2	2	2	1	44
草莓	22	0	1	2	0	25
柿	0	0	0	0	1	1
坚果类	6	0	0	2	0	8
板栗	1	0	0	1	0	2
核桃	5	0	0	1	0	6
合 计	284	5	3	2	3	315

表 2 我国鉴定明确的落叶果树病毒种类 (2003)

树 种	病 毒	首次报道
苹果	苹果锈果类病毒 (Apple scar skin viroid, ASSVd)	陈延熙 (1951)
	苹果花叶病毒 (Apple mosaic virus, ApMV)	魏宁生 (1958)
	苹果绿皱果病毒 (Apple green crinkle virus, AGCV)	刘福昌 (1983)
	苹果褪绿叶斑病毒 (Apple chlorotic Leaf spot virus, ACLSV)	刘福昌 (1981)
	苹果茎痘病毒 (Apple stem pitting virus, ASPV)	刘福昌 (1981)
	苹果茎沟病毒 (Apple stem grooving virus, ASGV)	刘福昌 (1981)
梨	榲桲矮化病毒 (Quince stunt virus, QSV)	王国平 (1993)
	梨环纹花叶病毒 (ACLSV)	王国平 (1993)
	梨脉黄病毒 (ASPV)	王国平 (1993)
	梨茎沟病毒 (ASGV)	王国平 (1993)
核果类	李属坏死环斑病毒 (Prunus necrotic ring spot virus, PNRSV)	周媛玥 (1997)
	李矮缩病毒 (Prune dwarf virus, PDV)	周媛玥 (1997)
	杏线纹斑病 (ApMV)	王国平 (1998)
	桃潜隐花叶类病毒 (Peach Latent mosaaic viroid, PLMVd)	洪 霓 (1997)
	李伪痘病 (ACLSV)	王国平 (1998)
葡萄	枣疯病 (Jujube witches' broom phytoplasma)	季 良 (1951)
	葡萄扇叶病毒 (Grapevine fanleaf virus, GFLV)	韦石泉 (1951)
	葡萄卷叶病毒 (Grapevine leafroll associated virus, GLRaV)	李知行 (1987)
	葡萄茎痘病毒 (Grapevine virus A, GVA)	李知行 (1987)
	葡萄栓皮病毒 (Grapevine virus B, GVB)	李知行 (1987)
	葡萄斑点病毒 (Grapevine fleck virus, GFkV)	王国平 (1998)
	葡萄黄斑类病毒 (Grapevine yellow speckle viroid, GYSVd)	王国平 (1998)
草莓	草莓斑驳病毒 (Strawberry mottle virus, SMoV)	杨式琅 (1986)
	草莓轻型黄边病毒 (Strawberry mild yellow edge virus, SMYEV)	杨式琅 (1986)
	草莓皱缩病毒 (Strawberry crinkle virus, SCrV)	王国平 (1988)
	草莓镶脉病毒 (Strawberry vein banding virus SVBV)	王国平 (1988)
柿	柿疯病 (Persimon proliferation spiroplasma)	徂显诗 (1988)

在现有报道的落叶果树病毒中, 其地理分布广泛、危害损失严重, 研究工作较为深入的有以下几种:

1. 2. 1 苹果褪绿叶斑病毒 (Apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)
1. 2. 2 苹果茎沟病毒 (Apple stem grooving virus, ASGV)
1. 2. 3 苹果茎痘病毒 (Apple stem pitting virus, ASPV)
1. 2. 4 李属坏死环斑病毒 (Prunus necrotic ringspot virus PNRSV)
1. 2. 5 李痘病毒 (Plum pox virus, PPV)
1. 2. 6 李矮缩病毒 (Prune dwarf virus, PDV)
1. 2. 7 葡萄扇叶病毒 (Grapevine fanleaf virus, GFLV)
1. 2. 8 葡萄卷叶病毒 (Grapevine leafroll-associated virus, GLRaV)
1. 2. 9 草莓轻型黄边病毒 (Strawberry mild yellow edge virus, SMYEV)

## 1.2.10 枣疯病 (Jujube witches' broom phytoplasma)

## 2. 病毒鉴定和检测

通过调查和传染性实验, 确认果树一种新病害是由病毒侵染的之后, 就要进一步确定这种病毒是与已报道的病毒相同, 还是一种新病毒。这种确定病毒种类的研究, 称为病毒鉴定 (Virus identification)。而确定树木或苗木内有无病毒, 则称为病毒检测 (Virus detection)。病毒鉴定和病毒检测, 是两种不同的概念, 但又不能截然划分。目前, 由于植物病毒的分类系统尚不完整, 许多病毒的自然性状、粒体结构和生化性质都不清楚, 因此病毒种类的鉴定, 主要根据它的生物学性质, 包括症状特点、传染方式、寄主范围等。特别是多数果树病毒, 很难从果树体内直接提取出来, 也难以用汁液摩法接种到草本植物上进行分离提纯, 所以果树病毒的鉴定, 主要利用它能引起病害, 即致病性这一特点来鉴别病毒种类, 通称生物鉴定法 (Biological indexing)。近些年来, 随着分子生物学技术的发展, 对一些果树病毒的深入研究取得突破, 研制出了多种病毒的快速诊断试剂, 并已广泛应用于果树病毒检测上。

## 2.1 木本指示植物鉴定法

## 2.1.1 常用的木本指示植物

所谓指示植物 (Indicator), 是指对某种或某几种病毒及类似病原物或株系具敏感反应并表明明显症状的植物。自 1946 年 Turey 提出弗吉尼亚小苹果 (Virginia crab k-6) 可用作苹果茎沟的病毒的指示植物以来, 各国研究工作者相继报道了多种可资利用的木本指示植物 (Woody indicator), 经过试验和筛选, 目前国际上各类果树都有一套通用的木本指示植物。落叶果树病毒种类鉴定常用的木本指示植物见表 3。

表 3 落叶果树病毒鉴定常用的木本指示植物

树 种	指 示 植 物	病 毒 种 类
仁果类	苏俄苹果 (R12740-7A) 或 A20	ACLSV
	弗吉尼亚小苹果或 <i>Malus yunnanensis</i>	ASGV
	光辉 (Radiant) 或杂种榲桲	ASPV
核果类	白普贤 (Shirofugen)	PNRSV、PDV
	桃 GF305	PNRSV、PDV、PPV、ACLSV、PLMVd
	萨姆 (Sam)	樱桃小果病毒
葡萄	樱桃李 (Shiro plum)	美洲线纹斑病毒
	砂地葡萄 (St. George)	GFLV, GfKv、葡萄茎痘病
	Baco 22A 或品丽珠	葡萄卷叶病毒
	LN-33	葡萄栓皮病、茎痘病、卷叶病毒
	Kober 5 BB	葡萄茎痘病
	Mission	葡萄黄斑类病毒、卷叶病毒

## 2.1.2 接种方法

所有果树病毒都可通过嫁接传染, 利用木本指示植物进行病毒鉴定, 可进行嫁接接种, 使病毒从待检株传入到指示植物。一切在园艺上采用的嫁接方法都可用于传毒。果

树病毒嫁接接种方法有 3 类：①枝接法，包括劈接法、切接法、舌接法、靠接法、瓶接法、双重切接法；②芽接法，包括盾片芽接法、嵌芽接法、套芽接法、双重芽接法；③叶接法和皮接法。通常使用较多的是二重芽接法（苹果、梨）、指示植物上直接芽接法（葡萄、核果类）和小叶嫁接法（草莓）。

利用木本指示植物进行鉴定，一般在田间进行，有条件的也可在温室内进行。前者操作简便，费用便宜，但鉴定时间较长，一般需要 3~5 年。后者可大大缩短病毒鉴定时间，一般为 2~4 个月，但需温室设备条件，增加鉴定费用，且一些仅在果实及枝干上显现症状的果树病毒如苹果绿皱果病毒等，在温室内则难以进行鉴定。

## 2.2 草本寄主鉴别法

目前一些落叶果树病毒已成功地从木本寄主转接到草本植物上，因此可以用表现明显症状的草本植物作为这一或这些病毒的鉴别寄主（Herbaceous host）。常用的鉴别寄主有藜科：昆诺藜（*Chenopodium quinia*）、苋色藜（*C. amaranticolor*）、墙生藜（*C. murale*）等；豆科：菜豆（*Phaseolus vulgaris*）、蚕豆（*Vicia faba*）等；茄科：心叶烟（*Nicotiana glutinosa*）、克利夫兰烟（*N. clevelandii*）、西方烟（*N. occidentalis*）“37B”；苋科：千日红（*Gomphrena globosa*）、青葙（*Celosia aragentea*）等；葫芦科：黄瓜（*Cucumis sativas*）。

落叶果树病毒多在草本植物 3~5 叶期时进行汁液摩擦接种，一般接种 7~10 天后即可显症，其症状反应有 2 种类型：①局部枯斑。它是因草本植物叶片上局部组织和细胞的死亡而形成局部坏死斑，这类植物被称为枯斑寄主（Necrotic spot host）；②系统性褪绿花叶。它是草本植物叶片因叶绿体的减少而形成褪绿斑或杂色性花叶、斑驳，到生长后期，叶片可出现扭曲、皱缩等畸形症，植株顶部也可出现扭曲和丛生。这类症状在前期常表现暂时性的叶脉黄化和脉明。

蔷薇科植物病毒包括苹果病毒，多是易变而不稳定的病毒，体外存活期较短，在树体内含量较低，而且由于树体内含有单宁、多酚酶素抑制病毒活性物质，因此汁液摩擦接种都比较难于成功。例如苹果病毒除用早春的嫩叶和花瓣接种外，其他时期则难以成功。

## 2.3 血清学检测法

采用生物学鉴定法检测果树病毒需要培育大量接种植物，很费工时，而且表现症状需要较长时间，此外，果树体内的病毒含量要足以使植物致病，故其灵敏度不太高。与之相比，血清学方法具有快速简易、灵敏度高、特异性强的特点，它一般只需几小时，灵敏度可高达 1ng/ml，并可检测病毒株系。因而在果树病毒鉴定和检测上具有十分广阔的应用前景。

### 2.3.1 果树病毒抗血清制备

家兔是常用的实验动物，它具有容易饲养和操作，能够采集数量比较多的血清等优点，在制备病毒抗血清时一般选用健壮的成年公兔作为实验动物。此外，小白鼠等也用于制备抗血清，尤其是在单克隆抗体（McAb）的制备上。

获得高效价的抗血清需要首先制备一定浓度的抗原和根据动物在免疫接种后血清中

抗体出现的规律采用适当的途径对动物进行免疫和加强免疫注射。用于植物病毒抗血清制备的免疫注射途径有多种,常用的有:无佐剂静脉注射,有佐剂肌肉注射、皮内注射、淋巴结注射、皮下注射等。

### 2.3.2 血清学方法

血清学关系反映种群内、物种间和个体间亲缘关系的程度。对植物病毒而言,同一种病毒的不同株系之间一般有近缘的血清学关系,表现强的血清学反应,同一病毒属的不同病毒之间,有较远缘的血清学关系或者没有血清学关系。植物病毒血清学反应主要有以下几个方面的用途:①用于病毒鉴定(包括株系鉴定)以及病毒之间和株系之间亲缘关系程度的确定;②用于病毒检测,测定植物材料中病毒的有无以及某些情况下的定量;③病毒在寄主或介体内的定位以及通过标记反映病毒在组织中或细胞中的行为;④在基因工程操作中也用于检测、分析病毒基因的表达产物等。

一般用于果树病毒血清学反应的方法有:①琼脂双扩散反应(Gel double diffusion test)是进行病毒血清学反应测定中采用较多的基本方法,不要求特殊仪器,方法简单,测定结果稳定,但此方法灵敏度较差,常用于抗血清效价测定。②环状沉淀反应(Tube precipitin test)操作简便,反应时间短,直观性强,但需用比较多的抗血清和抗原。③酶联免疫吸附法(ELISA)是一种用酶促反应的高效力把抗原抗体反应的特异性进行放大的一种技术,具有灵敏度高,特异性强,能够进行定量显示等优点,但所用试剂、程序相对复杂,其基本原理先将抗原和抗体包被在固相支持物上,免疫反应在固相载体表面进行,并借助于结合在抗体或抗原上的酶与底物反应所产生的有颜色的产物来检测特定抗原。用于ELISA的抗血清,一般要对免疫球蛋白的IgG进行提取,盐析法和离子交换柱层析方法是用于免疫球蛋白提取的常用方法。④免疫电镜(ISEM)把血清学反应的特异性与形态学观察的直观性结合起来,具有比ELISA反应更高的灵敏度而且抗原和血清用量均少,反应时间短,在具备电镜的条件下一项十分实用的技术。

## 2.4 分子生物学检测法

目前应用于落叶果树病毒、类病毒及植原体的分子生物学检测方法,主要有:①双链核糖核酸(Double-stranded RNAs, dsRNA)5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析;②核酸分子杂交技术(Molecular hybridization)也叫核酸探针检测法(Probe detection),包括液体杂交、点迹杂交(Dot hybridization)、Southern印迹杂交、原位杂交(In site hybridization);③聚合酶链反应(PCR)。

截至2003年,世界上已有19种落叶果树病毒、类病毒和植原体可采用分子生物学方法进行检测(表4)。

表4 落叶果树病毒、类病毒和植原体的分子生物学检测

病毒名称	检测方法	参考文献
苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)	IC-RT-PCR	Candresse et al., 1995
	RT-PCR	Kinard et al., 1996
苹果茎沟病毒(ASGV)	RT-PCR	MacKenzie et al., 1997
	IC-PT-PCR	Crossley et al., 1998



(续)

病毒名称	检测方法	参考文献
	RT-PCR-ELISA	Daniels et al., 1998
苹果茎痘病毒 (ASPV)	IC-PT-PCR	Schwarz and Jelkmann, 1998
	PT-PCR	Nemchinov et al., 1998
苹果花叶病毒 (ApMV)	PT-PCR	Rowhani, et al., 1995
	PT-PCR-ELISA	Candresse et al., 1998
南芥菜花叶病毒 (ArMV)	PT-PCR	MacKenzie et al., 1997
	Hybridization	Hadidi and Hammond, 1989
樱桃小果病毒 (CLRV)	RT-PCR	Jelkmann et al., 1998
樱桃叶卷病毒 (CLRV)	RT-PCR	Rowhani et al., 1995
樱桃病毒 A (CVA)	RT-PCR	James and Jelkmann, 1998
李痘病毒 (PPV)	IC-PT-PCR	Wetzel et al., 1992
	RT-PCR	Levy and Hadidi, 1994
李矮缩病毒 (PDV)	RT-PCR	Parakh et al., 1995
	RT-PCR-ELISA	Rowhani et al., 1998
李属坏死环斑病毒 (PNRSV)	RT-PCR	MacKenzie et al., 1997
	RT-PCR-ELISA	Rowhani et al., 1998
	Hybridization	Crosslin et al., 1992
番茄环斑病毒 (TomRSV)	RT-PCR	Griesbach, 1995
	RT-PCR-ELISA	Rowhani et al., 1998
	Hybridization	Hadidi and Hammond, 1989
苹果锈果类病毒 (ASSVd 及 DAVd)	RT-PCR	Hadidi et al., 1991
	Hybridization	Loreti et al., 1998
啤酒花矮化类病毒 (HSVd)	RT-PCR	Hadidi et al., 1992
	Hybridization	Loreti et al., 1998
桃潜隐花叶类病毒 (PLMVd)	RT-PCR	Hadidi et al., 1997
	Hybridization	Loreti et al., 1998
梨疱状溃疡类病毒 (PBCVd)	Hybridization	Ambros et al., 1995
苹果丛枝植原体 (Phytoplasma)	PCR	Lorenz et al., 1995
梨衰退植原体 (Phytoplasma)	PCR	Duvies et al., 1998
核果黄化植原体 (Phytoplasma)	RCR	Carraro et al., 1998

### 3. 果树脱毒技术

获得无病毒果树的方法大致有 3 种途径, 即: ①从果园高产质优的健树上选拔; ②从国外引进无病毒材料; ③人工培育无病毒母本树。第①种方法从果园中选拔品种纯正, 多年间树势健壮, 品质产量都好的单株, 经病毒检验, 确认无病毒后即可获得母本树。第②种方法通常以引进外国品种为主。从国外有关研究机构索取或向苗木生产者直接购入。以葡萄为例, 可参照国际葡萄病毒学会公布出的葡萄无病毒品种和砧木名单, 对所需的品种, 产于哪一国家由谁生产等, 一目了然。如从上述两种方法不能取得无病毒母本材料, 亦即本国固有品种的所有植株已被病毒污染时, 就必须采取第③种方法, 其中包括热处理、茎尖培养等方法, 培育无病毒母本树。