

蒋素华, 白冰洋, 牛苏燕, 等. 甘薯 G 病毒基因克隆及组培快繁苗病毒检测[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(24): 60–64.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.24.010

# 甘薯 G 病毒基因克隆及组培快繁苗病毒检测

蒋素华<sup>1</sup>, 白冰洋<sup>2</sup>, 牛苏燕<sup>1</sup>, 邵作峰<sup>3</sup>, 梁芳<sup>1</sup>, 袁秀云<sup>1</sup>, 崔波<sup>1</sup>

(1. 郑州师范学院生物工程研究中心, 河南郑州 450044; 2. 漯河田康农业发展有限公司, 河南漯河 462000;

3. 河南省南召县城关镇政府农业服务中心, 河南南召 474650)

**摘要:**为了脱除甘薯 G 病毒, 获得优良的脱毒甘薯种苗, 提高甘薯的质量和产量, 根据 NCBI 上已报道的甘薯 G 病毒外壳蛋白基因序列设计引物, 用 RT-PCR 克隆了商薯 19 叶片 G 病毒外壳蛋白基因序列。测序结果显示, 获得的 G 病毒外壳蛋白基因为 800 bp, 与报道的基因序列同源性达 99%。经过茎尖脱除病毒和组织快繁技术发现, 商薯 19 芽诱导的最适培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA; 苗增殖的最佳培养基为 1/2 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 2.0 g/L 椰汁水; 根诱导的最适培养基为 1/2MS + 0.5 mg/L NAA。经过 PCR 检测, 商薯 19 中确实存在 G 病毒, 经过茎尖脱除病毒后, G 病毒的脱毒率达到 83%。这为获得甘薯脱毒苗及甘薯病毒检测提供了实践操作的依据。

**关键词:**甘薯; G 病毒; 基因克隆; 病毒检测; 组培快繁苗

**中图分类号:**S531.01; S531.043

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2021)24-0060-04

甘薯种植作为我国覆盖范围较为广泛的农作物生产类型, 在我国南北地区均有发展, 病毒病在我国各个甘薯种植区快速大范围的蔓延, 对甘薯质量和产量造成了巨大的损失<sup>[1-4]</sup>。在传统种植模式中, 由于缺乏对种薯块根内病毒的有效处理技术, 导致我国甘薯生产效益不同程度地降低, 近几年甘薯脱毒技术虽不断改进和发展, 但是真正能用于实际生产并且大面积使用的脱毒技术还未见报道。因缺乏可大范围推广的脱毒技术, 故甘薯脱毒技术及脱毒甘薯种植仍处于初步发展阶段, 还无法在全国推广。

甘薯 G 病毒 (SPVG) 属于马铃薯 Y 病毒属病毒, 是单链的 RNA 病毒, 对主要侵染的甘薯病毒 SPFMV 和 SPCSV 有很重要的协同作用<sup>[5-6]</sup>。马铃薯 Y 病毒属基本都有一个高度保守的区域, 即 DAG (Asp-Ala-Gly) 三联体, 它在病毒外壳蛋白 (CP) 的 N-末端<sup>[7]</sup>。甘薯 G 病毒序列保守性特点为采用 RT-PCR 的方法检测 G 病毒提供了方便。甘薯

是通过营养体繁殖的, 病毒极易传递给后代<sup>[8]</sup>。迄今为止, 国内外尚未培育出高抗病毒的实用甘薯品种或者能抵抗病毒侵染的高效农药<sup>[9]</sup>。多年来, 海内外的专家学者都致力于探讨高效的甘薯脱毒方法<sup>[10-13]</sup>。伴随着组织培养技术的发展, 利用茎尖进行甘薯脱毒, 为甘薯植株脱毒提供了一条新途径, 成为无毒甘薯生产的首要方法<sup>[14-16]</sup>。但茎尖组培快繁技术要求高, 难度较大, 再生植株的分化受甘薯品种、培养基成分等因素的影响, 导致成苗率不高, 于是探究最高效的甘薯茎尖分生组织培养方法很有必要。本研究采用 RT-PCR 的方法从商薯 19 叶片中克隆出 G 病毒外壳蛋白基因, 建立了一套甘薯 G 病毒检测体系, 并利用组织培养快繁技术, 探讨不同植物生长激素组合对商薯 19 茎尖的诱导、分化、增殖以及生根的影响, 为推广商薯 19 脱毒苗和高效病毒检测方法提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 甘薯样品、菌株和载体

商薯 19 于 2020 年 8 月取自郑州师范学院新沟村试验田。菌株 DH5 $\alpha$  (大肠杆菌), 克隆载体 pMD19-T Vector, 均购于 TaKaRa 公司。

### 1.2 试剂

dNTP、DNA marker 均购自 TIANGEN 公司; 反转录酶、RNA 酶抑制剂、rTaq 酶购自 TaKaRa 公司; 其他为国产纯化试剂。

收稿日期: 2021-04-23

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (编号: 21B210011、21A210029); 河南省科技攻关计划 (编号: 202102110167); 河南省科技特派员经费项目。

作者简介: 蒋素华 (1983—), 女, 河南漯河人, 硕士, 副教授, 主要从事花卉分子生物学研究。E-mail: jiangsuhua2006@163.com。

通信作者: 崔波, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: laocuibo@163.com。

1.3 引物的设计与合成

从 NCBI 下载 G 病毒基因的核苷酸序列,利用 Primer 5.0 生物软件以及 DNAMAN 软件设计 1 对引物: GC PF, GCAGGAAAAACAGGAAACAC; GCPR, TG TAGACCATACCTCGGCAT。

1.4 商薯 19 叶片总 RNA 提取及目的基因克隆

取 0.1 g 商薯 19 叶片,在液氮中迅速研磨成粉末,提取总 RNA,鉴定完整性。

以商薯 19 叶片总 RNA 为模板,利用 M - MLV 反转录酶合成单链 cDNA。

以单链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应,回收甘薯 G 病毒目的片段,PCR 产物进行电泳检测,利用 DNA 回收试剂盒获取 G 病毒目的基因。

1.5 目的基因的连接、转化及阳性克隆测序

将所获取的目的基因与 pMD19 - T 载体进行连接,转化 DH5 $\alpha$ ,PCR 扩增,电泳检测确定为阳性的单克隆,送到上海英骏生物技术有限公司测序,并与数据库核酸序列进行比较。

1.6 脱毒苗快繁体系的建立

1.6.1 无菌芽的获得 以健壮、无病斑商薯 19 薯块为材料,用 1% 高锰酸钾处理 15 min,再用 0.5% 多菌灵浸泡 1 h,捞出晾干后置于灭菌水(0.1% 多菌灵)中在恒温(28  $^{\circ}$ C)和相对湿度 80% ~85% 条件下进行催芽。待薯芽萌发后,在 35 ~40  $^{\circ}$ C (8 h/d) 下培养 30 d。当薯芽长至 10 cm 左右时,用无菌解剖刀切下顶部约 3 cm 芽段,剪去多余的叶片,放入烧杯灭菌消毒后,利用 3 种不同消毒方法(表 1)进行处理,进行无菌播种。

表 1 不同消毒方法对茎尖成活率的影响

处理	表面消毒方法	接种数 (个)	污染数 (个)	污染率 (%)	成活率 (%)
A	0.1% 氯化汞灭菌 6 ~7 min	80	9	11.25	91.25
B	0.1% 氯化汞灭菌 4 min	80	15	18.75	83.50
C	10% 次氯酸钠灭菌 20 min	80	22	27.50	68.75

1.6.2 茎尖培养 切取茎尖顶端(约 1 cm),用已消毒的解剖刀在 40 倍解剖镜下切除较大的叶原基,用解剖针切下位于茎尖顶端的生长点。每个培养皿中分别接种 3 ~4 个。分别用 3 种培养基进行培养,编号 A1、A2、A3,所用培养基及生长状况见表 2。

1.6.3 苗的增殖 茎尖 30 d 后可分化出苗,然后进行增殖培养,分别采用 3 种不同的培养基进行培养,编号 B4、B5、B6,每个培养瓶中接种 3 ~5 个,所用培养基及增殖状况见表 3。

表 2 不同培养基对比对茎尖诱导的影响

编号	培养基	愈伤组织形成情况	诱导率 (%)
A1	MS + 1.0 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L NAA	愈伤组织形成快,绿色紧实	98.50
A2	MS + 0.5 mg/L KT	愈伤组织形成较快,黄绿色松散	92.25
A3	MS	愈伤组织形成慢,黄绿色紧实	70.50

表 3 不同培养基对比对苗的增殖的影响

编号	培养基	苗的生长情况	增殖率 (%)
B4	1/2 MS + 1.0 mg/L 6 - BA + 2.0 g/L 椰汁水	生长快,健壮,叶大而绿	98.5
B5	MS + 1.0 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L NAA	生长快,较壮,多数叶黄绿	92.0
B6	MS + 0.5 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L NAA	生长慢,较弱,叶变黄	86.5

1.6.4 脱毒苗根的诱导 在无菌条件下,将无菌苗剪切成带有 1 叶 1 节的小段,诱导生根。采用 3 种不同的培养基进行生根诱导,编号 C7、C8、C9,每组所用培养基配比不同,所用培养基及根诱导情况见表 4。

表 4 不同培养基对比对根诱导的影响

编号	培养基	生根情况	生根率 (%)
C7	1/2MS + 0.5 mg/L NAA	粗壮,平均生根 7 条	98.50
C8	1/2MS + 0.3 mg/L NAA	粗短,平均生根 6 条	90.50
C9	MS	细长,平均生根 3 条	87.25

1.7 病毒检测

当茎尖幼苗长至 6 ~ 7 张叶片时,进行 RT - PCR 病毒检测,挑取 6 株长势较好的商薯 19 幼苗,编号为 1、2、3、4、5、6,分别提取总 RNA,检验完整性,以总 RNA 为模板合成单链 cDNA,PCR 扩增,产物经电泳检测目的条带。已经成功脱毒的幼苗可进行快速繁殖生产,将未脱毒的幼苗淘汰或进行茎尖分生组织培养再次脱毒。

2 结果与分析

2.1 G 病毒基因的克隆

2.1.1 提取总 RNA RNA 检测结果如图 1 所示。28S、18S、5S 条带均存在,28S 约为 18S 亮度的 2 倍,说明商薯 19 叶片中 RNA 完整性很好,能够满足基因克隆的要求。

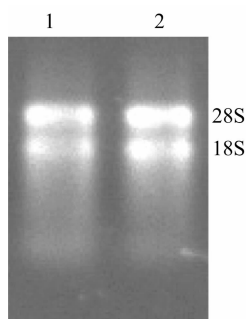


图1 总 RNA 电泳结果

2.1.2 目的基因克隆及检测 利用 RT-PCR 从商薯 19 叶片总 RNA 中扩增出目的片段(图 2)。对其进行回收、连接、转化、PCR 检测、测序,得到 800 bp 的 DNA 序列,与 NCBI 发表的序列相似度达到 99%,说明已经获得 G 病毒基因序列。

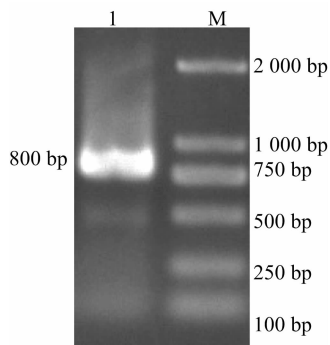


图2 RT-PCR 检测结果

## 2.2 甘薯脱毒苗组培快繁

### 2.2.1 不同表面消毒方法对茎尖成活率的影响

由表 1 得出,外植体以处理 A 效果最佳,处理 B 的效果次之,处理 C 的效果最差。可见,氯化汞的灭菌效果比次氯酸钠较好,将处理 A 和处理 B 对比发现,0.1%氯化汞灭菌时间对茎尖成活率也有一定的影响。综合不同的灭菌方法的结果来看,最佳选择是处理 A。

2.2.2 茎尖诱导 外植体茎尖接种 25 d 后观察其诱导情况,在加入 6-BA 和 NAA 组合的培养基中,无菌芽尖形成绿色紧实的愈伤组织,容易分化出芽(图 3);在加入激素 KT 的培养基中,无菌芽尖形成黄绿色松散的愈伤组织,不容易分化出芽,说明 KT 的茎尖诱导效果不好;在不加激素的 MS 培养基中,无菌芽尖形成少量的愈伤组织,且需要的时间长,说明茎尖诱导需要加入一定量的激素,茎尖诱导的最佳培养基为 1 号。

2.2.3 苗的增殖 茎尖愈伤组织 15 d 后即可分化出成苗(图 4),30 d 后长出 6~7 张叶片(图 5)。从

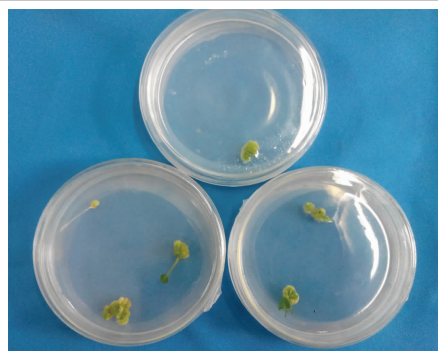


图3 茎尖诱导

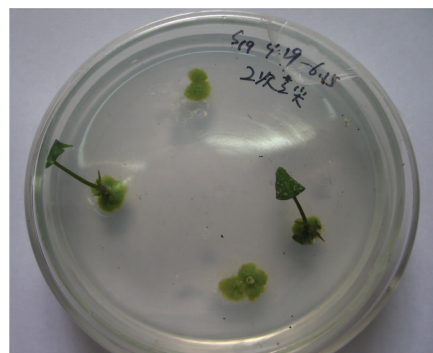


图4 茎尖分化



图5 增殖培养

3 种培养基的增殖情况可知,6-BA 可有效诱导苗的增殖,但较低浓度的效果不佳,6-BA 与 CW 的组合效果最佳,6-BA 与 NAA 的组合不利于叶的生长,综合 3 种培养基中苗的长势来看,适宜增殖的最佳培养基为 4 号培养基,苗生长快,健壮,叶绿。

2.2.4 生根培养 试验表明,NAA 有利于单茎苗的诱导生根,浓度稍高的 NAA 效果更好。综合 3 种不同培养基中多数幼苗的生根情况来看,诱导生根培养基的最佳选择为 7 号,生根多而且健壮,有利于后期整棵植株的营养供应(图 6)。

### 2.3 病毒检测

检测结果(图 7)显示,6 株商薯 19 幼苗叶片的



图6 生根培养

总 RNA 完整性很好。单链 cDNA 经 PCR 扩增及电泳检测结果见图 8, 编号为 1、2、3、4、5 的植株均无目的基因条带, 说明均已脱毒成功, 6 号有明显的 G 基因条带, 说明脱毒未成功, G 病毒脱毒率达到 83%。已经脱毒的商薯 19 幼苗可以进行脱毒苗快速繁殖培养, 将未脱毒的幼苗淘汰或继续脱毒。

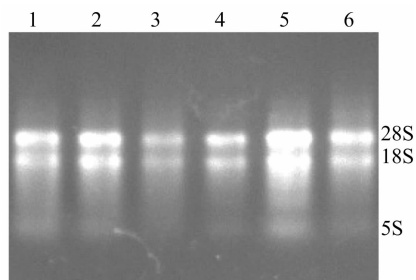


图7 病毒检测总 RNA 提取电泳图

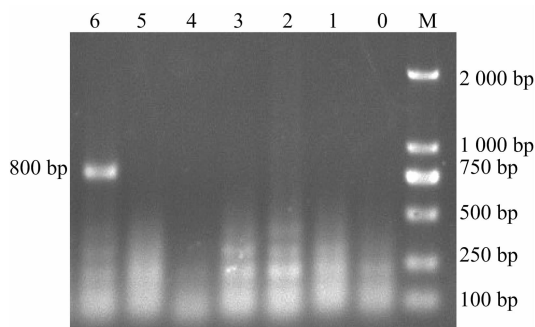


图8 病毒检测 RT-PCR 电泳图

### 3 讨论与结论

茎尖分生组织培养技术是当前获取和培养脱毒苗的主要手段<sup>[17-18]</sup>。本研究以商薯 19 的茎尖为外植体, 通过建立 RT-PCR 病毒检测体系, 筛选出成功脱毒的幼苗, 并初步建立了甘薯的脱毒苗组培快繁体系。本试验选取的研究对象是商薯 19, 建立了 G 检测方法和脱毒苗快繁体系。试验表明, 在商薯 19 茎尖表面消毒过程中发现, 以 0.1% 氯化汞灭

菌 6~7 min 为宜, 低于 6 min 外植体容易发生不同程度的污染, 高于 7 min 外植体容易死亡, 且 0.1% 氯化汞灭菌效果好于 10% 次氯酸钠。由于氯化汞属于重金属, 使用过的氯化汞应做特殊处理<sup>[19]</sup>。

脱毒苗快繁技术的关键在于剥离的茎尖进行诱导分化, 在培养基中加入适量的 6-BA 和 NAA 有利于芽的诱导分化, 但要注意浓度应适中, 过高或过低都不利于甘薯茎尖的诱导分化<sup>[19]</sup>。

在病毒检测过程中, 应选取长势较好的商薯 19 幼苗来检测其脱毒是否成功, 因为脱毒成功的幼苗要进行脱毒苗快速繁殖, 所以要选取长势较好的幼苗, 以便后代能遗传得到优良的性状, 达到提高产量和质量的目的。

脱毒苗快速繁殖利用单茎苗来进行, MS 培养基和 1/2MS 培养基是适合商薯 19 生根的基本培养基, 在培养基中加入适量的 NAA 有利于单茎苗诱导生根, 并且生出的根粗壮, 有利于后期成苗的营养吸收<sup>[19]</sup>。

在将茎尖分化出的苗从培养皿移植到培养瓶中时, 要注意轻轻夹取, 避免用力过猛而损伤茎和叶<sup>[20-21]</sup>。同时试验要在乙醇灯旁操作, 避免空气中的细菌污染培养基及茎尖分化组织, 此外, 操作时动作要快, 避免乙醇灯热量灼伤茎尖分化组织。

#### 参考文献:

- [1] 杨彩霞, 张帅宗, 孙蓬蓬, 等. 甘薯曲叶病毒的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(1): 298-301.
- [2] IsHak J A, Kreuze J F, Johansson A, et al. Some molecular characteristics of three viruses from SPVD-affected sweet potato plants in Egypt[J]. Archives of Virology, 2003, 148(12): 2449-2460.
- [3] Okada Y, Saito A, Nishiguchi M, et al. Virus resistance in transgenic sweetpotato [*Ipomoea batatas* L. (Lam)] expressing the coat protein gene of sweet potato feathery mottle virus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(5): 743-751.
- [4] 游春平, 陈炳旭. 我国甘薯病害种类及防治对策[J]. 广东农业科学, 2010, 37(8): 115-119.
- [5] 古英洪, 汤浩茹, 张义正. 甘薯 G 病毒外壳蛋白基因克隆与序列分析[J]. 中国农学通报, 2006, 22(9): 50-55.
- [6] 刘起丽. 中国甘薯双生病毒种类鉴定、分子变异及检测方法研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015, 10-22.
- [7] 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.
- [8] Valverde R A, Sim J, Lotrakul P. Whitefly transmission of sweet potato viruses[J]. Virus Research, 2004, 100(1): 123-128.
- [9] Awais Z, Ren H, Zhang J, et al. Molecular characterization of two isolates of sweet potato leaf curl virus infecting *Ipomoea indica* in

刘 芬,屈 成,方希林,等. 激动素处理对盐胁迫下水稻种子萌发和幼苗生长特性的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(24):64-69.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.24.011

# 激动素处理对盐胁迫下水稻种子萌发和幼苗生长特性的影响

刘 芬<sup>1</sup>, 屈 成<sup>2</sup>, 方希林<sup>3</sup>, 孙 琴<sup>1</sup>, 肖建平<sup>1</sup>

(1. 怀化职业技术学院, 湖南怀化 418000; 2. 湖南生物机电职业技术学院, 湖南长沙 410127; 3. 湖南农业大学农学院, 湖南长沙 410128)

**摘要:**为研究激动素浸种对盐胁迫下水稻种子萌发和幼苗生长的影响,以常规稻湘早粳 45 号为试验材料,预先用 0.2%、0.8% 和 1.5% NaCl 浸种,通过计算种子萌发指标,研究激动素对 0.8% NaCl 胁迫下种子萌发及幼苗生长特性的影响。结果表明,0.8% 和 1.5% NaCl 胁迫会显著降低水稻种子萌发指标。在 0.8% NaCl 胁迫下,1、10、100 mmol/L 激动素处理可以明显缓解 NaCl 胁迫的伤害,提高种子的发芽势、发芽率、发芽指数和萌发指数,促进水稻幼苗生长,其中以 10 mmol/L 激动素处理效果最佳,使水稻幼苗株高、根长、茎基宽、倒二叶叶长、幼芽鲜质量、幼根鲜质量和幼芽含水量分别提高 10.48%、10.42%、4.80%、24.77%、33.33%、30.00% 和 15.93%。通过灰度关联分析,发芽率、发芽指数、活力指数、倒二叶叶长和幼芽干质量等指标能敏锐地反映出激动素对盐胁迫的缓解作用。本研究结果可为水稻抗逆性研究提供一定的理论依据。

**关键词:**激动素;水稻;种子萌发;盐胁迫;幼苗;生长特性

**中图分类号:**S511.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)24-0064-06

近年来,随着工业化、信息化和现代农业的深入推进,以及人们长期以来农药化肥的不合理使用,导致全球土壤酸化、盐渍化等问题日益突出。

收稿日期:2021-06-17

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0301501);国家自然科学基金(编号:31971923、31301650);湖南省教育厅科学研究课题(编号:20C1503)。

作者简介:刘 芬(1993—),女,湖南益阳人,硕士,助教,主要从事水稻高产栽培研究。E-mail:liufen410@163.com。

通信作者:肖建平,硕士,副研究员,主要从事水稻种子资源创新与育种研究。E-mail:15874555885@163.com。

据统计,世界盐碱地面积达 9.5 亿  $\text{hm}^2$ ,其中我国土壤盐碱化面积约达 3 600 万  $\text{hm}^2$ ,占全国可利用土地面积的 4.88%,严重制约全球农业的生产与发展,特别是制约了水稻等主要粮食作物的生产<sup>[1]</sup>。盐渍化的土壤中离子浓度增加,盐浓度足够高时会改变土壤环境中的水势,使土壤渗透势降低<sup>[2]</sup>。盐胁迫会扰乱植物细胞内正常的生理生化反应,使植物细胞内离子代谢紊乱,对植物造成一定的损伤,如细胞膜的结构受损,造成细胞内活性氧的大量积累,从而影响植物的生长发育<sup>[3-4]</sup>。研究表明,植物种子在萌发阶段对盐胁迫最敏感<sup>[5]</sup>。在盐渍化环

China[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(45):9061-9067.

[10] Luan Y S, Zhang J, An L J. First report of sweet potato leaf curl virus in China[J]. Plant Disease, 2006, 90(8):1111.

[11] 张成玲,赵永强,孙厚俊,等. 甘薯卷叶病毒复制相关蛋白部分基因克隆及分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2):298-303.

[12] 乔贞贞,秦艳红,乔 奇,等. 甘薯卷叶病毒江苏分离物基因组全长序列测定及其外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达[J]. 河南农业科学, 2012, 41(4):86-89.

[13] 王碧琴,盖安俊. 紫色甘薯茎尖脱毒与快繁及试管苗移植技术研究[J]. 江西科学, 2010, 28(2):196-198, 202.

[14] 宋吉轩,陈 超,李 云,等. 甘薯病毒病脱毒及检测[J]. 河北农业科学, 2009, 13(9):29-30.

[15] 王 丰. 甘薯病毒病脱毒技术及检测[J]. 植物检疫, 2003, 17

(5):295-298.

[16] 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.

[17] 李怀情,牛力立,赵佐敏,等. 紫云甘薯组培脱毒及离体快繁技术研究[J]. 种子, 2014, 33(10):131-132, 134.

[18] 秦 梅,张 燕,徐美恩,等. 甘薯茎尖脱毒及组培快繁技术[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(32):11238-11239, 11258.

[19] 王 颖. 甘薯高产栽培茎尖组培快繁方法[J]. 乡村科技, 2018(13):96-98.

[20] 何凤发,王季春,张启堂,等. 甘薯茎尖脱毒与快速繁殖技术研究[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(6):509-511, 528.

[21] 张先云,李长看,袁秀云. 甘薯高效再生体系的建立[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(13):6666-6667, 6678.