分类号： 学校代码：10373

密 级： 学 号：11015071115



**硕士学位论文**

**题** 目**：**大蒜病毒的分子检测及脱毒技术的 究

**论文作者：**  **王 采 炜 指导教师：**  **何 道 一 专业名称：**  植 物 学 **研究方向：**  植物分子Th物学

淮北师范大学研究生处二○一三年六月



大蒜病毒的分子检测及脱毒技术的研究

王采炜（植物学）

摘 要

大蒜（*Allium sativum L.*）为百合科葱属植物，自然条件下的大蒜一般受到两种或两种以上病毒的侵染。大蒜是无性生殖作物，在生产上一般采取留种栽培，因此病毒在大蒜植物体内逐代累积，严重影响了大蒜的产量和质量。目前侵染大蒜的病毒主要有香石竹潜隐病毒属、马铃薯Y病毒属和青葱X病毒属成员等。对于植物病毒的鉴定，使用得比较广泛的有电子显微镜鉴定法，血清学法和分子生物学法，其中最灵敏、特异性最强的是分子生物学法，本实验采取的是RT-PCR法，是从核酸的层面上来检测大蒜病毒。本实验的主要研究有：

1.首先大致调查国内大蒜病毒病的发生情况，本实验收集了四个大蒜主要产区的样品进行实验，他们分别来自于贵州、四川、陕西、重庆。首先是采用传统RT-PCR法检测病毒，通过提取大蒜的总RNA，逆转录合成cDNA，根据已发表的大蒜3’端保守序列设计引物进行PCR扩增，获得的目的片段连接载体后导入到大肠杆菌中克隆，提取质粒酶切后送往上海生工测序，序列结果与GenBank中收录的序列分析比对后得知从大蒜样品上分离到的病毒是香石竹潜隐病毒属的大蒜潜隐病毒、马铃薯Y型病毒和大蒜新型病毒。

2.对扩增出的目的片段作单链多态性分析，本实验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行分析，PAGE能精确的检测出相同长度的DNA一个碱基上发生的变化。4个样品的PCR产物热变性处理后使其双链DNA解螺旋变为单链，经PAGE电泳后均只出现了两条主带，分别是两条单链DNA，说明不同样品中的同一病毒之间不存在差异，也未有突变发生。

3.在传统RT-PCR技术的基础上，对实验进行了改良和优化，改良了RNA的提取方法大大缩短了实验时间；优化了PCR反应过程，增加了循环次数，并尝试了一步法两步法等，寻找最适宜的扩增条件，最终建立起一套快速检测大蒜病毒的方法，在保证了相同灵敏度和特异性的同时缩短了检测时间。

4.目前防治大蒜的病毒病最有效的方式是培育和推广使用无毒苗，实验采用了高温脱毒法和药物脱毒法处理大蒜的根尖，将脱毒厚的根尖经组织培养再生诱导成新的植株，最终在药物脱毒法处理后的大蒜植株中获得无毒苗。若将此无毒

苗投入生产，便可获得无毒的大蒜优良种。关键词：大蒜，病毒检测，RT-PCR

Study on the detection of garlic viruses and production of

Virus-free garlic

Wang caiwei (Botany)

Abstract

Garlic (*Allium sativum L.*) belongs to the liliaceae Allium. Under natural conditions, it is usually infected by viruses. The accumulation of virus in garlic causes serious diseases because of vegetative propagation. Thus there is a serious impact on the yield and quality of garlics. The viruses in garlic mainly include Carlavirus, Potato Y virus and Shallots X virus, etc. As to the virus identification, electron microscopy assay method, serum method and molecular biological research method are·widely used. Molecular biological research method is the most sensitive and specific among them. This experiment adopted RT-PCR method identifying garlic virus in nucleic acid level. The main conclusions of this study are as follows:

Before the experiment, we investigated the virus development situation of garlic in China. We collected four kinds of samples from Guizhou province, Sichuan province, Shanxi province and Chongqing. The viruses were detected based on the traditional RT-PCR method. Firstly, total RNA was extracted and cDNA was synthesized by reverset ranscription enzyme. Secondly, the primers for PCR amplification were designed according to the conserved sequence of garlic 3' end, and then connect amplified target fragment with carrier which would betransformed into E. coli. Thirdly, the constructed plasmid was extracted, and after enzyme identification it would be sequenced. Compared to the sequence from the GenBank database, the viruses isolated from the garlic samples were carlavirus, potato Y virus and new garlic virus.

Single-stranded DNA polymorphism for amplified fragments was analysed by the polyacrylamide gel electrophoresis. Firstly, double-stranded PCR products unwinding by thermal denaturation process then test the single chain products by PAGE electrophoresis. The results showed that only two main bands were observed, the virus did not mutate between different samples, so there was no genetic

differences.

The improved virus detection protocol of garlic: Improved RNA extraction method has greatly shortened the experiment time; PCR reaction process was optimized by increasing cycle times, and tried to study the step method, etc. The most suitable amplification conditions were explored. A rapid virus detection system of garlic was established eventually, and it shorten the detection time with the same sensitivity and specificity.

Cultivating and promoting the virus-free garlics was the most effective way for garlic virus disease prevention. High temperature and drug detoxification method were used in the experiment process of dealing with the tip of garlic, then the tip of garlic was inducted into the new plant. Virus-free garlic was obtained eventually with drug detoxification method. The excellent garlic germplasm will be get, if putting virus-free garlics into production.

Key words: Garlic; RT-PCR; Virus detection

目 录

[摘 要](#_Toc686163772) 2

[Abstract](#_Toc686163773) 2

[第一章 文章综述](#_Toc686163774) 3

[1. 植物病毒](#_Toc686163775) 3

[1.1 植物病毒的类型](#_Toc686163776) 3

[1.2 植物病毒对植物Th长的危害](#_Toc686163777) 3

[1.3 植物病毒的检测手段](#_Toc686163778) 3

[1.3.1 Th物学检测法](#_Toc686163779) 4

[1.3.2 电镜技术](#_Toc686163780) 4

[1.3.3 血清学方法](#_Toc686163781) 4

[1.3.4 分子Th物学方法](#_Toc686163782) 4

[2 大蒜](#_Toc686163783) 4

[2.1 大蒜病毒的类型](#_Toc686163784) 4

[2.1.1 香石竹潜隐病毒属(](#_Toc686163785)*[Carlavirus](#_Toc686163785)*[)](#_Toc686163785) 5

[2.1.2 马铃薯Y病毒属(](#_Toc686163786)*[Potyvirus](#_Toc686163786)*[)](#_Toc686163786) 5

[2.1.3 青葱X病毒属(](#_Toc686163787)*[Allexivirus](#_Toc686163787)*[)](#_Toc686163787) 5

[2.2 大蒜病毒的检测方法](#_Toc686163788) 5

[2.2.1 核酸分子杂交技术(Nucleic Acid Hybridization)](#_Toc686163789) 6

[2.2.2 双链RNA电泳技术(Double-stranded RNA, dsRNA)](#_Toc686163790) 6

[2.2.3 聚合酶链式反应技术(Polymerase Chain Reaction，PCR)](#_Toc686163791) 6

[2.2.4 反转录聚合酶链式反应（Reverse Transcription PCR，RT-PCR)](#_Toc686163792) 6

[2.3 大蒜病毒的防治方法](#_Toc686163793) 6

[3 大蒜病毒的研究现状](#_Toc686163794) 6

[4 论文选题及欲解决的问题](#_Toc686163795) 7

[5. 本研究主要目的为：](#_Toc686163796) 7

[第二章 材料与方法](#_Toc686163797) 7

[2.1 实验材料](#_Toc686163798) 7

[2.1.1 植物材料](#_Toc686163799) 7

[2.1.2 酶及试剂](#_Toc686163800) 7

[2.1.3 主要试验仪器设备](#_Toc686163801) 8

[2.1.4 试剂配制](#_Toc686163802) 8

[2.1.4.1 提取质粒所需试剂的配置：](#_Toc686163803) 8

[2.1.4.2 培养基的配置](#_Toc686163804) 8

[2.1.4.3 提取RNA所需试剂配置](#_Toc686163805) 8

[2.1.4.4 PAGE电泳所需试剂配置](#_Toc686163806) 8

[2.2 实验方法](#_Toc686163807) 9

[2.2.1 用传统的RT-PCR法检测大蒜病毒](#_Toc686163808) 9

[2.2.1.1 设计引物](#_Toc686163809) 9

[2.2.1.2 大蒜叶片总RNA的提取](#_Toc686163810) 10

[2.2.1.3 病毒的RNA逆转录合成cDNA](#_Toc686163811) 10

[2.2.1.5 PCR扩增](#_Toc686163812) 11

[2.2.1.6 DNA的回收](#_Toc686163813) 11

[2.2.1.7 PAGE电泳](#_Toc686163814) 12

[2.2.1.7 感受态细胞的制备](#_Toc686163815) 12

[2.2.1.8 连接载体](#_Toc686163816) 12

[2.2.1.8 感受态细胞的转化](#_Toc686163817) 12

[2.2.1.9 提取质粒](#_Toc686163818) 13

[2.2.1.10 酶切](#_Toc686163819) 13

[2.2.1.11 序列测定与分析](#_Toc686163820) 13

[2.2.2 大蒜病毒的快速检测](#_Toc686163821) 13

[2.2.2.1 大蒜病叶总RNA提取](#_Toc686163822) 13

[2.2.2.2 一步法RT-PCR](#_Toc686163823) 13

[2.2.2.3 二步法RT-PCR](#_Toc686163824) 14

[2.2.2.4 RT-PCR产物检测](#_Toc686163825) 15

[2.2.3 大蒜脱毒](#_Toc686163826) 15

[2.2.3.1 高温脱毒](#_Toc686163827) 15

[2.2.3.2 药物脱毒](#_Toc686163828) 16

[第三章 实验结果与分析](#_Toc686163829) 16

[3.1 大蒜病毒的分子鉴定](#_Toc686163830) 16

[3.1.1 香石竹潜隐病毒的检测](#_Toc686163831) 16

[3.1.1.1 香石竹潜隐病毒的RT-PCR结果](#_Toc686163832) 16

[3.1.1.2 单链多态性分析](#_Toc686163833) 16

[3.1.1.3 重组质粒的鉴定](#_Toc686163834) 16

[3.1.1.4 序列测定](#_Toc686163835) 17

[3.1.2.5 序列分析](#_Toc686163836) 17

[3.1.2 马铃薯Y型病毒的检测](#_Toc686163837) 19

[3.1.2.1 马铃薯Y型病毒的RT-PCR结果](#_Toc686163838) 19

[3.1.2.2 PAGE 电泳](#_Toc686163839) 19

[3.1.2.3 重组质粒的鉴定](#_Toc686163840) 20

[3.1.2.4 序列测定与分析](#_Toc686163841) 20

[3.1.3 大蒜新型病毒的检测](#_Toc686163842) 25

[3.1.3.1 大蒜新型病毒的RT-PCR结果](#_Toc686163843) 25

[3.1.3.2 PAGE 电泳](#_Toc686163844) 26

[3.1.3.3 重组质粒的鉴定](#_Toc686163845) 26

[3.1.3.4 序列测定与分析](#_Toc686163846) 26

[3.2 大蒜病毒的快速检测实验结果](#_Toc686163847) 31

[3.3 大蒜脱毒实验结果](#_Toc686163848) 31

[3.3.1 高温脱毒实验结果](#_Toc686163849) 31

[3.3.2 药物脱毒法实验结果](#_Toc686163850) 32

[第四章 讨论与结论](#_Toc686163851) 32

[4.1 讨论](#_Toc686163852) 32

[4.2 实验结论](#_Toc686163853) 32

[4.2.1 传统RT-PCR法检测过程中的主要问题](#_Toc686163854) 32

[4.2.2 大蒜病毒的快速检测方法研究中的问题](#_Toc686163855) 32

[4.2.3 大蒜脱毒实验中的问题](#_Toc686163856) 33

[4.3 关于后续工作](#_Toc686163857) 33

[参考文献](#_Toc686163858) 33

[攻读硕士学位期间出版或发表的论著、论文.](#_Toc686163859) 37

# 第一章 文章综述

## 1. 植物病毒

病毒是一类不具细胞结构，只具有遗传、复制等生命特征的微生物，是一个由保护性的蛋白质或者脂蛋白外壳包裹着的DNA或RNA核酸。病毒是高度寄生生物，它的繁殖和正常生命活动都必须依赖于宿主细胞，它生命活动所需的物质和能量都来自于宿主的能量和代谢系统，它只是一个大化学分子，一旦离开宿主细胞便会停止生命活动。病毒虽然在细胞外也能保持生命力，但自身的复制和繁殖只能在寄宿在别的细胞中进行，需要借助寄主细胞内的能量、物质和蛋白质合成体系，核酸复制的过程也可能发生变异和基因突变。病毒虽为一个生命体，但当它遇到合适的宿主细胞时，它就会通过吸附进入细胞体内，并利用细胞内固有的生产系统进行复制、装配，最后释放出成熟的子代，显示出病毒典型的生命体特征。病毒同所有生物一样具有遗传、变异、进化的能力，但它体积非常微小，多数病毒直径在20~200nm之间，并且它的结构也极其简单，是介于生物与非生物之间的一种原始的生命体[1]。

植物病毒是指感染高等植物、藻类等真核生物的病毒，病常常在农业生产中造成巨大经济损失。在传种过程中因为病毒的感染而导致的病害称为病毒性传种病害，患病植株表现出的外部症状常有叶片皱缩、矮丛、环斑、枯斑、花叶和褪绿等明显症状。病毒性种传病带来的危害很大，通常会引发整个植株遭遇病害。例如：黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)侵染植物后，可以附着在其种子表皮内使得传播距离更远，它能侵染如葫芦科的植物黄瓜、甜瓜等[2]。瓜类蔬菜遭受病毒侵染后会导致整株植物发生病毒病，还有一些病毒能进入种子，并在种子中寄宿，使种子变成侵染源。烟草花叶病毒(TMV)和黄瓜花叶病毒(CMV)能够分别侵染辣椒、番茄，使其发生相应的病毒病，但在自然条件下，也有同时侵染辣椒、番茄的，这种复合侵染发生的病毒病更加严重，且病毒还会寄宿到种子中[3]。

### 1.1 植物病毒的类型

植物病毒病大部分属于单链RNA病毒，基本形态有丝、状杆状和等轴对称的近球形二十面体。病毒是至今人们所知的存在于自然界的最小生物之一，需要借助电子显微镜放大到几万甚至几十万倍才能观察到其形态大小。国际病毒分类委员会(ICTV)先后发表了八次关于植物病毒分类的报告，2005年的报告中总共收录的了1122个植物病毒，其中有七百六十三个已知病毒的已经确定到种，植物病毒暂定种二百七十九个，没有划分到属的植物病毒六十四个，暂时无法分类的植物病毒有十六个。植物病毒的种类相当多，动物病毒大多数是DNA，而植物病毒的基因组大多数是RNA，但也有很多其他形式，如ssDNA、dsDNA、

ss(+) RNA、ss(-) RNA和dsRNA等。由于植物病毒种类很多且常有变异发生，因此要对植物病毒病害进行认识和防治是比较困难的。在基因组方面的研究上，植物病毒相对于其他生物来说还算比较容易，它的基因组一般不会超过10kb，要想获取全部的基因组信息不算太难[4]。

植物病毒是严格的寄生生物，但是专一性不强，往往一种病毒可以寄生在不同科甚至不同种属的植物上，例如烟草花叶病毒就能侵染10多个科，200多种草本和木本植物。病毒对植物的损害与病虫的方式不同，病虫一般是消耗植物的组织、细胞、养分，以及释放毒素来杀死植物细胞，而病毒只是利用了植物细胞内的物质，来产生一些病毒自身需要的物质，它干扰了细胞的正常代谢过程，同时促使细胞产生一些异常条件和异常物质，这影响了植物细胞的正常功能，甚至危害到细胞或植株的生命。绝大多数种子植物都很容易发生病毒病，所以病毒病害的威力仅次于真菌病害[5]，被称为植物的癌症。

### 1.2 植物病毒对植物Th长的危害

植物病毒几乎在各种植物上都有发生，全世界范围内均有农作物病害，严重影响到农作物的质量和产量，给生产带来困难。植物病毒病在全世界都普遍发生，近几年不断有新的植物病毒被发现和报道，且有越演愈烈之势，植物的病毒病已成为植物第二大病害[6]。植物病毒传播方式很多，在自然界中多种昆虫都是传播

者，例如蚜虫、灰飞虱、叶蝉等，还有些土壤里的微生物也可以传播，例如真菌、线虫等。在适宜的环境条件与多种生物与非生物因素等条件下，病毒与传播介体、传播介体与寄主植物两者之间能够的识别和相互作用，病毒病害即可发生和流行

[7]. 随着国际之间的交流和贸易越来越频繁，发生了越多越多的外来病毒入侵，

也对农业生产甚至生态平衡造成了严重威胁，再加上农业产品越来越丰富，生产结构发生变化，气候、环境等因素也再改变，植物病毒病害的发展规律变得更加难以捉摸，甚至导致局部地区病毒病害暴发成灾，由此产生了不少新的生态问题和经济安全问题。

植物病毒病确实难以控制，常规办法如治虫防病法、喷增抗剂、喷病毒钝化剂法的效果都不是很理想，因此最有效的方法就是先对田间病源进行彻底清除，再将脱毒种苗投入到生产当中，并加强生态防治。使用这些种方法都需要用到病毒的检测技术，因此，高效灵敏的病毒检测技术是防治植物病毒病害的关键基础之一[8]。

### 1.3 植物病毒的检测手段

植物病毒病是一类重要病害，由于病毒的传播有太多未知的和难以控制的生物、非生物因素，目前也暂无有效的化学药剂可防治，是生产上的一大难题。早期植物病毒主要是通过生物学的方法来检测和鉴定，一般是通过介体传播到指示植物上，或者通过嫁、接汁液磨擦等使病毒侵入到指示植物上，再观察其发病症状。

九十年代科学家们只是在植物病理学领域里研究植物病毒，现代社会进步很快，科学技术迅速发展，生理学、生化学、医学、免疫学等飞速进步影响和带动了植物病毒学的发展，并与之相互渗透，特别是在基因工程、分子生物学等学科中获得了飞速的发展，加上不断开拓出新的技术和方法，并且已经运用到植物病毒的检测当中，这使得病毒学的发展更上一层楼，发生了质的飞跃。

早些年应用的大都是物理的方法检测病毒，使用一些特殊的手段使病毒与其他物质区分出来进行观察，比如呈现出来比如细菌过滤器、X射线衍射法扫描，或是使用显微技术对病毒进行观察，如电子显微镜、扫描投射电镜等，而现在，

研究者们已经开始生物分子学的技术手段来检测病毒了，例如分子重组、克隆和核酸的体外表达等[9]；从前学者们只能观察植物病毒的形态和结构，现在这些高新技术已经广泛运用，让我们不仅能够清晰地观察病毒的核酸、蛋白质和大分子等及其微小的结构，还能研究植物病毒的基因组，测出其核苷酸序列、进而分析它的氨基酸的组成和功能，这样才能抓住植物病毒的本质属性，无论在理论上还是在实际应用上都有了很大发展，让人们对植物病毒有了更深刻的认识。

#### 1.3.1 Th物学检测法

生物学鉴定是传统的病毒鉴定方法，其本质就是需要借助于某些对病毒敏感的植物作为指示植物来进行的病毒鉴定的办法，我们能够直接观察结果，鉴定结果比较可靠，也能准确地反映病毒的生物学特性。最早是在1925 年James

Johnson[10]发明的，并沿用至今，他将待测的植物病毒传染到指示植物上，再对指示植物进行鉴定。选用指示植物的目的是它一旦被感染上病毒就能迅速表现出明显病毒病症状，可以是某一种病毒，也可以是几种病毒，甚至是类病毒都能发生敏感反应[11]。指示植物的种类很多，一般依据植物种类划分为草本和木本两类指示植物，用的比较广泛的草本植物有茄科、葫芦科、豆科和藜科等。草本指示植物大部分都能和很多种病毒发生敏感反映，自然环境下的植物基本上都被多种病毒侵染，自然界中的昆虫还能到处散播病毒，比如蚜虫等，就是传播病毒很好的介体。因此在培育草本指示植物的时候，应当采取隔离措施再进行繁殖，并做好严格的防虫工作，以免带毒的指示植物体内的病毒相互侵染，影响结果和判断

[12]. 木本指示植物一般可以鉴定所有果树和林木上的病毒，一般的用法是当自

然寄主没有表现出明显的症状时，就将带有此病毒的枝条用嫁接法转移到另外一种能对此病毒产生敏感反映的植物上，再观察其发病症状，从而进行病毒的鉴定

[13]。

常用的接种方法有汁液摩擦接种和嫁接传染[14]，但汁液摩擦接种法只适合大部分病毒，如柑橘速衰病毒，直至目前还未能接种至草本指示植物，未能找到草本寄主[15]。一般病毒的传染我们都采用园艺上的方法，如嫁接、皮接、拼叶等。用指示植物来检测植物病毒在操作上比较简单，但需要花时间等待，快的大约1~2周可以有病毒症状出现，慢的则需1~3年才能表现出症状，还受季节的限

制，且维护指示植物的费用也较高，灵敏度比较低[16]。

#### 1.3.2 电镜技术

20世纪40年代Kausche等人最早在电子显微镜下观察到了烟草花叶病毒，建立了电子显微技术，从此在植物病毒研究中，电镜成为了最常用的不可或缺的重要工具。普通显微镜利用光学原理虽然能观察到植物病毒的内含体，但要进行植物病毒鉴定，还是电镜更为准确。电子显微镜技术多年来有了较大的进步和提高，现在常用于植物病毒的鉴定和检测中，用来观察植物病毒颗粒。将感病植物组织压片制成只具少数层细胞的检测样本，电子显微镜的光源是短波电子流，它属于电磁波，分辨率可达到0.1 nm，而病毒粒体大小为10~100 nm，在电子显微镜下可以清晰地看到病毒粒子的形态大小，还能看到病毒粒子内部的内含体等超微结构，以此来判断病毒的种类行。电镜技术的优点在于采取样本容易，整个检测过程较快无需等待，并且联合使用负染法，可以对大多数植物病毒进行染色，使其在电镜中更容易观察[17]。

在电镜样品的制作过程中，一般会采取超薄切片法制作样品，然后进行负染，在电镜下便能够观察到植物病毒，从而实现植物病毒的辨别和诊断，通常可以区分出病毒所属具体到属。鉴别植物病毒时，一般首先是观察寄主的发病症状，再根据病毒粒子的形态结构来判断，有些病毒会使寄主细胞发生明显的变化，还可根据这些特征辨别出所属的种和株系。陈集双等用超薄切片制作样品，再进行负染，根据电镜下观察到的内含体形态和类型不同，区分出了同属于马铃薯Y病毒属的9个不同种的病毒[18]。T. Hatta等也用同样的方法鉴别出了CMV病毒的6个株系[19]。

对于初学者来说应用电子显微镜的方法来鉴定和检测病毒有一定困难，因为我们必须首先对各个种属的有所了解，要掌握不同病毒的典型的形态特征和特点。在制作电镜样品时为了得到高浓度的病毒材料，可以将待检病毒提纯后再制片，一般是使用低温离心机进行多次超速离心分离出病毒粒子，具有一定浓度的病毒制片后即可在电镜下观察[20]。

随着科学的进步，各个学科之间相互的联系越来越多，在电子显微镜的基础上，又产生了很多新的检测方法，如1973年Derrick K. S结合了电镜技术和免疫

学技术，创造了免疫吸附电镜技术[21]，免疫吸附电镜技术比单纯的电镜技术或者免疫技术更加灵敏可靠，该技术在植物病毒的研究领域里已经占据了非常重要的地位[22]。1984年Louro D等人发明了胶体金电免疫电镜技术[23]，采取了用胶体金来标记悬浮样品然后进行免疫修饰的方法，此方法是在免疫吸附电镜技术基础上创造的，它在病毒上结合两个抗体，然后再用胶体金来标记抗体，形成的复合物上面的结合了金颗粒，用电镜观察时就会出现金色亮圈，比只进行免疫修饰更易于观察，而且灵敏度也提高了，能检测到寄主植物中含量很低的病毒[24]。电镜技术在与更多的先进手段相结合后，检测病毒更加容易，更加灵敏。

#### 1.3.3 血清学方法

植物病毒的结构很简单，是蛋白质包裹着的核酸，既然是核蛋白就可以作为抗原，相应的抗体可以与之发生反应，抗体和抗原结合的过程称为免疫反应，反应后的抗原也就失去了活力。血清学的原理是抗体与抗原之间能够进行专化性结合，每个病毒都可以产生一种独特的抗血清，那么可以用已知病毒的抗血清来检测待测植物，若能与之反应则说明它含有该种病毒[25]。血清学方法能有效的检测植物病毒，是最为常用的手段之一。早期利用血清学的原理来测定是用免疫扩散的方法，是用琼脂凝胶作为介质并在液体中进行的，其中双扩散技术，可以比较出抗原的同源性，从而区别出病毒的属和种，甚至可以辨别出株系。用于植物病毒检测的血清学方法主要包括：免疫电泳、免疫扩散、荧光免疫、斑点免疫结合测定法和酶联免疫吸附法等。血清学方法的发展迅速，现在使用得最多的有酶联免疫吸附技术、免疫胶体金技术和斑点免疫结合技术等，已经成为病毒检测中的常用手段[26]。

血清学检测病毒的方法比生物学的方法先进一些，但是在应用时也有受到许多方面的限制，比如病毒在感染植株上分布不均匀，且分离物的多样性也带来了问题，影响了血清学法判断；季节变化有时会引起植物发生不确定变化，使血清学检测结果错误；有些病毒侵染植株后出现相似症状并且两者本身在血清学上有相关性，这种情况用血清学法就检测不到；还有某些植物病毒如类病毒，它们的核酸是裸露在外的，没有外壳蛋白包裹，而血清法主要是用于检测外壳蛋白的，因此对这类病毒无效[27]。

#### 1.3.4 分子Th物学方法

分子生物学技术是用来检测核酸的，首先要提取待测植株的核酸，检测其中是否含有病毒的DNA或者RNA，来判定植株中是否被病毒侵染。分子生物学方法是目前检测病毒灵敏度最高的方法，能够检测出皮克(pg)级别的病毒，甚至飞克(fg)级都能检测得到[28]。分子生物学检测病毒不受病毒的种类限制，所有的病毒和类病毒都能用分子生物学法进行检测。分子生物学法检测病毒的特异性很强，检测结果准确率很高，还可以批量处理样本[29]。它的诸多优点得到广大研究者的亲睐，并广泛应用到了各种病毒的检测中。

目前用分子生物学技术检测、鉴定植物病毒时，常用的技术主要有：多聚酶链式反应技术(Polymerase Chain Reaction, PCR)、核酸斑点杂交技术(Nucleic Acid Spot Hybridization, NASH)和dsRNA电泳技术等。在进一步辨别病毒具体株系时，目前常用的方法有：分析核苷酸序列、单链构象多态性(PCR-SSCP)分析和进行核酸杂交等[30]。除上述方法外，目前国内外还常采用硝酸纤维素膜一酶联免疫吸附法、核酸斑点杂交技术、基因芯片检测技术和双抗体夹心法等较为先进的检测方法。

## 2 大蒜

大蒜（*Allium sativum L.*），多年生草本植物，是百合科(*liliacene*)植物中的葱属植物(*Alliums pp.*)。大蒜属于长日照植物，习性半寒，喜欢在阴冷气候中生长，幼苗可以经受最低为-10℃的寒冷，一般在16~20℃的条件下萌发，不耐高温，当温度达到30℃后会强迫进入休眠状态，最适宜鳞茎生长的条件是12~25℃。大蒜是浅根系作物，根系横展直径大约30cm，主要集中在5~25cm的耕作层，最适宜在沙壤土中生长[31]。叶片呈绿色管状，中空，先端尖，叶鞘圆筒状，抱合成为白色假茎，通称葱白。茎短缩为盘状，周围密生弦状根。伞形球状花序，白色花位于总苞中。分生组织位于叶鞘基部，葱叶收获后仍能继续生长。有分葱(*A. fistulosum var. caespitosum*)和楼葱(*A. fisrulosum var. viviparum*)两个变种，染色体都是2n=16。依据鳞茎大小可以分为大瓣蒜和小瓣蒜；按假茎的高度也可分为长

白葱（梧桐葱）、中白葱（鸡腿葱）和短白葱（秤陀葱）三类；依据鳞茎外皮色泽可分为白皮蒜和紫皮蒜两大类[32]。

大蒜原产于新疆天ft北部、西部等西亚和中亚地区[33-34]，汉代张骞出使西域时将大蒜引入中国，最早是在陕西关中地区开始人工种植，随后传遍全国，大蒜在中国都已经有两千多年的栽培历史[35]。早期只是作为药物用于防瘟治病，后来才逐渐开始食用。我国大蒜生的产量和贸易量都位列世界首位，ft东农业科学院蔬菜研究所调查的结果显示，我国现有用于大蒜种植的土地500余万亩，在世界大蒜种植的总面积中占三分之一，是亚洲大蒜种植总面积的一半[36]。我国地域辽阔，气候变化多，有热带气候、亚热气候和北温带气候，各种各样的生态条件提供了丰富的环境资源，大蒜在我国的主要生产地区包括东北地区、ft东、河北、河南、四川、云南、新疆等地，主要产品有：黑龙江省阿城白皮蒜、辽宁开原大蒜、ft东苍ft蒲棵蒜、ft东金乡白蒜、陕西蔡家坡蒜、云南紫皮蒜、新疆白皮蒜等等[37-38]。

大蒜在全世界范围内普遍种植，主要产品有蒜头（鳞茎）、蒜苗、蒜薹（花茎）、青蒜（嫩叶）。经济价值很高，目前世界总产量已经达到了762万吨，总面积已达80万公顷，最高单产为每公顷40吨左右[39]，产值高达3~4.5万元/km2以上。大蒜收获后的土地还可以复种其他蔬菜作物，充分利用了当地的土地、光热等资源，增加了高原地区的附加产值。大蒜的市场需求渐渐增加，更多的人开始重视大蒜的培育，以及如何提高大蒜的产量[40]。国际上对大蒜的关注也越来越多，近年来关于葱蒜类农作物的学术研讨会都成功举办了5次，IBM公司研发了大蒜的数据库，英国还专门为大蒜建立了信息中心，美国每年都要在休斯顿欢庆大蒜节[41]。

### 2.1 大蒜病毒的类型

大蒜因其花粉败育，只能进行无性繁殖，因此人们在生产过程中都采取留种繁殖，通常会保留大蒜鳞茎进行栽培[42]，但是这种方法的弊端是一旦大蒜植株遭到病毒侵入后，因为鳞茎的母体带有病毒，就垂直传染直接传给后代，病毒在大蒜植株内逐代累积，浓度越来越高就会引起种性退化甚至引起毁种，导致大蒜

的品质下降，产量也越来越低。Walkey早在1989年曾报道病毒给大蒜的生产带来危害非常严重，大蒜被病毒侵染后最多可致的产量减少一半[43]。大蒜感染上病毒病后一般症状会表现在蒜叶上，要么是改变蒜叶的颜色，在大蒜叶片上出现一些发黄的小点，这些小点连在一起变成黄色的条纹，称为条纹花叶症；要么是改变蒜叶的形态，新长出来的蒜叶包裹在里面伸展不开，后来长出的叶子会出现弯曲和畸形。染上病毒后的大蒜会出现瓣数减少或者蒜瓣不能正常分开，蒜头数目随即减少，最后的结果便是大蒜产量和品质都有所下降。侵染大蒜的病毒很多，比较常见的有香石竹潜隐病毒属、马铃薯Y病毒和青葱X病毒等[44]。

#### 2.1.1 香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*)

香石竹潜隐病毒属成员的寄主种类比较少，大多数都是葱属植物，由蚜虫作为介体进行传播，绝大多数香石竹潜隐病毒侵染后的植株会引起整个植株带毒，但通常宿主不会出现明显的病毒病症状。但当香石竹潜隐病毒属病毒与马铃薯Y病毒属病毒同时侵染到一个植株上时，就可能在植株上表现出明显的病毒病症状和产生严重的危害[45]。

香石竹潜隐病毒属*(Carlavirus*)的病毒粒子呈线型，外围没有包膜，长度在

610~700nm之间，直径大约12~5nm，用电镜可以看到病毒粒子在植物组织细胞中有分散状的，有聚集在一起呈现花束状的，是稍微卷曲的线性。香石竹潜隐病毒属所有病毒的基因组都是正义单链RNA，大小为7000~8000[46]，里面有6个开放性阅读框，能够翻译出6个大小为22OkDa左右的蛋白质，包括自身复制时需要的酶。三联体基因模块编码的是蛋白是25kDa的TGBI、12kDa的TGBZ 和

7kDa的TGB3，第5个开放性阅读框编码的是31~35kDa的CP外壳蛋白，第6个阅读框编码的是11kDa的NABP核酸结合蛋白。大部分的第2个阅读框和第2个阅读框以及第3个和第4个之间，有一些核苷酸的序列是相互交叉重叠的；

有些第4个阅读框和第5个阅读框之间，有一些核昔酸的序列是间隔开来的。第

6个阅读框编码的蛋白质是核酸结合蛋白NABP，其中有一个锌指状的结构[47]。

RNA 的3’端有poly(A)尾巴结构，5’末端含有保守序，序列 为

NNATAAACAAACA[48]。香石竹潜隐病毒在2004 年被划分到线形病毒科

（*Flexiviridae*），跟它基因结构比较接近的有葱X病毒属、马铃薯X病毒属和凹陷

病毒属，从进化上来看，它们之间具有一定的相关性和同源性[49]。

香石竹潜隐病毒属研究至今，已经确定了35个成员，还有29个成员暂时定

为该属[50]，已经测定出了其中15 个相关病毒种的完整序列，并已经收录到

GenBank上。自然界中的大蒜一般受到三种香石竹潜隐病毒属病毒的侵染，它们是大蒜潜隐病毒(*Garlic lattent virus*)、大蒜普通潜隐病毒（*Garlic common latent*

*virus*）和葱潜隐病毒(*Shallot latent virus*)，他们在日本、印度尼西亚、德国、韩国、挪威、阿联酋和我国等都有报道[51-52]，它们的基因组已经完成了序列测定工作，有些分离物的基因组全长都已经得到了[53]。1998年T. Tsuneyoshi等用RT-PCR法对日本各个地区葱属植物上的香石竹潜隐病毒属的大蒜普通潜隐病毒、大蒜潜隐病毒和葱潜隐病毒基因组的3’端进行了测序，对比了它们的基因序列，还比较了

CP基因的核苷酸序列，发现大蒜潜隐病毒和葱潜隐病毒的基因序列是一致的，它们应该是同一种病毒[54]，国际病毒委员会在第8次病毒分类时把葱潜隐病毒和大蒜潜隐病毒划分为同一个病毒，最后统一名称为葱潜隐病毒ShLV。

#### 2.1.2 马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*)

在已经确定的植物病毒中，马铃薯Y病毒属是最大的一类，它的比例高达已经发现的植物病毒总数的20%，已经发现的马铃薯Y病毒中90%以上已经成为确定或者可能成员，一共有200多个种类[55]。马铃薯Y病毒可以侵染很多种类的植物，单子叶和双子叶植物中都有它的寄主[56]。已经报道过的葱属植物上发现的马铃薯Y病毒属病毒有洋葱黄矮病毒(*Onion yellow dwarf virus*)、韭葱黄条病毒(*Leek yellow stripe virus*)和胡葱黄条病毒(*Shallot yellow stripe virus*)等。

马铃薯Y 病毒属是线状病毒，病毒粒子稍微弯曲，测量得知长度在

680~900nm之间，直径大约在11~13nm之间，外围没有包膜，形态呈现出螺旋对称。用电镜进行观察时可以看到感病植物的每个部分都有病毒粒子，病毒粒子在细胞质中一般是到处散开分布或这聚集成束状。电镜还可以观察到受病毒侵染后的植株内涵体纵切时呈现圆柱状，横切时内涵体的形态是风轮状。马铃薯Y病毒属的外壳是一种单体蛋白，这种单体蛋白的成分只有一种多肤，分子量一般是在30~47kD之间，里面有267个氨基酸。马铃薯Y病毒属病毒的核酸是10kb左右的正义单链RNA，分子量大约在3.0~3.5x106kD左右，其中病毒粒子总重量

的5%为核酸。基因组RNA的非翻译区和3’端-UTR含有大量的AUAU，这些二级结构在反义RNA的复制过程中起到稳定作用，同时还能阻止RNA降解[57-58]。基因组RNA 5’端为VPG，末端有poly（A）尾巴，5’末端UTR 有保守序列

UCAACACAACAU，也被称作potybox，这个结构是病毒的生命活动中必不可少的部分，它参与了RNA的翻译和复制，还在Nfa-vPg与5’端的结合过程中发挥了一定功效。马铃薯Y病毒属的基因组还能编码出一个多聚蛋白，这个多聚蛋白很长，经过酶切后变成10个单体蛋白质[59]。

#### 2.1.3 青葱X病毒属(*Allexivirus*)

青葱X病毒属的发现比较晚，在1998年才正式确立并命名为青葱X病毒属，它的成员一般寄宿的植物类型比较少，传播介体是蜗虫(*mite*)，但蚜虫不能传播青葱X病毒属病毒，汁液也可以传播。青葱X病毒属是线状的病毒粒子，外围没有包膜，在电镜下观察它的形态是非常卷曲的线形，长度在800nm左右。报道青葱X病毒属病毒的普通生物学特征的不多，目前还没弄清楚血清学关系，但研究发现在自然界中青葱X病毒属病毒通常会与多种病毒一起同时侵染一个植株[60]。

青葱X病毒属病毒的基因组是正义单链RNA，长度8.1~9.0kb之间，含有6个开放翻译阅读框，一共能翻译出6个蛋白质。其中第四个开放性阅读框能编码出一个特殊蛋白[61]，大小在40kDa左右，它是青葱X病毒属独有的的特征[62]，可用于与区别其它病毒相区别。被青葱X病毒侵染后的植株细胞内含有大量这种特殊蛋白[63]，它与其它属病毒第四个开放性阅读框编码的蛋白质相比，明显体积都要大很多，例如马铃薯X病毒属和香石竹潜隐病毒属第四个开放性阅读框编码的蛋白质就明显小很多，并且目前还未发现没发现同源的其它已知蛋白。这个特殊蛋白中含有大量的丝氨酸，有30个左右的磷酸化位点，估计它的作用是起到磷酸化和去磷酸化作用，对于病毒的生活活动中发挥重要功能[64]。青葱X病毒属病毒的其它开放性阅读框的基因组结构和香石竹潜隐病毒属的开放性阅读框相差不大，它们都有一个编码大的开放性阅读框，香石竹潜隐病毒属的大小为220kDa，而青葱X病毒属相应部位的大小在170~195kDa左右，这个部分的基因能够编码出的蛋白是与复制有关的酶类，其中可能有RNA多聚酶和甲基转

移酶等。有研究发现青葱X病毒属中，第三个开放性阅读框和第四个开放性阅读框之间还有一个开放性阅读框，暂时称为开放性阅读框3-4（ORF3-4），它除了没有起始密码子，其他方面如大小、位置和保守序列均与香石竹潜隐病毒属和马铃薯Y病毒属的TGB3编码的蛋白比较接近[65]。另外第6个开放性阅读框当中含有一个锌指结构，其中含有大量的精氨酸，是一个高度保守的区域。这个结构与香石竹潜隐病毒属病毒的对应部分也很接近，可能它的作用是RNA复制中的某个过程[66]。与香石竹潜隐病毒属相比，青葱X病毒属的外壳蛋白相对较小仅约28kDa。

陈炯2001年[67]对浙江余杭大蒜样品进行分析鉴定，发现了一个青葱X病毒属的新成员，报道了其基因组全序列，这个新成员被取名为大蒜E病毒(GarV-E)，通过分析青葱X病毒属的所有成员的系统进化情况后，对青葱X病毒属的详细分类有了新的看法。Sumi等先将青葱X病毒的DNA进行扩增，再用特殊的酶来切割成片段，根据具体酶切位点的不同产生了4种不同的病毒，命名为GarV-A、GarV-B、GarV-C和GarV-D [68]。陈炯等在2003年时收集了来自中国的大蒜样品

28个，他们分别来自于24个省，分析了这些样品上的青葱X病毒属病毒后，发现它们几乎都是GarV-D或GarV-X，没有出现GarV-C和ShV-X[69]。

### 2.2 大蒜病毒的检测方法

全世界的葱属植物几乎都有发生病毒病，感染病毒后引起大蒜产量下降和品质变劣，已经严重影响到生产，侵染葱属植物的病毒已被广泛研究，特别是像大蒜这样的进行无性繁殖的作物，已经成为农事生产的一个瓶颈。侵染大蒜的病毒往往是复合侵染，所以所产生的症状大相径庭，普通的观察法都难以区分。有些病毒侵染大蒜后，早期只是在蒜叶上出现淡黄色的小斑点，然后随着病毒的繁殖病情越加严重，局部的蒜叶出现一些黄色形状，大蒜植株也开始变矮，到了后期更加严重时，表现为整个大蒜叶片都黄了，同时叶片形状也发生变化，可能出现褶皱、叶片卷曲和萎缩等状态。也有一些病毒感染大蒜以后可能不表现任何症状，由于缺乏灵敏的鉴定方法，寄主范围也十分狭窄，导致对这些病毒的区分和鉴定都很困难。

病毒的检测技术发展的发展经历了三大阶段，分别是传统的生物学鉴定法、免疫化学鉴定法和核酸分子鉴定法。传统的生物学鉴定法的优点有直观、简便，可以作为病毒的形态学鉴定中的指标。免疫化学方法的基础是抗血清反应，它的优点在于检测速度快和灵敏，它是从蛋白质的水平上来检测植物病毒。核酸分子标记技术是在核酸的水平上检测病毒的手段，通过比较核酸分子组成上的差异来鉴定病毒的，检测结果更加精确可靠，并且所花时间较短。分子病毒学在快速的发展，病毒病的检测中经常使用分子学进行检测，从此对病毒的鉴定研究开启了新的篇章，植物病理学也开始向分子水平发展，大多数的国际病毒分类与命名委员会（ICTV）确认的植物病毒都进行了基因组测序的工作，有的是部分序已经测得，有的是全部序列都完成测序。现在常用的办法是借鉴已知的核酸普序列来设计特异性引物，再进行PCR扩增或者先逆转录再扩增，都可以很快的检测病毒。现在还有更多的方法在植物病毒的检测中实现运用，例如核酸杂交技术、PCR微量板杂交法和双链RNA分析等。对病毒进行分子水平上的检测，检测结果的非常准确，在潜隐病毒和发现新病毒的研究中都不失为目前的最佳手段之一。

#### 2.2.1 核酸分子杂交技术(Nucleic Acid Hybridization)

20世纪70年代利用核酸分子的碱基会进行互补配对的原理，研发出一种分子生物学技术称为核酸分子杂交技术，其实就是将待测样品的DNA或RNA提取出来，再与特异性的核酸发生反应，最后会变成一个杂交分子。这个特异性的核酸被称为探针，是一段已知核苷酸序列，它可以与特定的核苷酸序列发生反应，形成互补的杂交链。杂交技术可以用来检测DNA病毒、RNA病毒以及类病毒，它的优点在于灵敏度更高、特异性很强等[70-71]。实验证明，核酸分子杂交技术能够检测到含量仅有1pg的DNA。李尉民等运用该技术在南方菜豆上检测出了花叶病毒[72]。

核酸探针在反应后需要被检测出来，一般是用有针对性的方法来检测。一般用来标记核酸探针的物质有两个大类：同位素和非同位素。同位素标记法实际就是采用放射性物质的方法，它虽然操作简单并且灵敏度很高，但是放射性物质对环境的污染不容小视，而且使用后的带有放射性的废物处理起来也很麻烦。非同位素标记的灵敏度虽低于同位素标记的，但此方法不存对于环境是没有危害的，

且近年来有了新的方法放大标记的信号，再加上模板的扩增也有了更好的办法，在经过这些改进后，非同位素法标记也能够比较灵敏的检测植物病毒了。目前一般用于标记核酸探针的非同位素物质有生物素、地高辛和荧光素。

在利用核苷酸制作探针来进行杂交鉴定病毒的多种检测方法中，最简单的就是核酸斑点杂交法（Nucleic Acid Dot-blot Hybridization），我国许多植物病毒都是用该方法检测出来的，例如番茄的环斑病毒，菊花的矮化类病毒[73]和苹果的茎痘病毒等[74]。核酸分子杂交相对于血清学方法来说结果更可靠，但是它的灵敏度是比上不足比下有余的，比血清学法的灵敏度高，比RT-PCR的灵敏度就低一些。它的优势在于检测时无须特殊仪器，探针制作完成后便于存放，在对大量样品进行检测时它更为合适。还有研究者将核酸杂交技术和RT-PCR技术相结合，从而起到扬长避短的作用，例如Bertolini等采用这种结合的方式进行复合RT-PCR，一次性便检测到了橄揽树中的6种RNA病毒[75]。

#### 2.2.2 双链RNA电泳技术(Double-stranded RNA, dsRNA)

双链电泳技术是针对RNA在复制过程中，病毒的RNA和植物的RNA不同，正常的植物组织中不会出现大分子的双链RNA，但病毒、类病毒和卫星RNA病毒的基因组会出现一个中间体，它是一段特异性的双链RNA，就是复制时产生的，它们的特异之处在于它的片段数、分子量和迁移率与众不同。双链RNA电泳技术就是利用这个特殊之处来检测植物病毒的，只要用电泳技术检测样品中是否存在大分子的双链RNA，就可以判断植物是否带毒[76]。双链RNA经过凝胶电泳后再进行染色，凝胶上出现的特殊谱带就是病毒的复制中间体，根据中间体的特殊形态便可反映出这种病毒群体的特性，还有一些单个病毒也能利用双链

RNA 电泳技术在电泳图谱上展示其复制中间体的形态和特征。所以利用双链

RNA的电泳技术可以辨别出病毒的类型和种类。双链RNA电泳技术的优点在于操作过程中不需要贵重的实验仪器，一般实验室就能满足它的需要。双链RNA的电泳技术的缺点在于对实验员的要求较高，具体操作需要一定的技术，所以要求实验员要有较强的专业技术和知识累积，还有一个缺点就是对于样品数量较多时，此方法不适用。

#### 2.2.3 聚合酶链式反应技术(Polymerase Chain Reaction，PCR)

PCR技术是1985年Mullis等发明的一种可以体外扩增DNA的技术，并且它还能够进行特异性的扩增，只扩增某种或者某个DNA片段，PCR是是最常用的分子生物学技术之一[77-78]。它的基本原理是模拟DNA复制的过程，把待扩增的样品作为DNA复制时的模板，设计合成两条引物，引物一定是能够与待扩增DNA相同和互补，设置温度条件使其变性、退火、延伸，在TaqDNA聚合酶的催化下实现DNA的体外复制，再将此过程反复循环，就能一次又一次的复制DNA，达到扩增DNA的目的。一般我们在实验过程中，设定循环30次左右，就能够将DNA的数量扩增到100万倍以上[79]，PCR技术的应用所受限制较少，越来越多的病毒检测都开始用PCR的方法，经过不断的改进和提高，它的特异性和灵敏度也有所提升[80]。PCR技术检测病毒特别灵敏，样品中仅含有几fg的病毒都能够被检测出来[81]。

#### 2.2.4 反转录聚合酶链式反应（Reverse Transcription PCR，RT-PCR)

PCR技术也有局限性，只能扩增DNA病毒，因为RNA病毒中的mRNA非常少，通常都扩增不到它的DNA，所以Saiki等首创了一个称为RT-PCR的方法来克服这个问题，具体做法是先提取出病毒的RNA，将RNA逆转录变成cDNA，

cDNA就可以用作普通的PCR扩增，这样不仅是得到了病毒的cDNA克隆，还可以用这个办法来检测RNA病毒，它的灵敏度也非常高[82]。植物病毒大多数都是RNA病毒，起码占所有病毒总数的70%，因此RT-PCR法的出现解决了病毒检测的一大难题，并且很快的投入到广泛应用中。例如Thorv. M. Fajardo等人选用了RT-PCR技术，对巴西地区的大蒜进行病毒鉴定时，检测到了马铃薯Y病毒属和香石竹潜隐病毒属的几个成员。国内也在检测韭葱黄条病毒的报道中指出RT-PCR技术的灵敏度现在可以达到10-4 [83]。

近年来，又有许多方法与RT-PCR法相结合演变出了一些新的方法，例如用于检测多个病毒的复合PT-PCR法，将几对不同的引物一次性全部加入到一个反应试管中进行反应，就可以同时扩增出多个目的片段，简化了实验的步骤，实现一举多得；一步法RT-PCR，所谓一步，就是将RT-PCR过程中的逆转录和PCR扩增都放在同一个试管中完成，减少了操作步骤，还降低了二次操作时污染的可

能性[84]；免疫捕捉反转录PCR(IC-RT-PCR)法是在RT-PCR技术的基础上，与免疫学技术结合，这种方法的优点在于检测病毒时不用提取RNA，因为RNA非常容易讲解，这种方法省去了提取RNA这一步使得实验操作更加简便容易，它的灵敏度与普通RT-PCR的灵敏度是一样的[85]；PCR-ELISA法是在PCR产物的检测过程中，用酶联免疫吸附反应的方法替代琼脂糖凝胶电泳，它的灵敏度也很高。

Olmos等采用PCR-ELISA法来检测李痘病毒的过程中证实了PCR-ELISA的灵敏度比免疫PCR的灵敏度还高出100倍[86]；原位PCR法，结合了原位杂交技术和

PCR技术，可以检测到低拷贝数的RNA和DNA，同时也可以用于确定细胞来源和进行特异性的细胞内定位；定量PCR法，PCR在扩增过程中，产物数量是呈现规律的增长趋势，且在某个扩增时期内产物的数量呈现出指数的方式增长，如果不限定扩增次数，那么模板的数量就决定了最终扩增出的产物数量，因此固定了模板的量就相当于固定了最终获得PCR产物的量。进行PCR定量扩增时的最重要的是要选对时机，要掌握扩增动态利用产物呈指数增长的时期。PCR扩增后模板的数量多了，有些微小的差异在DNA量很少时本来不明显，但是经过放大后就很容易体现出来了。定量PCR技术还可以定量的扩增RNA，并且在

RNA含量极低时也能够进行测定[87]，定量PCR技术还有助于研究基因的表达和基因的调控，有了这项技术，还能够更好的了解因为基因数量异常引发的一些疾病；多重RT-PCR法，是用多对引物同时对模板DNA上的多个区域进行扩增，可同步检测出多种病毒[88]；巢式PCR，是用来检测含量极少DNA和只有单拷贝数的基因，它与常规PCR的不同之处在于它需要两套引物，第一套引物正常扩增后的产物再用第二套引物再扩增，形成一个连环的反应过程，是一环扣一环的反应所以也称为套式PCR。它的优点在于特异性更强，灵敏度更高。

### 2.3 大蒜病毒的防治方法

病毒侵染植株后一般会分散在植物的各个部位中，虽然每个部位都有病毒粒子，但是每个部位的含量是不同的，呈现不均匀分布的状态。一般在患病植物的体内，越是新生的部位病毒的含量越低，例如幼嫩的叶片、未成熟的组织和不成熟的器官，植株生长最快的部位是顶端的分生组织，新生出的部位还可能不含病

毒；但在患病植株已经成熟的组织中就含有较多的病毒，而且越是老的部位病毒含量越高，病毒的含量与所在部位到顶端分生组织的距离成正比[89]。

郑平研究发现病毒在植株中的含量是有规律的，它随着植株的组织部位不同而变化，与植株的年龄变化呈正比[90]。一株植物在生长过程中，长得最快的是茎尖部分，因为这里的是生长点的分生组织，细胞很活跃并不断的进行分裂，生长出新的细胞，这个部分很幼嫩，通常都没有病毒[91]。经过研究发现，患病植株内的病毒在植株体内的进行扩散时运输的速度并不快，同时分生组织的细胞分裂增值的速度很快，因而茎尖的生长速度也很快，几乎超过了病毒运输的速度，所以经茎尖的部位病毒还未送达，很可能没有病毒[92]。也有人认为是病毒繁殖比较慢，而茎尖分生组织的细胞繁殖速度很快，这也可能是植物的茎尖不含病毒的原因所在。还有人指出植物病毒在进行繁殖的时候需要一些特殊的物质，而茎尖部位的细胞是新生的还没有发育成熟，里面可能没有病毒繁殖生长必须的那些特殊的物质，所以病毒也不能在茎尖生长点进行繁殖[93]；还有的观点是从病毒的运输通道出发的，认为病毒在植物细胞间的运输需要进行扩散作用借助植物细胞之间的胞间连丝，但是分生组织的细胞还没发育成熟，胞间连丝不完全，因此病毒的运输也受到阻碍，未能进入到茎尖去[94]；还有人认为是植株茎尖分生组织中存在某些具有抑制、钝化植物病原物作用的物质[95]。

现在很多研究者都抓住了茎尖病毒含量极低甚至不带毒的特性，截取茎尖的生长点的分生组织来培养，根据植物细胞的全能性再生成为植株，这样新长出的植株中病毒的含量就会很低甚至没有病毒，便可成功的获得无毒苗。茎尖生长点组织培养法也可以脱去植物中一些其他病毒，如类病毒、菌原体和类细菌，研究发现对植物茎尖生长点进行组织培养用以脱毒的方法很有效，不仅对绝大多数病毒都有效，还对类病毒、类细菌和菌原体等都能有效脱除，不失为一种培养脱毒苗的最佳方法[96]。近年来有很多采用大蒜的茎尖生长点组织培养法获得了脱毒试管苗研究报道，而且还有报道脱毒试管苗已经应用于生产实践中[97-102]。在全世界都有很多报道，将组织培养脱毒的技术用于大蒜脱毒实验中，并且已经培育出了大量的脱毒苗[103]。经过大量的研究和生产实践证实，脱毒对提高大蒜鳞茎质量有显著的效果[104]。

早期病毒的脱除最常用的方法是利用高温来脱毒，称为热处理法（heat

treatment），也是现在用的最多的方法之一，它是抓住了植物病毒病的弱点，即耐热性低，而植物的耐热性相对较高的原理，把在高于正常温度且在植物的承受范围之内的环境条件下处理植物材料一定时间，植物体内的病毒会因为高温钝化并失去活性。也有可能是在较高温度的条件下，植物不但不受影响反而生长更快，但病毒的繁殖速度没有，结果就是病毒的增值速度比植物的生长速度小，病毒还来不及扩散到植物的新生部分去，所以这样处理后的植物新长出的部分就没有病毒[105]。要想获得无毒植株，可以采用茎尖阻止培养法，也可以用热处理法，但若想两者结合起来，脱毒效率将会大大提高，一般是先用热处理，脱去植物的病毒后，再截取植株的茎尖进行组织培养。早在1987年Walkey就研究了植株活体的高温脱毒法，他把植株放在38℃的高温下一段时间，病毒的脱除率最高达到

85%[106]。后来1998年Luciani使用了高温脱毒法处理大蒜，他把大蒜蒜瓣放在

36℃的高温下一段时间，再截取大蒜的茎尖生长点进行组织培养，研究结果发现大蒜植株中原有的洋葱黄矮病毒、韭葱黄条病毒和大蒜普通潜隐病毒已经被全部脱去，而且大蒜鳞茎经过36℃高温处理后试管鳞茎的形成率有所提高，但是茎尖增殖率有显著的降低[107]。

## 3 大蒜病毒的研究现状

大蒜由于花粉败育，只能进行无性繁殖，在生产上都只能采取留种的方法进行繁殖，通常是利用鳞茎即蒜头进行种植[108]，但是大蒜植株一旦染上病毒导致母本鳞茎已经带毒，病毒必然会被传给下一代，这样垂直传染的结果是大蒜植株内的病毒数量和浓度逐代累积且越来越高，最后还可能引起严重的大蒜病毒病，甚至导致种性退化。研究发现在自然界中的大蒜，一般都受到了两种以上的病毒复合侵染，并且没有明显和独特的发病症状，根据发病情况不能判断感染了哪些病毒[109-111]。1989年Walkey研究发现大蒜因感染病毒发生了病毒病可能带来生产上的损失高达50%。而且病毒进入大蒜体内后就很难脱除，因而鳞茎母体一直带毒不能脱除，导致后代都将延续性的带上病毒，最终可能引起种性退化甚至造成毁种[112-114]。

目前大蒜病毒的研究受到国际上的广泛关注和研究，人们已经开始重视大蒜

的病毒了，正在研究大蒜病毒引起的植物病毒病，关于大蒜病毒病的研究进展很快。近年来分子生物学也发展很快，分子生物学技术得到广泛应用，成为了植物病毒鉴定和植物病毒分类的新思路和新方法，并一直在完善着植物病毒系统性的分类。Nagakubo等在20世纪90年代初，在日本北部收集了289份大蒜主产区的样品，提取基因后对3’端进行扩增，检测出了部分片段分别是大蒜所携带的两种病毒的，这两个片段大小（包括整个CP和部分Nla）分别为l.4kb和l.9kb，分析了CP基因对应的氨基酸，再比对了相关基因的进化树，最后确定出这两个片段是香石竹潜隐病毒和马铃薯Y病毒，同时也证实了该样品大蒜被这两种病毒混合侵染[115]。Tsuneyoshi等研究了来自荷兰、印尼、日本、中国、阿根廷和阿联酋等地区并换上病毒病的葱属植物，利用相关病毒的3’端作为引物进行RT-PCR扩增，获病了毒基因组当中的一部分序列，通过分析提出葱属植物上存在的马铃薯Y病毒属应该是三种不同的成员，在后续研究者的研究中也表明蕌头(*Rakkyo*)和大葱(*Welsh onion*)上发现的OYDV分离物都应当归为SYSV的分离物[116-118]。

Tsuneyoshi的研究小组曾采取直接组织免疫印迹法，用病毒抗血清检测到了日本蒜类植物中含有洋葱黄矮病毒，但一直没有确定的证据证明是感染了洋葱黄矮病毒。后来他们采取了RT-PCR 法，从大蒜植株上提取到了韭葱黄条纹病毒

（LYSV）的基因，从外壳蛋白的基因3’末端进行了克隆，并作了序列分析；还从大葱栽培种、洋葱和蕌头上提取出了洋葱黄矮病毒(OYDV)的基因，克隆了外壳蛋白基因的3’末端，也分析了基因序列[119]。Tsuneyoshi等研究了患有病毒病的大蒜，并鉴定出其中的六个病毒，采取了组织免疫印迹法分析出这六个病毒分别来自三个以上的不同的属，他们包括Potyvirus的GV-7和GV-2, CarIvirus的GV-H和GV-l和蜗虫线状病毒，后来蜗虫线状病毒GMBFVA(登录号L38892)被划分为青葱X病毒属病毒。最后利用RT-PCR技术进行分析，结果是原先鉴定出的那三个病毒其实都是是侵染大蒜的同一个病毒[120]。通过这三种方法的比较可以看出，在检测复合感染病毒上直接组织免疫印迹法、RT-PCR和用血清做抗体的方法的效果都很好，但在大规模和常规检测中DIBIA法比RT-PCR操作容易，简单便利，灵敏度与ELASA差不多，但是对进一步分析和确定病毒的分类时，RT-PCR则表现出更强的优势。

迄今为止报道了二种侵染大蒜的潜隐病毒，是大蒜潜隐病毒和大蒜普通潜隐

病毒，印度尼西亚、德国、中国、荷兰、日本等国家都已经报道过了[121-122]，

Tsuneyoshi等比较了这些病毒的外壳蛋白CP的基因，分析了病毒的核酸结合蛋白NABP的基因序列，他的分析结果葱潜隐病毒和大蒜潜隐病毒基因方面的一致性说明他们可能是同一个病毒[123]。青葱X病毒属（*Allexivirus*）在1998年才建立起来的一个新植物病毒属，报道过他侵染的葱属植物主要有大蒜和葱。日本、阿根廷、英国和韩国等都有关于青葱X 病毒属的报道[124-125]，葱病毒X 病毒

（*Shallot virusX*, ShV-X）是该属最具代表性的病毒。我国第一次从大蒜样品上分离出了青葱X病毒的人是陈炯，他分析的样品是来自浙江的大蒜，这个病毒并未被收录，应该是一个属于青葱X病毒属的未知成员，取名为大蒜病毒E (*Garlic virusE*, GarV-E)，分析了它的基因结构，随后还完成了大蒜病毒E的全基因组的序列测定[126]。

Kobayashi等利用RT-PCR技术测定了大蒜和洋葱株的洋葱黄矮病毒的基因序列[127]。1995年Song等在构建大蒜DNA文库的时，鉴定出了韩国地区的大蒜样品中存在的两种PVX的CP[128]。2003年Chen等从国内保定、武汉、南京和余航等不同地区采集了大蒜样品，利用RT-PCR技术对洋葱黄矮病毒(OYDV)的多聚蛋白中的P3蛋白进行了检测，并对其进行测序、比较、分析，再与已发表的相同区域内的OYDV的多聚蛋白中的P3蛋白进行了比较，发现从余杭地区的样品中分离到的OYDV P3 蛋白的和其他地区的在氨基酸上有比较明显的变化

[129]. 陈剑平等人设计出了马铃薯Y病毒属、马铃薯X病毒属、麝香石竹潜隐病毒属和葱X病毒属成员的简并引物，找出了适宜的反应条件和扩增体系，建立了这4个植物病毒属的RT-PCR基因组序列扩增技术，并成功的应用于植物病毒的检测和新病毒的鉴定，共鉴定了49种线状植物病毒[130-131]。

## 4 论文选题及欲解决的问题

大蒜有较高的食用价值和药用价值，因此一直深受人们喜爱，现在已经是全世界的重要经济作物之一。随着大蒜的市场需求量越来越大，种植大蒜的面积和种植规模也在变大，同时耕作制度和栽培环境亦在不断的变化中，但是大蒜植株的抗病能力却在逐年的降低，大蒜病毒病日趋严重的影响着大蒜的产量和质量。

尤其是新病害正在不断的出现，特别是某些病害出现了急剧上升趋势，使得大蒜病害造成的损失越来越大，进一步加大了对大蒜的危害，对大蒜病毒病的研究开始显得更加重要。

本研究应用了分子生物学方法RT-PCR技术先对对我国四个代表性大蒜产区的病毒病病进行检测，测序后分析证实样品中都含有香石竹潜隐病毒、马铃薯Y型病毒和大蒜新型病毒。通过对传统的RT-PCR方法做了一些改进，建立了一套快速检测大蒜病毒的分子检测方法。首先是在提取RNA的过程中进行改进，将提取的植物总RNA粗提液直接用于后面的RT-PCR反应，虽然RNA浓度很低，但PCR的高灵敏度正好与之互补；再对PCR过程中的反应体系和程序设定进行了一定的调整，使其更适用于快速检测体系中，因而缩短了病毒检测的时间，省去了中间步骤也使得实验操作更简单容易。还采用药物脱毒法处理大蒜的根尖，再诱导出的植株经检测证实成功获得大蒜脱毒苗。本研究为大蒜病毒的检测提供快速可行的参考方法，为大蒜脱毒苗的培育提供研究基础。

### 5. 本研究主要目的为：

1.调查全国主要蒜种携带的病毒种类。

2.应用传统的RT-PCR分子方法检测常见的大蒜病毒。

3.建立快速检测大蒜病毒的方法和大蒜脱毒的方法。

4.获得脱毒苗并移栽至大田中，为无毒种子的产生提供研究基础。

# 第二章 材料与方法

## 2.1 实验材料

### 2.1.1 植物材料

实验所用大蒜分别采自贵州、成都、陕西、重庆。

### 2.1.2 酶及试剂

Ladder-DNA为SDM38, UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒，均购自上海生工，引物也由上海生工合成。TaqDNA聚合酶，各限制性内切酶，连接酶及克隆载体PMD18-T均购自TakaRa生物有限公司。IPTG，X-gal，氨苄青霉素(Amp)购自

sigma公司。

### 2.1.3 主要试验仪器设备

AUW220D 电子分析天平（SHIMADZU）；TGRADIENT 普通PCR 扩增仪

（Biometra）；3K30高速冷冻离心机（SiGma）；Tammon1600全自动数码凝胶分析系统；WFH-201B紫外投射反射仪（上海精科实业有限公司）；DYY-12、DYY-6C电泳仪；GHP-300智能光照培养箱；RJ-TGL-16G普通离心机；LDZX-50KBS立式压力蒸汽灭菌锅；SZ-1型快速混运器；GHP-300型智能光照培养箱（Safe）；HZ-9311K恒温振荡器；XK02-201液氮罐；电热恒温水浴锅；超纯水器；超净工作台；冰箱；微波炉；超低温冰箱；空气浴摇床；各种剂量移液枪。

### 2.1.4 试剂配制

#### 2.1.4.1 提取质粒所需试剂的配置：

溶液 I: 50mM/L 葡萄糖

25MM/L Tris-HCl pH=8.0 10 mM/L EDTA pH=8.0

溶液II: 0.2mol/L NaOH 1% SDS

溶液III: （预冷液）5 mol/L 乙酸甲60mL

冰醋酸11.5mL

水28.5mL

#### 2.1.4.2 培养基的配置

大量元素母液×10: 1650mg/L NH4NO3 + 1900mg/L KNO3 + 370mg/L MgSO4·7H 2O

+ 170mg/L KH2PO4

微量元素母液×100: 860mg/L ZnSO4·7H2O + 620 mg/L H3BO3 + 83 mg/L KI + 25 mg/L NaMnO4·2H 2O +2.5 mg/L CuSO4·5H2O + 2.5 mg/L CoCl2·6H2O

钙盐×10: 4400mg/L CaCl2

铁盐×100: 3725mg/L Na2·EDTA·2H 2O + 2785mg/L FeSO4·7H 2O

有机×50: 100 mg/L甘氨酸+ 20 mg/L盐酸硫胺素B1 + 25 mg/L盐酸吡哆醇素

B6 + 25 mg/L烟酸

肌醇×50: 5000 mg/L肌醇

MS基本培养基（1L）= 100mL大量元素+ 10mL微量元素+ 10mL钙元素+

10mL铁盐+ 10mL肌醇+ 10mL有机

A1= Ms + 3%糖+ 8%琼脂粉+ 0.1% NAA

A2= Ms + 3%糖+ 8%琼脂粉+ 1% NAA + 3% 6BA

LB液体培养基：25g LB, 1000ml 水

LB固体培养基：25g LB, 1000ml水，8g琼脂粉

大蒜再生培养基=MS + 3%蔗糖+ 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA

大蒜生根培养基=MS + 3%蔗糖+ 0.1 mg/L NAA。

#### 2.1.4.3 提取RNA所需试剂配置

DEPC水溶液的配置：

DEPC: 水= 100µL: 100 mL

#### 2.1.4.4 PAGE电泳所需试剂配置

制胶配比：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 胶浓度 | 5% | 6% | 8% | 10% |
| 分离胶用量 mL | 5 | 6 | 8 | 10 |
| TAE 用量 mL | 25 | 24 | 22 | 20 |
| 10%APS µL | 240 | | | |
| TEMED µL | 40 | | | |

分离胶= 29g丙烯酰胺+ 1g Bis + 100mL 水

固定液= 50mL无水乙醇+ 2.5mL冰醋酸+ 500mL水硝酸银= 0.4g硝酸银+ 200mL 水

显色液= 4.5g氢氧化钠+ 3.2mL 37%甲醛+ 300mL 水

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 用传统的RT-PCR法检测大蒜病毒

#### 2.2.1.1 设计引物

通过查阅已发表的香石竹潜隐病毒、马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒的基因序列，根据这三种病毒的外壳蛋白保守序列分别设计合成寡核苷酸引物。引物序列如下所示：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 病毒名称  The nanme of virus | 引物序列  The sequence of primer | 引物名称  The name of primer |
| 香石竹潜隐病毒  Carlavirus virus | CT1: Aga Gct Aag Agt Att Ggt Ag | 上游引物 |
| CT2: Ggg Ttt Cac Att Gtt Aca Cc | 下游引物 |
| 马铃薯 Y 病毒  Potato Y virus | PT1: Aag Agt Caa Cac Tta Gtt Tg | 上游引物 |
| PT2:: Ggt Ctc Aat Cct Agc Tag Tc | 下游引物 |
| 大蒜新型病毒  Garlic new virus | NT1: Cct Gct Aag Cta Tat Gct Ga | 上游引物 |
| NT2: Gta Agt Tta Gcg Ata Tca Ac | 下游引物 |

#### 2.2.1.2 大蒜叶片总RNA的提取

(1)称取蒜叶顶端幼嫩部位约100mg，加入液氮研磨迅速研磨成粉末后倒入

1.5mL离心管，加500µL Trigol，反复吹打、振荡裂解细胞，室温放置5min。

(2)每1mL Trigol加0.2mL氯仿，盖紧管盖，用力摇晃15s，室温放置2~3 min，

14000rpm离心5min，取上层水相。

(3)水相转移到干净试管中，加入与水相等体积的异丙醇，混匀样品，冰冻30 min

后14000rpm离心5min, RNA呈胶片状沉淀。

(4)去除上清液，用DEPC水配置的75%乙醇洗涤RNA一次，烘箱干燥4min。

(5)用20µL DEPC水溶解RNA，于-80℃冰箱保存备用。注意：

操作中必须戴手套，实验用的枪头、离心管、研钵、剪刀等所有器具需提前用

DEPC水浸泡处理，再经高压灭菌。

#### 2.2.1.3 病毒的RNA逆转录合成cDNA

将提取到的大蒜总RNA作为模板，引物采用OligT，在反转录酶AMV的作用下将病毒的RNA逆转录成为cDNA，反应体系是：

10×Buffer 2µL

d NTP 2µL

RNase 1µL

AMV 1µL

digT 1µL

RNA 3µL

水 10µL

Total 20μL

反应程序设定：25℃5 min，50℃30 min，70℃15 min。

#### 2.2.1.5 PCR扩增

反应体系是：

程序设定：

10×Buffer 2µL

MgCl2 4µL

d NTP 2µL

Tag 酶 1µL

引物 1 1µL

引物 2 1µL

模板2µL

水7µL

Total 20μL

①94℃ 2 min，

②94℃ 30s，

③50℃ 50s，

④72℃ 3 min，②-④步 循环 30 次

⑤72℃ 10 min

#### 2.2.1.6 DNA的回收

(1)用2%琼脂糖凝胶，电压75V、电流100mA条件下电泳50 min，在紫外投射仪下切胶回收条带。

(2)加200µL Bing ding Buffer，50-55C℃水浴10min溶胶，每2min混匀一次。

(3)融化的胶液转移到收集管内的UNIQ-10柱中，室温放置5min, 12000rpm离心3min。

(4)取下UNIQ-10柱，倒掉废液后将UNIQ-10柱放回收集管内，加入300µL Wash

Solution洗涤，8000rpm离心3min，倒掉废液。

(5)加入300µL Wash Solution再洗涤一次，8000rpm离心3min，倒掉废液。

(6) UNIQ-10柱放入新的离心管中，柱子膜中央滴入10µL Elution Buffer，于35℃烘箱中助溶10min。

(7) 14000 rpm离心5min，离心管中液体即回收DNA片段。

#### 2.2.1.7 PAGE电泳

样品的预处理：将样品置于沸水中加热10min，使DNA完全变性，双链打开变为单链；再置于冰上放置3min骤冷，以免DNA复性双链重新螺旋。

（1）制胶：按照配比调配胶液，调好后迅速振荡使其均匀混合后再倒入胶槽内，放置1小时后胶板凝固，取出，放置于电泳池中，加入电泳缓冲液。

（2）连接电源调电压至100V，恒压电流，预电泳10 min使胶体通畅。

（3）预电泳结束后关闭电源，点样后进行正式电泳，电压150V，时间1小时

30 min。

（4）当溴酚蓝指示剂迁移到距前沿1~2cm处即停止电泳，约90min。电泳结束后小心取出胶板。

银染：

(1)将胶板平放至银染池中，倒入固定液完全没过胶板，摇晃固定6 min。

(2)倒掉固定液再加入新的固定液，再摇晃固定6 min。

(3) 0.2%硝酸银染色液中浸泡10~15 min染色。

(4)水洗2~3次，每次5 min。

(5)加入显色液，37℃温箱中显色。

(6) 0.75%碳酸钠或水终止反应。

#### 2.2.1.7 感受态细胞的制备

本实验采取的是用CaCl2法制备感受态细胞，具体步骤为：

(1)将实验室冷冻保存的E. coli. 涂布到平板培养基上培养复性，16~20小时后挑取单个菌落转到20mL LB培养基中，37℃90rpm摇床培养过夜。

(2)取0.2mL过夜菌液至5mL LB中摇床培养3小时。

(3)菌液分装在1.5mL离心管中，冰上放置10min, 6000rpm离心5min沉淀菌体。

(4)用冰冷的0.1mol/L CaCl2溶液200µL悬浮菌体，移液枪吹打混匀菌体。

(5)低温离心机4℃6000 rpm离心3 min，倒掉上清，加100µL CaCl2使菌体重新悬浮。

(6)在4℃放置过夜，自然沉淀。24小时后可用于转化连接产物。注意：感受态细胞需要保存于4℃环境中

#### 2.2.1.8 连接载体

(1) 1µL载体PMD18-T；

(2) 4µL样品；

(3) 5µL连接缓冲液（连接缓冲液中含DNA连接酶，超过16℃失效，加入连接液后需放置冰上）；

(4)置于4℃环境中24小时。

#### 2.2.1.8 感受态细胞的转化

(1)取连接产物（20µg/µL）5µL加入50µL感受态细胞中，冰上放置10min。

(2) 42℃热击50s后立即冰上冷却3min。

(3)加入到200µL LB液体培养基中，37℃，摇床培养1小时。

(4)制作抗生素平板：每个平板加入4µL IPTG，40µL X-Gal

LB固体培养基一瓶200mL，可倒2个平板

a）抗生素AP的工作浓度：固体平板=60mg/L，液体=100mg/L. LB固体培

养基加热，不烫手后加AP，每200mL LB加24µL(50mg/µL) AP。

b)蓝白筛选：4µL IPTG + 40µL X-Gal

(5)接种：移液枪调到42mL，吸取培养液至平板，打点后旋转涂布。37℃恒温温箱培养过夜。

#### 2.2.1.9 提取质粒

成功导入表达载体的大肠杆菌可以在含有抗生素的培养基上生长，且菌落为白色，用灭菌牙签挑取白色的单个菌落，连同牙签一起放入含10mL LB液体培养基（含氨苄青霉素）的25mL无菌锥形瓶中，37℃恒温摇床振荡培养过夜。

(1)取5mL箘液倒入5mL回收管中6000rpm离心3min，倒掉上清，收集菌体。

(2)加入0.5mL溶液I，150µL溶菌酶，充分振荡使细胞溶解，放入37℃烘箱

10min。拿出来后再次振荡使细胞全部破碎。

(3)加入750µL溶液II，缓缓颠倒数次，轻晃，否则核DNA打断，管内白色丝状需晃至溶解。冰上放置10min。

(4)加0.5mL预冷溶液III，轻摇离心管，冰上放置10min。出现白色沉淀为蛋白质。

(5) 14000rpm离心5min。加苯酚：氯仿=1: 1 1mL，摇匀，14000rpm离心5min。取上清水相，中间为蛋白质，下层为有机物。

(6)上清液转至另一离心管，加等体积的异丙醇，摇匀后冰箱冷冻30 min沉淀

DNA。

(7) 14000rpm离心5min. 弃上清。

(8) 70%乙醇洗涤，室温干燥，加入500µL乙醇后摇晃使质粒悬浮，14000rpm离心5min，弃上清。若管壁较湿则放入烘箱烘干4min。

(9)加100µL TE溶解DNA. 加1µL RNase，去除RNA。

#### 2.2.1.10 酶切

(1)加入3µL缓冲液；

(2)加1µL酶液（一般用BamHI或BamHIII）；

(3)加入7µL水；

(4) 37℃酶切16小时左右酶切后的处理：

(1)短暂离心使液体沉于管底

(2)加100µL水，200µL异丙醇，冷冻1小时。

(3) 14000离心5min，弃上清，加70%乙醇洗涤。

(4)离心去乙醇，37℃烘箱3min，后室温放置5min。

(5)加水或TE缓冲液5µL。

#### 2.2.1.11 序列测定与分析

DNA序列委托上海生物工程有限公司进行测定，测得的序列结果分别利用

NCBI网站的Nucleotide Blast程序进行分析，比对测得序列与GenBank中收录的病毒各个分离物的相应区域的基因序列，并作出遗传关系图。

### 2.2.2 大蒜病毒的快速检测

#### 2.2.2.1 大蒜病叶总RNA提取

(1)取大蒜材料10mg于离心管中，加100µL Trizol，杵碎材料。

(2)加40µL氯仿，摇匀后室温静置2min。

(3) 14000r/min离心5min，取上清液1µL作模板。

#### 2.2.2.2 一步法RT-PCR

程序设定：

10×Buffer 2µL

MgCl2 5µL

dNTP 2µL

RNase 抑制剂 1µL

AMV 1µL

AMV-Taq 1µL

引物 1 1µL

引物 2 1µL

模板1µL

DEPC水4µL

Total 20μL

①50℃30min，

②94℃2min，

③94℃30s，

④46℃30s，②-④步循环30 次

⑤72℃3min

#### 2.2.2.3 二步法RT-PCR

第一步，反转录cDNA：

10×Buffer 2µL

d NTP 2µL

RNase抑制剂1µL

Omniscript Reverse Transcriptase 1µL

模板1µL

Olig-T 1µL

水2µL

Total 10μL

程序设定：

①37℃60min，

②94℃2min

第二步，PCR扩增：

10×Buffer 2µL

d NTP 2µL

引物 1 1µL

引物 2 1µL

逆转录产物 2µL

RNase 1µL

水 10µL

Total 20μL

程序设定：

①94℃2min，

②94℃30s，

③46℃30s，

④72℃3min，②-④步循环30 次

⑤72℃10min

#### 2.2.2.4 RT-PCR产物检测

PCR产物采用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 2.2.3 大蒜脱毒

本实验的大蒜脱毒采用的是高温脱毒法和药物脱毒法，脱毒部位为大蒜根尖，是先将大蒜鳞茎诱导生根后利用根尖进行脱毒。

#### 2.2.3.1 高温脱毒

（1）植物材料预处理：大蒜鳞茎去皮，在自来水中冲洗干净，用70%乙醇处理2min，再经0.1%升汞浸泡灭菌10min，无菌水冲洗三次。

（2）生根培养：经灭菌处理的大蒜鳞茎放置在有湿润滤纸的培养皿中，于25℃黑暗条件下培养24小时，鳞茎基部的根萌发伸长，当根长至0.5cm长度时开始高温脱毒。

（3）高温脱毒：将生根的大蒜鳞茎置于42℃条件下黑暗培养48小时，截取0.5cm

长的根尖接种在大蒜再生培养基上培养。

（4）脱毒大蒜再生植株：将脱毒后的大蒜根尖接种到再生培养基上，25℃光照条件下培养20天左右长出新的植株。

（5）脱毒大蒜再生植株生根：新生长出的小植株在接种到生根培养基上，光照培养15天左右，植株基部就开始长出幼根。

#### 2.2.3.2 药物脱毒

（1）植物材料预处理：大蒜鳞茎去皮，在自来水中冲洗干净，用70%乙醇处理2min，再经0.1%升汞浸泡灭菌10min，无菌水冲洗三次。

（2）生根培养：经灭菌处理的大蒜鳞茎放置在有湿润滤纸的培养皿中，于25℃黑暗条件下培养24小时，鳞茎基部的根萌发伸长，当根长至0.5cm长度时开始高温脱毒。

（3）药物脱毒：将生根的大蒜鳞茎浸泡于1%的盐酸吗林双胍中，然后截取0.5cm

长的根尖接种在大蒜再生培养基上培养。

（4）脱毒大蒜再生植株：将脱毒后的大蒜根尖接种到再生培养基上，25℃光照条件下培养20天左右长出新的植株。

（5）脱毒大蒜再生植株生根：新生长出的小植株在接种到生根培养基上，光照培养15天左右，植株基部就开始长出幼根。

# 第三章 实验结果与分析

## 3.1 大蒜病毒的分子鉴定

运用分子生物学的方法检测病毒较灵敏、精确，本实验选用了RT-PCR法检测大蒜病毒，先将RNA病毒的mRNA反转录成cDNA，再做PCR扩增。根据大蒜病毒的保守序列分别设计引物，先用trizol法提取大蒜总RNA作为模板进行PCR扩增，而后将回收到的目的片段链接载体后导入大肠杆菌内增值，提取质粒后进行酶切，即可得到较纯净且具有一定数量、浓度的目的片段，将所得序列测序后与GenBank中收录的进行比较，鉴别病毒的种类。

### 3.1.1 香石竹潜隐病毒的检测

#### 3.1.1.1 香石竹潜隐病毒的RT-PCR结果

分别提取贵州、成都、陕西、重庆四个产区样品的大蒜的总RNA，逆转录合成cDNA，根据香石竹潜隐病毒的外壳蛋白基因的保守序列设计了两套引物，再进行PCR扩增，扩增后的产物用1%的琼脂糖凝胶电泳来检测，均得到了长度约为200bp的目的片段，与预期相符，见图3.1。



图3.1 大蒜潜隐病毒的RT-PCR检测结果。M: Ladder-DNA Marker-L，1：陕西样品，2：贵州样品，3：重庆样品，4：成都样品

Fig. 3.1 RT-PCR result of GLV virus. M: Ladder-DNA Marker-L，1: Shanxi，2: Guizhou，3: Chongqing，4: Chengdu

#### 3.1.1.2 单链多态性分析

本实验的四个大蒜样品经传统的RT-PCR扩增后，获得了大小相同的DNA片段，这四个来自不同地区的大蒜病毒是否存在变异和突变，需要进行单链多态性分析。本实验采用的是PAGE电泳进行单链多态性分析。PAGE电泳可以分离出长度相同但序列不一的核酸，甚至能检测出一个碱基发生的突变。

PAGE电泳图谱上只出现了两条主带如图3.2所示，是双链DNA经变性后形成的单链DNA，没有发生变异和突变，因此，四个实验样品中经RT-PCR扩增出的4个Ct病毒为同一个病毒，具有完全相同的序列，测序时只需任选其中之一便可。



图3.2 PAGE电泳图。A：重庆样品，B：成都样品。

Fig. 3.2 PAGE result of GLV virus. A: Chongqing，B: Chengdu

#### 3.1.1.3 重组质粒的鉴定

琼脂糖凝胶电泳图中的样品4条带明亮清晰，所以选取样品4做测序样品。再用2%的琼脂糖凝胶分离样品4的扩增产物，在紫外灯照射下切取目的条带，用回收DNA试剂盒进行回收。回收到的目的片段连接载体后在热击作用下转入大肠杆菌感受态细胞，在含有氨苄青霉素的LB培养基上进行蓝白筛选，随机挑取了4个白色单个菌落分别标记为Ct1、Ct2、Ct3、Ct4，接种至液体培养基，培养24小时后用裂解法提取质粒。提取到的质粒用BamHI酶切，最后用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，得到与预期相符的约3000bp的片段，如图3.3。



图3.3 重组质粒的鉴定电泳图。M: Ladder-DNA Marker-L，A：Ct1，B：Ct2，C：Ct3，D：Ct4

Fig3.3 Electrophoresis result of recombined plasmid. M: Ladder-DNA Marker-L, A: Ct1, B: Ct2, C: Ct3, D: Ct4

#### 3.1.1.4 序列测定

重组质粒经PCR扩增和酶切鉴定后的，送至上海生物工程技术有限公司测序，测得Ct1的核苷酸序列长为155bp，碱基序列如下所示：GGGTTTCACATTGTTACACCATTAACTATAAAATCCTTGACTTTAGTATTGTA

GCTTATACCAGGGGTACAAGTTTTAGTATCACAGTTTTTAGTGAAAACGAA ACACGGTGAACACCTGAAACAACGAGGGCACCTACCAATACTCTTAGCTCT

#### 3.1.2.5 序列分析

登陆美国国立生物技术信息中心网站（[http: //www. ncbi. nlm. nih. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)），利用BLAST进行序列比较，基因库检索表明Ct1片段与GenBank中发表的核苷酸序列片段的相似性为99%~87%，比对结果如图3.4。相似性最高99%的为2002年陈炯等人从来自金乡的大蒜上分离出的大蒜潜隐病毒，基因库的编号为AJ409316.1，同源性较低的为来自日本的D11161.1（87%）。在NCBI 网站利用在线作图分析Ct1的遗传关系，见图3.5

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Sequences producing significant alignments: | | | | | | |
| Accession | Description | Max score | Total score | Query covera  ge | E value | Max ident |
| HQ258896.2 | Garlic latent virus isolate MS/SW/Aus2, complete  genome | 279 | 279 | 99% | 3e-72 | 99% |
| AJ409316.1 | Garlic latent virus genes for TGB2 protein, TGB3  Protein, coat protein and nucleic-acid binding protein, isolate sd: Jinxiang, genomic RNA | 279 | 279 | 99% | 3e-72 | 99% |
| AJ409315.1 | Garlic latent virus genes for TGB2 protein, TGB3  Protein, coat protein and nucleic-acid binding protein, isolate js: Nanjing, genomic RNA | 224 | 224 | 99% | 1e-55 | 93% |
| JF320811.1 | Shallot latent virus isolate WA-1, complete genome | 207 | 207 | 99% | 1e-50 | 91% |
| D11161.1 | Garlic latent virus genomic RNA for RNA  Replicase, coat protein and other products, complete and partial cds | 171 | 171 | 100  % | 2e-39 | 87% |

图3.4 Ct1序列与已报道的分离物同源性比较

Fig3.4 Comparison of nucleotide seguences between Ct1 and related virus isolates.



图3.5 Ct1遗传关系图

Fig3.5 Genetic relationship diagram of Ct1

### 3.1.2 马铃薯Y型病毒的检测

#### 3.1.2.1 马铃薯Y型病毒的RT-PCR结果

分别提取贵州、成都、陕西、重庆四个产区样品的大蒜的总RNA，逆转录合成cDNA，根据马铃薯Y型病毒的外壳蛋白基因的保守序列设计了两套引物，再进行PCR扩增，扩增后的产物用1%的琼脂糖凝胶电泳来检测，均得到了长度约为200bp的目的片段，与预期相符，见图3.6



图3.6 马铃薯Y型病毒的RT-PCR检测结果。M: Ladder-DNA Marker-L，1：陕西样品，2：贵州样品，3：重庆样品，4：成都样品

Fig. 3.6 RT-PCR result of Potato Y virus. M: Ladder-DNA Marker-L，1: Shanxi，2: Guizhou，3: Chongqing，4: Chengdu

#### 3.1.2.2 PAGE 电泳

本实验的四个大蒜样品经传统的RT-PCR扩增后，获得了大小相同的DNA片段，这四个来自不同地区的大蒜病毒是否存在变异和突变，需要进行单链多态性分析。本实验采用的是PAGE电泳进行单链多态性分析。PAGE电泳可以分离出长度相同但序列不一的核酸，甚至能检测出一个碱基发生的突变。

PAGE电泳图谱上只出现了两条主带如图3.7所示，是双链DNA经变性后形成的单链DNA，没有发生变异和突变，因此，四个实验样品中经RT-PCR扩增出的四个Pt病毒为同一个病毒，具有完全相同的序列，测序时只需任选其中之一便可。



图3.7 马铃薯Y型病毒的PAGE电泳图。A：陕西样品，B：贵州样品，C：重庆样品，D：成都样品。

Fig. 3.7 PAGE result of Potato Y virus. A: Shanxi，B: Guizhou，C: Chongqing，D: Chengdu

#### 3.1.2.3 重组质粒的鉴定

琼脂糖凝胶电泳图中的样品3条带明亮清晰，所以选取样品3做测序样品。再用2%的琼脂糖凝胶分离样品4的扩增产物，在紫外灯照射下切取目的条带，用回收DNA试剂盒进行回收。回收到的目的片段连接载体后在热击作用下转入大肠杆菌感受态细胞，在含有氨苄青霉素的LB培养基上进行蓝白筛选，随机挑取了4个白色单个菌落分别标记为Pt1、Pt2、Pt3、Pt4，接种至液体培养基，培养24小时后用裂解法提取质粒。提取到的质粒用BamHI酶切，最后用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，得到与预期相符的约3000bp的片段，如图3.8。



图3.8 重组质粒的鉴定电泳图。M: Ladder-DNA Marker-L，A：Pt1，B：Pt2，C：Pt3，D：Pt4

Fig3.8 Electrophoresis result of recombined plasmid. A: Pt1, B: Pt2, C: Pt3, D: Pt4

#### 3.1.2.4 序列测定与分析

重组质粒经PCR扩增和酶切鉴定后，送至上海生物工程技术有限公司测序并命名为Pt3，测得核苷酸序列长为191bp，碱基序列如下所示：

AAGAGTCAACACTTAGTTTGAAGCTAATCATCTGAAGATTTATCCTGAG TACGGTTTTGTAAAGAAGGTGAATTCAATCGATAAGGATAGTAAGTCTGAA ACCTTTATGGTGTATAAGCAGCCTGATTTTTGATACCCCACCTTTACCCTACA ATGGAGTGCTACTTTAAAGACTAGCTAGGATTGAGACC

利用BLAST进行序列比较，基因库检索表明Pt3片段与GenBank中已发表的核苷酸序列片段的相似性为99%~90%，相似性最高的为99%，是1998 年

Tsuneyoshi, T等人从大蒜植株上分离到的马铃薯Y型病毒属的韭黄条纹病毒基因编号为AB005611.1，同源性低至90%的有D85436.1，DQ925452.1，AB194623.1。

根据国际病毒分类委员会的属分类标准，Pt3与已报道的各个马铃薯Y病毒DNA片段的外壳蛋白氨基酸同源性均大于80%，证明Pt3片段是马铃薯Y病毒的不同分离物。核苷酸比对结果相似度大于92%的如图3.9。在NCBI网站利用在线作图分析Pt3的遗传关系，见图3.10。

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Sequences producing significant alignments: | | | | | | |
| Accession | Description | Max score | Total score | Query  Covera ge | E value | Max ident |
| AB005611.1 | Leek yellow stripe virus CP gene for polyprotein  (Viral coat protein), partial cds, clone: Guae-D3 | 348 | 348 | 100% | 9e-93 | 99% |
| HQ258895.1 | Leek yellow stripe virus isolate MS/SW/Aus1,  Complete genome | 322 | 322 | 97% | 5e-85 | 98% |
| HQ918255.1 | Leek yellow stripe virus isolate Spanish  Polyprotein gene, partial cds | 276 | 276 | 100% | 4e-71 | 93% |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| AJ409308.1 | Leek yellow stripe potyvirus partial ORF1 for  Polyprotein, isolate js: Nanjing, genomic RNA | 276 | 276 | 96% | 4e-71 | 94% |
| JN127340.1 | Leek yellow stripe virus isolate Bate4 polyprotein  Gene, partial cds | 270 | 270 | 100% | 2e-69 | 92% |
| AY007693.1 | Leek yellow stripe potyvirus polyprotein gene,  Partial cds | 270 | 270 | 100% | 2e-69 | 92% |
| AJ409307.1 | Leek yellow stripe potyvirus partial ORF1 for  Polyprotein, isolate yn1, genomic RNA | 270 | 270 | 96% | 2e-69 | 93% |
| AJ409305.1 | Leek yellow stripe potyvirus partial ORF1 for  Polyprotein, isolate sd: Jinxiang , genomic RNA | 270 | 270 | 100% | 2e-69 | 92% |
| X89711.1 | Leek yellow stripe potyvirus genomic RNA for  Partial nuclear inclusion protein and coat protein | 270 | 270 | 100% | 2e-69 | 92% |
| JN127339.1 | Leek yellow stripe virus isolate Bate3 polyprotein  Gene, partial cds | 265 | 265 | 100% | 9e-68 | 92% |
| AY842136.1 | Leek yellow stripe virus isolate pLYSVg2  Polyprotein gene, partial cds | 265 | 265 | 100% | 9e-68 | 92% |
| AY842134.2 | Leek yellow stripe virus isolate pLYSVg1  Polyprotein gene, partial cds | 265 | 265 | 100% | 9e-68 | 92% |
| AJ409304.1 | Leek yellow stripe potyvirus partial gene for  Polyprotein, isolate hub: Wuhan, genomic RNA | 265 | 265 | 96% | 9e-68 | 92% |
| AB005612.1 | Leek yellow stripe virus CP gene for polyprotein  (Viral coat protein), partial cds, clone: Lind3 | 265 | 265 | 100% | 9e-68 | 92% |
| AB005610.1 | Leek yellow stripe virus CP gene for polyprotein  (Viral coat protein), partial cds, clone: Gchi3 | 265 | 265 | 96% | 9e-68 | 92% |

图3.9 Pt3序列与已报道的分离物同源性比较

Fig3.9 Comparison of nucleotide seguences between Pt3 and related virus isolates



图3.10 Pt3遗传关系图

Fig3.10 Genetic relationship diagram of Pt3

### 3.1.3 大蒜新型病毒的检测

#### 3.1.3.1 大蒜新型病毒的RT-PCR结果

分别提取贵州、成都、陕西、重庆四个产区样品的大蒜的总RNA，逆转录合成cDNA，根据大蒜新型病毒的外壳蛋白基因的保守序列设计了两套引物，再进行PCR扩增，扩增后的产物用1%的琼脂糖凝胶电泳来检测，均得到了长度约为200bp的目的片段，与预期相符，见图3.11。



图3.11 大蒜新型病毒的RT-PCR检测结果。M: Ladder-DNA Marker-L，1：陕西样品，2：贵州样品，3：重庆样品，4：成都样品

Fig. 1 RT-PCR result of Garlic new virus. M: Ladder-DNA Marker-L，1: Shanxi，2: Guizhou，3: Chongqing，4: Chengdu

#### 3.1.3.2 PAGE 电泳

本实验的四个大蒜样品经传统的RT-PCR扩增后，获得了大小相同的DNA片段，这四个来自不同地区的大蒜病毒是否存在变异和突变，需要进行单链多态性分析。本实验采用的是PAGE电泳进行单链多态性分析。PAGE电泳可以分离出长度相同但序列不一的核酸，甚至能检测出一个碱基发生的突变。

PAGE电泳图谱上只出现了两条主带如图3.12所示，是双链DNA经变性后形成的单链DNA，没有发生变异和突变，因此，四个实验样品中经RT-PCR扩增出的四个Nt病毒为同一个病毒，具有完全相同的序列，测序时只需任选其中之一便可。



图3.12 大蒜新型病毒的PAGE电泳图。A：陕西样品，B：贵州样品，C：重庆样品，D：成都样品。

Fig. 3.12 PAGE result of Garlic new virus. M: Ladder-DNA Marker-L，A: Shanxi，B: Guizhou，C: Chongqing，D: Chengdu

#### 3.1.3.3 重组质粒的鉴定

琼脂糖凝胶电泳图中的样品1条带明亮清晰，所以选取样品1做测序样品。再用2%的琼脂糖凝胶分离样品1的扩增产物，在紫外灯照射下切取目的条带，用回收DNA试剂盒进行回收。回收到的目的片段连接载体后在热击作用下转入大肠杆菌感受态细胞，在含有氨苄青霉素的LB培养基上进行蓝白筛选，随机挑取了4个白色单个菌落分别标记为Nt1、Nt2、Nt3、Nt4，接种至液体培养基，培养24小时后用裂解法提取质粒。提取到的质粒用BamHI酶切，最后用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，得到与预期相符的约3000bp的片段，如图3.13。



图3.13 重组质粒的鉴定电泳图。M: Ladder-DNA Marker-L，A：Nt1，B：Nt2，C：Nt3，D：Nt4

Fig3.13 Electrophoresis result of recombined plasmid. M: Ladder-DNA Marker-L, A: Nt1, B: Nt2, C: Nt3, D: Nt4

#### 3.1.3.4 序列测定与分析

重组质粒经PCR扩增和酶切鉴定后，送至上海生物工程技术有限公司测序并命名为Nt1,测得核苷酸序列长为185bp，碱基序列如下所示：

TGTAAGTTTAGCGATATCAACAGTCGTGAGTGTCTTTGTTCACGTCCAG AACCCTGTAAACCCGGTGGGAGGCTTGGGTCAAGCCTTATAATTTGAGAGT TTTAATGTACAGTATGTCATTCTCAATCAATTGTGCTGCGTCGGAGTTCGGC CTGTAGGACCTTTCAGCATATAGCTTAGCAGGA

登陆美国国立生物技术信息中心网站（[http: //www. ncbi. nlm. nih. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)），利用

BLAST进行序列比较，基因库检索表明Nt1片段与GenBank中发表的核苷酸序列片段的相似性为95%~70%，相似性最高的为95%，是Riabov, E. V.等分析日本大蒜病毒时，从大蒜样品上分离出的L38892.1。同源性较低的为[AJ292229.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/18621083?report=genbank&amp;log%24=nucltop&amp;blast_rank=19&amp;RID=XDH9P97101S)。核苷酸比对结果相似度大于85%的如图3.14。在NCBI网站利用在线作图分析

Nt1的遗传关系，见图3.15

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Sequences producing significant alignments: | | | | | | |
| Accession | Description | Max  score | Total  score | Query  coverage | E  value | Max  ident |
| L38892.1 | Japanese garlic virus (UK garlic isolate) genomic RNA, 3'  clip | 286 | 286 | 98% | 4e-74 | 95% |
| AF519572.1 | Garlic virus D coat protein (ORF-V) and 15 kDa protein  (ORF-VI) genes, complete cds | 277 | 277 | 96% | 2e-71 | 94% |
| JN019815.1 | Garlic virus D isolate Bate1 TGB1 gene, partial cds; and TGB2, 40 kDa protein, coat protein, and NAPB genes,  Complete cds | 268 | 268 | 98% | 1e-68 | 92% |
| FJ643476.1 | Garlic virus D nucleic acid binding protein gene, partial  cds | 268 | 268 | 98% | 1e-68 | 92% |
| AB010303.  1 | Garlic virus D genomic RNA,  3' portion, partial sequence | 262 | 262 | 98% | 5e-67 | 92% |
| AJ292230.1 | Garlic virus E complete  Genomic RNA, isolate YH | 244 | 244 | 98% | 1e-61 | 90% |
| M97264.1 | Shallot virus X replicase and coat protein genes, complete  Cds; and unknown genes | 208 | 208 | 98% | 9e-51 | 85% |
| L76292.1 | Shallot virus X non-structural protein, coat protein and 15 kDa protein genes, complete  cds's | 206 | 206 | 99% | 3e-50 | 85% |

Sequences producing significant alignments:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Accession | Description | Max  score | Total  score | Query  coverage | E  value | Max  ident |
| JN019812.1 | Garlic virus A isolate Bate1 replicase (RdRp) gene, partial cds; and triple gene block 1, triple gene block 2, 40 kDa protein, coat protein, and  NABP genes, complete cds | 203 | 203 | 96% | 4e-49 | 85% |

图3.14 Nt1序列与已报道的分离物同源性比较

Fig3.14 Comparison of nucleotide seguences between Nt1 and related virus isolates



图3.15 Nt1遗传关系图

Fig3.15 Genetic relationship diagram of Nt1

## 3.2 大蒜病毒的快速检测实验结果

在提取总RNA提取过程的中进行优化，将材料研磨后直接Trizol、氯仿，离心后取上清即可作为RNA模板，省去了制备RNA、纯化RNA的繁琐过程，加之RNA本不易保存，此简化方法在用于病毒检测方面将更加快捷、方便。

在实验设计上进行优化、调整，随机选取的成都样品作为实验材料。PCR体系的改进：尝试了一步法和二步法，从电泳结果来看，一步法的条带模糊，且量很少；二步法有清晰明亮的条带。做了两种PCR体系，一是加入了1µl RNA酶，去掉了成熟的RNA，只用合成的cDNA进行扩增。二是不加RNA酶，里面含有少量的RNA，

循环次数的改进：一般的PCR循环次数为30，在快速检测程序中，由于模板数相对较少，故提高循环次数以获得更多的目的片段产物。实验用40次、45次循环，结果相对于30次的较好，能看到明显清晰的条带。实验结果如图3.16。



图3.16 大蒜病毒快速检测结果。A: 一步法RT-PCR, M: Ladder-DNA Marker-L，1：大蒜潜隐病毒，2：马铃薯Y型病毒，3：大蒜新型病毒。B: 二步法RT-PCR, M: Ladder-DNA Marker-L，1：马铃薯Y型病毒，2：大蒜新型病毒。C: PCR循环数30，M: Ladder-DNA Marker-L，

1: 反应体系中加入RNA酶，2：不加RNA酶。D: PCR循环数40，M: Ladder-DNA Marker-L，

1：大蒜潜隐病毒，2：马铃薯Y型病毒

Fig.3.16 RT-PCR result. A: One step RT-PCR, M: Ladder-DNA Marker-L, 1：GLV, 2：Potato Y virus, 3：Garlic new virus. B: Two step RT-PCR, M: Ladder-DNA Marker-L, 1：Potato Y virus, 2：Garlic new virus. C: PCR cycle 30 times, M: Ladder-DNA Marker-L, 1：with RNase, 2：without RNase. D: PCR cycle 40 times, M: Ladder-DNA Marker-L, 1：GLV, 2：Potato Y virus

## 3.3 大蒜脱毒实验结果

### 3.3.1 高温脱毒实验结果

高温脱毒后的大蒜根尖，诱导其再生成为新的植株，经过一段时间的培养后取其幼嫩蒜叶部分提取RNA，用大蒜病毒的快速检测法进行检测，电泳结果如图3.17所示。样品2和样品3有明显条带，马铃薯Y型病毒和大蒜新型病毒都未能脱去，说明该脱毒办法不能有效脱去大蒜病毒，可能是因为病毒在42℃条件下不生长，但是大蒜根尖不耐高温，大蒜根尖在42℃条件下也不能生长，所以导致传统的这种脱毒效果不好。而大蒜的生长点可以耐得住高温，病毒在高温下不生长，猜想利用大蒜根尖也许脱毒效果会好。



图3.17 高温脱毒大蒜RT-PCR检测结果。M: Ladder-DNA Marker-L，A:大蒜潜隐病毒，B:

马铃薯Y型病毒，C：大蒜新型病毒。

Fig3.17 RT-PCR result of heat treatment. M: Ladder-DNA Marker-L, A: GLV, B: Potato Y virus, C: Garlic new virus.

### 3.3.2 药物脱毒法实验结果

药物脱毒后的大蒜根尖，诱导其再生成为新的植株，经过一段时间的培养后取其幼嫩蒜叶部分提取RNA，用RT-PCR法进行检测，之前提取到的病毒扩增

结果作为对照，电泳结果如图3.17所示。RT-PCR检测已经看不到条带，说明药物脱毒法能脱去大蒜的潜隐病毒、马铃薯Y型病毒和大蒜新型病毒。



图3.18 药物脱毒大蒜RT-PCR检测结果。M: Ladder-DNA Marker-L，A:脱毒大蒜GLV检测，

B：脱毒大蒜的马铃薯Y型病毒检测，C：脱毒大蒜的大蒜新型病毒检测，D：大蒜潜隐病毒，E：马铃薯Y型病毒，F：大蒜新型病毒。

Fig3.18 RT-PCR result of medicine treatment. M: Ladder-DNA Marker-L, A: GLV detection on virus-free garlic, B: Potato Y virus detection on virus-free garlic, C: Garlic new virus detection on virus-free garlic, D: GLV, E: Potato Y virus, F: Garlic new virus 。

# 第四章 讨论与结论

## 4.1 讨论

调查发现，在自然条件下的大蒜普遍感染了病毒病，由于大蒜的无性繁殖机制在生产上只能采取留种种植，因而使得病毒逐代累积，日益严重，已经影响到了大蒜的产量和质量，带来巨大经济损失。对于大蒜病毒病的防治，目前还未找到有效的防治药物，现在切实可行的办法就是推广使用培养脱毒苗和清除田间病源，而这两种方法都依赖于灵敏的病毒检测技术。因此研究大蒜病毒的检测方法至关重要。

目前在病毒检测中使用最为广泛，最为准确的是分子生物学法，它从核酸的水平上进行检测，比其他方法更加灵敏，特异性更高。本实验收集了来自全国四个大蒜主要产区的大蒜作为实验样品，根据已经发表的大蒜潜隐病毒、马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒这三种病毒的外壳蛋白保守序列分别设计合成寡核苷酸引物，首先用传统的RT-PCR法检测四个大蒜样品，经过RT-PCR扩增、克隆，将获得目的片段测序后进行比对分析，确定了本实验方法扩增到的片段是香石竹潜隐病毒、马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒，和预期的一致说明该方法切实有效。本研究中的样品同时侵染了香石竹潜隐病毒(Carlavirus)、马铃薯Y 型病毒

（Potyvirus）和大蒜新型病毒（Garlic new virus），说明大蒜病毒存在复合感染现象。本实验收集的四个样品来自不同省、市，他们都同时感染了相同的病毒，说明香石竹潜隐病毒、马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒没有地域差异。

复合感染的病毒病原较难分离和纯化，用普通生物学和血清学等方法也很难判断出病毒的具体种类，特别是像香石竹潜隐病毒、马铃薯Y病毒等这些线状病毒，他们的寄主范围比较狭窄，而且出现的病毒病症状相似、细胞病理特征等也很相似很容易对病毒种类的判断生产混淆，因此，针对复合感染的病毒鉴定和检测应当结合分子生物学方法加以验证。分子生物学的发展为这些线状病毒的鉴定提供了新的理论依据和研究思路，对病毒进行详细的分类提供了能可靠的依据，也使病毒的分类系统日益完善。

本实验运用RT-PCR法扩增到的大蒜病毒分离物片段，测得序列与GenBank

中收录的相应序列进行同源性比较，结果表明，本实验得到的Ct1分离物与来自金乡大蒜的分离物AJ409316.1的同源性高达99%，因而将Ct1鉴定为大蒜潜隐病毒。Pt3分离物与来自日本大蒜植株上分离到的马铃薯Y型病毒属的韭黄条纹病毒分离物AB005611.1的同源性高达99%，因此将Pt4鉴定为马铃薯Y型病毒属的韭黄条纹病毒。Nt2分离物与来自英国的大蒜病毒分离物L38892.1的同源性高达95%，因此将Nt2鉴定为青葱X属病毒。

传统的RT-PCR法虽然准确率高可靠性强，但是实验操作比较复杂，因此，本实验在传统的RT-PCR法基础上进行优化，主要从RNA的提取和RT-PCR这两个过程中进行改进，用Trizol提取RNA后，直接用粗提液代进行RT-PCR，这种方法能节省了提取RNA的时间，大大缩短了整个实验的时间；RT-PCR过程的优化先是比较了一步法和二步法，实验结果说明二步法比较适用，从PCR反应过程中的循环次数进行改进，适当的增加的了循环次数更利于实验结果的显示；还对比了是否添加RNA酶的效果。通过优化改进后，新的RT-PCR法检测大蒜病毒更加快捷、简便，而且与传统的RT-PCR同样的精确灵敏。

针对目前大蒜病毒难以防治的情况，培养脱毒大蒜不失为一种切实可行的办法，本实验采取了高温脱毒和药物脱毒两种办法对大蒜根尖进行处理，实验结果证实用1%的盐酸吗林双胍处理后大蒜根尖再培育成为新的植株后，不含大蒜潜隐病毒、马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒。但是高温脱毒法却未能有效的脱去大蒜病毒，这与马雯、李唯[132]的研究结果一致，他们使用茎尖培养和热处理脱毒相结合，使大蒜的病毒的脱除率达到60%. Ma[133]等利用花序轴离体培养法进行脱毒，脱毒率最多能达到77.6%. Ayabe和Sumi[134-135]茎盘圆顶培养脱毒法进行大蒜病毒的脱除，发现培养5至7天的茎盘圆顶进行RT-PCR检测时没有扩增出特异性片段，而培养了2至3周的茎盘圆顶均扩增到了特异性片段，说明茎盘发育的过程中可能受病毒侵染。

## 4.2 实验结论

### 4.2.1 传统RT-PCR法检测过程中的主要问题

传统的RT-PCR法检测大蒜病毒是先将病毒的RNA逆转录为cDNA，再用

cDNA进行PCR扩增。PCR技术已经比较成熟了，我们根据前人的研究结果设置了PCR反应体系和反应程序，经过多次实验，最终摸索出了PCR反应过程需要的最佳退火温度，大蒜潜隐病毒的最佳退火温度约为45℃，马铃薯Y病毒的最佳退火温度约为40℃，而大蒜新型病毒的最佳退火温度约为35℃。

本实验一共四个样品，三种病毒，用RT-PCR法分别在4个样品中扩增到了大蒜潜隐病毒、马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒，说明大蒜潜隐病毒、马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒具有普遍性，这与李金娟[136]的研究结果一致。样品大蒜都感染了至少三种病毒，由此可见自然界中的大蒜一般都受到多种病毒复合侵染。同时还发现，在这四个样品中均到了大小一致的条带，经PAGE电泳后分析证实这些条带大小、构型一致，均属同一病毒。说明这四种大蒜虽然来自相距甚远的四个地区，但所感染的这三种病毒并无明显差异。测序结果通过比对分析，与报道的其他分离物相似度也较高。基因库检索表明：分离出的大蒜潜隐病毒片段与

GenBank中发表的核苷酸序列片段的相似性为99%~87%；分离出的马铃薯Y病毒片段与GenBank中发表的核苷酸序列片段的相似性为99%~90%；分离出的蒜新型病毒片段与GenBank中发表的核苷酸序列片段的相似性为95%~70%。

### 4.2.2 大蒜病毒的快速检测方法研究中的问题

传统的RT-PCR法检测大蒜病毒有高效、灵敏、特异性强等优点，但是在实际操作过程中也比较复杂繁琐，而且所花时间也长，针对此情况，我们对传统RT-PCR法进行优化和改进，开始寻找一种更快捷方便的办法来检测大蒜病毒。首先，我们在提取大蒜RNA的过程进行中改进，本实验选择的是Trizol 试

剂法，于冰等[137]用Trizol试剂方法提取到了甜菜花蕾总RNA，高志勇[138]用Trizol

试剂法分别提取到了水稻的花、叶、根的总RNA，所得RNA产物的凝胶电泳结

果和OD260/OD280比值都较理想，说明Trizol法提取RNA切实可行，效果好、使用范围广。传统的Trizol法提取RNA大致需要2个小时左右，侯义龙等[139]用Trizol试剂法提取果树组织总RNA需要操作4~5小时，阮小凤等[140]用二氧化硅法提取RNA需要1.5~2小时，谷瑞华等[141]用Trizol试剂盒提取烟草RNA需要1小时。本实验提取的RNA是用于后续RT-PCR检测的，而PCR检测的灵敏度相当高，即便是含量很低的RNA也可以被检测到，所以对提取到的RNA在纯度上要求并不高，因此我们在Trizol提取到RNA后，不经过纯化等处理就将RNA粗提液直接用于后续的RT-PCR检测，省去了中间步骤使得实验操作更加简单，仅用单一的抽提液Trizol试剂即可提取到RNA，简化了操作过程的同时也减少了RNA降解的机会。提取RNA的时间压缩至10 min，缩短了检测病毒的时间，提高了病毒检测效率，张威等人[142]的RT-PCR快速检测法更省时间，可以在短时间内处理大量样品。

其次是在PCR反应过程中进行改进，我们发现在其他条件不变的情况下，用RNA粗提液扩增到的条带不如之前传统方法扩增到的条带明亮，可能是提取到的RNA浓度比前面传统法的低的导致的，因此我们对PCR的反应过程进行改进，尝试了增加PCR的循环次数以获取更多的目的片段数量，从原来的30次改为了40次，琼脂糖凝胶电泳结果条带亮度增加，更有利于观察。

最后还尝试了一步法和二步法的RT-PCR法，一步法是将逆转录和PCR扩增在一个反映管内进行，理论上一步法相对快捷，减小了污染的机会，但在实际操作中，对于大蒜病毒的检测本实验用一步法还没能扩增到明显的目的条带，具体原因尚不清楚，可以在后续的实验中继续摸索，找出一步法没能成功的原因，探索一步法的具体操作和条件。

### 4.2.3 大蒜脱毒实验中的问题

本实验利用大蒜新长出的根尖进行脱毒处理，虽然很多人使用大蒜的茎尖进行脱毒处理，但茎尖的获得相对较难，茎尖需要精确的剥离出来，所花时间也长。但是根尖的处理就比较容易，更适合投入到大批量的生产中。

实验采用了高温脱毒和药物脱毒两种方法，实验结果显示高温脱毒后的大蒜

样品中没有检测到大蒜潜隐病毒，但是检测到了马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒，说明高温脱毒法对大蒜的马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒无效，我们推测有可能是42度的高温虽然抑制了病毒繁殖，但同时也抑制了大蒜的生长，未能长出新的无毒的部分；也有可能是42度的高温对马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒的繁殖没有较大的影响。实验结果证实药物脱毒法却有效的脱去了样品大蒜的大蒜潜隐病毒、马铃薯Y病毒和大蒜新型病毒，药物脱毒脱毒同样是对大蒜新长出的根尖进行脱毒处理，采用的药物是1%的盐酸吗林双胍，说明1%的盐酸吗林双胍对大蒜新型病毒，药物脱毒脱毒这三种病毒可能有抑制性。

## 4.3 关于后续工作

1. 药物法脱毒是否能脱去更多的大蒜病毒，还需进一步验证。

2. 将脱毒苗经过炼苗移栽到大田中，最后投入批量生产。

3. 无毒种子大蒜的制作工艺，以及分级种子的质量检测与保存。

参考文献

[1] A grio G N.著, 陈永萱, 陆家云, 许志刚译. 植物病理学(第3 版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 336-381.

[2] 辛艳, 刘玉华. 常见蔬菜种子病害及其测定技术[J]. 天津农林科技, 2008(5): 21- 23.

[3] 阚春月, 王守法, 杨翠云. 植物种传病害检测技术的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(15): 7956-7959

[4] 董祎, 徐启江. 葱蒜类病毒的分子生物学鉴定研究进展[J]. 微生物学免疫学进展2005.33(4): 76-78

[5] 顾青雷, 刘昊, 张绍红. PCR相关技术在植物病毒检疫检测中的应用[J]. 生物技术通报, 2011, 3: 78-81

[6] 李大伟. 我国植物病毒学的研究现状及发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(2): 5-8

[7] 黄永达, 许萌萌. 现代生命科学发展进程中的病毒学[J]. 工程技术, 2009, 5: 123

[8] 邱并生, 王敏. 植物病毒学的研究进展[J]. 中国病毒学, 2004, 19(3): 309-312

[9] 邵碧英. 植物病毒分子检测方法概述[J]. 植物检疫, 2002, 16(6): 377-379

[10] 杜琳, 钟先锋, 陈剑泓等. 植物病毒检测技术研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2007, 106(7): 48-51

[11] 陈继峰, 赵军营, 李绍华. 果树病毒检测方法及其应用[J]. 河北林果研究, 2005, 20(2): 167-173

[12] 杜琳, 钟先锋, 陈剑泓, 等. 植物病毒检测技术研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2007, 106(7): 48-51

[13] 侯义龙, 张开春, 胡文玉, 等. 20世纪果树病毒检测技术的回顾与展望[J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(2): 144-149.

[14] 吴凌娟, 张雅奎, 董传民, 等. 用指示植物分离鉴定马铃薯轻花叶病毒(PVX)的技术[J]. 中国马铃薯, 2003, 17(2): 82-83.

[15] 余冬冬, 刘永清, 王国平. 柑橘衰退病毒研究进展[J]. 果树学报, 2003, 20(3): 224- 229.

[16] 吴雅琴. 果树病毒检测方法研究进展[J]. 河北果树, 2005, 5(3): 1-2.

[17] 何晨阳, 陈功友. 我国植物病原细菌学的研究现状和发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 6-8

[18] 陈集双, 周雪平, 洪健. 九种Potyviruses柱状内含体结构的比较研究[J]. 电子显微学报, 1995(1): 39-46

[19] Hatta T, Francki R L B. Cytopathic structures as-sociated with tonoplasts of plant cells infectedwith cucumber mosaic and tomato aspermy virus [J]. Journal of General Virology, 1981, 53: 343-347

[20] 马筠. 植物病毒鉴定检测方法的研究进展[J]. 世界农业, 2003, 292(8): 50-51

[21] Derrick K S. Quantitative assay for plant virusesusing serologically specific electron mi-croscopy[J]. Virology, 1973, 56: 652-657

[22] Berger E. Identification partial characterization and distribution of viruses infecting Allium crops in south and southeast Asia [J]. Acta Horitic, 2004, 358(26): 251-258

[23] Louro D, Lesemann D E. Use of protein A-gold com-plex for specific labeling of antibodies bound to plant viruses Viral antigens in suspensions [J]. Journal of Virological Methods, 1984, 9: 107-122

[24] 萨仁高娃, 其木格, 吴岩. 胶体金免疫电镜技术及其应用[J]. 内蒙古医学 院报, 2007, 29(05): 373-377

[25] 阚春月, 王守法, 杨翠云. 植物种传病害检测技术的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(15): 7956-7959

[26] 孙伟, 焦奎. 酶联免疫吸附分析法在植物病毒检测中的应用[J]. 化学研究与应用, 2002, 14(5): 511-514

[27] 乔艳艳, 杨凌. 烟草环斑病毒检测及其cp基因片段原核表达[J]. 西北农林科技大学报, 2008: 3-4.

[28] Sanchez Navarro J A. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR, European [J]. Journal of Plant Pathology, 2005, 111: 77-84.

[29] 袁小环, 李青. 血清学方法和分子生物学方法检测植物病毒研究进展[J]. 热带农业科学, 2001, 21(6): 63-68

[30] 王健华, 王运勤, 吉训聪, 等. 植物病毒检测技术研究进展[J]. 热带农业科学, 2005, 25(3): 71-75

[31] 顾智章. 大蒜栽培与贮藏[M]. 北京: 金盾出版社. 2002.

[32] 山东农业大学主编. 蔬菜栽培学各论(北方本)[M]. 第三版. 北京中国农业出版社, 1999: 96.

[33] 陈青奇等. 大蒜育种研究现状[J]. 北方园艺, 2006, (2): 40-41

[34] 严根元. 大蒜栽培技术及综合利用. [M] 上海: 上海科技文献出版社, 1989

[35] 中国农业百科全书编辑委员会. 中国农业百科全书·蔬菜卷[M] 北京: 农业出版社, 1990.25-18, 51-55

[36] 中国农业百科全书编辑委员会. 中国农业百科全书·蔬菜卷[M] 北京: 农业出版社, 1990, 25(18): 51-55.

[37] 申青岭. 无公害大蒜高产栽培技术[J]. 现代农业科技, 2007, (12): 38-40

[38] 管正学, 王建立, 张学予. 我国大蒜资源及其开发利用研究[J]. 资源科学, 1994, (05): 54-59.

[39] 陈青奇等. 大蒜育种研究现状[J]. 北方园艺, 2006, (2): 40-41

[40] 杨有权等. 大蒜病害的识别与防治综述[J]. 吉林农业科学, 1995, (40): 73-76.

[41] 徐培文. 我国进入WTO后大蒜业面临的机遇, 挑战及对策[J]. 中国种业, 2000, (04): 9-10.

[42] 赵心爱, 薛庆中. 检测大蒜病毒和产生脱毒蒜的方法[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 603-606

[43] 刘丽杰. 蒜茎尖脱病毒组培技术研究[J]. 佳木斯教育学院学报, 1997, 3: 73-74

[44] 董祎. 葱蒜类病毒的分子生物学鉴定研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2005, 33(4): 76-78

[45] Van DijK P. Carlavirus isolates from cultivated Allium species represent three viruses[J]. Neth Plant Pathology, 1993, (99): 233-257

[46] Adams M J, Antoniw J F, Bar-Joseph M. et al. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation [J]. Arch Virol, 2004, 149: 1045-1060

[47] 陈炯, 陈剑平. 马铃薯Y病毒属成员基因组全序列的简并引物PCR和RACE扩增方法[J]. 病毒学报, 2002, 18(4): 371-374

[48] 陈炯, 郑红英, 陈剑平. 我国大蒜潜隐病毒的基因组结构及3’端序列的变异[J]. 中国科学(C辑). 2002, 32(3): 225-231

[49] Chen J, Zheng H Y, Chen J P, et al. Genome organization and variation in the 3' partial sequence of garlic latent virus in China[J]. Science in China, 2002d, 45(4): 441-448

[50] Fauquett C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus taxonomy. In: Elghth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus [J]. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, 2005: 1101-1106

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

86:253-259

[52] 徐培文, 孙慧生, 孙瑞杰, 等. 大蒜脱毒技术及应用研究[J]. 中国农业科学, 1998, 31(2): 92-93

[53] Song S I, Choi J N, Song J T, et al. Complete Genome Sequence of Garlic Latent Virus, a Member of the Carlavirus Family [J]. Mol Cells, 2002, 14(2): 205-213

[54] Tsuneyoshi T, Matsumi T, Natsuaka KT, Sumi S. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three potyvirus species in Album plants [J]. Archives of Virology 1998, (143): 97-113.

[55] 陈炯, 陈剑平. 马铃薯Y病毒属成员基因组全序列的简并引物PCR和RACE扩增方法[J]. 病毒学报, 2002, 18(4): 371-374

[56] 史雨红, 陈炯, 陈剑平. 燕花叶病毒外壳蛋白抗血清制备及其与相关病毒血清学关系[J]. 植物保护学报, 2006, 33(3): 273-276

[57] Hardy R W, Rice C M. Requirements at the 3' end of the sindbis virus genome for efficient synthesis of minus-strand RNA [J]. Virol, 2005, 79: 4630-4639

[58] Bryan G T, Gardner R C, Forster R L 5. Nucleotide sequence of the coat protein gene of a strain of clover yellow vein virus from New Zealand: conservation of a stem-loop structure in the 3' region of potyviruses [J]. Arch Virol, 1992, 124: 133-146

[59] Niepel M, Gallie D R. Identification and Characterization of the Functional Elements within the Tobacco Etch Virus 59 Leader Required for Cap-Independent Translation [J]. Virol, 1999, 73: 9080-9088

[60] Vin Dijk P, Van der Vlugt R A. New mite-bome virus isolates from rakkyo, shallot and wild leek species [J]. Eur J Plant Path, 1994, 100: 269-277

[61] Sumi S, Matsurni T, Tsuneyoshi T. Complete nueleotide sequences of garlic viruses A and C, members of the newly ratified genus Allixivirus [J]. Arch Virol, 1999, 144: 1819-1826

[62] Kanyuka K V, Vishmichenko V K, Levay K E, et al. Nueleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 50-Proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 30-proximal cistrons [J]. Gen Virol, 1992, 73: 2553-2560

[63] Aishava N V, Kondareva T N, Riabov E V, et al. 42K Protein of shallot X virus is expressed in infected Allium species plants [J]. Mol Biol (Mosk), 1995, 29: 192-198

[64] Chen J, Zheng H Y, Antoniw J F, et al. Detection and classifleation of allexiviruses fromgarlic in China [J]. Arch Virol, 2004, 149: 435-445

[65] Foster G D, Meehan B M, Mills P R. Nucleotide sequence of the 7K gene of camation latent virus [J]. Mol Biol, 1990, 15: 937-939

[66] Song S I, Song J T, Kim C H, et al. Molecular characterization of the garlic virus X genome [J]. Gen Virol, 1998, 79: 155-159

[67] 陈炯, 陈剑平. Allexivirus属的一个新成员——大蒜病毒E的基因组全序列测定和系统树分析[J]. 科学通报, 2001, (40): 1463-1468

[68] Sumi S, Tsuneyoshi T, Suzuki A, et al. Development and establishment of practical tissue methods for production of virus-free garlic seed bulbs, a novel field cultivation system and convenient methods for detecting garlic infecting virus [J]. Plant Biotechnol, 2001, (3): 179-190

[69] J. Chen, H. -Y. Zheng, J. F. Antoniw, et al. Detection and classification of allexiviruses from garlic in China [J]. Arch Virol, 2003, (149): 435-445

[70] Pilar Ivars, Mertxe Alonso. Development of a non-radioactive dot-blot hybridization assay for the detection of Pelargonium flower break virus and Pelargonium line pattern virus [J]. European Journal of Plant Pathology, 2004(110): 275-283.

[71] Wen-Wei Hu, Sek-Man Wong. The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of cymbidium mosaic potexvirus (CymMV) and odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) in orchids [J]. Journal of Virological Methods, 1998, (70): 193-199

[72] 李尉民, Roger Hull, 张成良, 等. 南方菜豆花叶病毒(SB-MV)两典型株系异cDNA和RNA探针的制备及应用[J]. 植物病理学报, 1998, 28(3): 243-247

[73] 孟清, 曹先维, 张彤. 应用Digoxigenin标记的cDNA探针检测菊花矮化类病毒番茄环斑病毒苹果茎痘病毒[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1999, 30(3): 367-371

[74] 牛建新, 朱军, 马兵钢. 库尔勒香梨的苹果茎痘病毒cDNA探针检测技术研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1): 99-105

[75] Bertolini E, Olmos A, Martinez MC, et al. Single-step multiplex PT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees [J]. Virol Methods, 2001, 96(1): 33-41

[76] 周雪平, 李德葆. 双链检测技术在植物病毒研究中的应用[J]. 生物技术, 1995, 5(1): 1-4

[77] 邵碧英. 植物病毒分子检测方法概述[J]. 植物检疫, 2002, 16(6): 377-379.

[78] 吴乃虎. 基因工程原理. 第2版[M]. 北京科学出版社, 2000.100

[79] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术第2版[M] 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999, 388

[80] 梁国栋等. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京科学出版社, 2001, 129

[81] Mullis k. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerse chain reaction. Cold Spiring Harbor Symp [J]. Quant Biol, 1986, 51: 263

[82] 穆里斯K B, 费里F, 吉布斯R, 等. 聚合酶链式反应[M]. 北京科学出版社, 1997.93.

[83] 郑国华, 明艳林. 分子检测韭葱黄条病毒的研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 105-107

[84] Bertolini E, Lmos A, Lopez MM, et al. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi in olive trees [J]. Phytopathology, 2003, 93(3): 286-292

[85] Nolasco G, Blas DC, Torres V, et al. A Method combining innunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant virus and subvisal pathogens [J]. virol methods, 1993, 45(2): 201-218

[86] Y Sun, et al. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA [J]. Theor Appl Genet, 1994, 89: 26-32

[87] Deborab S G. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer-P Applied biosystems division 7700sequence detector [J]. Jouranl of Biomolecular Techniques, 1999, 10(1): 11-16

[88] 袁青, 王中康, 殷幼平, 等. 三重RT-PCR 同步检测马铃薯多种病毒影响因素[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5)

[89] 赵军良. 植物茎尖培养与无毒种苗生产[J]. 北方园艺, 1995, 6: 10-12.

[90] 郑平, 张雄坚, 陈应东等. 广东甘薯组培脱毒苗田间比较试验初报[J]. 广东农业科学, 1991, 5: 12-14.

[91] 薛光荣, 杨振英, 洪霓等. 茎尖培养等处理脱除梨病毒的技术研究[J]. 中国果树, 1996(3): 9-11

[92] 彭于发, 王慧敏, 彭有良. 植物病理学研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.9-13.

[93] Navarro L. Citrus shoot-tip grafting in vitro (STG) and its applications: a review Proc [J]. Int. Soc. Citriculture, 1981, l: 452-456.

[94] Kawarabayashi W, Asahira T. In vitro Multiplication of virus-free bublbs of Lilies [J]. Japan SocHort Sci, 1989, 58: 195-209

[95] 徐启江, 陈典, 张云修. 分孽洋葱茎尖培养脱毒苗技术研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2002, 30(2): 102-106.

[96] 徐品三, 栗雨时, 刘纪文等. 百合不定芽培养脱毒种球生产的研究[J]. 植物学通报, 2003, 20(3): 313-318.

[97] Ploaie P G. Use of immune electron microscopy o detect viruses in plants regenerated from meristem tip cultures [J]. Buletinul de Protectia Plantlor, 1984.

[98] Choi S L, Paek K Y, Kwun K C. Effect of explants source and shoot trimming on shoot multiplication and bulb formation of garlic in vitro [J]. Jounal of the Korean Society for Horticultural Science, 1985, 26(4): 304-312

[99] 徐培文, 孙慧生, 孙瑞杰. 脱毒大蒜速繁途径探讨和良繁体系的建立[J]. 中国蔬菜, 1993, 5: 9-13

[100] 赵顺庆, 李鹏飞, 范怀忠. 花叶病大蒜的茎端组织脱毒培养[J]. 华南农业大学学报, 1987, 8(4): l-8

[101] 陈典. 大蒜脱毒种苗培育技术研究[J]. 北方园艺, 1997, (2): 29-30．

[102] 陈世儒, 黄菊辉. 大蒜离体快繁及脱毒[J]. 园艺学报, 1991, 3(3): 133-137

[103] Burdon R H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1995, 18: 775-779

[104] Dare K C, Oberley T D, Mouse K E, et al. Expression of manganese superoxide dismutase Promote cellular differentiation [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1994, 16: 275

[105] Baker R, et al. In: kruse PF Jr, Patterson M K Jr. eds. Tissue Culture: Methure: Methods and Application [J]. New York: Academie Press, 1973, 735-739

[106] Walkey D. G. A, et al. Agronomic evaluation of virus-free and virus-infected garlic(Allium sativum L. )[J]. Hort. Sci, 1987, 64(1): 53-60

[107] Ucman R, Zel J, Ravnikar M. Thennotherapy in virus elimination from garlic: Influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro[J]. Scientia Horticulturae, 1998, 73(4): 193-202

[108] 王久兴, 孙成印, 李清云, 等. 蔬菜病虫害诊治原色图谱葱蒜类分册[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2004.42

[109] Louie R, Lorbeer J W. Mechanical transmission of onion yellow dwarf virus [J]. Phytopathology, 1966(56): 1020-1023.

[110] 洪健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱（第一版）[M]. 北京: 科学出版社, 2001

[111] Hari V. The RNA of tobacco etch virus: Further characterisation and detection of protein linked to RNA [J]. Wirology 1981 (112): 391-399.

[112] Murphy J F, Rhoads RE, Hunt AG, et al. The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24kDa part of the proteinase [J]. Virology 1990. (178): 285-288.

[113] Siaw MFE, Shahabuddin M, Ballard S, et al. Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of tobacco vein mottling virus RNA [J]. Virology. 1985(142): 134-143.

[114] 鲁宇文, 沈嘉乐, 韦传宝, 等. 洋葱黄矮病毒和韭葱黄条病毒外壳蛋白基因的原核表达及抗血清制备[J]. 科技通报, 2006(5): 638-641

[115] Nagakubo T, Kubo M. Viruses from Mosaie-Diseased Garlic: Molecular Evidence of Mixed Infection by a PotyVirus and a Carlavirus [J]. Phytopathology, 1994, 84(6): 640-645

[116] Tsuneyoshhi T, Matsumi T, Natsuaka K T, Stimi S. Nucleotide sequence analysis of virus

Isolates indicates the presence of three potyvirus species in Allium plants [J]. Arch Virol,1998a,143:97-113

[117] Yamashita K, Hanada K, Iwai H. Some properties of Onion yellow dwarf virus isolated from garlie (Allium sativum) [J]. Ann Phytopathology Soc Jpn, 1997, 63: 195-196

[118] Yamashita K, Hanada K. Welsh onion yellow stripe virus (WYSV) isolated from Welsh onion (Allium fistulosum) in Aomori prefecture [J]. Ann Phytopathology Soc Jpn, 1996, 62: 325

[119] TSuneyoshiT, IkedaY, Sumi5. Nucleotide sequences of the 3'-terminal region of onion yellow dwarf isolates from Alliurn plants in Japan [J]. Virus Genes, 1997, 15: 73-77

[120] Sumi S, Tsuneyoshi T, Furutani H. Novel rod-shaped viruses isolated from garlie, Alliuxn sativum, Possessing a unique genome organization [J]. Gen Virol, 1993, 74: 1879-1885

[121] Van Dijk P. Carlavirus isolated from cultivated Allium species represent three viruses [J]. Neth J Plant Pathol, 1993b, 99: 233-257

[122] 徐培文, 孙慧生, 孙瑞杰, 杨元军. 大蒜脱毒技术及应用研究[J]. 中国农业 科学, 1998, 31(2): 92-93

[123] Tsuneyoshi T, Matsumi T, Deng T C, Sako I, et al. Differeniiation of Allium carlaciruses isolated from different parts of the world based onthe viral coat protein sequence [J]. ArchVirol, 1998b, 143(16): 1093-1107

[124] Song S I, Song J T, Kim C H, et al. Molecular characterization of the garlic virus X genome [J]. Gen Virol, 1998, 79: 155-159

[125] Sumi S, Matsurni T, Tsuneyoshi T, et al. Complete nueleotide sequences of garlic virues A and C, members of the newly ratified genus Allixivirus [J]. Arch Virol, 1999, 144: 1819-1826

[126] 洪健, 周雪平. ICTV第八次报告的最新病毒分类系统[J]. 中国病毒学, 2006, 21(1): 84-96.

[127] Kobayashi K, Rabinowiez P, Bravo-Almonacid F, et al. Coat protein gene sequences of garlic and onion isolates of the onion yellow dwarf PotyVirus (OYDV) [J]. Arch Virol, 1996, 141: 2277-2287

[128] Song J T, Choi J N, Song S I, et al. Ideniification of a potexvirus in Korean garlic plants [J]. Agri chemi Biotech, 1995, 38(1): 55-62

[129] Chen J, Adams M J, Zheng H Y, et al. Sequence analysis demonstrates that Onion yellow dwarf virus isolates from China coniain a P3 region much larger than other potyviruses [J]. ArchVirol, 2003, 148: 1165-1173

[130] Chen J, Shi Y H, Adams M J, et al. The complete sequence of the genomic RNA of an isolate of Lily virusX (genus Potex virus) [J]. Arch Virol, 2005a, 150(4): 825-832

[131] Chen J, Zheng H Y, Antoniw J F, et al. Detection and classification of allexiviruses from garlie in China [J]. Arch Virol, 2004, 149: 435-445

[132] 马雯. 大蒜茎尖脱毒体系的建立与病毒电镜检测分析[D]. 甘肃农业大学: 2011

[133] Ma Y, Wang HL, Zhang C J, et al. High rate of virus-free plant-let regeneration via garlic scape-tip culture [J]. Plant Cell Rep, 1994, 14(1): 65-68

[134] Ayabe M, Sumi S. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micro-propagation of garlic (Allium sativum) [J]. Plant Cell Rep, 1998, 17: 773-779

[135] Ayabe M, Sumi S. A novel and efficient tissue culture method-stem-disc dome culture0-for producing virus-free garlic (Allium sativum) [J]. Plant Cell Rep, 2001, 20: 503-507

[136] 李金娟. 大蒜病毒病原的分子鉴定与序列分析[D]. 甘肃农业大学: 2011

[137] 于冰, 李海英, 张绍军, 等. 用TRIzol试剂一步法提取甜菜花蕾中的总RNA[J]. 黑龙江大学(自然科学学报), 2004, 21(1): 138-140

[138] 高志勇. 一种水稻总提取的简易方法[J]. 曲阜师范大学学报, 2005, 31(4): 97-98.

[139] 侯义龙, 张开春, 吴禄平, 等. 果树组织中总RNA提取的新方法[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(2): 122-125

[140] 阮小凤, Jelkmann Wilhelm, 杨勇. 果树病毒RNA的二氧化硅提取法[J]. 果树学报, 2004, 21(4): 388-390

[141] 谷瑞华, 王进忠, 文思远, 等. RT-PCR快速检测3种烟草病毒技术[J]. 华北农学报. 2007, 22(增刊): 21-23

[142] 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): 133-137

# 攻读硕士学位期间出版或发表的论著、论文.

大蒜病毒的快速检测，淮北师范大学学报（自然科学版），2013, 3.注：第一作者

致 谢

时光匆匆如流水，转眼便是毕业的时节，春梦秋云，聚散容易。离校日期已日趋临近，毕业论文的的完成也随之进入了尾声。从开始进入课题到论文的顺利完成，一直都离不开老师、同学、朋友给我热情的帮助，在这里请接受我诚挚的谢意！

首先我要感谢的是我的导师何道一教授，本学位论文是在我他的亲切关怀与细心指导下完成的。从课题的选择，到最后论文的反复修改，直至最终完成，何老师始终都给予了细心的指导和不懈的支持。何老师专业知识渊博，治学态度严谨，精益求精的工作作风对我影响深远，使我树立了良好的学习习惯，掌握了专业知识的同时还学会了实验操作中的基本技能。何老师不仅在教给了我专业知识，还教会了我为人处世的道理，是我在今后的工作和生活中都能用到的，使我受益终生。

感谢我的同学和实验室的师姐师弟们，陪我一起度过了这三年愉快的学习时光，大家相互帮助，互相学习，给枯燥的学习带来不少欢声笑语。特别感谢后期论文写作遇到困难时，对我伸出援助之手的同学和老师，是你们给了我莫大的帮助和鼓励。

感谢我的父母和亲友，感谢你们对我生活上无微不至的关怀和照顾，感谢你们队我攻读研究生阶段给予的鼓励和帮助。

最后，感谢评阅论文的各位专家、教授和答辩委员会的老师们！