



我国大蒜种质资源携带的病毒种类及分布

阳文龙^{1#}, 王洋^{1#}, 宋江萍¹, 张晓辉¹, Hassan H.A. Mostafa², 付艳¹, 王海平^{1*}, 李锡香^{1*}

1 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

2 埃及农业研究中心有机农业中心实验室, 吉萨 12619, 埃及

阳文龙, 王洋, 宋江萍, 张晓辉, Hassan H.A. Mostafa, 付艳, 王海平, 李锡香. 我国大蒜种质资源携带的病毒种类及分布. 微生物学报, 2022, 62(12): 4868–4877.

Yang Wenlong, Wang Yang, Song Jiangping, Zhang Xiaohui, Hassan H.A. Mostafa, Fu Yan, Wang Haiping, Li Xixiang. The species and distribution of viruses in the garlic germplasm resources of China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4868–4877.

摘要: 病毒感染导致大蒜产量下降, 品质变劣。大蒜种质资源的收集、监测和安全保存对大蒜产量、抗病性和品质的遗传改良具有重要意义。【目的】检测我国大蒜资源中病毒的携带和分布情况。【方法】采用 2 种多重反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法对 689 份大蒜种质资源中的 7 种病毒的分布进行了检测。【结果】研究表明, 青葱 X 病毒属病毒[包括 GarV-A、GarV-B、GarV-C、GarV-D、GarV-E、GarV-X、葱病毒 X(SH VX)]携带率最高(98.69%), 接着依次是洋葱黄矮病毒(OYDV, 90.13%)、大蒜蚜传丝状病毒(GMBFV, 71.12%)、韭菜黄条病毒(LYSV, 50.65%)、葱潜隐病毒(SLV, 49.20%)、马铃薯 Y 病毒(PVY, 41.94%)和大蒜普通潜隐病毒(GarCLV, 32.08%)。其中有 27 份资源(3.92%)含有 7 种病毒, 122 份(17.71%)含有 6 种病毒, 190 份(27.58%)携带 5 种病毒, 150 份(21.77%)携带 4 种病毒, 129 份(18.72%)含有 3 种病毒, 62 份(9.00%)含有 2 种病毒, 7 份(1.02%)只携带 1 种病毒, 而有 2 份资源(0.29%)没有检测到病毒。此外, 大蒜资源种植世代与病毒种类数呈显著正相关($P < 0.05$), 茎尖培养可以有效地减少或清除病毒。【结论】本研究明确了我国大蒜种质资源中 7 种主要病毒的分布情况, 为大蒜种质资源的安全保存提供了理论参考, 也为大蒜的抗病毒育种提供了基因资源。

关键词: 大蒜; 种质资源; 病毒; 多重 RT-PCR; 茎尖脱毒培养

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-24-A-01); 中国农科院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2022-IVFCAAS); 农业农村部作物种质资源安全保存项目(2022NWB037)

Supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-24-A-01), by Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2022-IVFCAAS) and by Safe Preservation Project of Crop Germplasm Resources of MARA (2022NWB037)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: LI Xixiang, lixixiang@caas.cn; WANG Haiping, wanghaiping@caas.cn

Received: 29 March 2022; Revised: 25 May 2022; Published online: 22 June 2022

The species and distribution of viruses in the garlic germplasm resources of China

YANG Wenlong^{1#}, WANG Yang^{1#}, SONG Jiangping¹, ZHANG Xiaohui¹,
Hassan H.A. Mostafa², FU Yan¹, WANG Haiping^{1*}, LI Xixiang^{1*}

1 Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2 Central Laboratory of Organic Agriculture, Agricultural Research Center, Giza 12619, Egypt

Abstract: Virus infection leads to severe yield reduction and quality deterioration in garlic production. It is of great significance to collect, monitor, and conserve garlic germplasm resources for genetic improvement of garlic yield, virus resistance, and quality. **[Objective]** To reveal the virus-carrying status and distribution of garlic resources in China. **[Methods]** We employed two multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods to evaluate the distribution of seven virus species among 689 garlic germplasm accessions. **[Results]** Allxivirus [GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X, and shallot virus X (ShVX)] had the highest detection rate (98.69%), followed by onion yellow dwarf virus (OYDV, 90.13%), garlic mite-borne filamentous virus (GMBFV, 71.12%), leek yellow stripe virus (LYSV, 50.65%), shallot latent virus (SLV, 49.20%), potato Y virus (PVY, 41.94%), and garlic common latent virus (GarCLV, 32.08%). Among these garlic accessions, 27 (3.92%), 122 (17.71%), 190 (27.58%), 150 (21.77%), 129 (18.72%), 62 (9.00%), and seven (1.02%) accessions carried seven, six, five, four, three, two, and one virus species, respectively, while two (0.29%) accessions did not carry any virus. In addition, there was a significantly positive correlation between the planting generations of garlic resources and the number of virus species ($P < 0.05$). Shoot tip culture can effectively reduce or eliminate viruses. **[Conclusion]** This study reveals the distribution of seven main virus species in garlic germplasm resources in China, providing a theoretical basis for the safe preservation of garlic germplasm resources and enriching the gene resources for the breeding of antiviral garlic germplasm.

Keywords: garlic; germplasm resources; virus; multiplex RT-PCR; shoot tip virus-free culture

大蒜(*Allium sativum* L.)是最古老的栽培植物之一,也是一种重要的商业作物,在世界范围内用作食品和药物^[1-2]。目前,中国拥有世界上最大的大蒜产区,其产量远远领先于其他国家。从2006–2016年,大蒜消费量每年增长3.2%,2016年达到2650万t^[3]。预测显示,到2030年,中国的大蒜消费量将进一步增加到3110万t [中国商务部的全球市场报告:大蒜(MOFCOM.Gov.cn)]。然而,由于耕地有限,进

一步扩大种植面积是不现实的。因此,满足大蒜预期需求的最佳可行方法是培育高产和抗性品种。

植物种质资源是作物产量、品质和抗性遗传改良的重要基础^[4]。因此,我们从全国和世界各地收集了近千份大蒜资源,并将它们保存在国家无性繁殖及多年生蔬菜资源圃中。目前大蒜种质安全保存面临的巨大挑战是突发的自然灾害和田间病毒感染。大蒜是一种无性繁殖

作物, 在大蒜的繁殖和生产过程或在种质资源的保存过程中, 各种病毒会持续感染并存在于种质材料中, 导致在繁殖世代中病毒积累增加^[5]。感染大蒜的病毒种类主要有马铃薯 Y 病毒(PVY)、洋葱黄矮病毒(OYDV)、韭菜黄条病毒(LYSV)、大蒜普通潜伏病毒(GarCLV)、葱潜伏病毒(SLV)、Allexivirus(GarV: GarV-A、GarV-B、GarV-C、GarV-D、GarV-E、GarV-X、SHVX)、大蒜蚜传丝状病毒(GMBFV)等^[6-14]。病毒感染使大蒜品种逐渐失去优良特性和降低产量^[15-16]。据报道, 一些病毒降低了大蒜鳞茎的质量, 也有一些病毒降低了大蒜的品质^[15-17]。随着时间的推移, 病毒在大蒜材料中积累的增加可能会导致产量和品质的严重丧失^[17]。因此, 了解大蒜种质资源中病毒的多样性对于种质资源的安全保存和抗病品种的选育是十分必要的。

大蒜病毒的检测方法主要包括血清学检测、电镜检测和反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)^[18]。酶联免疫印迹试验(ELISA)和斑点 ELISA 等血清学方法通常用于检测大蒜病毒指数^[7,19-20]。但是该方法中抗体不容易获得, 并且每次只能检测一种病毒。而电子显微镜的检测方法也存在成本高、技术难度大的问题。与血清学检测和电镜检测方法相比, RT-PCR 方法具有较高的灵敏度和检测速度。如果使用多重 PCR, 一次可以检测到多种病毒^[6,8-9,17,21-25]。为此, 我们使用 2 套多重 PCR 引物, 对 689 份大蒜种质中 Allexivirus、OYDV、LYSV、SLV、PVY、GarCLV 和 GMBFV 等 7 种病毒的携带情况进行了检测, 并对收集的大蒜种质资源在资源圃中保存的时间与检测到的病毒种类数进行了相关性分析。此外, 我们还探索了从受感染的品种/种质中去除病毒的可能解决方案, 为大蒜的安全生产和种质的长期有效保存提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

植物材料采用国家无性繁殖及多年生蔬菜资源圃在 2003–2020 年收集的 689 份大蒜种质资源(相关数据已上传至国家微生物科学数据中心 NDMC, 编号 SUB1669016203500, 其中有 540 份分别收集于 2003–2020 年, 包括 2003 年 26 份, 2004 年 30 份, 2005 年 30 份, 2006 年 10 份, 2007 年 28 份, 2008 年 13 份, 2009 年 10 份, 2010 年 14 份, 2011 年 44 份, 2012 年 11 份, 2013 年 33 份, 2014 年 145 份, 2015 年 22 份, 2016 年 12 份, 2017 年 39 份, 2018 年 51 份, 2019 年 21 份, 2020 年 1 份。另外有 22 份为育成品种)。将材料种植在中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室内的育苗盆中, 每个材料种植 2 盆, 每个盆中种植 8–10 个大蒜蒜瓣。在 (22 ± 2) °C、相对湿度(relative humidity, RH) 为 60%–80%、光照(L)/黑暗(D)=14 h/10 h 的条件下, 培养大蒜到三叶期, 随机采集 5 个植株的幼嫩叶片混合在一起, 用于总 RNA 的提取。

为了检测种质繁殖方法对大蒜中存在的病毒是否有影响, 通过茎尖脱毒培养获得的 124 份材料(根据 Vieira 等和 Taşkın 等^[5,26]的方法, NDMC 编号, SUB1669016203500), 使用传统的鳞茎繁殖方法在田间种植 5 代。第 5 代材料的样本采集和总 RNA 提取的方法同上。

1.2 多重 PCR 引物

Allexivirus、OYDV、LYSV 和 SLV 4 种病毒的检测采用 Hu 等^[22]的专利文献报道的引物组合(表 1)。GarCLV、PVY 和 GMBFV 3 种病毒中, GarCLV 和 PVY 病毒采用文献报道的引物^[21,27], GMBFV 病毒的检测引物根据 GenBank 获得的病毒序列用 Primer Premier 5.0 软件设计得到(表 2)。

表 1 四重 PCR 引物

Table 1 Primer sequences of quadruple PCR

Virus	Primer name	Sequence (5'→3')	Product size/bp
Allexivirus	Allexivirus-F	CCTGCTAAGCTATATGCTGA	180
	Allexivirus-R	GTAAGTTTAGCGATATCAAC	
OYDV	OYDV-F	TAATGGCACATTCAGTGATGC	265
	OYDV-R	TCCGTGTCCTCTCCGTTGT	
LYSV	LYSV-F	TGCAGAACTGAGCATGGGTA	404
	LYSV-R	GTAAGGTTGGTTGTGCGTGT	
SLV	SLV-F	GAGCGAAAGTAGATTCAACAAAC	592
	SLV-R	CCTTATCAGACCCTCAAGTGGT	

表 2 三重 PCR 引物

Table 2 Primer sequences of triple PCR

Virus	Primer name	Sequence (5'→3')	Product size/bp
GarCLV	GarCLV-F	AAATGTTAATCGCTAAACGACC	450
	GarCLV-R	CWRCCATTAAACGTAGCAGC	
PVY	PVY-F	GGCACATTTCTCAGATGTTGCA	272
	PVY-R	GTGGTGTGCCTCTCTGTGT	
GMBFV	GMBFV-F	GACCCTGTTGACCCAAGC	625
	GMBFV-R	GTGCGAGAATTCAGCATCT	

1.3 大蒜样品总 RNA 的提取和第一链 cDNA 的合成

大蒜材料叶片总 RNA 的提取采用 Trizol 法(天根公司, 按试剂生产商的说明书进行操作)。通过电泳检测 RNA 的质量和浓度, 然后将 RNA 样品用液氮速冻后保存于 -80°C 超低温冰箱, 或者直接使用试剂盒 FastKinggDNA Dispelling RT SuperMix (天根公司)合成第一链 cDNA。以 $50\text{ ng}-2\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 为模板, 按照试剂盒说明书进行操作, 获得的 cDNA 用于后续 PCR 实验或保存于 -20°C 冰箱。

1.4 单一 PCR 和多重 PCR

以上述合成的 cDNA 为模板, 用表 3 和表 4 中的引物分别进行单一 PCR 和多重 PCR 扩增。PCR 反应体系为: cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$ 、单独一对引物或多对引物混合物($4\text{ }\mu\text{mol/L}$) $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{PCR}$ 缓冲液 $2\text{ }\mu\text{L}$ 、dNTPs 混合物(2.5 mmol/L) $1.6\text{ }\mu\text{L}$ 、DNA 聚合酶($2.5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.4\text{ }\mu\text{L}$, 用灭菌蒸馏水补

至最终体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 循环参数为: 94°C 3 min ; 94°C 30 s , 50°C 30 s , 72°C 1 min , 40 个循环; 72°C 5 min 。PCR 产物($6\text{ }\mu\text{L}$)用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司)拍照。

1.5 大蒜材料的种植世代与病毒携带种类数的相关性分析

采用 SPSS 17.0 软件包的双变量协方差法对大蒜材料的种植世代数与病毒携带种类数进行相关分析, 显著水平(双侧检验)设定为 $P\leq 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 大蒜资源携带病毒情况的多重 RT-PCR 检测

四重 PCR 检测 Allexivirus、OYDV、LYSV 和 SLV 4 种病毒的引物组合已经被证实有效^[22]。为了检测三重 RT-PCR 引物对检测 GarCLV、PVY 和 GMBFV 3 种病毒的有效性, 首先分别

使用单独一对引物对随机挑取的大蒜样品 cDNA 进行 PCR, 然后用相同的大蒜样品进行三重 PCR 扩增, 结果发现单一 PCR 和三重 PCR 的扩增产物条带一致(图 1A), 克隆测序表明扩增片段确实为目标病毒的基因片段(GenBank 登录号: OL505403-OL505418)。这些结果表明, 这 2 套多重 PCR 引物可用于检测大蒜资源中的 7 种病毒。

分别用四重 PCR 引物组合(表 1)和三重 PCR 引物组合(表 2)检测大蒜资源的病毒携带情况。四重 PCR 扩增产物的电泳结果显示, 4 条清晰的条带分别对应于 Allexivirus (180 bp)、

OYDV(265 bp)、LYSV(404 bp)和 SLV(592 bp)的特异条带(图 1B)。三重 PCR 扩增产物的电泳结果显示, 3 条主带分别对应于 PVY(272 bp)、GarCLV(450 bp)和 GMBFV(625 bp)的特异产物(图 1C)。根据 2 组多重 PCR 的电泳图谱, 有条带的位置标记为“+”(表示含有相应的病毒), 没有条带的位置标记为“-”(表示不含该病毒)。用同样的方法对 689 份大蒜资源(NDMC 编号 SUB1669016203500)和 124 份茎尖脱毒培养的大蒜后代材料(NDMC 编号 SUB1669016203500)进行了检测和记录。

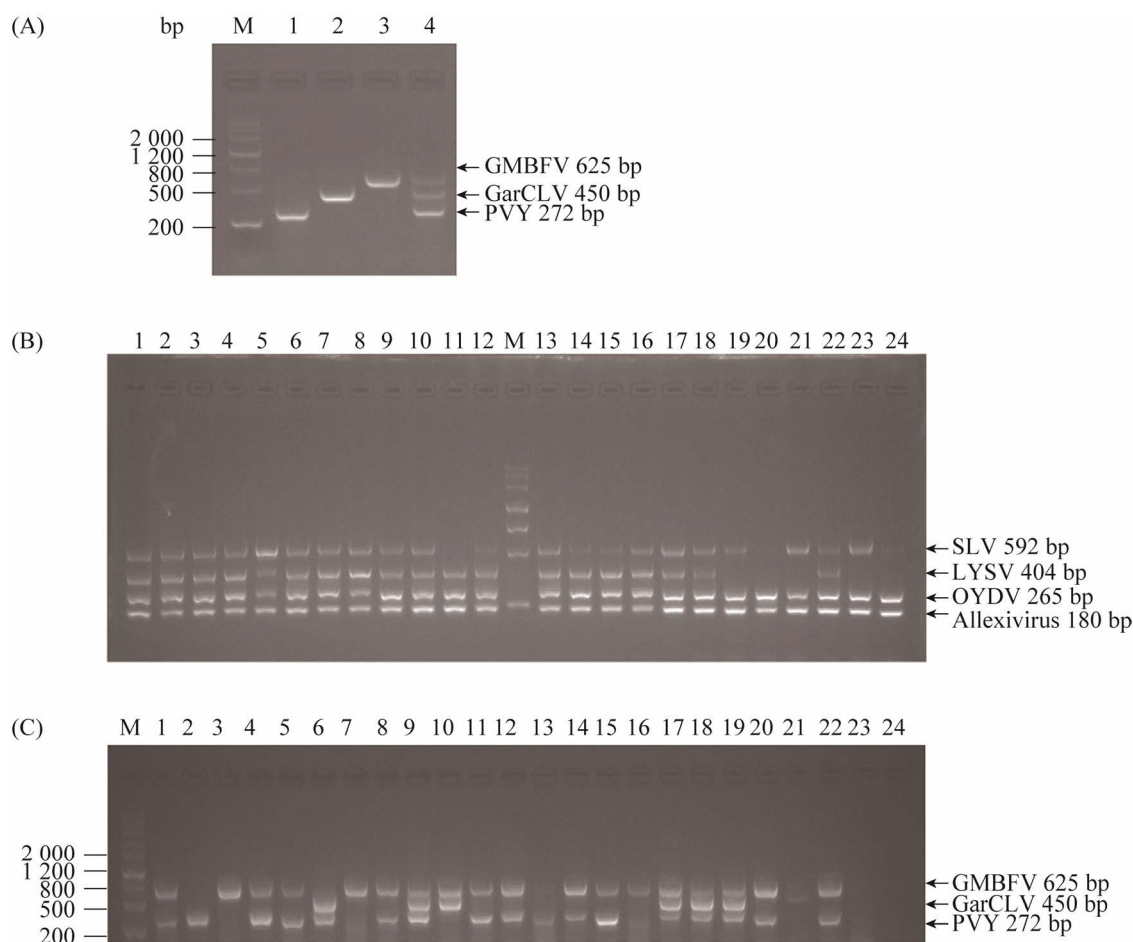


图 1 RT-PCR 检测大蒜种质资源的病毒

Figure 1 Virus detection of garlic germplasm resources by RT-PCR methods. A: single RT-PCR and triple RT-PCR products of Gar0125; B: quadruple RT-PCR electrophoretic patterns of target viruses in 24 garlic resources amplified with primers in table 1; C: triple RT-PCR electrophoretic patterns of target viruses in 24 garlic resources amplified with primers in table 2. M: DNA marker III, from the bottom to the top, the bands represent 200, 500, 800, 1 200, 2 000, 3 000, 4 500 bp, respectively.

2.2 大蒜资源的病毒携带和分布情况

对 689 份大蒜种质资源的病毒携带情况的分析表明, Allxivirus 病毒的携带率最高, 98.69%的资源含有该病毒; GarCLV 的携带率最低, 32.08%的资源含有该病毒; 其他病毒的携带率分别为 OYDV 90.13%、LYSV 50.65%、SLV 49.20%、PVY 41.94%和 GMBFV 71.12% (图 2A)。在 689 份材料中, 27 份(3.92%)携带 7 种病毒, 122 份(17.71%)携带 6 种病毒, 190 份(27.58%)携带 5 种病毒, 150 份(21.77%)携带 4 种病毒, 129 份(18.72%)携带 3 种病毒, 62 份(9.00%)携带 2 种病毒, 7 份(1.02%)携带 1 种病毒, 2 份(0.29%)不含病毒(图 2B)。

2.3 大蒜种质资源种植时间与携带病毒种类数的相关性

为探讨大蒜种质资源种植时间(NDMC 编号 SUB1669016203500, 2003–2020 年)与携带病毒种类数的关系, 我们进行了相关分析。结果表明, 大蒜种质资源种植时间与病毒种类数呈显著正相关(相关系数为 0.107, $P=0.013$)。

随着种植时间的增加, 大蒜资源中的病毒种类数也显著增加。

2.4 茎尖脱毒培养对大蒜资源携带病毒的影响

通过茎尖脱毒培养, 获得了无病害症状、发芽力强的 124 份大蒜材料(NDMC 编号 SUB1669016203500)。经田间种植一年后, 大多数材料仅含有 1–4 种病毒(图 3: 泳道 1–11 为茎尖脱毒后种植一年的材料, 泳道 12 为含有 7 种病毒的阳性对照大蒜材料)。在田间种植 5 年后, 脱毒培养材料的病毒种类(3.52 ± 0.98)仍显著低于保存在资源圃中的相应种质(4.34 ± 1.38) ($P<0.001$)。对 124 份脱毒培养大蒜后代的病毒携带率分析表明, 病毒携带率最高的是 Allxivirus (98.39%), 其次是 OYDV (87.90%) 和 GMBFV (84.68%), GarCLV (5.65%)和 PVY (6.45%)的携带率最低(图 4A)。在 124 份材料中, 只有 1 份材料(0.81%)携带 6 种病毒, 16 份材料(12.9%)含有 5 种病毒(图 4B), 表明茎尖脱毒培养是获得较少病毒大蒜幼苗的有效方法。

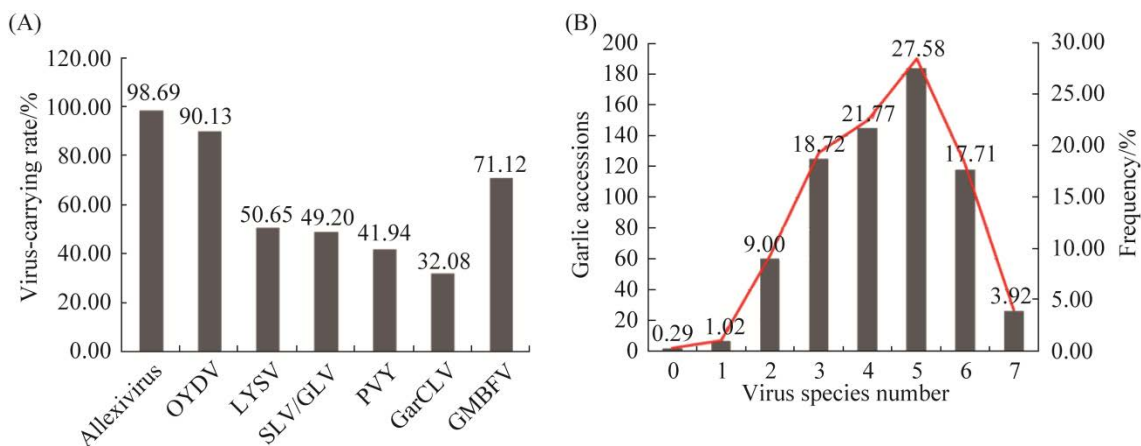


图 2 689 份大蒜资源的病毒携带率(A)和病毒种类的分布情况(B)

Figure 2 The virus carrying rates of 689 garlic germplasm resources (A) and the distribution of virus species in different garlic germplasm resources (B).

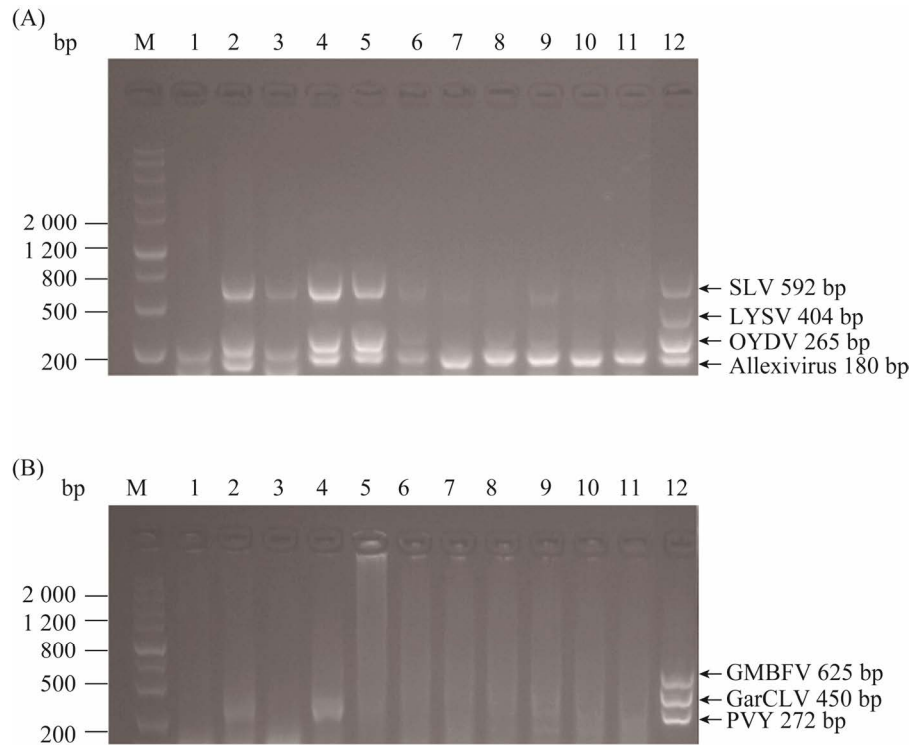


图 3 茎尖脱毒培养的大蒜材料种植 1 年携带病毒情况的 RT-PCR 检测

Figure 3 The virus carrying status of garlic samples planted for one year after virus-free culture by multiples RT-PCR detection. A: quadruple RT-PCR products; B: triple RT-PCR products. Lane 1–11: the offspring of garlic stem tip virus-free culture material planted for one year, they are T141, JX, T167, Gar0141a, Gar0141b, T141-0, T141-40, JX-0, JX-40, T167-0, T167-40, respectively. Lane 12: Gar0125, positive control. M: DNA marker III, from the bottom to the top, the bands represent 200, 500, 800, 1 200, 2 000, 3 000, 4 500 bp, respectively.

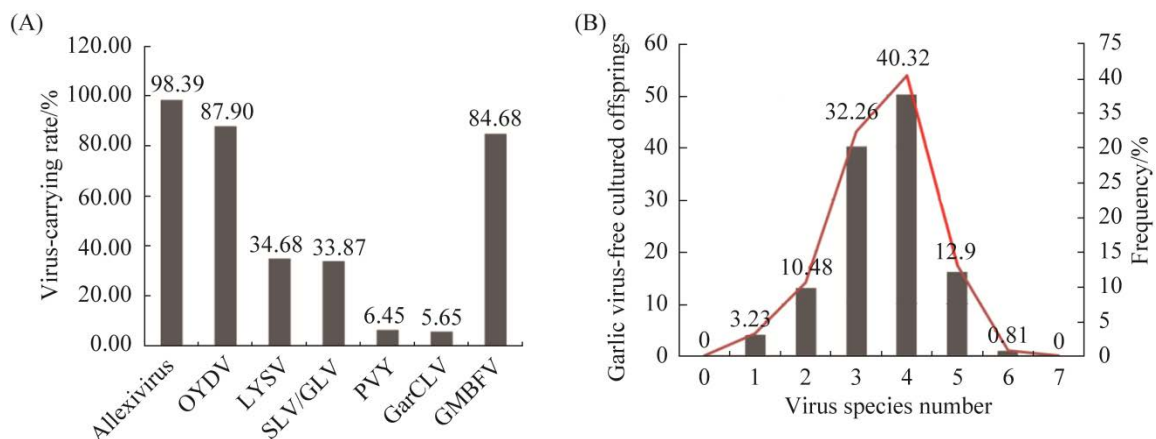


图 4 124 份茎尖脱毒培养大蒜材料的病毒携带率(A)及病毒分布情况(B)

Figure 4 The virus carrying rates of 124 virus-free cultured garlic offspring (A) and the distribution of virus species in the garlic offspring (B).

3 讨论与结论

植物的繁殖方式一般分 2 种, 即有性繁殖和无性繁殖。如果母株本身携带病毒, 当通过营养器官或组织培养繁殖时, 病毒会传给后代^[5]。大蒜是一种无性繁殖作物, 大蒜鳞茎在生产中通常被用作无性繁殖器官, 因此, 通过一年又一年的无性繁殖, 病毒会随着种植世代的增加而积累越来越多, 从而导致病毒在大蒜植株中感染和积累。这是大蒜生产和种质保持中的一个重要问题^[28-29]。已有的研究表明, 田间种植的大蒜通常感染 2 种或 2 种以上的病毒(混合感染)^[6-11,30]。血清学方法, 如酶联免疫印迹试验(ELISA)、直接组织免疫印迹试验和斑点 ELISA, 通常用于大蒜相关病毒的检测, 但并非所有病毒的抗体都可用^[15,19-20,31]。与 ELISA 等血清学检测方法相比, RT-PCR 的灵敏度高出许多倍, 且获得结果的速度更快^[32-34]。本研究应用多重 RT-PCR 方法检测了国家无性繁殖及多年生蔬菜资源圃中保存的 689 份大蒜资源的病毒携带情况。结果显示, 近半数的材料携带 4-5 种病毒, 21.63% 的材料携带 6-7 种病毒。约 98.69% 和 90.13% 的大蒜资源中分别含有 Allxivirus 和 OYDV 病毒。类似地, Majumder 等也发现, 在来自印度不同地区的所有 21 份受试大蒜材料中都观察到了 OYDV 和 Allxivirus 病毒, 而使用多重 RT-PCR 方法仅在少数材料中检测到 SLV 和 GarCLV^[9]。此外, 随着保存时间的增加, 病毒的种类数也越来越多。这些研究结果表明, 大蒜种质在资源圃中的保存受到病毒病的严重威胁。

在生产实践中, 无病毒大蒜可以通过以下途径获得: 大蒜茎尖脱毒培养、使用抗病毒药物、大蒜种子繁殖、培育抗病毒大蒜品种等。大蒜茎尖培养是生产大蒜脱毒苗的有效方

法^[5,26-28,35-36]。但这种方法存在 2 个主要问题, 一是生产成本相对较高; 其次, 技术要求高, 不易实施。为了减少病毒病对大蒜生产和种质资源保护的影响, 采用茎尖脱毒培养与传统无性繁殖相结合的方法是比较理想的。本研究表明每 5 年通过茎尖脱毒培养生产大蒜可以显著降低大蒜繁殖材料中的病毒载量。Conci 等也发现, 无病毒大蒜植株在田间种植时会很快被病毒感染, 在种植的第 1 年到第 5 年中, 前 3 年产量会逐渐下降, 随后, 在第 4 年和第 5 年产量保持相对稳定, 但仍高于未经脱毒培养的大蒜的产量^[15]。表明每隔 5 年进行茎尖脱毒培养来保存大蒜是合适的。这些措施还可以通过在防虫网内繁殖大蒜鳞茎来辅助。虽然使用抗病毒药物可以抑制大蒜病毒, 但其对环境和人类的安全性尚不清楚。此外, 这些药物比较昂贵, 大多数农民不易买到。种子繁殖, 即指有性生殖, 是通过雌雄性生殖细胞的结合形成种子, 在这个过程中, 母体细胞中的病毒一般不传给生殖细胞。但是, 由于大蒜在进化过程中失去了有性生殖能力, 因此, 短时间内很难获得理想的大蒜种子^[37]。所以, 生产无病毒大蒜材料的最有效途径是培育抗病品种。本研究从 689 份大蒜种质资源中鉴定得到 7 份含 1 种病毒和 2 份无病毒的大蒜材料, 可直接用于生产上培育大蒜抗病毒品种或作为研究材料, 用于研究大蒜抗病机理、挖掘抗病基因, 从而有效解决大蒜的病毒病问题。这些还需要进一步的深入研究。

参考文献

- [1] Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1112(1/2): 3-22.
- [2] Fritsch RM, Friesen N. Evolution, domestication and taxonomy. *Allium crop science: recent advances*. UK: CABI Publishing, 2002, 5-30.

- [3] 杨宾宾, 宗义湘, 赵邦宏. 中国大蒜生产布局及贸易格局分析. *农业展望*, 2019, 15(11): 117–122.
Yang BB, Zong YX, Zhao BH. Garlic production layout and its trade patterns in China. *Agricultural Outlook*, 2019, 15(11): 117–122. (in Chinese)
- [4] 阳文龙, 李锡香. 我国蔬菜种质资源工作 70 年回顾与展望. *蔬菜*, 2019(12): 1–9.
Yang WL, Li XX. 70 years' review and prospect of vegetable germplasm resources in China. *Vegetables*, 2019(12): 1–9. (in Chinese)
- [5] Vieira RL, Silva AL, Zaffari GR, Steinmacher DA, Freitas Fraga HP, Guerra MP. Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 37(1): 1–11.
- [6] Takaichi M, Yamamoto M, Nagakubo T, Oeda K. Four garlic viruses identified by reverse transcription-polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan. *Plant Disease*, 1998, 82(6): 694–698.
- [7] 徐培文, 刘宪华, 曲士松, 高主太, 杨崇良, 尚佑芬, 赵玖华, 刘恒英. 中国主要大蒜品种和品系的病毒检测. *山东农业科学*, 2000, 32(2): 27–28.
Xu PW, Liu XH, Qu SS, Gao ZT, Yang CL, Shang YF, Zhao JH, Liu HY. Virus detection of main garlic varieties and strains in China. *Shandong Agricultural Sciences*, 2000, 32(2): 27–28. (in Chinese)
- [8] Abraham AD, Kidanemariam DB, Holton TA. Molecular identification, incidence and phylogenetic analysis of seven viruses infecting garlic in Ethiopia. *European Journal of Plant Pathology*, 2019, 155(1): 181–191.
- [9] Majumder S, Baranwal VK. Simultaneous detection of four garlic viruses by multiplex reverse transcription PCR and their distribution in Indian garlic accessions. *Journal of Virological Methods*, 2014, 202: 34–38.
- [10] Mansouri F, Krahulec F, Duchoslav M, Ryšánek P. Newly identified host range of viruses infecting species of the genus *Allium* and their distribution in six habitats in the Czech Republic. *Plant Pathology*, 2021, 70: 1496–1507.
- [11] Majumder S, Johari S. First report of onion yellow dwarf virus and garlic common latent virus infection in garlic from Nepal. *Journal of Plant Pathology*, 2014, 96(4): 4–117.
- [12] Majumder S, Yadav V, Yakasai MA, Muhammad JY. First report of onion yellow dwarf virus in garlic from Nigeria. *Journal of Plant Pathology*, 2017, 99 (1): 299.
- [13] Majumder S, Yadav V, Yakasai MA, Muhammad JY. First report of garlic common latent virus in garlic from Nigeria. *Journal of Plant Pathology*, 2016, 98(3): 684.
- [14] Taglienti A, Tiberini A, Manglli A, Rea R, Paoletti S, Taviani P, Tomassoli L. Molecular identification of Allieviruses in a complex mixture of garlic viruses in Latium (central Italy). *European Journal of Plant Pathology*, 2018, 150(3): 797–801.
- [15] Conci VC, Canavelli A, Lunello P, Di Rienzo J, Nome SF, Zumelzu G, Italia R. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Disease*, 2003, 87(12): 1411–1415.
- [16] Lot H, Chovelon V, Souche S, Delecalle B. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Disease*, 1998, 82(12): 1381–1385.
- [17] Nam M, Lee YH, Park CY, Lee MA, Bae YS, Lim S, Lee JH, Moon JS, Lee SH. Development of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of garlic viruses and the incidence of garlic viral disease in garlic genetic resources. *Plant Pathology Journal*, 2015, 31(1): 90–96.
- [18] Pallás V, Sánchez-Navarro JA, James D. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2087.
- [19] Tsuneyoshi T. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. *Phytopathology*, 1996, 86(3): 253–259.
- [20] Takaichi M, Nagakubo T, Oeda K. Mixed virus infections of garlic determined by a multivalent polyclonal antiserum and virus effects on disease symptoms. *Plant Disease*, 2001, 85(1): 71–75.
- [21] Kim J, Cha DJ, Kwon M, Maharjan R. Potato virus Y (PVY) detection in a single aphid by one-step RT-PCR with boiling technique. *Entomological Research*, 2016, 46(4): 278–285.
- [22] Hu X, Xiong X, Lei Y, Wang P, He C, Song Y, Tang L. A quadruple RT-PCR method and primer combination for simultaneous detection of garlic viruses. ZL201410092027.8.
- [23] 孙新艳, 史亚娟, 王振跃, 燕照玲, 孙虎, 施艳. 河南省大蒜病毒病的分子检测. *河南农业科学*, 2016, 45(3): 102–105.
Sun XY, Shi YJ, Wang ZY, Yan ZL, Sun H, Shi Y. Molecular detection of garlic virus disease in Henan province. *Journal of Henan Agricultural Sciences*,

- 2016, 45(3): 102–105. (in Chinese)
- [24] 王采炜, 孙浩. 大蒜病毒的快速检测. 淮北师范大学学报: 自然科学版, 2013, 34(1): 41–45.
Wang CW, Sun H. A rapid detection for the viruses in garlic. *Journal of Huaibei Normal University: Natural Science Edition*, 2013, 34(1): 41–45. (in Chinese)
- [25] 许蕊, 栗孟飞, 王雅琳, 李唯. 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. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(2): 46–49, 54.
Xu R, Li MF, Wang YL, Li W. Detection of garlic latent virus and onion yellow dwarf virus in ‘Chengxianchisuan’ of Gansu by multiplex RT-PCR. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2013, 48(2): 46–49, 54. (in Chinese)
- [26] Taşkın H, Baktemur G, Kurul M, Büyükalaca S. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 781282.
- [27] 张威, 张匀华, 李学湛, 高艳玲, 白艳菊. 应用 RT-PCR 分子检测技术快速检测大蒜普通潜隐病毒. 植物保护, 2008, 34(1): 133–137.
Zhang W, Zhang YH, Li XZ, Gao YL, Bai YJ. Rapid detection of garlic common latent virus by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Protection*, 2008, 34(1): 133–137. (in Chinese)
- [28] Kereša S, Kurtović K, Ban SG, Vončina D, Jerčić IH, Bolarić S, Lazarević B, Godena S, Ban D, Mihovilović AB. Production of virus-free garlic plants through somatic embryogenesis. *Agronomy*, 2021, 11: 876.
- [29] Pramesh D, Baranwal VK. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) through meristem tip culture after solar or hot air treatment of cloves. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2015, 90(2): 180–186.
- [30] Conci VC, Canavelli AE, Balzarini MG. The distribution of garlic viruses in leaves and bulbs during the first year of infection. *Journal of Phytopathology*, 2010, 158(3): 186–193.
- [31] MeloFilho P, De A, Nagata T, Dusi AN, Buso JA, Torres AC, Eiras M, Resende R, De O. Detection of three Alexivirus species infecting garlic in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 2004, 39: 735–740.
- [32] Dovas CI, Hatzibukas E, Salomon R, Barg E, Shibolet Y, Katis NI. Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp.. *Journal of Phytopathology*, 2001, 149: 731–737.
- [33] Shibolet Y, Gal-On A, Koch M, Rabinowitch HD, Salomon R. Molecular characterisation of onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. *Annals of Applied Biology*, 2001, 138: 187–195.
- [34] Du Z, Chen J, Hiruki C. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Disease*, 2006, 90(2): 185–189.
- [35] Deng TC, Ning FY, Chen CT, Chou CM. Detection of viruses infecting *Allium* and cultivation of healthy seedlings of Welsh onion. *Plant Protection Bulletin*, 2014, 56(3): 75–88.
- [36] Wu H, Qu X, Dong Z, Luo L, Shao C, Forner J, Lohmann JU, Su M, Xu M, Liu X, Zhu L, Zeng J, Liu S, Tian Z, Zhao Z. WUSCHEL triggers innate antiviral immunity in plant stem cells. *Science*, 2020, 370(6513): 227–231.
- [37] 刘冰江, 张海燕, 孔素萍, 徐培文. 大蒜有性生殖研究进展. 中国蔬菜, 2008(8): 41–44.
Liu BJ, Zhang HY, Kong SP, Xu PW. Research progress on sexual reproduction of garlic. *China Vegetables*, 2008(8): 41–44. (in Chinese)