

兰州百合病毒 RT-PCR 检测技术建立及应用

王红梅, 王立光, 刘新星, 李淑洁, 石有太, 李忠旺
(甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 病毒病是引起兰州百合产量下降、品种退化的主要原因, 准确、高效的病毒检测技术在百合脱毒种球生产和推广应用十分重要。根据 CMV、LSV 和 LMoV 病毒外壳蛋白基因序列设计引物, 以百合 18S rRNA 为内参照, 建立兰州百合病毒 RT-PCR、二重 RT-PCR 检测体系。对兰州百合主栽区病毒病的抽样调查发现, CMV、LSV 带毒率分别达到 98%、100%, LMoV 检出率在不同时期样品中存在较大差异。

关键词: 兰州百合; 病毒检测; 反转录-聚合酶链式反应; 病毒病调查

中图分类号: S644.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2021)03-0038-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2021.03.011

Establishment and Application of Virus Detection Technology of *Lilium davidii* Var. unicolor

WANG Hongmei, WANG Liguang, LIU Xinxing, LI Shujie, SHI Youtai, LI Zhongwang
(Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Virus disease is the main cause of yield decline and variety degradation of *Lilium davidii* Var. unicolor. It is very important to master efficient virus detection technologies in the production of virus-free bulb seedball and planting period. The PCR primers were designed according to the sequences of CMV, LSV and LMoV virus coat protein genes, and the virus detection system of RT-PCR and double RT-PCR was established with lily 18S rRNA as internal reference in this study. The results showed that sampling survey of *Lilium davidii* Var. unicolor. virus disease in main planting area, CMV and LSV were 98% and 100% respectively, and detection rates of LMoV were different in different periods samples.

Key words: *Lilium davidii* Var. unicolor; Virus detection; RT-PCR; Virus survey

兰州百合(*Lilium davidii* Var. unicolor)属百合科(*Liliaceae*)百合属(*Lilium*)多年生球根类草本植物, 是兰州市最具特色的名优特农产品之一, 为中国国家地理标志保护产品^[1], 2014年“兰州百合”被国家工商总局认定为“中国驰名商标”^[2]。兰州百合因鳞茎瓣大肉厚, 色泽洁白如玉, 味醇香甜, 营养丰富, 药食同源, 素有“兰州百合甲天下”之

美誉^[3]。与其他旱地农作物相比, 兰州百合在经济效益上有着明显的优势, 2016年仅兰州市七里河区西果园百合种植面积 0.38 万 hm², 产量 0.197 万 t, 实现产值达 8.36 亿元。兰州百合多年来靠对自然生长的母籽进行繁育, 种球退化导致兰州百合产量下降, 尤其病毒病是引起兰州百合产量下降、品种退化的主要原因^[4], 准确、高效的病毒检测

收稿日期: 2020-09-07

基金项目: 甘肃省农业科学院科技支撑计划(No.2018GAAS01); 甘肃省农业科学院重点研发计划(No.2019GAAS019); 兰州市科技计划项目(No.2019-1-67)。

作者简介: 王红梅(1972—), 女, 甘肃灵台人, 副研究员, 硕士。联系电话: (0)13893659623。Email: wanghm@gsagr.ac.cn。

技术在百合脱毒种球生产中十分重要。近年来兰州百合种植规模不断扩大,但由于种源退化问题引起百合产量不稳定、品质良莠不齐、价格大幅度波动、市场萎缩等现象,严重制约了兰州百合产业持续发展。生产用百合种球繁殖通过籽球、鳞片扦插等方式进行,而长期的无性繁殖极易造成病毒病害的传播和积累,一般发病率在 65%~70%,二代种球的带病率在 95%以上^[5]。百合感染病毒后终身带毒,病毒侵入会破坏植株正常的生理机制,出现花叶、矮化、畸形、坏死等症状,致使生长衰弱、产量下降、品质变劣、种性退化,一般种植 2 a 后失去商品价值^[6]。植物病毒分布广、繁殖快、防治难,有植物“癌症”之称。据统计,全世界每年因病毒病导致的粮食作物损失高达 200 亿美元,经济作物因病毒病造成的损失每年高达 600 亿美元^[7-8]。据调查,浸染百合的病毒种类有 20 多种,危害兰州百合的主要病毒有黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)、百合无症状病毒(Lily symptomless virus, LSV)、百合斑驳病毒(Lily mottle virus, LMoV)3 种^[9-10]。目前,生产和应用脱毒种球是控制兰州百合病毒病的有效途径,而准确、高效的病毒检测手段是百合脱毒种球生产环节的核心技术。

植物病毒检测方法主要有生物学检测法、电子显微镜法、血清学检测法和分子生物学方法等,不同方法在时效性、可操作性、准确性、灵敏度等方面各有优缺点。RT-PCR 技术因特异性强、灵敏度高、简便快速等优点,近年来在百合病毒检测方面得到了一定的应用^[9-12]。由于研究材料来源和试验条件的不同,我们早期曾借鉴前人的研究成果用于兰州百合病毒检测,但出现 PCR 扩增片段大小与预期不符,或者无扩增产物等问题。我们又以兰州百合主栽区病毒病危害严重的植株为材料,根据 CMV、LSV 和 LMoV 病毒外壳蛋白基因保守序列设计并合

成引物,以百合 18S rRNA 为参照,改进了兰州百合 RT-PCR 病毒检测技术体系,以期百合脱毒种苗和种球的生产以及田间病毒病调查研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料来源

供试兰州百合分别从主栽区七里河区西果园乡、榆中县园子岔乡和永靖县关山乡采集。田间调查发病情况,选取发病严重的植株采集新鲜叶片,保存于液氮中带回实验室用于 RNA 提取。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 称取 0.15 g 百合叶片在液氮中研磨。RNA 提取按照天根生化科技有限公司生产的 DP441 RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明进行,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测提取效果;RNA 反转录参照天根 KR116 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒说明进行,RNA 和 cDNA 浓度和质量检测在超微量分光光度计 NanoDrop™ ONE 上进行。采用 RNase-Free ddH₂O 将样品 cDNA 稀释到 50 ng/μL, -20 °C 保存备用。

1.2.2 引物设计 根据 NCBI Genbank 登录的百合 CMV、LSV、LMoV 病毒外壳蛋白基因序列和百合 18S rRNA 基因序列保守区段,应用 Primer premier 5.0 软件和 Oligo 6.22 软件设计引物,分别设计 CMV 引物 4 对、LSV 引物 3 对、LMoV 引物 5 对。百合 18S rRNA 引物参照张玉宝等^[11]的方法,引物委托北京 Invitrogen 生物技术有限公司合成。

1.2.3 RT-PCR、多重 RT-PCR 扩增与产物检测 首先采用百合 18S rRNA 引物进行扩增,PCR 扩增体系为 15 μL: 模板 cDNA 0.5 μL(25 ng), 2 × Taq PCR MasterMix(中科瑞泰北京生物技术有限公司)7.5 μL, 上下游引物各 1 μL(10 μmol/L), ddH₂O 5 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 42~60 °C 梯度退火 30 s, 72 °C 延伸

40 s, 34 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 反应在 BIO-RAD T100™ 型扩增仪中进行, PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 1 × TAE 缓冲液, 100 V 稳压电泳大约 30 min, 采用 BIO-RAD ChemiDoc XRS+ 凝胶成像系统观察结果。

通过上述方法对 PCR 反应体系和反应程序优化, 确定不同引物退火温度, 筛选出特异性高、稳定性好、PCR 产物电泳条带亮度强的引物。选择使用退火温度一致、扩增片段差别较大的引物建立多重 PCR, PCR 扩增体系为 30 μL: 模板 cDNA 1 μL (50 ng), 2 × Taq PCR MasterMix (中科瑞泰北京生物科技有限公司) 15 μL, 第 1 组上下游引物各 1 μL, 第 2 组上下游引物各 1 μL, ddH₂O 10 μL。PCR 反应程序、产物检测与成像方法同上。

1.2.4 RT-PCR 产物回收和测序 采用天根 Universal DNA 纯化回收试剂盒对百合病毒 RT-PCR 产物进行回收, 回收产物与 T 载体连接、转化大肠杆菌感受态, 挑取阳性克隆, 送金唯智生物科技有限公司进行测序, 测序结果采用 NCBI Blast 软件进行同源性比较分析。

1.2.5 田间病毒病调查 在兰州百合苗期(5 月中旬)和植株停止生长期(9 月上旬), 从百合主栽区(西果园乡、园子岔乡、关山乡)不同田块, 随机各选取 50 株百合采集叶片, 保存于液氮中带回以备检测。

2 结果与分析

2.1 百合叶片总 RNA 提取

百合叶片总 RNA 提取后, 采用超微量分光光度计测定了波长 230、260、280 nm 下的吸光度, 吸光值 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~

2.1 范围内, 说明提取的 RNA 蛋白或其他有机溶剂基本去除干净; OD₂₆₀/OD₂₃₀>2.0, 表明无异硫氰酸胍残留。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 结果显示, 28S 和 18S 条带清晰亮度强, 5S 条带较弱(图 1), 无拖尾现象, 表明 RNA 完整性较好, 符合下一步 RNA 反转录试验要求。cDNA 第一链合成后采用超微量分光光度计测定了浓度, 浓度范围 800~1 000 ng/μL 内, 完全能够满足 PCR 扩增需求。

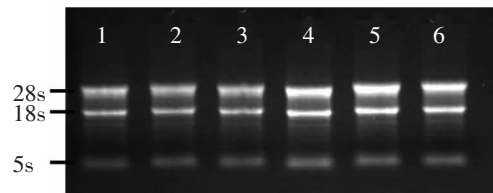
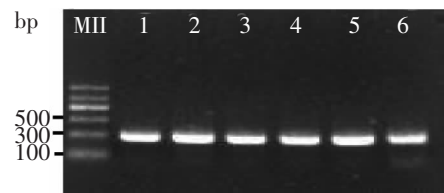


图 1 百合叶片总 RNA

2.2 百合病毒特异性引物筛选

以百合 18S rRNA 引物作为内参照, 对 cDNA 进行扩增, 产物出现了大约 300 bp 的目标片段(图 2), 证明提取的百合 RNA 质量可信。进一步通过采用梯度 PCR 和调整反应程序, 从设计的百合 CMV、LSV、LMoV 三种病毒引物中, 筛选到了 5 对目标条带清晰、重复性好的特异性引物可用于百合病毒检测(表 1)。



图中 MII 为 Marker II

图 2 18S rRNA 基因扩增

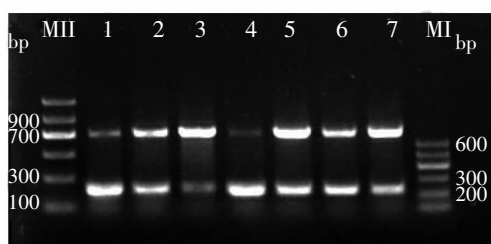
2.3 百合病毒多重 RT-PCR 体系建立

以前期建立的单重 RT-PCR 体系为基

表 1 百合病毒 CMV、LSV、LMoV 引物序列

病毒	编号	上游引物	下游引物	退火温度 /°C	扩增片段 /bp
CMV	A1	CTTTGTAGGGAGTGAACGCTG	AGATGGCGGCAACGGATA	60	248
LSV	B1	AATCAAGACCAGCAC AAGAA	GCAATGACCTCAGCA GAAGT	55	736
LMoV	C1	TGTAATGGCGTGTGGCT	GCTGGCGTGCCTGAAGTG	58	252

础,综合考虑各引物退火温度、目标片段大小和条带清晰度等因素组配多重 PCR,扩大 PCR 反应体系到 30 μ L,在退火温度为 58 $^{\circ}$ C 时引物 A1 和 B2 在同一反应体系中扩增,电泳检测显示两条清晰的扩增片段,与预期 736 bp 的 LSV 和 248 bp 的 CMV 片段大小相吻合(图3),说明该二重 PCR 具有较高的特异性,可用于兰州百合 CMV、LSV 病毒检测研究。LMoV 引物 C1 扩增产物(252 bp)与 CMV(248 bp)、18S rRNA(303 bp)的 PCR 产物片段大小接近,电泳条带难以区分,还需要设计更为理想的引物。



图中 MI 为 Marker I, MII 为 Marker II

图 3 二重 PCR 检测 CMV 和 LSV 结果

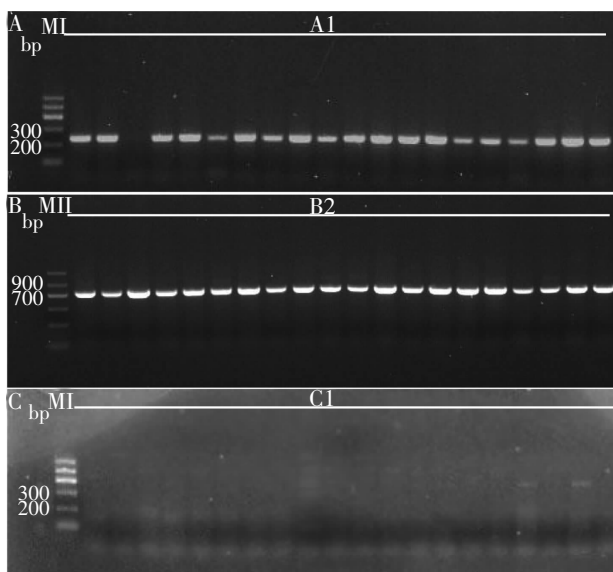
2.4 RT-PCR 产物序列分析

对百合病毒 CMV、LSV、LMoV PCR 扩增片段测序,测得全长序列分别为 248、736、252 bp,与预期长度一致。采用 NCBI Blast 软件进行基因序列比对分析,发现 CMV 序列与与已报道的 11 个百合病毒序列同源性达 98%,LSV 序列与已报道的 14 个百合病毒序列同源性达 99%,LMoV 序列与 8 个百合病毒序列同源性达 97%。序列比对同源性很高,说明本研究设计合成的引物扩增得到的基因片段确为百合 CMV、LSV 和 LMoV,这些引物可用于百合病毒检测。

2.5 兰州百合病毒田间发生情况

于 5 月中旬和 9 月上旬从兰州百合主产区取样,分别以 A1、B2 和 C1 引物进行 PCR 扩增,结果显示,CMV、LSV 检出率在两批样品之间没有明显差异,合计检出率分别为 98%、100%,说明 CMV 和 LSV 感染率非常高,是浸染兰州百合的主要病毒。

LMoV 在 5 月中旬的样品中带毒率为 80%,在 9 月初已停止生长、近乎枯萎的样品检出率为 16%,LMoV 检出率在不同时期样品中存在较大差异(图4)。



A 为 CMV 检测, B 为 LSV 检测, C 为 LMoV 检测, MI 为 Marker I, MII 为 Marker II, A1、B2、C1 为检测引物

图 4 百合病毒检测

3 结论与讨论

根据 genbank 登录的百合病毒外壳蛋白基因序列设计新的引物,筛选出重复性好、能特异性检测 CMV 的引物 2 对、LSV 引物 2 对、LMoV 引物 1 对,可用于兰州百合病毒检测。优化的 PCR 反应体系和反应条件是保证 RT-PCR 扩增成功的关键。本研究采用 2 \times Taq PCR MasterMix,通过试验确定模板 cDNA 和引物浓度,设置温度梯度筛选适宜的引物退火温度。在保证每一对单独引物与模板能够特异性地产生产物的基础上,根据退火温度接近、具有高度特异性的目标片段,且不同扩增片段能有效区分的原则建立多重 PCR 体系。最终 CMV 引物 A1 和 LSV 引物 B2 在同一 PCR 反应体系中得到了特异性扩增,取得了与预期片段大小一致的扩增产物。二重 RT-PCR 技术的建立,可提高兰州百合 CMV 和 LSV 检测效率、降低试验成本,具有一定的实际应用价值。

研究表明,兰州百合田间病毒病 CMV、LSV 检测结果在 2 批样品之间没有明显差异,检出率分别为 98%、100%,说明兰州百合主要感染病毒为 CMV 和 LSV,这与王发林等^[13]的研究一致。LMoV 检出率在不同时期样品中存在较大差异,5 月中旬苗期样品检出率为 80%,9 月初已停止生长的样品检出率为 16%,说明 LoMV 检出率与植株发育时期有关。百合病毒病发病程度与寄主生长周期呈正相关,其发生受多种条件影响,如温度、生长发育时期、传毒介体等,如温度是百合病害病发生有重要影响的环境因素之一^[14-16]。有研究认为,气温在 20℃ 以下时,百合发病程度较轻,但随气温升高百合发病程度不断加重,当气温达到 35℃ 以上时病情开始减轻,并随着持续高温出现隐症现象^[16-17]。百合苗期很容易感染病毒病,发病率和病情指数不断升高,在显蕾期发病率最高,病情指数也较高,在花期出现隐症现象^[14]。一般植物病毒只有在寄主活体内才具有活性,仅少数植物病毒可在病株残体中保持活性几天或几个月,病毒入侵与植物调控生长发育进程以及生物和非生物应激反应的抗病毒机制有关^[18]。因此,百合病毒检测率高低与病毒活性及对寄主入侵机制相关。

病毒病是无性繁殖植物的常见病害,其分布广、危害大,且多为复合感染,主要通过蚜虫等昆虫媒介和土壤、机械损伤传播,传播速度快,有日益严重的趋势。植物病毒病防治方法主要有抗病毒育种、使用化学农药和推广应用脱毒种苗,但抗病育种存在基因资源匮乏、育种周期长、效率低下,使用化学药剂或生物制剂对植物病毒病尚不能进行直接有效防治^[19]。因此,生产和种植脱毒种苗,进行“无毒化”栽培成为控制植物病毒病的主要措施,而准确、高效的病毒检测是把好种源关、实现“无毒化”栽培必不可少的首要环节。

参考文献:

[1] 国家质量监督检验检疫总局. 2004 年第 137

号[EB/OL]. (2004-09-27)[2020-08-29].
<https://law.lawtime.cn/d362330367424.html>.

- [2] 白贺兰, 乔德华. 兰州百合产业发展现状及优化升级对策[J]. 甘肃农业科技, 2017(12): 79-82.
- [3] 新华网. “兰州百合”——坚持绿色发展. 打造地方品牌[EB/OL]. (2017-09-27)[2020-08-29]. http://m.xinhuanet.com/gs/2017-10/25/c_112185321_3.htm.
- [4] 周清泉. 兰州百合产业发展现状及对策[J]. 甘肃农业科技, 2016(1): 64-66.
- [5] 张元英. 浅议兰州百合产量和品质下降问题[J]. 农民致富之友, 2016(20): 96.
- [6] 赵祥云, 王文和. 百合品种退化原因及国产种球繁殖与复壮技术[J]. 中国花卉园艺, 2008(6): 14-17.
- [7] 迟惠荣, 毛碧增. 植物病毒检测及脱毒方法的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(8): 26-33.
- [8] BELÉN PICÓ, MARÍA JOSÉ DÍEZ, FERNANDO NUEZ. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. - the tomato yellow leaf curl virus - a review[J]. Scientia Horticulturae, 1996, 67(3): 117-150.
- [9] 邹迎春, 杨朝柱, 覃大吉, 等. 百合病毒的多重 RT-PCR 检测技术[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(20): 5051-5053.
- [10] 李 瑛, 黄惠英, 张金文, 等. 兰州百合病毒多重 PCR 和 ELISA 检测体系的比较与应用[J]. 甘肃农业大学学报, 2011, 46(3): 59-64.
- [11] 张玉宝, 谢忠奎, 王亚军, 等. RT-PCR 方法同步检测兰州百合(*Lilium davidii* var. unicolor)两种主要病毒[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(6): 744-749.
- [12] 陈 进, 李晓昕, 袁 雪, 等. 百合三种主要病毒的 RT-PCR 检测及脱毒技术研究[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(4): 489-497.
- [13] 王发林, 古勤生, 刘 芬, 等. 兰州百合病毒病原的 DAS-ELISA 检测[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(4): 106-107.
- [14] 王仙芝, 张延龙, 牛立新, 等. 秦巴山区六种野生百合感染 3 种病毒病鉴定及其田间抗病性初步评价[J]. 中国农业科学, 2008(11): 3618-3625.

冬小麦新品种武都 21 号选育报告

宛 亮, 张援文, 何蔷薇

(陇南市农业科学研究所, 甘肃 陇南 746005)

摘要: 冬小麦新品种武都 21 号是以 97-4-6-2-1-3 为母本, 以引 11-12 为父本, 通过有性杂交, 系统选育而成。在 2015—2017 年陇南川区组区域试验中, 平均折合产量 6 357.0 kg/hm², 较对照品种兰天 33 号增产 3.6%。在 2017—2018 年度生产试验中, 折合产量 6 661.5 kg/hm², 较对照品种兰天 33 号平均增产 2.7%。全生育期 246 d, 株高 76.75 cm, 穗长 8.5 cm, 千粒重 37.1 g。适宜陇南市半山干旱、半干旱区, 徽成盆地及低半山河谷川台地区和天水市甘谷、清水等地种植。

关键词: 冬小麦; 选育; 新品种; 武都 21 号

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2021)03-0043-03

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2021.03.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2021.03.012)

Report on Breeding of New Winter Wheat Cultivar Wudu 21

WAN Liang, ZHANG Yuanwen, HE Qiangwei

(Longnan Institute of Agricultural Sciences, Longnan Gansu 746005, China)

Abstract: Wudu 21 is a new winter wheat cultivar, was systematically bred by sexual hybridization with 97-4-6-2-4-3 as female parent and 11-12 as male parent. In 2015—2017, the average yield of Wudu 21 was 6 357.0 kg/hm², which was 3.6% higher than the check Lantian 33 in Regional Trial of Longnanchuan district group. In 2017—2018, the average yield of Wudu 21 was 6 661.5 kg/hm², which was 2.7% higher than the check Lantian 33 in the Production Trial. The growth period is 246 d, plant height is 76.75 cm, ear length is 8.5 cm, 1 000-grain weight is 37.1 g. It is suitable to be grown in mid-mountain arid, semi-arid area of Longnan City, Huicheng basin and Gangou, Qingshui and Tianshui City and other areas.

Key words: Winter wheat; Breeding; New cultivar; Wudu 21

陇南市位于甘肃省东南部, 地处秦巴山区, 地理坐标东经 104° 1'~106° 35', 北纬

收稿日期: 2021-01-18

基金项目: 陇南市科技局“陇南市冬小麦新品种选育”项目(2007-6-2-1-1)部分内容。

作者简介: 宛 亮(1971—), 男, 甘肃陇南人, 农艺师, 主要从事冬小麦育种研究工作。联系电话: (0)18793992910。Email: gslnwl2021@163.com。

通信作者: 张援文(1967—), 女, 甘肃陇南人, 高级农艺师, 主要从事冬小麦育种研究工作。联系电话: (0)18089398109。Email: 1261966931@qq.com。

[15] SZITTYA G, SILHAVY D, MLLNAR A, et al. Low temperature inhibits RNA silencing mediated defence by the control of siRNA generation[J]. The European Molecular Biology Organization Journal, 2003, 22(3): 633-640.

[16] 王小青, 赵 志, 蒋士君, 等. 接种 TMV 的烟草高温胁迫后防御酶活性的变化[J]. 烟草科技, 2006(12): 51-54.

[17] 石延霞. 黄瓜霜霉病菌侵染模拟、致病机理

和高温诱导抗病性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2002.

[18] 钱礼超, 刘玉乐. 植物抗病毒分子机制[J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(10): 999-1009.

[19] 娄 虎, 徐 熔, 王海竹, 等. 植物病毒病检测及防治的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24): 25-31.

(本文责编: 杨 杰)