

生姜脱毒快繁与病毒检测技术研究

肖雅¹ 雷艳¹ 杨建国^{1,2} 卜晓云¹ 肖骋¹ 左小义^{1*}

(1 湘西州农业科学研究院, 湖南吉首 416000; 2 湖南省蔬菜研究所)

摘要 本文以感染 TMV 和 CMV 的湘西本地小黄姜为试材, 采用热处理、茎尖培养结合添加病毒唑的方法进行脱毒处理以获得无病毒的优质生姜种苗, 运用 RT-PCR 方法检测病毒, 以期探讨出生姜最适宜的脱毒快繁及病毒检测技术。结果表明, 将生姜块茎置于 40℃ 条件下催芽, 显微镜下剥取 0.2~0.5 mm 的茎尖进行培养, 最佳诱导培养基的配方为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+病毒唑 40 mg/L, 继代培养基中将 MS 培养基中的蔗糖浓度调整为 80 g/L, 即可实现生姜试管苗的增殖、生根及壮苗的一步培养, 培养周期以 30~40 d 为宜。建立了一套生姜 CMV 和 TMV 2 种病毒的 RT-PCR 检测体系, 运用该检测方法对生姜脱毒试管苗进行检测, 病毒检出率为 0, 生姜脱毒率达 100%。

关键词 生姜; 茎尖脱毒; 同步培养; 病毒唑; 病毒检测

中图分类号 S632.5 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2017)22-0049-03

Study on Virus-free and Detection Technology of Ginger

XIAO Ya¹ LEI Yan¹ YANG Jian-guo^{1,2} BU Xiao-yun¹ XIAO Cheng¹ ZUO Xiao-yi^{1*}

(1 Xiangxi Agricultural Science Research Institute, Jishou Hunan 416000; 2 Hunan Vegetable Research Institute)

Abstract In order to obtain high quality ginger seedlings without virus, the yellow ginger of Xiangxi three main virus detoxification methods were studied. Taking TMV and CMV infection Yellow ginger of Xiangxi as experimental materials, the heat treatment, stem tip cultivation method of adding ribavirin combination, in the process of test using RT-PCR method to detect virus, the most suitable detoxification and virus detection technology of ginger were discussed. The results showed that while putting the ginger tuber for germination at 40℃, and then wring 0.2~0.5 mm size stem tip under the microscope for culturing. The optimal medium for induction was MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+virazole 40 mg/L. In the subculture medium, when the sucrose concentration in the MS medium was adjusted to 80 g/L, the ginger test tube's proliferation, taking root and strong seedlings can be realized by one step, and the suitable culture cycle is 30~40 days. A RT-PCR detection system for CMV and TMV viruses was established. The virus detection rate of ginger detoxification test tube was zero by RT-PCR, ginger detoxification rate is 100%.

Key words ginger; stem tip detoxification; synchronization culture; ribavirin; virus detection

生姜为姜科姜属多年生宿根植物, 营养丰富, 是药、食、加工等多用途经济作物, 是我国重要的外贸产品。湘西自治州地处我国生姜主产区, 生姜种植历史悠久, 全州生姜种植面积约 3 333.33 hm²[1]。生姜在生产上长期采用无性繁殖, 重茬种植, 易感染多种病毒, 使姜体内积累多种病毒, 从而导致生姜产量下降、品质降低, 种性退化, 严重制约了生姜的生产发展。国内外目前尚无高抗病毒的生姜品种和高效杀病毒药剂, 因此, 亟需通过组织培养手段对现有优良品种进行脱毒和复壮, 提高品种自身抗逆性和增产潜力。研究表明[2-3], 侵染生姜的病毒主要为黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草花叶病毒(TMV), 病毒与姜竞争生长必需的营养成分, 使生姜出现局部或系统花叶褪绿、植株矮化或叶畸形等症状, 从而导致生姜产量降低 30%, 严重者可减产 45% 以上, 且品质和抗性也会受到不同程度的影响。因此, 探索出一套生姜种苗脱毒快繁体系以及病毒检测技术是提高生姜产量和品质的有效途径。本文以湘西小黄姜为材料, 利用热处理、茎尖培养及化学药剂相结合的方法进行生姜脱毒, 并用 RT-PCR 检测病毒, 以期建立一套生姜脱毒快繁体系, 为脱毒姜种的快速繁殖提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用感染 TMV 和 CMV 的湖南湘西本地小黄姜为试验材料。

基金项目 湖南省蔬菜产业技术体系武陵山区试验站项目(2015—2019 年); 湘西州科技局重大项目(2060449)。

作者简介 肖雅(1982—), 女, 湖南长沙人, 助理研究员, 从事生物技术研究工作。

* 通信作者

收稿日期 2017-08-04

1.2 试验方法

1.2.1 热处理催芽。将试验材料置于干净的沙盘中, 上面覆盖约 3 cm 厚的细沙, 喷水使河沙湿润(以沙盘内不积水为宜), 河沙上用湿毛巾覆盖, 置于人工光照培养箱内(设置温度: 40℃, 湿度: 70%, 光照: 0)培养, 4~6 周后待芽长至 1~2 cm 时取出。

1.2.2 茎尖脱毒。待种姜芽点萌发至 1~2 cm 时, 选取粗壮的芽, 用解剖刀切下, 放入器皿中用洗衣粉等清洁剂冲洗 20 min, 转入超净工作台进行操作, 将芽段放入灭菌后的烧杯内, 用 75% 酒精清洗 30 s, 无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 20 min, 最后用无菌水冲洗 5~6 次。将完成消毒灭菌操作的生姜芽段放在无菌滤纸上吸干水分, 在 30~40 倍解剖镜下用无菌的解剖刀、解剖针剥取带 1 个叶原基的茎尖(大小 0.2~0.5 mm), 将生长点迅速按无菌操作程序接入诱导培养基中。

1.2.3 基础诱导培养基筛选。据研究表明[4-7], 添加 6-BA 1.0~3.0 mg/L、NAA 0.1~1.0 mg/L 时, 对诱导生姜的生芽分化具有很大的作用。本试验设置 12 个处理(表 2), 记录接种 30 d 后的成活率、出芽时间及出芽率, 筛选出最佳的基础诱导培养基。

1.2.4 不同浓度病毒唑对生姜脱毒效果的影响。以 1.2.3 中的基础诱导培养基为基础培养基, 添加不同浓度的病毒唑, 共设置 6 个处理, 分别为 0(B₁)、5 mg/L(B₂)、20 mg/L(B₃)、40 mg/L(B₄)、80 mg/L(B₅)、150 mg/L(B₆)。观察记载每个处理的成活率和出芽率。以每个处理为一个株系, 对每个株系进行扩繁, 根据抽样方法(见 1.2.6)对每个株系的扩繁试管苗进行病毒检测, 统计每个处理下的生姜脱毒率。

1.2.5 增殖与生根培养基的筛选。观察接入诱导培养基的

芽点,待苗长至2~3 cm时,整株取出接入培养基中进行增殖与生根培养。有研究表明^[8],蔗糖浓度和培养时间对试管姜的诱导及膨大具有重要作用。本试验中的增殖培养基以MS为基础培养基,不添加任何激素,设置5个不同的蔗糖浓度处理,分别为30 mg/L(C₁)、50 mg/L(C₂)、80 mg/L(C₃)、100 mg/L(C₄)、120 mg/L(C₅)。观察记载每个处理在不同时间下的生长情况,统计生根诱导率及增殖倍数。

1.2.6 病毒检测方法。采用逆转录-聚合酶链式反应法(Reverse Transcription-PCR, RT-PCR)进行病毒检测。

检测对象为烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)和黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV)。抽样方法:用作繁育基础苗的每块姜块都必须检测,每块姜块取小部分即可,其余大部分姜块用作扩繁的脱毒材料。由一个生姜姜

块繁育而来的试管苗为同一个株系,每个株系随机抽取1%~2%的增殖苗进行检测,每个株系取样3个以上。植物总RNA的提取和反转录方法根据TransGen Biotech公司的EasyPure RNA Kit和TransScript[®] Two-Step RT-PCR SuperMix试剂盒说明书进行。PCR扩增体系:采用50 μL PCR反应体系,包含模版2 μL,正向和反向引物(根据Genebank中已报道的序列,通过Primer 5软件设计,引物序列见表1)各2 μL,10×TransTaq-T buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,TransTaq-T DNA polymerase 0.5 μL,最后加ddH₂O至50 μL。取8 μL PCR扩增产物,用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,5 V/cm恒压条件下电泳30 min左右,在柯达凝胶成像系统下观察并照相保存。根据DNA分子量标准为参照,观察是否有目的基因大小的条带出现。

表1 病毒病检测引物序列

病毒	上游引物	下游引物	目的片段
CMV	CCCACTCTTAACCAACCAACC	GACGCAGCATACTGATAAACCAA	323 bp
TMV	TAGACCCGCTAGTCACAG	CAGAGGTCCAACCAAAAC	237 bp

2 结果与分析

2.1 基础诱导培养基的筛选

在MS培养基的基础上添加不同配比的6-BA和NAA,接种培养观察,结果如表2所示。从表2可以看出,处理A₃、A₄、A₈中,当6-BA的浓度≤NAA时,接入培养基的生姜芽点成活率很低,出芽率为0;当6-BA加入量为1 mg/L和3 mg/L时,无论添加多大浓度的NAA,所有处理的成活率及出芽率都很低,出芽时间长,说明低浓度的6-BA不能很好地诱导生姜芽点的萌发,高浓度的6-BA抑制生姜芽点的萌发;当6-BA加入量为2 mg/L时,处理A₅、A₆均有较高的成活率及出芽率,出芽时间也较短,其中以处理A₆为最佳处理,接入的生姜芽点于30 d左右开始转绿出芽,成活率高达86.7%,出芽率为83.3%,出芽时间最短。说明基础诱导培养基中最佳激素配比为MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

2.2 不同浓度病毒唑对生姜茎尖生长及脱毒率的影响

在最佳基础诱导培养基的基础上,添加不同浓度的病毒唑,接种培养观察,结果如表3所示。从表3可以看出,当培养基中未添加病毒唑时,生姜茎尖的成活率和出芽率最高,但脱毒率相对较低,仅为69%,说明病毒唑的加入有抑制病毒生长的作用。随着病毒唑浓度的增加,生姜茎尖的成活率和出芽率有所下降,但脱毒率呈上升趋势,说明病毒唑对植株的生长具有一定的抑制作用。当加入的病毒唑浓度≥40 mg/L时(处理B₄、B₅、B₆),脱毒率达到100%。综合3个测量指标,处理B₄为最佳处理,脱毒率达到100%,成活率

表2 不同激素浓度对生姜成活及出芽的影响

处理	6-BA 浓度 mg·L ⁻¹	NAA 浓度 mg·L ⁻¹	成活率 %	出芽率 %	平均出芽 时间/d
A ₁	1	0.2	33.3	3.3	45
A ₂	1	0.5	16.7	10.0	40
A ₃	1	1.0	33.3	0	—
A ₄	1	2.0	0	0	—
A ₅	2	0.2	73.3	60.0	35
A ₆	2	0.5	86.7	83.3	30
A ₇	2	1.0	50.0	40.0	32
A ₈	2	2.0	0	0	—
A ₉	3	0.2	13.3	6.7	35
A ₁₀	3	0.5	20.0	10.0	38
A ₁₁	3	1.0	20.0	6.7	35
A ₁₂	3	2.0	0	0	—

表3 不同浓度病毒唑对生姜茎尖生长及脱毒率的影响

处理	病毒唑浓度 mg·L ⁻¹	接种数 个	成活率 %	出芽率 %	脱毒率 %
B ₁	0	20	95	90	69
B ₂	5	20	90	90	71
B ₃	20	20	90	90	93
B ₄	40	20	90	90	100
B ₅	80	20	50	50	100
B ₆	150	20	25	20	100

和出芽率为90%,当病毒唑浓度增加时,成活率和出芽率都有所下降,对生姜生长的抑制作用愈加明显。

2.3 不同蔗糖浓度对生姜组培苗增殖及生根的影响

MS培养基中加入不同的蔗糖浓度,以期实现生姜增殖和生根的同步培养,接种培养观察,结果如表4所示。从表4可以看出,普通的MS培养基(C₁)中,即使生长周期达到40 d,

表4 不同蔗糖浓度对生姜组培苗增殖及生根的影响

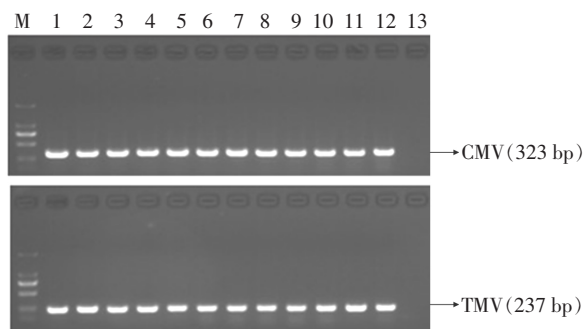
处理	25 d			30 d			35 d			40 d		
	生根诱导率 %	增殖倍数 倍	生长情况	生根诱导率 %	增殖倍数 倍	生长情况	生根诱导率 %	增殖倍数 倍	生长情况	生根诱导率 %	增殖倍数 倍	生长情况
C ₁	0	0.11	好	2.8	0.17	好	3.3	0.19	好	4.4	0.28	好
C ₂	27.8	1.78	好	44.4	2.28	好	55.6	2.72	好	66.7	3.11	好
C ₃	66.7	5.30	好	100.0	7.30	好	100.0	7.80	好	100.0	8.50	一般
C ₄	69.4	5.50	好	100.0	7.50	好	100.0	8.50	一般	100.0	8.50	一般
C ₅	66.7	5.80	一般	100.0	6.90	一般	100.0	7.80	差	100.0	7.80	差

注:生长情况分为好、一般和差3个等级,“好”代表组培苗叶绿、长势旺盛、茎秆高而粗壮;“一般”代表组培苗叶色略微发黄,长势较好,茎秆较为粗壮;“差”代表组培苗叶片黄化,长势差,茎秆矮粗。

生姜组培苗也几乎没有增殖,随着蔗糖浓度的增加,生姜组培苗的增殖率和生根诱导率也越来越高。处理 C₃、C₄、C₅ 的增殖倍数都较高,生根诱导率在培养周期为 30 d 时,都达到了 100%,处理 C₄ 和 C₅ 试管苗的增殖和生根率虽然都较高,但均出现了叶片黄化、茎秆矮粗的现象,说明培养基中糖浓度过高不适宜生姜试管苗的生长。综合比较,生姜的增殖和生根培养基以处理 C₃ 为最佳处理,即 MS 培养基中蔗糖浓度调整为 80 g/L 时,生姜试管苗的增殖率和诱导生根率达到最高,长势也最好,实现了增殖、生根及壮苗的一步培养,培养周期以 30~40 d 为宜。

2.4 RT-PCR 检测生姜感病率

运用 RT-PCR 方法对用作繁育基础苗的每块姜块进行检测,检测结果显示,所检测的样品均出现了 323 bp 和 237 bp 的病毒特异性条带(图 1),条带很亮,说明本试验的 RT-PCR 体系非常适合 2 种病毒的检测,所有检测的样品呈阳性,均感染了 CMV 和 TMV 病毒,可用作进一步脱毒用的生姜材料。运用本方法对不同浓度病毒唑处理下的生姜脱毒试管苗进行检测,检测结果统计如表 3 所示。



注: M 为 DNA ladder,从上到下依次为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp; 1~11 为生姜块茎样品,12 为阳性对照,13 为阴性对照。

图 1 RT-PCR 检测生姜块茎中 CMV 和 TMV 病毒

3 结论与讨论

3.1 结论

通过对生姜脱毒方法的研究,筛选出最佳方法:运用热处理(40℃)对生姜块茎进行催芽,在显微镜下剥取 0.2~0.5 mm 的茎尖,接入诱导培养基中诱导发芽,最佳诱导培养基的配方为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+病毒唑 40 mg/L,30 d 左右,芽点转绿,50 d 左右,待苗长至 2~3 cm 高,转至继代培养基,继代培养基中仅仅将 MS 培养基中的蔗糖浓度调整为 80 g/L,即可实现生姜试管苗的增殖、生根及壮苗的培养,培养周期以 30~40 d 为宜。该培养基配方颠覆了一般增殖及生根培养基必须使用激素的传统,大大提高了培养效率,降低了生产成本。

建立了一套生姜 CMV 和 TMV 2 种病毒的 RT-PCR 检测体系,运用该方法对用于脱毒的生姜试验材料进行检测,检测结果出现清晰的病毒特异性条带,说明该方法能够快速灵敏地检测出这 2 种病毒。建立了一套生姜 CMV 和 TMV 2 种病毒的 RT-PCR 检测体系,运用该检测方法对生姜脱毒试管苗进行检测,病毒检出率为 0,生姜脱毒率达 100%。

3.2 讨论

3.2.1 生姜脱毒方法。目前,植物的脱毒方法主要有热处理、

茎尖培养和化学药剂处理等。茎尖培养是目前使用最广泛的脱毒方法,剥取的茎尖越小,脱除病毒效果越好,但同时存在成活率低、易褐化死亡等问题,对操作人员的技术要求较高,脱毒率的高低也有一定的偶然性,因而仅以此一种方法难以达到预期的效果^[9]。高温热处理能使病毒钝化,抑制病毒的分化和转移,使其失去活性。有研究表明,添加病毒唑可起到钝化病毒、抑制病毒生长的作用,但也存在单独使用效果不明显的问题,需结合其他方法方可达到理想效果^[10]。在生姜脱毒上通常运用前 2 种方法较多,有研究表明,采用高温 38℃催芽+超高温 50℃5 min 处理姜芽,对生姜进行茎尖脱毒培养可使试管苗脱毒率达 97.5%以上^[11],但作为生姜原原种来说,脱毒率必须达到 100%。本试验在热处理和茎尖培养 2 种脱毒方式的基础上添加了病毒抑制剂处理的方式,即在诱导培养基中添加适宜浓度的病毒唑,使扩繁的生姜脱毒试管苗的脱毒率达到 100%,符合作为原原种的要求。

3.2.2 病毒检测方法。ELISA 是目前检测生姜组培苗病毒的最常用方法(海南小黄姜脱毒快繁技术研究),该方法特异性强、操作简单、适用于大量田间样品的检测,是目前生产应用最便捷、使用最为广泛的检测技术。随着病毒检测技术的发展,分子生物学检测技术发展迅速,本试验中采用的 RT-PCR 是一种检测 RNA 病毒的行之有效的方法。该方法较 ELISA 而言,在检测样品量不太大的前提下,检测成本更低,有研究表明,其灵敏度更是 DAS-ELISA 敏感度的 1 000 倍^[12],具有更高的准确性。脱毒后的生姜试管苗为生姜原原种苗,对脱毒率的要求特别严格,必须达到 100%的脱毒率,才能保证后续种苗的质量,因而准确率更高的 RT-PCR 方法相较 ELISA 检测方法来说更为合适,本试验通过各种试验条件的优化,摸索了一套最适合检测 TMV 和 CMV 2 种病毒的 RT-PCR 体系,可高效、准确地获得病毒检测结果。

4 参考文献

- [1] 杨建国,左小义,吴光辉,等.湖南省生姜产业发展的现状及对策[J].湖南农业科学,2015(5):131-134.
- [2] 任清盛,于广霞,毕于义.姜脱毒及增产抗病性研究[J].中国植保导刊,2005(7):8-10.
- [3] 唐燕梅,李全,陆飞,等.生姜脱毒组培苗栽培技术[J].现代农业科技,2009(8):42.
- [4] 韦坤华,李林轩,缪剑华,等.姜的脱毒方法比较与繁殖生根同步化培养技术研究[J].湖北农业科学,2013,52(18):4522-4525.
- [5] 黄皓,周生茂,尚小红,等.西林火姜健康组培苗快繁体系的建立[J].长江蔬菜,2016(20):25-29.
- [6] 齐兰,朱红林,陈健晓,等.海南小黄姜脱毒快繁技术研究[J].热带农业科学,2013,33(9):37-40.
- [7] 吴家丽,赵佐敏,艾勇,等.白水生姜组培脱毒及离体快繁体系建立研究[J].长江蔬菜,2011(4):17-20.
- [8] 周逊,徐晓舒,潘辉,等.蔗糖浓度对遵义大白姜试管姜诱导的影响[J].湖北农业科学,2011,50(24):5256-5258.
- [9] 周晓波,吴艺飞,丁苗黄,等.卷丹百合 3 种主要病毒脱毒方法研究[J].湖南农业科学,2011(10):7-10.
- [10] 张惠华,刘晓荣,颜范悦,等.东方百合综合脱毒技术研究[J].辽宁农业科学,2009(6):17-19.
- [11] 陈云凤,黎世龄.生姜离体脱毒快繁培养研究[J].江苏农业科学,2011,39(6):91-92.
- [12] 王继华,器素萍,孔宝华,等.百合无症病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测[J].云南农业大学学报,2004,19(2):148-150.