

无毒藏红花组培芽的获取及其病毒检测^①

陈书安^{②**} 陈文浩^{*} 王晓东^{*} 赵兵^{③*} 王玉春^{*}

(*中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

(**科技部中国生物技术发展中心 北京 100081)

摘要 为解决病毒感染藏红花问题和获得无毒种质资源,在球茎诱导愈伤组织以及愈伤组织再分化成苗的过程中进行了脱毒处理,并首次采用间接 ELISA 和 RT-PCR 方法检测了国内外报道的侵染藏红花的芜菁花叶病毒(TuMV)、鸢尾花叶病毒(IMV)、菜豆黄花叶病毒(ByMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草脆裂病毒(TRV)。结果表明:在藏红花愈伤组织和再分化芽中未发现国内外报道的侵染藏红花的病毒 TuMV、TRV、CMV 和 potyvirus,获得了无毒藏红花种质资源。

关键词 藏红花,脱毒,愈伤组织

0 引言

藏红花(*Crocus sativus* L.)作为传统妇科良药在欧洲和亚洲已广泛应用,又可用于功能性食品和保健性化妆品的开发。研究发现,藏红花柱头中藏红花素等活性成分具有良好的抗癌作用,能够从分子水平上抑制肿瘤的形成,有望成为 21 世纪最理想的抗癌药物之一^[1,2]。但藏红花只是柱头入药,产量极低,又因其资源有限,致使其价格昂贵,被誉为“植物黄金”^[3]。我国藏红花的栽培品种主要来自于德国和日本^[4],在田间种植 2~3 年后均严重退化,叶片出现黄色条斑,整株矮化、黄化,顶端枯死,提前倒苗,球茎畸小,柱头产量大大降低。国内外报道其病源为芜菁花叶病毒(turnip mosaic virus, TuMV)、鸢尾花叶病毒(iris mosaic virus, IMV)、菜豆黄花叶病毒(bean yellow mosaic virus, ByMV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)及烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)^[4,6],其中 TuMV、IMV 和 ByMV 属于马铃薯 Y 病毒(potyvirus)。经田间调查和病毒学鉴定,导致中国藏红花品质衰退、产量递减的植物病源是 TuMV^[4,7],这种病毒对藏红花的危害巨大,发生面积大,田间发病率为 70%~97%。通过组培快繁无毒种苗是解决藏红花资源短缺的有效途径,但关于采用藏红花组培脱毒方面的研究还未见到报

道。本研究在愈伤组织再分化成苗的过程中对藏红花材料进行了脱毒处理,并首次通过间接酶联免疫检测(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测了国内外报道的 TuMV、IMV、ByMV、CMV 和 TRV 等 5 种藏红花病毒,旨在获得无毒藏红花种苗,为抗病毒的品种的选育和组培快繁提供无毒种质资源。

1 材料和方法

1.1 材料

藏红花球茎取材于浙江省建德市三都镇藏红花种植基地^[8]。

1.2 藏红花组织及其分化芽的获得

(1)藏红花组织的诱导:选取无病斑的藏红花球茎,去掉皮膜,蒸馏水冲洗,加入 70% 酒精和 2% 活性氯的次氯酸钠消毒后用于愈伤组织的诱导,方法参见文献^[8]。

(2)愈伤组织分化成芽:将愈伤组织接种在添加 0.25mg/L 萘乙酸(2,4-D)和 2.0 mg/L 6-苄基腺嘌呤(6-BA)的 MS 固体培养基上,在(21±0.3)℃下全时暗培养 21d 后,将其转接在添加 0.25mg/L 2,4-D、2 mg/L 6-BA 和 200 mg/L 水解酪蛋白(casein hydrolysate, CH)的 1/2 MS 固体培养基上,在光照强度 31.74 μmol/m²s 下每天光照 10h,暗处理 14h,(21±

① 863 计划(2002AA241121)资助项目。

② 男,1973 年生,博士;研究方向:生物技术在中药现代化和天然药物中的应用。

③ 联系人,E-mail:bzhao@home.ipe.ac.cn
(收稿日期:2006-02-20)

0.3)℃培养可分化芽。

1.3 藏红花愈伤组织和藏红花芽的脱毒方法

(1)分化芽的高温处理:将由愈伤组织获得的分化芽接种在添加 0.25mg/L 2,4-D、2 mg/L 6-BA 和 200 mg/L CH 的 MS 芽分化培养基上,在光照强度 31.74 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 下,每天光照 10h,暗处理 14h, (35 $\pm$ 1)℃培养 25d 后,可用于愈伤组织的诱导。

(2)以分化芽为外植体再次诱导愈伤组织:方法同 1.2(1)。

(3)愈伤组织的高温处理:将诱导出的愈伤组织接种于添加 0.5mg/L NAA 和 0.25mg/L 6-BA 的芽愈伤组织培养基上,在(35 $\pm$ 1)℃下全时暗培养 40d 用于芽的再次诱导。

(4)芽的再次诱导:方法同 1.2。

1.4 酶联免疫检测(ELISA)

Potyvirus 和 TuMV 的抗血清由中国农业大学植物病理学系提供,间接 ELISA 检测方法参见文献[9]。

1.5 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测

(1)主要试剂:Trizol 试剂(Sangon),焦磷酸二乙酯(DEPC)处理的蒸馏水,反转录酶 XL (AMV)与 5 $\times$ 反转录缓冲液(TaKaRa),Taq(5w/ μL)DNA 连接酶与 10 $\times$ Taq 缓冲液(购于 TaKaRa 公司),dNTP (2-Deoxynucleoside 5-Triphosphate, 10 mM each)(鼎国公司),RNA 酶抑制剂(Promega)。

(2)样品中总 RNA 的提取:取 0.2 g 藏红花愈伤组织或 0.2 g 再分化芽,剪成小段,加入液氮研磨成粉末状,移入灭菌的 1.5mL 离心管中,然后加入 1mL 的 Trizol,剧烈振荡、摇匀。4℃,12000 g 离心 10 min,将上清液转入一新的 1.5mL 离心管中。室温下保持 5min,加 0.2mL 氯仿,剧烈振荡 15s,然后在室温下保持 2~3 min 后,4℃下 12000g 离心 15 min。将上层水相转移到新的 1.5mL 离心管中,加 0.5mL 异丙醇,颠倒混匀,室温下保持 15 min。4℃下 12000 g 离心 10 min,RNA 就会在管的侧壁和底部形成沉淀。倒掉上清液,加入 75%的乙醇洗涤沉淀,然后 4℃下 7500 g 离心 5 min(如沉淀悬浮起来,则用 12000 g),弃去乙醇。沉淀于室温下充分干燥后,溶于经过 DEPC 处理的 30 μL dH₂O 中,-20℃冰箱保存备用。

(3)PCR 引物设计:CMV 和 potyvirus 引物采用文献[10-13]的方法设计,见表 1。

表 1 为检测 CMV^[10-11]和 potyvirus^[12-13]所用的 PCR 扩增引物

病毒	引物名称	引物序列
CMV	上游引物	5' ATG GAC AAA TCT GAA TCA CCC'
	下游引物	5' TAA GCT GGA TGG ACA ACC CGT3'
Potyvirus	上游引物	5' GG (AGCT) AA (CT) AG (CT) AG (CT) GG (AGCT) CA (AG) CC3'
	下游引物	5' CAG GAT CCA AGC TTT TTT TTT TTT TTT TTT3'

TuMV 和 TRV 的引物设计分别根据已经发表的 TuMV cDNA 序列^[14-23]和 TRV cDNA (complementary DNA)序列^[14-35]而设计的,引物序列见表 2。

表 2 为检测 TuMV^[14-23]和 TRV^[24-35]所设计的 PCR 引物

病毒	引物名称	引物序列	对应的氨基酸	氨基酸位置
TuMV	上游引物	5' GTG GCT TTA AAC CTC GAT CA3'	VALNLDH	85-91
	下游引物	5' ACC CCA AGT AAG TTA TGC AT3'	MHNLLGV	277-283
TRV	上游引物	5' GCT ATG AAA TTT GCG TTA CA3'	AMKFALQ	38-45
	下游引物	5' TTA TGA TAC GCA GTA GAA GC3'	ASTAYHK	153-161

TuMV 和 TRV 引物设计所用病毒株系的同源性分别见其下面的同源性矩阵。

TuMV 引物设计所用病毒株系的同源性矩阵^[14,23]

TuMV7-浙江	100%
TuMV9-台湾	97.9% 100%
TuMV12-山东	99.0% 97.6% 100%
TuMV14-以色列	93.4% 94.8% 93.1% 100%
TuMV1-日本	94.8% 95.8% 95.1% 95.1% 100%
TuMV2-爱尔兰	95.3% 96.6% 95.3% 98.3% 97.5% 100%
TuMV3-韩国	97.2% 96.5% 96.9% 93.8% 95.5% 94.9% 100%
TuMV5-台湾	99.3% 98.6% 99.0% 94.1% 95.5% 95.8% 97.9% 100%
TuMV6-韩国	98.3% 97.6% 97.9% 94.4% 95.8% 96.2% 98.3% 99.0% 100%
TuMV10-西班牙	94.4% 95.1% 94.1% 98.3% 95.8% 98.7% 94.8% 95.1% 95.5% 100%

TRV 引物设计所用病毒株系的同源性矩阵^[24,36]

TRV2-韩国	100%
TRV10-苏格兰	44.3% 100%
TRV-英国	44.3% 67.3% 100%
TRV12-荷兰	45.1% 35.3% 34.9% 100%
TRV13-荷兰	45.6% 36.4% 37.6% 88.7% 100%
TRV1-美国	100.0% 44.3% 44.3% 45.1% 45.6% 100%
TRV3-FL0989	44.8% 35.6% 34.7% 98.1% 87.7% 44.8% 100%
TRV4-TUM	49.2% 68.8% 81.3% 37.0% 37.8% 49.2% 36.2% 100%
TRV6-德国	44.7% 36.1% 36.2% 94.6% 91.9% 44.7% 93.6% 36.1% 100%
TRV8-德国	44.3% 98.0% 67.9% 35.8% 36.4% 44.3% 35.1% 69.8% 36.1% 100%
TRV9-德国	45.4% 66.8% 94.8% 35.4% 37.0% 45.4% 35.3% 81.3% 36.2% 67.3% 100%
TRV11-德国	44.3% 67.3% 94.8% 35.4% 37.6% 44.3% 35.3% 82.8% 36.8% 67.3% 93.3% 100%

(4)反转录(RT):反转录以植物总 RNA 为模板,用表 3 中的引物进行反转录合成 cDNA,其反应体系为:3.0 μL RNA、2.0 μL 5 $\times$ RT 缓冲液、1.0 μL dNTP

(10 mM each)、0.5 μL RNA 酶抑制剂(40 U/ μL)、0.5 μL 反转录酶 XL(AMV)(5U/ μL)、0.5 μL 引物和 2.5 μL dH₂O。混合均匀后,室温放置 10min,45℃水浴 1 h。

表 3 反转录所用的引物

病毒	引物名称	引物序列	文献
TuMV	上游引物	5'ACG CCA AGT	10-11
		AAG TTA TGC AT3'	
TRV	下游引物	5'TTA TGA TAC	12-13
		GCA GTA GAA GC3'	
CMV	上游引物	5'TAA GCT GGA	14-23
		TGG ACA ACC CGT3'	
Potyvirus	下游引物	5'CAG GAT CCA AGC	24-35
		TIT TTT TTT TTT TTT TTT3'	

(5)聚合酶链式反应:聚合酶链式反应以反转录产物为模板,用表 3 中的引物,进行聚合酶链式反应,其反应体系如下。聚合酶链式反应的体系为 2.0 μL 反转录产物、2.5 μL 10 × Taq 缓冲液、1.0 μL dNTP (10 mM each)、0.5 μL Taq DNA 聚合酶、0.5 μL 上游引物、0.5 μL 下游引物和 18 μL dH₂O,其反应条件见表 4。

表 4 PCR 扩增的条件

病毒	扩增条件
TuMV	94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 48℃ 30 s, 72℃ 1 min, 3 个循环; 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 1 个循环; 4℃ 保温
	94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 48℃ 30 s, 72℃ 1 min, 3 个循环; 94℃ 30 s, 49℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 1 个循环; 4℃ 保温
TRV	94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 48℃ 30 s, 72℃ 1 min, 3 个循环; 94℃ 30 s, 49℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 1 个循环; 4℃ 保温
	94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 3 个循环; 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 1 个循环; 4℃ 保温
CMV	94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 3 个循环; 94℃ 30 s, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 1 个循环; 4℃ 保温
	94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 3 个循环; 94℃ 30 s, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 1 个循环; 4℃ 保温

按照上述条件进行 PCR 扩增,若材料中有 TuMV、potyvirus、CMV 和 TRV,则会扩增出 TuMV、potyvirus、CMV 和 TRV 的特异性片段(其大小见表 5)。

表 5 特异性扩增片段的长度

病毒	Potyvirus	TuMV	CMV	TRV
理想片段长度	1.7 kb	0.6 kb	0.75 kb	0.45 kb

(6)电泳及凝胶成像:将聚合酶链式反应产物置于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,其反应体系为:4.5 μL 标物,2.0 μL 10 × loading buffer,7.0 μL PCR products,80V 电压。电泳结束后将凝胶于 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溴化乙锭中染色 15 ~ 20 min,于 Alpha 凝胶成像仪中观察并记录结果。

2 结果与分析

2.1 藏红花组织及其分化芽的获得

以出芽后芽周围 2cm 左右的球茎为外植体,MS 为培养基,2.0mg/L 2,4-D 和 0.25 mg/L 6-BA 为激素,在(21 ± 0.3)℃及黑暗环境下培养,14d 后可获得淡黄色的愈伤组织,将该愈伤组织接种在添加 0.25mg/L 2,4-D、2.0 mg/L 6-BA 和 200 mg/L CH 的 MS 固体培养基上,21℃全时暗培养 45d 后,挑取白色,质地坚硬,半透明状的愈伤组织转接到新的培养基上继续培养,45d 可分化芽。

2.2 经高温脱毒藏红花愈伤组织和分化芽的获得

分化芽的高温处理、分化芽诱导愈伤组织及其经高温处理愈伤组织的再分化过程见方法 1.3(1)-(3)。以高温处理的分化芽为外植体,经诱导 25d 后可获得愈伤组织,该愈伤组织经过高温处理可获得高温脱毒的藏红花愈伤组织;以高温脱毒的藏红花愈伤组织为材料,经过分化培养 50d 后可获得高温脱毒的藏红花分化芽。

2.3 经高温脱毒藏红花愈伤组织和分化芽的 Potyvirus 和 TuMV 的 ELISA 检测

采用 ELISA 方法检测经高温脱毒藏红花愈伤组织和再分化芽,其 potyvirus 和 TuMV 病毒检测结果分别见表 6 和表 7。

表 6 采用 ELISA 检测藏红花愈伤组织和再分化芽中的 potyvirus

样品	光密度 ($\lambda = 405\text{nm}$)	L/H	颜色
缓冲液	0.064;0.064	-	-
无病毒样品	0.076;0.067	-	-
藏红花愈伤组织	0.068;0.071	0.73	-
藏红花分化芽	0.065;0.075	0.8	-

表 7 采用 ELISA 检测藏红花愈伤组织和再分化芽中的 TuMV

样品	光密度 ($\lambda = 405\text{nm}$)	I/H	颜色
缓冲液	0.047;0.054	-	-
无病毒样品	0.056;0.061	-	-
藏红花愈伤组织	0.048;0.044	<0	-
藏红花分化芽	0.044;0.055	<0	-

注: I/H = (样品的平均 OD 值 - 空白对照的 OD 值) / (健康对照的平均 OD 值 - 空白对照平均 OD 值), “-”表示没有颜色

表 6 和表 7 表明,以 potyvirus 和 TuMV 的抗血清为抗体,藏红花愈伤组织和再分化芽的抗原制备液经过间接 ELISA 反应后,没有出现可见的颜色反应,其 OD 值与空白对照或健康样品的相比,数值十分相近,均小于 0.1,没有明显的差异,这表明在愈伤组织和再分化芽中没有检测到 potyvirus、TuMV。再从 I/H 来分析,藏红花愈伤组织和再分化芽的抗原制备液经过间接 ELISA 反应后,其 I/H 值均小于 0,这也说明在愈伤组织和再分化芽中没有检测到 potyvirus、TuMV。

总之,经过间接 ELISA 检测,在藏红花愈伤组织和再分化芽中没有发现包括 TuMV 的马铃薯 Y 病毒属的植物病毒。

2.4 经高温脱毒愈伤组织和分化芽的 TuMV、potyvirus、CMV 和 TRV 的 PCR 检测

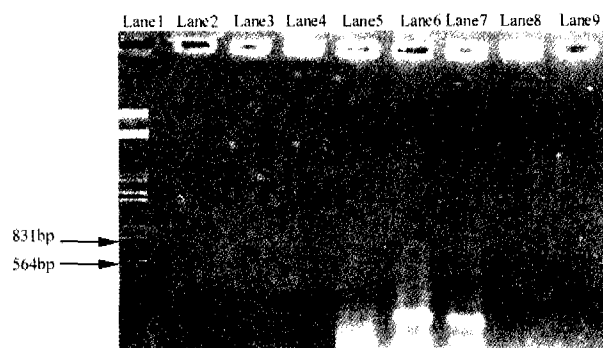
采用 PCR 方法检测经高温脱毒藏红花愈伤组织和再分化芽,其结果见图 1。

由图 1 中的泳道 2、3、4、5、8、9 可见,以 TuMV、potyvirus 和 TRV 设计的特异性引物为引物,以藏红花愈伤组织和再分化芽中总 RNA 的反转录产物为模板,经过 PCR 扩增后,没有扩增出 DNA 片段,这表明经过 RT-PCR 检测,在愈伤组织和再分化芽中没有发现 TuMV、Potyvirus 和 TRV。

从图 1 中的泳道 6 和泳道 7 亦可见,以 CMV 设计的引物为引物,以愈伤组织和再分化芽中总 RNA 的反转录产物为模板,经过 RT-PCR 扩增后,扩增出了一 200kb 左右的 DNA 片段,但 CMV 的特异性片段在 0.75 kb 左右,因此这一 DNA 片段不是 CMV 的特异性片段。这也表明经过 RT-PCR 检测,在愈伤组织和分化芽中没有发现 CMV。

总之,以 TuMV、potyvirus、CMV 和 TRV 设计的特异性引物为引物,分别以愈伤组织和再分化芽中总 RNA 的反转录产物为模板,经 PCR 扩增后,在电泳图中没有出现 TuMV、potyvirus、CMV 和 TRV 的特

异性片段(它们的大小分别为 1.7 kb、0.6 kb、0.75 kb 和 0.45 kb),这说明在愈伤组织和再分化芽中没有发现 TuMV、CMV 和 TRV 这三类植物病毒以及马铃薯 Y 病毒属的植物病毒(potyvirus)。



泳道 1: Marker (λ DNA/EcoRI + HindIII);泳道 2: 愈伤组织的 TuMV PCR 产物;泳道 3: 芽的 TuMV PCR 产物;泳道 4: 愈伤组织的 potyvirus PCR 产物;泳道 5: 芽的 potyvirus PCR 产物;泳道 6: 愈伤组织的 CMV PCR 产物;泳道 7: 芽的 CMV PCR 产物;泳道 8: 愈伤组织的 TRV PCR 产物;泳道 9: 芽的 TRV PCR 产物

图 1 藏红花愈伤组织和再分化芽的 PCR 扩增片段电泳图

3 结论

在藏红花愈伤组织再分化成苗的过程中进行脱毒处理,经间接 ELISA 和 RT-PCR 方法检测,在藏红花愈伤组织和再分化芽中没发现国内外报道的侵染藏红花的病毒 TuMV、TRV、CMV 和 potyvirus,获得了藏红花的无毒组培材料。

藏红花植物病毒的危害巨大。藏红花花叶病的防治主要方法有:轮作、使用化学诱抗剂、减少病毒的传播途径、组织培养脱病毒和选用抗病品种^[7],但最终防治需要获得无毒的种质资源。本研究获得无毒藏红花组培材料可为抗病毒的品种的选育、藏红花的组培快繁提供无毒种质资源,从而为解决藏红花资源短缺问题奠定了材料基础。

致谢:中国农业大学植物病理系的李怀方教授、范在丰博士、郭学水硕士、邓同良博士在藏红花病毒检测方面给予的诸多指导,并提供了良好的实验条件,在此表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Escribano J, Alonso G L. Crocin and crocetin microcrocin from saffron inhibit the growth of human cancer cell *in vitro*. *J Cancer Letter*, 1996, 100 (12): 1913-1918
- [2] Wang C J, Cheng T C. Inhibition of protein kinase C and

- protonogene expression of crocetin in NIH/3T3 cell. *Molecular Carcinogenesis*, 1996, 17 (4):235-240
- [3] 陈书安, 王晓东, 赵兵等. 藏红花的研究进展. 中草药, 2001, 32(12):1137-1139
- [4] 陈集双, 李德葆. 侵染番红花的芜菁花叶病毒研究. 植物病理学报, 1995, 25: 361-365
- [5] Klinkowski M, Flanzliche P. *Virology Band 4*. Berlin: Academic Verlag Press, 1977. 2-7
- [6] 赵培洁, 许彩霞. 由栽培番红花中检测出鸢尾轻花叶病毒. 中药材, 1990, 13(5):4-6
- [7] 陈集双. 番红花花叶病的发生与防治. 浙江农业科学, 2000(3):131-134
- [8] 陈书安, 王晓东, 赵兵等. 藏红花球茎愈伤组织快速诱导的研究. 中国药理学杂志, 2003, 38: 254-256
- [9] 王文静. 白草花叶病毒生物学特性的测定和玉米矮花叶病毒原山西分离物的鉴定: [硕士学位论文]. 北京: 中国农业大学植保系, 2003
- [10] 徐平东, 周仲驹, 林奇英等. 黄瓜花叶病毒亚组 I 和 II 分离物外壳蛋白基因的序列分析和比较. 病毒学报, 1999, 15:165-167
- [11] Peden K W C, Symons R H. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology*, 1973:487-492
- [12] Langeveld S A, Dore J M, Memelink J, et al. Identification of potyvirus using the polymerase chain reaction with degeneration primers. *J General Virology*, 1991, 72: 1531-1541
- [13] 陈炯, 陈剑平. Potyvirus 属成员基因组全序列的兼并引物 PCR 和 RACE 扩增方法. 病毒学报, 2000, 18: 371-372
- [14] Dombrovsky A, Huet H, Raccach B. Submitted (18-JUN-2003) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. *Virology*, A.R.O, Volcani Center, P.O. Box 6, Bet-Dagan 50250, Israel. Accession: AY325268
- [15] Li L L, Wen F J. Submitted (19-AUG-2002) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. College of Life Science, Daizong Street 61, Tai'an, Shandong 271018, China. Accession: AF539408
- [16] Sanchez F, Wang X, Jenner C E. Submitted (16-OCT-2001) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Biotechnology, INIA, Autopista A-6 Km 7.5, Madrid 28040, Spain. Accession: AF43472
- [17] Wu M F, Wang H L. Submitted (26-JUN-2001) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Graduate Institute of Biological Science, 116 Hou-Ping 1st Road, Kaohsiung 802, Taiwan, Republic of China. Accession: AF395675
- [18] Xu P, Xu J, Xue Z, Li D. Submitted (08-NOV-2000) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Biotechnology Institute, Faculty of Agriculture and Biotechnology, Kaixuan Road 268, Hangzhou, Zhejiang 310029, China. Accession: AF320127
- [19] Kwon S J, Kim K H. Submitted (25-OCT-2000) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, 103 Seodun-dong, Kwon-sun-gu, Suwon 441-744, Korea. Accession: AF316359
- [20] Chen T M, Chen M J, Yeh S D. Submitted (14-FEB-2000) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Kuo-Kuang Road No. 250, Taichung 402, Taiwan. Accession: AF233888
- [21] Sohn S H, Hahn J H, Hwang Y S. Submitted (02-NOV-1998) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Biochemistry, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Republic of Korea. Accession: AF103785
- [22] Shibolet Y M, Koch-Dean M, Gal-On A. Submitted (10-JUN-1998) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Dept. of Virology, Volcani Institute, ARO, Beit Dagan, Israel. Accession: AF071526
- [23] Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R. Molecular evolution of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J Gen Virol*, 2002, 83:1511
- [24] Hernandez C, Mathis A, Brown D J F. Sequence of RNA 2 of a nematode-transmissible isolate of tobacco rattle virus. *J Gen Virol*, 1995, 76:2847
- [25] Hernandez C. Submitted (03-SEP-1994) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Hernandez C. Institute of Mol. Plant Sciences, Einsteinweg 55, 2300 RA Leiden, The Netherlands. Accession: Z36983 Koenig R. Submitted (04-JUL-1997) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Koenig R., Biologische
- [26] Bundesanstalt Land, Forstwirtschaft. Institute Biochemie/Pflanzenvirologie, Messeweg 11, Braunschweig, D38104, Germany. Accession: Z97357
- [27] MacFarlane S A, Vassilakos N, Brown D J F. Similarities in the genome organization of tobacco rattle virus and pea early-browning virus isolates that are transmitted by the same vector nematode. *J Gen Virol*, 1999, 80: 273
- [28] Schmidt K, Koenig R. Genetic analyses of large-sized RNA 2 species of a TCM-like tobacco rattle virus source from spinach. *Arch Virol*, 1999, 144: 503
- [29] Heinze C, von Barga S, Sadowska-Rybak M. Sequences of tobacco rattle viruses from potato. *J Phytopathol*, 2000, 148: 547
- [30] Vassilakos N, Vellios E K, Brown E C, et al. Tobravirus 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes. *Virology*, 2001, 279: 478 Adam G. Submitted (04-APR-2000) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Adam G.,

Abteilung

- [31] Pflanzenschutz, . Institut fuer Angewandte Botanik der Universitaet Hamburg, Marseillerstr. 7, 20355 Hamburg, GERMANY. Accession: AJ269500
- [32] Angenent G C, Linthorst H J M. , van Belkum A F. RNA 2 of tobacco rattle virus strain TCM encodes an unexpected gene. *Nucleic Acids Res*, 1986,14(11): 4673
- [33] Angenent G C, Posthumus E, Brederode F T M. Genome structure of tobacco rattle virus strain PLB: Further evidence

on the occurrence of RNA recombination among tobamoviruses. *Virology*, 1989, 171: 271

- [34] Hang M U, Shin H Y, Kang S G. Submitted (14-NOV-2002) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Department of Biology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea. Accession: AY179834
- [35] Sudarshana M.R, Berger P H. Nucleotide sequence of both genomic RNAs of a North American tobacco rattle virus isolate. *Arch Virol*, 1998, 143:1535

Acquisition of virus-free tissue shoots of *Crocus sativus* L. and detection of their viruses

Chen Shu'an^{* **}, Chen Wenhao^{*}, Wang Xiaodong^{*}, Zhao Bing^{*}, Wang Yuchun^{*}

(^{*} The State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

(^{**} The China National Center For Biotechnology Development, MOST, Beijing 100081)

Abstract

The induction of virus-free callus of *Crocus sativus* L. and its tissue shoot were studied to solve the problems of its virus infection. During the induction of callus and the tissue shoot differentiation, all the callus and shoots were treated with high temperature to disinfect virus, and then the viruses which could infect *Crocus sativus* L. were detected by the methods of indirect ELISA and RT-PCR. The results showed that no TuMV, potyvirus, CMV and TRV were found in the calluses and differentiation shoots of *Crocus sativus* L. so the virus-free *Crocus sativus* L. calluses and shoots were obtained.

Key words: *Crocus sativus* L., virus-free, callus