

越南紫薯组培快繁及 FMV 病毒检测

李艳辉¹, 穆玉洁^{1*}, 白冰洋², 蒋素华³ (1. 封丘县农业农村局, 河南新乡 453000; 2. 漯河田康农业发展有限公司, 河南漯河 462000; 3. 郑州师范学院生物工程研究中心, 河南郑州 450044)

摘要 [目的]探究获得大规模的越南紫薯脱毒苗的技术方法。[方法]采用茎尖组织培养快繁技术和 RT-PCR 技术, 探讨不同培养基成分对越南紫薯无毒茎尖的诱导、分化、增殖以及生根的影响和羽状斑驳病毒的检测, 建立越南紫薯高效再生体系和病毒检测体系。[结果]筛选出最适越南紫薯不定芽产生的培养基是 MS+6-BA 1.0 mg/L, 最佳增殖培养基为 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+CW 2.0 mg/L, 最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L。[结论]该试验为大田甘薯种苗 FMV 病毒的高效检测提供了理论依据。

关键词 越南紫薯; FMV 病毒; 组织培养

中图分类号 S531 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)07-0092-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.07.021

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Tissue Rapid Propagation and FMV Virus Detection of Vietnam *Ipomoea batatas*

LI Yan-hui¹, MU Yu-jie¹, BAI Bing-yang² et al (1. Fengqiu County Agriculture and Rural Affairs Bureau, Xinxiang, Henan 453000; 2. Luohe Tiankang Agricultural Development Co., Ltd., Luohe, Henan 462000)

Abstract [Objective] To acquire large-scale Vietnam *Ipomoea batatas* seedlings. [Method] This study adopts the tissue of rapid propagation technology, discusses different culture medium components of Vietnam *Ipomoea batatas* buds reduction, differentiation, proliferation and the influence of root. [Result] The results illustrate that the MS+6-BA 1.0 mg/L was the optimum medium for *Ipomoea batatas* buds reduction, 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+CW 2.0 g/L was the best medium for *Ipomoea batatas* proliferation, 1/2MS+NAA 0.5 mg/L was the optimum medium for *Ipomoea batatas* growing roots. [Conclusion] Therefore, this experiment can provide a fundamental theory for virus G detection in the field.

Key words Vietnam *Ipomoea batatas*; Virus FMV; Tissue culture

病毒病是甘薯的重要病害之一, 该病直接影响甘薯的生产量, 使其种性退化。据报道, 目前世界上甘薯病毒有 30 余种^[1-3], 其中甘薯羽状斑驳病毒(FMV)是我国甘薯中检测到的最普遍的病毒^[4], 通常情况下 FMV 与甘薯褪绿矮化病毒(CSV)交叉感染甘薯^[5]。但是两者对甘薯植株产生的影响不同, FMV 主要的生理病症是破坏叶绿体结构, 降解叶绿素, 常见的表现症状是不规则的萎黄症状、褪绿斑以及不规则的羽状黄化斑, 有些病斑外缘通常会有紫色素的产生。据统计, 目前发现的甘薯病毒中, 对甘薯感染面积最大的病毒是马铃薯 Y 病毒属, 病毒 FMV 和 CSV 都是马铃薯 Y 病毒^[6], FMV 已被明确指出有多个株系, 属于世界性分布, 几乎所有的甘薯种植区都会有 FMV 的存在。FMV 是长 825~850 nm、杆状弯曲的粒子, 是马铃薯 Y 病毒所有病毒中最长的病毒^[7-9], 侵染成功率相当高。

甘薯采用无性繁殖进行增殖, 病毒会随植株不断的增殖, 通过块茎或者秧苗代代相传, 致使甘薯的生产质量不断下降。国内外研究者致力于甘薯抗病病毒育种及甘薯脱毒研究, 但至今尚未发现对甘薯病毒病有效的化学预防和治疗药剂, 也未发现实用的甘薯品种能够高抗病病毒^[10]。鉴于此, 甘薯脱毒苗的大量培养成为提高甘薯产量和质量最有效的方法之一^[11]。

甘薯脱毒苗的培养利用甘薯茎尖分生组织是无毒区的

原理, 将茎尖剥离, 并进行组织培养获得无毒苗的一种生物技术^[12-13]。分子生物学检测法即 RT-PCR 法, 根据待测病毒外壳蛋白的核酸序列设计出特定的引物, 提取越南紫薯的总 RNA, 建立合适的体系反转录得到其 cDNA, 用设计好的引物建立 RT-PCR 体系对得到的 cDNA 进行扩增并用普通琼脂糖进行电泳检测^[8]。该研究利用越南紫薯的茎尖进行快繁, 通过 RT-PCR 检测获得真正的无毒薯苗, 提高紫薯的生产量, 为甘薯病毒检测及脱毒苗快繁技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 采取新鲜越南紫薯叶片, 用自来水清洗干净并放于液氮中速冻, 标记后存放于-80℃恒温中备用。

1.2 引物设计 在 NCBI 上查取 SPFMV 外壳蛋白(SPFMV-CP)的序列, 用 Primer premier 5.0 设计序列保守引物, 并由上海英骏生物技术公司合成, 上引物: FMV-CP-F: 5'-TTAG-GCAGATTATGACGCA-3'; 下引物: FMV-CP-R: 3'-GCA-CACCCCTCATTCCTA-5'。

1.3 PCR 扩增与测序 利用 TIANGEN 公司的多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取紫薯的总 RNA, 用试剂盒 M-MLV 反转录得到 cDNA, 以得到的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 凝胶回收目的基因, 然后进行 T 载体连接转化, 最后进行基因测序。

1.4 越南紫薯的茎尖脱毒与病毒检测

1.4.1 脱毒苗的获得与芽诱导培养。 选取健康无病斑的越南紫薯块, 用清水洗净表面泥土。先用 0.1% 高锰酸钾处理 15 min, 再用 0.5% 多菌灵浸泡 1 h, 捞出晾干, 在 0.1% 多菌灵水中进行恒温催芽, 温度为 28℃, 相对湿度为 80%~85%, 待薯芽萌动后, 于 35~40℃处理 30 d(8 h/d)。

剪取生长旺盛的甘薯枝条顶芽下 3~6 节, 剪去叶片和

基金项目 河南省科技攻关计划项目(202102110167); 河南省高等学校重点科研项目(21A210029); 河南省高等学校重点科研项目(21B210011)。

作者简介 李艳辉(1983—), 女, 河南安阳人, 农艺师, 硕士, 从事甘薯脱毒苗及栽培种植研究。*通信作者, 农艺师, 从事大田作物病虫害防控技术研究。

收稿日期 2021-11-08; **修回日期** 2021-12-02

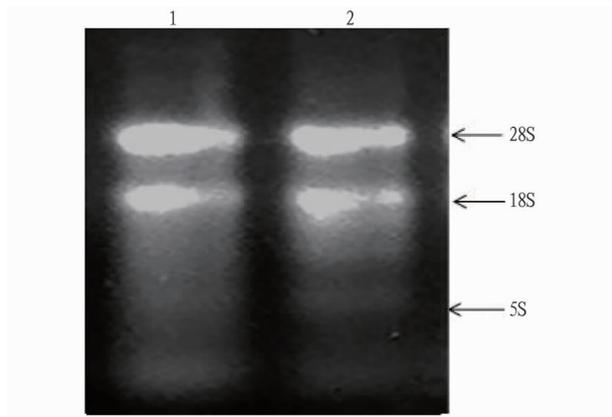
叶柄后进行消毒。消毒时先将材料放在水与洗洁精比例为 1:500 的溶液中冲洗 15 min, 流水冲洗 30 min, 再将枝条剪成至少带 2 个顶芽的小段后, 再用 70% 乙醇浸泡 40 s。用无菌水清洗干净后, 以 0.1% HgCl₂ 灭菌 6~7 min, 再用无菌水反复清洗 4 次。在超净工作台上, 把小段茎尖顶端的生长点 (一般带有 1~2 个叶原基) 剥离后, 插入芽诱导 X₁~X₃ 号培养基中, X₁: MS+6-BA 1.0 mg/L; X₂: MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L; X₃: MS。接种 15 d 后观察生长情况并统计。

1.4.2 脱毒苗的增殖培养。选取健壮无菌丛生芽分割成 5 mm 左右的小段, 叶片切成直径为 4 mm 左右大小的块, 接种到 M₁~M₃ 号培养基中培养, M₁: MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L; M₂: MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L; M₃: 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+CW 2.0 mg/L。培养基为 120 °C 灭菌 30 min。每瓶接种数目一致 (4~6 个), 置于光照培养室进行培养, 并观察丛生芽增殖和长势情况。

1.4.3 脱毒苗的生根培养与病毒检测。选取脱毒成功的越南紫薯增殖苗, 切成带有 2~3 片嫩叶且 2~3 cm 的小段, 移至 Z₁~Z₃ 号生根培养基中, Z₁: 1/2MS+NAA 0.5 mg/L; Z₂: 1/2 MS+NAA 0.3 mg/L; Z₃: 1/2MS。每瓶接种数目一致, 培养 20 d, 观察生根情况。当小苗在培养瓶中长到 7~9 cm 时可进行炼苗和移栽。每株至少摘取 1 片生根培养后的叶片进行 RT-PCR 检测, 然后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳及 UVITEC 成像系统分析电泳结果。若无对应 FMV 病毒外壳蛋白目标条带, 即可判断经过茎尖脱毒的株系脱毒成功, 并将未脱毒成功的株系淘汰。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取 获得总 RNA 溶液后, 凝胶电泳检测其完整性, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 18S、28S 条带清晰, 且 28S 条带为 18S 的 2 倍, 通过紫外分光光度计检测其 OD 值在 1.8~2.0, 说明提取的 RNA 完整性较好, 可通过 PCR 进行扩增。



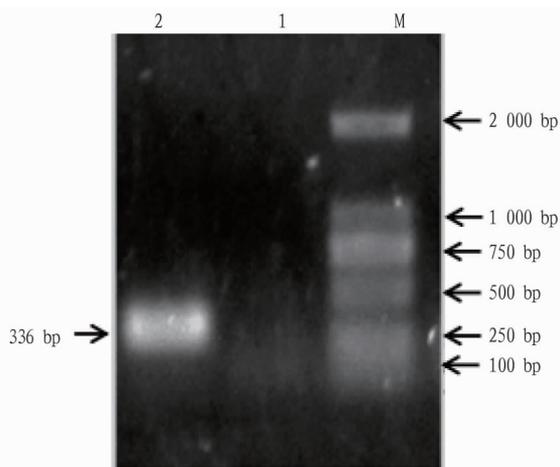
注: 1, 2 为 RNA 条带
Note: 1, 2 are RNA bands

图 1 总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA extraction

2.2 基因克隆 以获得的 cDNA 作为模板, 设计好引物 FMV-CP-F 和 FMV-CP-R, 用 RT-PCR 检测, 结果显示有 1

条特异性条带在 336 bp (图 2), 说明基因片段已经获得。



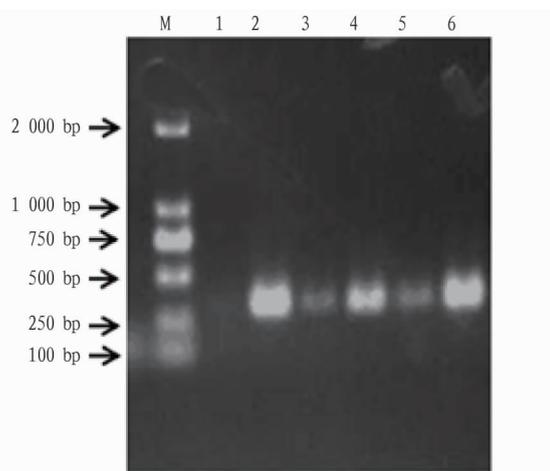
注: M. Marker; 1. 对照; 2. 目的基因

Note: M. Marker; 1. Control; 2. Target gene

图 2 FMV-CP 基因 PCR 产物

Fig. 2 PCR product of FMV-CP gene

2.3 PCR 检测与分析 连接转化后挑取阳性菌落作为目的基因模板, 用引物 FMV-CP-F 和 FMV-CP-R 配制 PCR 体系, 经扩增得到 300 bp 片段 (图 3)。



注: M. Marker; 1. 对照; 2~6. 阳性克隆

Note: M. Marker; 1. Control; 2-6. Positive cloning

图 3 阳性克隆检测结果

Fig. 3 Test results of positive cloning

2.4 茎尖脱毒与病毒的检测

2.4.1 茎尖诱导。对越南紫薯进行消毒和催芽后, 取茎尖生长点接种到芽诱导培养基中进行培养, 15 d 后观察培养情况。由表 1 可知, X₁ 培养基诱导率达到 100%, 不定芽生长旺盛, 呈深绿色, 说明诱导效果好; X₂ 的诱导率虽然达到 97.0%, 但芽呈黄绿色, 说明 X₂ 的茎尖诱导效果一般; X₃ 的诱导率为 92.5%, 芽较弱, 说明诱导效果欠佳。综合判断, X₁ 培养基中的激素适合不定芽的诱导, 茎尖诱导情况见图 4。

2.4.2 增殖培养和病毒检测。为了避免诱导得到的不定芽老化, 在其培养一段时间后, 将其及时分成独立的芽苗接种到新鲜的培养基上, 使芽苗能够快速增殖生长, 以满足生根培养的需求。该试验采用 3 种不同的培养基对增殖培养过

表 1 不同培养基成分对不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of different medium components on buds induction

处理 Treatments	培养基 Culture medium	不定芽诱导情况 Adventitious bud induction	诱导率 Induction rate//%
X ₁	MS+6-BA 1.0 mg/L	不定芽呈深绿色,高 2~4 cm,较壮	100
X ₂	MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	不定芽呈黄绿色,高 2~3 cm,弱	97.0
X ₃	MS	芽浅黄绿色,高 1~2 cm,较弱	92.5

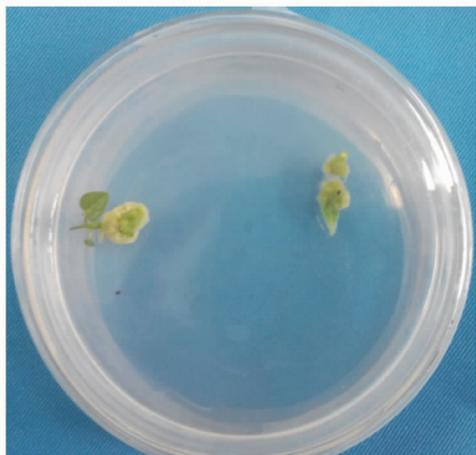


图 4 茎尖诱导情况
Fig. 4 Buds induction

程进行比较筛选,结果见表 2。由表 2 可知,培养基 M₃ 的增殖效果最好,即培养基 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+CW 2.0 mg/L 适合越南紫薯苗的增殖,增殖率达 98.9%,且苗生长健壮。增殖培养情况见图 5。

2.4.3 脱毒检测。从快繁体系中挑取长势较好的植株,将其移栽至智能温室中培养,剪取茎尖,提取脱毒苗的总 RNA,进行 PCR 检测,判断其是否含有病毒。从图 6 可见,条带 1 明亮,为阳性对照,条带 2、3 看不到条带则证明脱毒成功,可将植株 2、3 继续培养,作为获得无毒苗的材料。

2.4.4 生根培养。选取未淘汰的无毒紫薯苗,在超净工作台上取带有 2~3 片嫩叶的短茎转移到 Z₁~Z₃ 培养基上进行生根培养,结果见表 3。由表 3 可知,越南紫薯嫩苗在 Z₁ 培养基上生根率为 100%,且根长而粗,生根效果理想。而 Z₂ 培养基上的生根率虽然也为 100%,但植株长势不好。因此,根诱导最适培养基为 Z₁。生根培养情况见图 7。

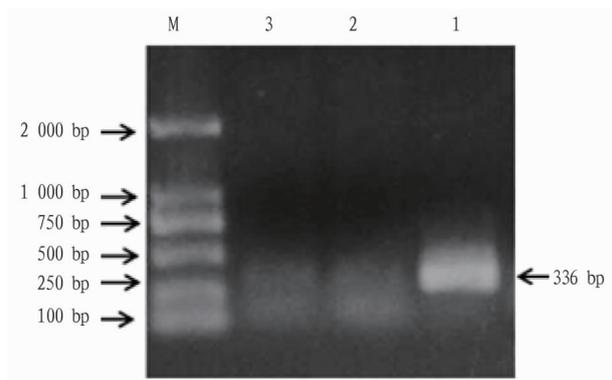
表 2 不同培养基对苗增殖生长状况的影响

Table 2 Effects of different media on the growth status of seedling

处理 Treatments	培养基 Culture medium	苗生长情况 Growth of seedling	增殖率 Proliferation rate//%
M ₁	MS+ 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	生长弱,有变黄萎蔫、衰亡的现象	86.3
M ₂	MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	生长较壮,高 2~3 cm,叶片绿色	92.7
M ₃	1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+CW 2.0 mg/L	生长健壮,高 2~6 cm,叶片深绿色	98.9



图 5 增殖培养情况
Fig. 5 Proliferation culture



注:1. 阳性对照;2、3. 脱毒紫薯检测样本;M. Marker

Note: 1. Positive control; 2, 3. Test samples of virus-free *Ipomoea batatas*; M. Marker

图 6 病毒检测 RT-PCR 电泳图

Fig. 6 RT-PCR electrophoresis of virus detection

3 讨论

该研究通过比较不同浓度 6-BA、NAA、KT 等对越南紫薯组培快繁的影响,初步建立了越南紫薯的组培快繁体系。根据该研究结果可知,不同培养基成分在对越南紫薯茎尖的诱导、增殖和生根产生了不同效果:在诱导紫薯茎尖产生不

定芽时宜采用 MS+6-BA 1.0 mg/L;在进行增殖培养时宜采用 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+CW 2.0 mg/L;在进行生根培养时宜采用 1/2MS+NAA 0.5 mg/L,该组合得到的越南紫薯苗适合炼苗和移栽,单纯的 1/2MS 培养基上紫薯苗虽然也能长

出根,但根较弱,难以吸收营养物质,不适合炼苗和移栽。综合说明培养基中添加激素可以促进器官诱导,而不同激素组合

对同一种诱导有不同效应。组织培养的过程中根据 RT-PCR 检测方法可检测脱毒苗是否脱毒成功,检测过程灵敏快捷。

表 3 不同培养基对根诱导的影响

Table 3 Effects of different medium components on roots induction

处理 Treatments	培养基 Culture medium	根生长情况 Root growth	平均根数量 Average number of roots//条	生根率 Rooting rate//%	成活率 Survival rate//%
Z ₁	1/2MS+NAA 0.5 mg/L	粗、壮	7	100	99.2
Z ₂	1/2MS+NAA 0.3 mg/L	稍细、壮	8	100	93.0
Z ₃	1/2MS	较细、根弱	5	89	91.2



图 7 生根培养情况

Fig. 7 Rooting culture

该研究在短时间内可完成越南紫薯植株再生和病毒检测过程,实现了再生体系的建立,该体系的建立对越南紫薯快速繁殖和规模化生产有着重要的指导意义。根据相关报道,我国每年因甘薯病毒病而造成的损失极大^[14],而高效的茎尖脱毒体系将会大大降低损失,因此推广优质的甘薯品种病毒检测体系及茎尖脱毒体系势在必行。

参考文献

[1] LUAN Y S,ZHANG J,LIU D M,et al. Molecular characterization of sweet

potato leaf curl virus isolate from China (SPL CV-CN) and its phylogenetic relationship with other members of the Geminiviridae [J]. Virus genes, 2007,35(2):379-385.

[2] LOZANO G,TRENADO H P,VALVERDE R A,et al. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*;Taxonomic and phylogenetic implications [J]. Journal of general virology,2009,90(10):2550-2562.

[3] 何海旺,何虎翼,谭冠宁,等. 反向斑点杂交法快速检测甘薯羽状斑驳病毒和甘薯 G 病毒[J]. 南方农业学报,2014,45(1):43-48.

[4] 王关林,刘娟. 甘薯病毒的分子生物学研究进展[J]. 商丘师范学院学报,2009,25(3):7-15.

[5] 张盼,兰新芝,乔奇,等. 甘薯病毒病害 (SPVD) 的多重 RT-PCR 检测方法及其应用[J]. 植物保护,2013,39(2):86-90,100.

[6] CLARK C A,HOY M W. Effects of common viruses on yield and quality of Beauregard sweetpotato in Louisiana[J]. Plant disease,2006,90(1):83-88.

[7] 王丰. 甘薯病毒病脱毒技术及检测[J]. 植物检疫,2003,17(5):295-298.

[8] 林林,陈炯,郑红英,等. 甘薯羽状斑驳病毒分离物的基因组 3'-末端序列测定与分析[J]. 浙江农业学报,2003,15(4):211-214.

[9] 王升吉,尚佑芬,杨崇良,等. 甘薯羽状斑驳病毒分子生物学研究概况[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2001,32(4):539-543.

[10] 张希太,张彦波,肖磊,等. 指示植物检测甘薯病毒技术的改进研究[J]. 西南农业学报,2014,27(4):1509-1513.

[11] 孟令文. 甘薯茎尖脱毒及快繁技术研究[J]. 杂粮作物,2010,30(6):414-415.

[12] 卢玲,聂明建,王学华. 甘薯脱毒苗培育的研究进展[J]. 安徽农业科学,2013,41(4):1456-1458.

[13] 王林生,马晓玉. 甘薯脱毒技术的研究与应用[J]. 种子,2005,24(10):51-53.

[14] 乔奇,张德胜,秦艳红,等. 中国甘薯病毒种类的初步鉴定[C]//郭泽建,侯明生. 中国植物病理学会 2011 年学术年会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社,2011.

(上接第 72 页)

[30] KENDALL M G. Rank correlation methods[M]. London:Charles Griffin, 1970.

[31] 代子俊,赵霞,李冠稳,等. 基于 GIMMS NDVI 3g, v1 的近 34 年青海省植被生长季 NDVI 时空变化特征[J]. 草业科学,2018,35(4):713-725.

[32] 郭妮,韩天虎,王静,等. 玛曲退牧还草工程生态效果的遥感监测[C]//中国气象学会医学气象学委员会,兰州大学大气科学学院. 第 26 届中国气象学会年会气候环境变化与人体健康分会场论文集. 北京:中国气象学会,2009:11.

[33] 李森,范航清,邱广龙,等. 不同潮区矮大叶藻地上高度和覆盖度以及生物量的动态变化[J]. 广西科学,2012,19(3):276-278,288.

[34] 王静,郭妮,王振国,等. 甘南草地地上部生物量遥感监测模型[J]. 干旱气象,2010,28(2):128-133.

[35] 王莹,夏文韬,梁天刚,等. 基于 MODIS 植被指数的甘南草地净初级生

产力时空变化研究[J]. 草业学报,2010,19(1):201-210.

[36] 王建宏. 甘肃甘南黄河重要水源补给生态功能区生态保护与建设规划研究[R]. 甘肃省生态环境监测监督管理局,2011.

[37] 郑伟,董全民,李世雄,等. 放牧对环青海湖高寒草原主要植物种群生态位的影响[J]. 草业科学,2013,30(12):2040-2046.

[38] 王静,郭妮,蔡迪花,等. 玛曲县草地退牧还草工程效果评价[J]. 生态学报,2009,29(3):1276-1284.

[39] 穆少杰,李建龙,陈奕兆,等. 2001—2010 年内蒙古植被覆盖度时空变化特征[J]. 地理学报,2012,67(9):1255-1268.

[40] 冯琦胜,尚占环,梁天刚,等. 甘肃省玛曲县沼泽湿地遥感监测与动态变化分析[J]. 湿地科学,2008,6(3):379-385.

[41] 郭述茂. 基于 3S 技术的高寒草地植被覆盖度分布特征及动态变化研究[D]. 兰州:兰州大学,2009.

[42] 姚玉璧,邓振镛,尹东,等. 黄河重要水源补给区甘南高原气候变化及其对生态环境的影响[J]. 地理研究,2007,26(4):844-852.