



嘉定白蒜的病毒检测

李 贤¹, 张爱冬¹, 朱宗文¹, 吴雪霞¹, 查丁石¹, 高 畅²

(1. 上海市农业科学院 园艺研究所, 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403; 2. 上海蔬菜研究所, 上海 201899)

摘要:为明确嘉定白蒜在种植区的病毒情况,从嘉定白蒜两个种植基地采样,分别提取总 RNA,然后反转录。采用 RT-PCR 方法检测洋葱黄矮病毒(OYDV)和大蒜普通潜隐病毒(GCLV)。结果表明:根据 GCLV 中间保守序列设计 3 对特异性引物,在两处样品中均分别扩增到 300、710 和 450 bp 片断。将其中 450 bp 片断克隆后测序。测序结果与 GenBank 上的 GCLV 基因序列比对,发现其同源性达到 95%。由此确认嘉定白蒜中含有 GCLV。根据 OYDV 中间保守序列设计 5 对引物,在两处样品中均未扩增到可检测的片断,表明嘉定白蒜中不含 OYDV。

关键词:嘉定白蒜; RT-PCR; 大蒜普通潜隐病毒; 洋葱黄矮病毒

嘉定白蒜是指最早在上海市嘉定区生产的大蒜(*Allium sativum* L.),具有色泽白、蒜头肥大、肉质脆嫩、辛辣味浓郁、耐久储藏等独有的特点,是上海蔬菜地方特色品种之一,也是我国大蒜出口历史长、出口量大的重要品种,享誉日本等东南亚国家,也曾经为当地农民的增产创收发挥重要

作用。但是,近 20 年来,嘉定大蒜的种植和出口每况愈下。究其原因,由于无性繁殖,病毒感染和逐代积累,造成种性退化,蒜头质量下降,符合出口标准的蒜头比例低。解决种性退化最有效的手段是脱毒。通过茎尖培养等脱毒技术获得脱毒苗,由此获得脱毒原种和生产种。上海市农委为此设立旨在恢复嘉定白蒜种性的脱毒、快繁产业化示范的项目。迄今发现,我国大蒜病毒病至少有 4 种,包括韭葱黄条病毒(LYSV)、洋葱黄矮病毒(OYDV)、大蒜潜隐病毒(GLV)和大蒜普通潜隐病毒(GCLV),华北、东北和西北大蒜都有相关病毒检测报道^[1-4]。但针对嘉定白蒜的病毒检测工作尚未见正式报道。

收稿日期:2018-02-08

基金项目:上海市种业发展资助项目(沪农科种字 2016 第 1-11 号)。

第一作者简介:李贤(1962-),男,博士,副研究员,从事蔬菜生物技术研究。E-mail:Xianlisiwei@163.com。

通讯作者:查丁石(1966-),男,博士,研究员,从事蔬菜育种及生物技术研究。E-mail:dingshizha@aliyun.com。

Study on Stem-tip Tissue Culture and Rapid Propagation Techniques of New Strawberry Cultivar Jingzangxiang

YANG Bo¹, ZHAO Bao-long², SUN Jun-li², LIU Lian-ling¹

(1. College of Agronomy, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. The Corps Key Laboratory of the Cultivation Physiology and Germplasm Resources Utilization of Characteristic Fruits and Vegetables, Shihezi 832000, China)

Abstract: In order to accelerate the application of strawberry virus-free seedling, this experiment chose Chinese self-bred strawberry variety Jingzangxiang as material, we analyzed the selection of different types and concentrations of different hormones in stem tip induced germination, secondary appreciation and rooting culture, and detected the virus condition by RT-PCR and evaluated its detoxification effect. The results showed that the suitable medium for Jingzangxiang shoot tip induction was MS+0.6 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ IAA, the subculture medium was MS+1.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, and the rooting medium was 1/2 MS+0.1 mg·L⁻¹ IBA. The detoxification rate of the SMYEV and the SMoV was all 100%, and the detoxification rate of the SVBV was 82%, indicated that the detoxification effect was good.

Keywords: strawberry; Jingzangxiang; tissue culture; stem tip

根据中华人民共和国农业行业标准有关脱毒大蒜种蒜病毒检测技术规程(NY/T 405-2000),应用脱毒技术获得的再生试管苗须经检测确认不带洋葱黄矮病毒(OYDV)和大蒜普通潜隐病毒(GCLV),才确认为脱毒苗。本文从嘉定白蒜的两个主要种植区海门和太仓采集样本,针对洋葱黄矮病毒和大蒜普通潜隐病毒采用 RT-PCR 技术进行检测,一则调查嘉定白蒜在种植区的感病情况,二则为将来研制嘉定白蒜脱毒种蒜的脱毒检测提供标底依据。

1 材料与方法

1.1 材料

5 月中旬从嘉定白蒜海门种植基地和太仓种植基地取样,取样方法依据中华人民共和国农业行业标准有关脱毒大蒜种蒜病毒检测技术规程(NY/T 405-2000),分别标记为样品 1 和样品 2。

1.2 方法

1.2.1 RNA 抽提和纯化 采用 TRIZOL Reagent(Cat # 15596-018, Life technologies, Carlsbad, CA, US)并且根据生产厂商提供的标准操作流程进行样品的总 RNA 抽提,抽提所得总 RNA 经 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)电泳质检合格后使用 RNeasy mini kit(Cat # 74106, QIAGEN, GmbH, Germany)和 RNase-Free DNase Set (Cat # 79254, QIAGEN, GmbH, Germany),纯化总 RNA。

1.2.2 cDNA 第一链合成 cDNA 的合成按 Clontech 公司 SMART cDNA Library Construction Kit 说明书操作进行第一链合成。

1.2.3 PCR 扩增 按照大蒜普通潜隐病毒(GCLV)中间保守序列设计 3 对引物:

R44366 = GCLV: 5'-GTGGTTTGAAT-GAA-3';

R44367 = GCLVF: 5'-CGATCCATTGAA-GTTTGT-3';

R44567=GCLVCPZ;R44368=GCLVCPF;

R44569=GCLVNABPZ;

R44370=GCLVNABPF。

以合成的嘉定白蒜 cDNA(S1,S2)第一链为模板,以上述 3 对引物,进行 PCR 扩增,扩增条件为:94 ℃ 预热 10 min;94 ℃,30 s,52 ℃,30 s,

72 ℃,3 min。共 25 个循环。PCR 结束后,琼脂糖电泳检测 PCR 片断。

按照洋葱黄矮病毒(OYDV)中间保守序列设计多对引物:

R44388 = OYDVZ: 5'-GAATAATAGTA-AGCAGCCGTC-3'; R44389 = OYDVF: 5'-CT-TAATACCAAGCAACGTGTG-3';

R44571 = OYDVZ1;R44572 = OYDVZF1;

R44818 = OYDVCPZ1;

R44819 = OYDVCPZ2;

R44820 = OYDVCPZ3;

R44822 = OYDVCPF1; R44823 = OYD-VCPF2;R44540 = OYDVCPF3。

以合成的嘉定白蒜 cDNA(S1,S2)第一链为模板,以上述 5 对引物,进行 PCR 扩增条件为:94 ℃ 预热 10 min;94 ℃,30 s;52 ℃,30 s;72 ℃,3 min。共 25 个循环。PCR 结束后,琼脂糖电泳检测 PCR 片断。

1.2.4 病毒片断克隆和测序 酚:氯仿抽提 R44567、R44568 引物扩增的 PCR 产物(450 bp),再加入 2 倍体积的无水乙醇进行沉淀,沉淀用 30 μL 水溶解,获得的 PCR 基因片段进行平端克隆。克隆阳性进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 大蒜普通潜隐病毒的检测结果

按照大蒜普通潜隐病毒(GCLV)中间保守序列设计 3 对引物,以嘉定白蒜两组样品的 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增,经琼脂糖电泳检测,均出现明显条带。其中第一对引物 R44366、R44367 扩增出 300 bp 条带(图 1)。第二对引物 R44567、R44568 扩增出 710 bp 条带(图 2)。第三对引物 R44569、R44570 扩增出 450 bp 条带(图 3)。取 R44567、R44568 引物扩增的 PCR 产物克隆后测序,与报道的大蒜普通潜隐病毒比较,其同源性达到 95%(详见测序附件)。表明海门种植区和太仓种植区的嘉定白蒜样品中均含有该病毒。

2.2 洋葱黄矮病毒检测结果

按照洋葱黄矮病毒(OYDV)中间保守序列设计 5 对引物,以嘉定白蒜两组样品的 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增,经琼脂糖电泳检测,均未检测出条带。表明嘉定白蒜在海门和太仓两个种植区中均不含洋葱黄矮病毒。

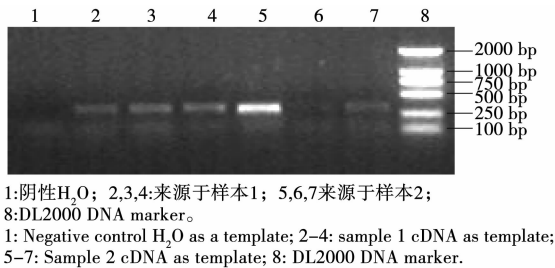


图 1 以嘉定白蒜 cDNA 为模板和 R44366、R44367 引物扩增结果

Fig. 1 PCR amplified results with R44366 and R44367 primers in Jiading white garlic cDNA

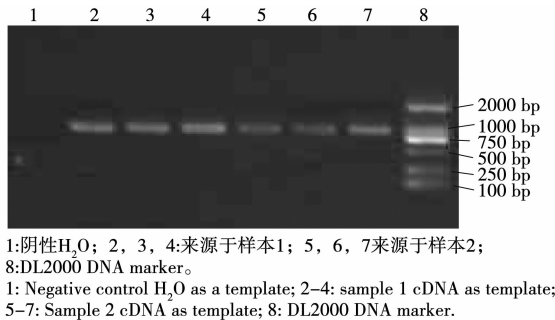


图 2 以嘉定白蒜 cDNA 为模板和 R44567、R44568 引物扩增结果

Fig. 2 PCR amplified results with R44567 and R44568 primers in Jiading white garlic cDNA

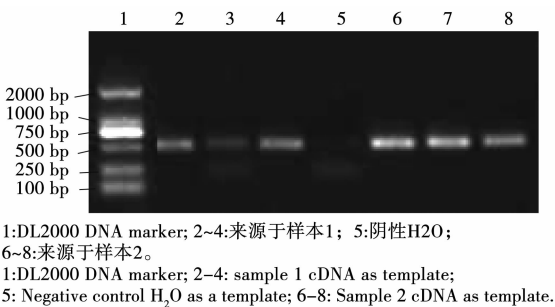


图 3 以嘉定白蒜 cDNA 为模板和 R44569、R44570 引物扩增结果

Fig. 3 PCR amplified results with R44569 and R44570 primers in Jiading white garlic cDNA

3 讨论与结论

大蒜病毒检测方法有许多种,包括目测法、指示植物检测法、电子显微镜检测、血清学检测和分子生物学检测。本文采用的 RT-PCR 技术是属于分子生物学检测方法,也是现在最流行的病毒检测方法,因为具有检测简单、快速和灵敏度高等优点^[8]。检测大蒜普通潜隐病毒的过程非常顺利,根据其保守序列设计的 3 对引物在两个样品中均扩增到相应的片段,取其中 450 bp 片段克隆

后测序,与 Genbank 上发表的大蒜普通潜隐病毒基因序列具有 95% 的同源性。由此说明该方法简单有效。但在检测洋葱黄矮病毒的过程中,根据其保守序列先设计 3 对引物,在两个样品中均未扩增出可检测的片段。后来又另外设计了两对引物,并调整扩增参数,重复多次,依然未能扩增出可检测的片段。由此推断,在江苏海门和太仓两个种植区的嘉定白蒜,洋葱黄矮病毒不是主要病害,而大蒜普通潜隐病毒则普遍存在。但孙新艳等^[4]在河南省大蒜病毒病的分子检测中,也采用 RT-PCR 方法对表现矮缩症状的大蒜样品分别用 5 对引物进行检测,结果同时检测到洋葱黄矮病毒(OYDV)、韭葱黄条病毒(LYSV)和青葱潜隐病毒(SLV),而没有检测到大蒜普通潜隐病毒(GCLV)。这说明大蒜病毒病有地域差别。洋葱黄矮病毒的主要宿主是洋葱,而植物病毒依赖蚜虫、蛱蝶等昆虫传播。昆虫咬噬带 OYDV 的洋葱后再咬噬附近的大蒜,就可能传染 OYDV。因此在洋葱种植区的大蒜感染 OYDV 的机会较大。事实上,在洋葱产区的东北和西北,在大蒜上均检测到洋葱黄矮病毒^[3,5]。嘉定白蒜主要在上海周边地区种植,种植区附近少有洋葱种植,因此受昆虫传播洋葱黄矮病毒的机会较少。另外,洋葱黄矮病毒感染大蒜后,症状较明显,可以轻易拔除以免进一步传播;而大蒜普通潜隐病毒感染症状不明显,必须与其它病毒复合感染才表现出感病症状^[6-7]。这可能解释了嘉定白蒜普遍含有大蒜普通潜隐病毒而不含洋葱黄矮病毒的试验结果。下一步将对嘉定白蒜脱毒试管苗进行病毒检测,确认脱毒后繁殖原种。按照中华人民共和国农业行业标准有关脱毒大蒜种蒜(苗)病毒检测技术规程(NY/T 405-2000),必须检测确认不带洋葱黄矮病毒(OYDV)和大蒜普通潜隐病毒(GCLV),有了本文的试验结果,就可以只检测大蒜普通潜隐病毒(GCLV)。

参考文献:

[1] 李金娟,李唯,栗孟飞,等. 三种大蒜中洋葱黄矮病毒的 RT-PCR 分子鉴定[J]. 基因组学与应用生物学,2011,30(3): 330-335.

[2] 张威,张匀华,李学湛,等. 应用 RT-PCR 分子检测技术快速检测大蒜普通潜隐病毒[J]. 植物保护,2008,34(1): 133-138.

[3] 张威,白艳菊,申宇,等. 黑龙江省大蒜病毒病原鉴定及病毒病发生情况调查[J]. 东北农业大学学报,2010,41(7):

21-26.

[4]

孙新艳,史亚娟,王振跃,等. 河南省大蒜病毒病的分子检测[J]. 河南农业科学,2016,45(3):102-105.

[5]

许蕊,栗孟飞,王雅琳,等. 应用多重 RT-PCR 检测甘肃成县迟蒜中的大蒜潜隐病毒和洋葱黄矮病毒[J]. 甘肃农业学报,2013,48(2):46-49.

[6]

王采炜,孙浩. 大蒜病毒的快速检测[J]. 淮北师范大学学报,2013,34(1):41-45.

[7]

Van DUK P. Carlavims isolates from cultivated Auium species represent three viruses[J]. Netherland Journal of Plant Pathology,1993,99:233-257.

[8]

Tsuneyoshi T,Sumi S. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays [J]. Phytopathology, 1996, 86:253-259.

Viruses Detection of Jiading White Garlic

LI Xian¹,ZHANG Ai-dong¹,ZHU Zong-wen¹,WU Xue-xia¹,ZHA Ding-shi¹,GAO Chang²

(1. Horticultural Research Institute,Shanghai Academy of Agricultural Sciences,Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201403, China; 2. Shanghai Research Institute of Vegetable, Shanghai 201899,China)

Abstract: In order to clarify the virus situation in Jiading white garlic, total RNA was extracted from samples, which collected from two Jiading white garlic planting bases, and cDNA was synthesized using reverse transcriptase. Onion yellow dwarf virus(OYDV) and garlic common latent virus(GCLV) were detected by RT-PCR. The results showed that 3 pairs of specific primers were designed according to the GCLV intermediate conservative sequence. We amplified and got 300,710 and 450 bp fragments from two samples respectively. We cloned the 450 bp fragment and sequenced. The sequencing result was compared with GCLV gene sequence in GenBank and the homology rate reached 95%, which confirmed the existence of GCLV in Jiading white garlic. According to conserved sequence of OYDV, we designed 5 pairs of specific primers. However, we didn't obtain the amplified fragments, indicating Jiading white garlic in two planting bases contained no OYDV.

Keywords: *Allium sativum* L.; RT-PCR; garlic common latent virus(GCLV); onion yellow dwarf virus(OYDV)

致谢:本试验在上海农业科学院生物技术研究所基因工程研究室完成,得到姚泉洪和彭日荷研究员的大力支持。

《黑龙江农业科学》理事会

理事长单位	代表	理事单位	代表
黑龙江省农业科学院	院长 李文华	黑龙江生物科技职业学院	院长 李承林
副理事长单位	代表	宁安县农业委员会	主任 曾令鑫
黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所	所长 潘国君	农垦科研育种中心哈尔滨科研所	所长 姚希勤
黑龙江省农业科学院五常水稻研究所	所长 张广柱	黑龙江农业职业技术学院	院长 李东阳
黑龙江省农业科学院克山分院	院长 邵立刚	黑龙江职业学院	院长 赵继会
黑龙江省农业科学院黑河分院	院长 张立军	鹤岗市农业科学研究所	所长 姜洪伟
黑龙江省农业科学院绥化分院	院长 陈维元	伊春市农业技术推广中心	主任 张含生
黑龙江省农业科学院牡丹江分院	院长 张太忠	甘南县向日葵研究所	所长 孙为民
黑龙江农业经济职业学院	院长 张季中	萝北县农业科学研究所	所长 张海军
中储粮北方农业开发有限责任公司	总经理 戴传雄	齐齐哈尔市自新种业有限责任公司	总经理 陈自新
常务理事单位	代表	黑龙江省农垦科学院水稻研究所	所长 解保胜
勃利县广视种业有限责任公司	总经理 邓宗环	黑龙江八一农垦大学农学院	院长 杨克军
黑龙江垦丰种业有限公司	总经理 刘显辉	绥化市北林区农业技术推广中心	主任 张树春
内蒙古丰垦种业有限责任公司	董事长 徐万陶	黑龙江省齐齐哈尔农业机械化学学校	校长助理 张北成