

吉林、黑龙江部分地区毛葱 OYDV 感染情况调查

李小宇, 郭炎, 张春雨, 刘宝权, 李建平, 王永志*

(吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100)

摘要:本研究运用ELISA检测方法对吉林、黑龙江多个毛葱种植地区(柴岗、杨树林、哈拉海、前岗乡、三清山、太平山镇、肇州和阿城)的洋葱黄矮病毒(OYDV)感染情况进行了系统的调查。结果表明:八个地区中,OYDV感染情况都比较严重,整体检出率在30%以上,吉林太平山镇OYDV感染率最高,为75%,说明OYDV感染在东北毛葱种植区普遍存在;目测结果与ELISA检测结果符合率的分析发现,柴岗和肇州目测为健康的植株与OYDV-ELISA检测结果的符合率最高,为90%,哈拉海最低,只有10%,说明哈拉海地区种植的毛葱中有OYDV弱毒株感染而植株不显症现象;太平山镇和哈拉海目测为感病的植株与OYDV-ELISA检测结果阳性的符合率为100%。阳性植株鳞茎中OYDV分布情况为:外层和内层OYDV检出率低,中层检出率高。本研究明确了不同地区毛葱OYDV感染情况及OYDV在鳞茎中的分布,为毛葱的脱毒繁育奠定了理论基础。

关键词:分蘖洋葱;洋葱黄矮病毒

中图分类号:S633.9;S436.33 文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2019)06-0053-04

Investigation of OYDV Infection on Shallot in Part Areas of Jilin and Heilongjiang Province

Li Xiaoyu, Guo Yan, Zhang Chunyu, Liu Baoquan, Li Jianping, Wang Yongzhi*

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: In this study, ELISA was used to investigate the infection of OYDV in part areas of Jilin and Heilongjiang Province. The results showed that in the eight regions(Chaigang, Yangshulin, Halahai, Qiangang, Sanqingshan, Taipingshan, Zhaozhou and Acheng), the OYDV infection situation was relatively serious, the OYDV infection incidence was more than 30%, and the infection rate of the OYDV at Taipingshan areas was 75%, which indicated that OYDV infection was prevalent in shallot growing areas in Northeast China. The coincidence rate between visual results and ELISA results was analyzed. The negative results of OYDV-ELISA and visual detection healthy results in Chaigang and Zhaozhou showed the highest coincidence rate (90%). Halahai was the lowest, for only 10%, which indicated OYDV attenuated strains infection in Harahai with no symptoms. The coincidence rate of symptomatic plant and the OYDV-ELISA-positive was 100% in Taipingshan and Halahai. The infection rate of OYDV in scales of positive bulb was low in outer layer and inner layer and high in middle layer. In this study, the infection of OYDV in different areas and its distribution in scale tablets were clarified, which laid the foundation for the virus-free and breeding of onion.

Keywords: Shallot; Onion yellow dwarf virus

毛葱(*Allium cepa* var. *aggregatum*), 又称分蘖洋葱, 分蘖葱头, 俗称鬼子葱, 为百合科葱属两年生草本植物, 在东北地区有悠久的栽培历史, 是北方地区特色经济作物^[1], 具有降血脂、降血

压、抗癌、抑菌、消炎等保健功能^[2]。通常以分蘖鳞茎进行营养繁殖, 鳞茎为卵形或狭卵形, 单生或聚生^[3], 其内部由鳞芽和肉质鳞片组成, 每株蘖生多个鳞茎, 多为紫红色或淡紫色^[4]。毛葱以其肉质鳞茎为主要食用器官, 其生育期短, 高产、病虫害较轻、耐寒性强、适应性广, 同时耐贮运, 供应期和货架期长, 栽培面积广, 产品深受消费者青睐^[5]。

洋葱黄矮病毒(Onion yellow dwarf virus, OYDV), 隶属于马铃薯Y病毒属, 是危害毛葱质量和

收稿日期: 2019-03-26

基金项目: 农业部东北作物有害生物综合治理重点实验室开放基金课题(DB2018-09)

作者简介: 李小宇(1981-), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 分子病毒学与生物反应器研究。

通讯作者: 王永志, 男, 博士, 副研究员, E-mail: yzwang@126.com

产量的主要病毒之一。OYDV一般通过蚜虫以非持久方式传播,也可以汁液的摩擦接种传播,另外通过带毒种苗也可传播^[6-7]。植株感染OYDV后表现为矮化,叶片伴随局部不规则发黄,后期整个叶片发黄、向下卷曲、起皱及萎缩等症状^[8]。OYDV在世界各地传播广泛,感病率欧洲为52%,亚洲为86%。在受病毒感染的毛葱植株中,鳞茎和种子的产量会大大降低,造成巨大经济损失。据报道,阿根廷OYDV发病率高达92%;在美国高达95%;在印度,OYDV是以渐进的比例出现的,并且与毛葱种子的产量下降有关^[9]。目前,栽培户多以鳞茎进行无性繁殖,但播种的带毒鳞茎会导致下一代植株发病。

近些年来,运用血清学方法检测植物病毒得到了广泛的应用^[10-12],本研究利用实验室已制备的马铃薯Y病毒属通用型单克隆抗体,运用ELISA方法对吉林、黑龙江部分地区的毛葱OYDV进行了系统的调查,明确不同地区毛葱OYDV的感染率,以及OYDV在分蘖和鳞茎中的分布。为OYDV的防治奠定了基础,为毛葱脱毒繁育提供了指导。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

检测抗体4G12-HRP由实验室制备保存^[11]。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集

样品采自吉林、黑龙江柴岗乡、杨树林镇、哈拉海镇、前岗乡、三清山镇、太平山镇、肇州县和阿城县8个地区,采用五点取样法。

于2018年5月中旬到六月初,其管状叶长度15~20 cm时进行采集。选择不同地区内连片地块面积在1 hm²以上为代表的生产田,每块田随机

采集其叶片及地下鳞茎,田间现场采集的样品装入密封袋,置于冰盒中,实验室内4℃保存。

1.2.2 检测方法

运用ELISA方法对采集的样品进行OYDV检测,0.1 mol碳酸盐缓冲液充分研磨毛葱植株叶片,12 000 r/min离心5 min,吸取上清,100 μL包被96孔酶标版,室温孵育60 min;检测抗体为4G12-HRP,工作浓度为3.3 μg/mL,室温孵育30 min;TMB显色液显色,2 mol/L H₂SO₄终止反应。酶标仪OD_{450nm}读数,根据OD_{450nm}样品(P值)/OD_{450nm}阴性(N值)≥1.5为阳性结果。

1.2.3 洋葱黄矮病毒病调查

每个调查区采集40份样品,运用ELISA方法进行OYDV检测,调查各个区域内毛葱OYDV感染情况。调查区内的样品按目测观察分为健康植株和疑似发病植株,每个地区随机抽取10份表观健康样品和10份表观疑似发病样品进行ELISA检测,统计并分析其目测观察与检测结果的符合率。在调查区内随机采集不等数量的植株,统计其分蘖数,运用ELISA方法,调查分蘖中OYDV感染情况;选取检测呈阳性的分蘖3~4个,将其鳞茎层层剥离,每层鳞茎进行ELISA检测,调查每层鳞茎中OYDV感染情况。

2 结果与分析

2.1 各个生产区OYDV调查

利用ELISA方法对每个毛葱生产区的40份样品进行检测,检测结果(表1)显示:8个地区OYDV感染情况差异较大,总体在30%以上,其中太平山OYDV感染率最高,达到75%;三清山和前岗的感染率最低,为30%,从结果中可以看出,调查的8个生产区OYDV均有发生,且较为严重。吉林和黑龙江毛葱OYDV感染率相似,且都接近50%。

表1 OYDV感染情况

	柴岗	肇州	三清山	太平山	哈拉海	杨树林	阿城	前岗
阳性植株数	15	20	12	30	23	25	18	12
阴性植株数	25	20	28	10	17	15	22	28
发病率	37.5%	50%	30%	75%	57.5%	62.5%	45%	30%

2.2 目测与检测结果的符合率分析

每个产区的样品通过目测观察,随机采集表观健康和表观疑似发病植株各10份,运用ELISA方法检测其OYDV感染情况,结果显示:目测表观健康植株与检测结果的符合率差异较大(表2),

均检测到OYDV,且带毒率不等。符合率最高的为柴岗和肇州,为90%;哈拉海最低,只有10%。植株是否显症与病毒毒力和植株自身的抗性有关,也与当年的气候条件有关,如果病症较轻或不明显,在表观上容易判断为健康植株,但随着

病毒的积累很可能在下一代植株突出爆发。

目测表观发病植株与检测结果的符合率相对较高(表2),其中太平山和哈拉海的符合率最高,

达到100%,杨树林和阿城也达到90%,肇州最低,为20%。肇州的检测结果分析可能为其它病毒感染,或是与种植模式有关,造成植株生理上的缺陷。

表2 表观符合率检测结果

		柴岗	肇州	三清山	太平山	哈拉海	杨树林	阿城	前岗
表观健康植株	阴性植株数	9	9	2	3	1	5	3	3
	阳性植株数	1	1	8	7	9	5	7	7
	符合率	90%	90%	20%	30%	10%	50%	30%	30%
表观疑似发病植株	阳性植株数	6	2	6	10	10	9	9	6
	阴性植株数	4	8	4	0	0	1	1	4
	符合率	60%	20%	60%	100%	100%	90%	90%	60%

2.3 分蘖中 OYDV 发生情况

在调查区采集不同数量目测健康的植株,统计其分蘖数,运用 ELISA 方法对各分蘖进行检测,结果显示(表3)整体符合率偏低,只有柴岗和肇

州分蘖符合率达到50%左右,杨树林的符合率只有7.5%。说明在目测表观健康的毛葱中,会出现带有 OYDV 的分蘖, OYDV 在分蘖中的分布并非一致,单靠植株表观留种扩繁具有极大的风险。

表3 分蘖检测结果

	柴岗	肇州	三清山	太平山	哈拉海	杨树林	阿城	前岗
株数	15	15	11	6	6	12	12	12
分蘖数	86	124	89	55	39	80	52	119
阳性分蘖数	41	56	49	31	28	74	32	62
阴性分蘖数	45	68	40	24	11	6	20	57
符合率	52.3%	54.8%	44.9%	43.6%	28.2%	7.5%	38.5%	47.9%

2.4 阳性植株鳞茎中 OYDV 的分布

各个地区在分蘖检测中结果为阳性的分蘖继续进行鳞茎检测。每个地区随机采集3~4份分蘖样品,共33份样品。将其鳞茎层层剥离进行 ELISA 检测。在33份样品中,剥离的鳞茎数不同。对鳞茎检测结果统计(见图1):最外一层、第二层、第三层鳞茎检测多为阴性,只有1份样品结果

呈阳性;第四层有3份为阳性;第五、六层分别有11份样品为阳性;第七层有20份样品为阳性;第八层有16份样品为阳性;第九层有17份样品为阳性;第十层有16份样品为阳性;第十一层有9份样品为阳性;第十二层有4份样品为阳性;第十三层、十四层有2份样品为阳性。结果显示,外部层和内部层 OYDV 检出率低,中部层检出率高,出现这种现象,是由于内部层的鳞茎为新生组织,茎块偏小,带毒率低;外部层的鳞茎组织细胞老化,不利于病毒的存活;中部层组织生长旺盛,有利于病毒的生存和复制。

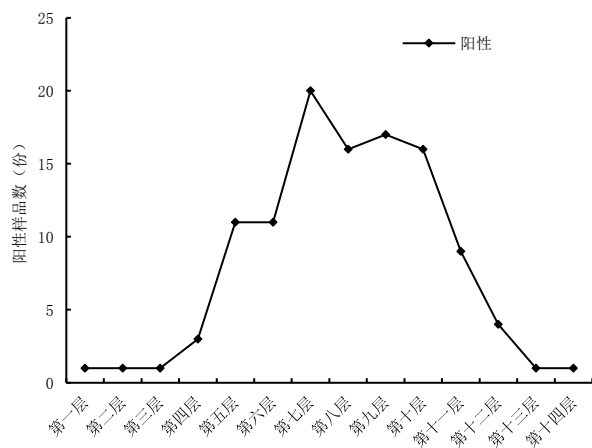


图1 鳞茎中 OYDV 的分布

3 讨论

毛葱是北方地区的经济作物,历史悠久。传统的种植方式为分蘖鳞茎无性繁殖,这种栽培方式为农民创造了很高的经济效益^[13]。在采集地的八个地区中,农安县是毛葱的主产区,每年毛葱的种植面积都在75 000亩以上。毛葱受 OYDV 感染后所造成的影响极大,质量和产量都会相应地减少。采集地中太平山受 OYDV 感染率为75%,

杨树林侵染率为62.5%，哈拉海侵染率为57.5%，其余地区受侵染率均在30%~50%之间，表明调查区中植株受OYDV影响较大，急需从源头控制OYDV的发生。由于北方地区毛葱多进行无性繁殖，且繁殖系数在6~12之间，因此毛葱的繁育工作难度较大^[14]，目前应采用组培技术对毛葱进行繁育，建立一套组培脱毒技术至关重要。

对目测观察与检测结果符合率的分析发现，目测表观健康植株与OYDV检测结果的符合率相对较低，当发病症状较轻或不明显时，单纯以表观症状对毛葱进行判定，并留种种植，不能有效筛选无毒种苗。另外，带有OYDV的毛葱资源异地调运以及常年的积累使OYDV的毒力增强，会出现大面积爆发，造成严重的减产。

在对阳性鳞茎进行OYDV分布检测时发现，病毒OYDV由外层向内层病毒积累量呈先升高再下降的趋势，即外层检测多为阴性，向内检测逐渐出现病毒积累，但是再继续向内检测直至最内层鳞茎病毒积累量则呈下降趋势。选择最外层或最内层鳞茎组培，在无OYDV检测条件时，不失为一种有效的组培脱毒方法。

参考文献：

- [1] 李曙轩.栽培学各论[M].北京:中国农业出版社,1980:12.
- [2] 李翔,刘达玉,邹强,等.洋葱精油提取工艺研究及化学成分GC/MS分析[J].中国调味品,2013(12):82-85.
- [3] 郭贵林,邢启研.黑龙江省植物检索表[M].哈尔滨:黑龙江人民出版社,1992:666.
- [4] 卢育华.蔬菜栽培学各论—北方本[M].北京:中国农业出版社,2000:241.
- [5] 徐培文,杨又迪.大蒜病毒病的研究进展[J].世界农业,1997,9(4):32-34.
- [6] Van Dijk P. Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species[J]. European Journal of Plant Pathology, 1993, 99: 1-48.
- [7] Graichen. CMI/AAB Description of plant viruses[J]. Phytopath, 1978, 14:1.
- [8] Conci V, Nome S F, Milne R G. Filamentous viruses of garlic in Argentina[J]. Plant Disease, 1992, 76(6): 594.
- [9] Melhus I E, Reddy C S, Henderson W J, et al. A new virus disease epidemic on onions[J]. Phytopathology, 1929, 19: 73-74.
- [10] 尤晴,李小宇,张春雨,等.马铃薯Y病毒属三种病毒通用型单克隆抗体的鉴定[J].植物保护,2016,42(6):76-79.
- [11] 王永志,万千,李小宇,等.OYDV衣壳蛋白表达及其单克隆抗体分析[J].东北农业科学,2018,43(2):26-29.
- [12] 李小宇,张春雨,张伟,等.大豆花叶病毒间接ELISA检测方法的建立及应用[J].东北农业科学,2019,44(1):22-28.
- [13] 陈少灿,吴凤芝.轮作分蘖洋葱对大白菜生长、品质及产量的影响[J].北方园艺,2015(12):31-34.
- [14] Bos L. Viruses and virus diseases of *Allium* species[J]. Acta Horticulturae, 1983, 127: 11-29.