

# 茎尖脱毒生姜组培苗病原检测研究

黄 科, 刘奕清, 陈泽雄, 唐建民

(重庆文理学院 花卉研究所, 重庆特色植物种苗工程技术研究中心, 重庆 永川 400210)

**摘 要:**利用 PCR 技术及扫描电镜技术对茎尖脱毒生姜组培苗进行病原检测。用细菌 16S rRNA 通用引物对生姜组培种苗根部和固体培养基混合提取的基因组 DNA 作为模板进行 16S rRNA 扩增, 不能扩增出 16S rRNA; Trizol 提取生姜组培苗根部和茎段 RNA 经凝胶电泳检测无明显 RNA 目的条带; 生姜组培苗茎段组织经扫描电镜观察组培苗茎段中无呈球形、杆状、卵圆形、丝状、冠状及蝌蚪形等规则形状的病毒颗粒, 只见表皮、微管等组织。研究认为, PCR、RT-PCR 和扫描电镜是茎尖脱毒生姜组培苗病原检测的有效手段。

**关键词:**茎尖脱毒; 组织培养; 细菌; 病毒

**中图分类号:**S 632.503.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)08-0148-03

生姜属于多年生单子叶草本植物, 为无性繁殖植物。具有重要的药用和食用价值, 易栽培、产量高、利润丰厚, 是重要的出口创汇农业产品, 在我国大部分地区均可种植。生姜在长期的营养过程中, 积累了多种病原, 导致其品质下降、抗逆性差、产量低。通过培养植物分生组织或愈伤组织也许可以去除植物中已感染的病毒, 因为在分生组织中病毒的滴度很低或根本不含病毒<sup>[1]</sup>。运用这一技术虽已成功获得了许多脱毒品种, 但并不是所有植物的分生组织培养都能完全的去感染所感染的病毒<sup>[2]</sup>, 因此必须用严谨的方法检测脱毒的再生植株脱毒是否完全。再生植株培养的每一过程, 以及再生植株的大规模培养都需要严格的病毒检测, 防止再生植株脱毒未完或组织培养过程中引入新的病原。茎尖脱毒组培苗特别是工厂化育苗技术需要快速、灵敏的检测方法去除茎尖脱毒未完全或在培养过程中感染新病原的种苗, 以免在继代培养中扩大污染。现以生姜茎尖脱毒组培快繁为基础<sup>[3]</sup>, 形成工厂化育苗技术<sup>[4]</sup>, 利用 PCR 技术检测细菌 16S RNA, 检测茎尖脱毒组培苗中的病毒 RNA 以及生姜生产过程中易感染的烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus) 衣壳蛋白基因及黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus) 衣壳蛋白基因。并通过扫描电镜对生姜组培苗茎段进行直观的观察。通过以上技术

检测茎尖脱毒生姜组培苗是否携带病原, 为茎尖脱毒组培苗提供快速、特异、直观、准确、精准的检测技术, 以利于组培脱毒种苗的产业化生产。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

生姜组培苗由重庆文理学院花卉研究所、重庆市特色植物种苗工程技术研究中心研发并保存。主要酶类: DNA 聚合酶购于 Promega 公司; 土壤 DNA 基因组试剂盒购于 Omega 公司; RNA 抽提试剂盒 Trizol 购于 Invitrogen 公司; M-MLV 反转录试剂盒购于 Promega 公司; 扩增引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 生姜组培苗脱病原菌分子检测 利用土壤 DNA 基因组试剂盒提取茎尖脱毒生姜组培苗、培养基中可能存在的细菌基因组 DNA。称取 0.3 g 组培种苗根部用液氮研磨, 将粉末转移至预热 A 液, 用涡旋振荡器振荡处理; 称取 0.3 g 培养基于预热 A 液中使其充分溶化, 65℃ 水浴中保温至少 5 min, 13 000 r/min 离心 5 min, 350  $\mu$ L 上清液转移至一新离心管中, 加入等体积的溶液 B 充分混匀, 冰浴 5 min, 13 000 r/min 室温离心 5 min, 上清液转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 200  $\mu$ L 的氯仿, 振荡 30 s, 13 000 r/min 室温离心 5 min, 上清液转移至新离心管中, 加入 2 倍体积无水乙醇混匀, 15 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 1 mL 75% 乙醇洗涤, 干燥, 产物加入 20  $\mu$ L 的 TE 缓冲液溶解。利用细菌 16S rRNA 通用引物 8F (5'-AG AGT TTGATCCTGGCT-CAG-3') 和 1512R (5'-A CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3'), 以提取物为基因组 DNA 模板, 进行 16S rRNA 扩增。扩增体系为 ddH<sub>2</sub>O 17.5  $\mu$ L, 10× Buffer

**第一作者简介:**黄科(1980-), 男, 博士, 讲师, 现从事植物生理学研究工作。E-mail: shanbnm@126.com。

**责任作者:**刘奕清(1966-), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 现从事园林植物方向研究工作。E-mail: liung906@163.com。

**基金项目:**重庆市委重点攻关资助项目(CSTC, 2009AB1077); 重庆市永川区科委重点攻关资助项目(YCSTC, 2008AC1001)。

**收稿日期:**2011-01-18

2.5  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTP 1.5  $\mu\text{L}$ , 8F 引物 0.5  $\mu\text{L}$ , 1512R 引物 0.5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 总 DNA 1  $\mu\text{L}$ 。95℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min 20 s, 30 个循环后延伸 10 min。取 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后紫外分析检测。

**1.2.2 生姜组培种苗脱病毒分子生物学检测** 分别取 0.5 g 生姜组培苗根部和茎段放入用液氮预冷的研钵中, 加入液氮后快速磨成粉末状, 转移至 1.5 mL 无 RNase 的离心管中, 按 0.1 g 组织样品加入 1 000  $\mu\text{L}$  Trizol (充分摇匀), 室温放置 10 min。12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min。取上清液至 1.5 mL 离心管。加氯仿 200  $\mu\text{L}$ , 轻轻摇匀, 静置 5 min。10 000 r/min, 4℃ 离心 10 min 后, 取上清液至 1.5 mL 离心管。加 2 倍体积异丙醇, 轻轻摇匀, 静置 10 min。12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min。弃上清液, 加 75% 乙醇 1 000  $\mu\text{L}$ , 洗涤提取物, 干燥。用 50  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解提取物并电泳检测。利用 M-MLV 反转录试剂盒对提取 RNA 进行 cDNA 第一链合成。分别用黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus) 衣壳蛋白基因 (BB8 coat protein gene, HM015286.1) 和烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus) 衣壳蛋白基因 (699-07 coat protein gene, GQ340671) 设计特异引物: CMVF: 5' ATGGACAAATCTGAATCAACC 3', CMVR: 5' TAAGCTGGATGGACAACCCGT 3'; TMVF: 5' TTCTTGTCATCAGCGTGGGC 3', TMVR: 5' AAGTTGCAGGACCAGAGGTCCA 3', 以 cDNA 模板进行烟草花叶病毒衣壳蛋白基因和黄瓜花叶病毒衣壳蛋白基因进行扩增。10  $\mu\text{L}$  PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外分析检测。

**1.2.3 生姜组培种苗扫描电镜检测** 取生姜组培苗茎段组织放在用 2% 戊二醛预冷的玻璃板上, 将样品切成约 5 mm × 5 mm, 高约 4 mm 的大小; 样品经清洗、固定、脱水、干燥、导电处理后用扫描电镜观察。扫描电镜观察在第三军医大学中心实验室完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌 16S rRNA 扩增

利用细菌 16S rRNA 通用引物 8F (5'-AG AGT TT-GATCCTGGCTCAG-3') 和 1512R (5'-A CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3'), 对混合提取的生姜组培苗和培养基 30 个基因组 DNA 模板及大肠杆菌标准菌株基因组 DNA, 进行 16S rRNA 扩增, 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物电泳检测, 结果表明, 以生姜组培种苗根部和固体培养基为混合物提取的基因组 DNA 作为模板, 利用 16S rRNA 通用引物, 不能扩增出 16S rRNA, 而大肠杆菌标准菌株基因组能扩增出 16S rRNA, 这一结果表明, 生姜组培苗可

能不含病原菌 (图 1)。

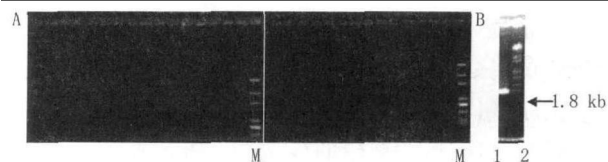


图 1 生姜组培苗细菌 16S rRNA PCR 扩增结果

注: A: 混合基因组扩增结果, M: DL 2000 Marker B: 大肠杆菌标准菌株基因组扩增结果, 1: 大肠杆菌标准菌株 16S rRNA 扩增结果, 2:  $\lambda$ -EcoT14 Marker

### 2.2 病毒衣壳蛋白扩增

Trizol 提取生姜组培苗根部和茎段 RNA 经凝胶电泳检测, 电泳没有检测到明显的 RNA 目的条带 (图 2)。提取的 RNA 经 M-MLV 反转录后作为模板, 分别以烟草花叶病毒和黄瓜花叶病毒衣壳蛋白基因特异引物进行扩增, PCR 产物经电泳检测, 结果表明, 2 种病毒衣壳蛋白基因均未得到阳性结果 (图 2)。根据 RNA 电泳检测结果及病毒衣壳蛋白基因扩增结果, 表明该试验中的生姜组培苗含病毒的机会较小, 特别是生姜种植过程中易感染的烟草花叶病毒和黄瓜花叶病毒。

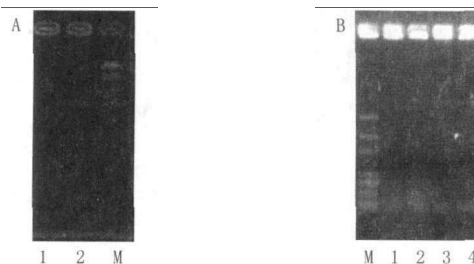


图 2 生姜组培苗中病毒分子生物学检测

注: A 生姜组培苗根部和茎段病毒 RNA 提取, 1 根部病毒 RNA 提取, 2 茎段病毒 RNA 提取, M:  $\lambda$ -EcoT14 Marker。B 病毒衣壳蛋白基因 PCR 扩增结果, 1 黄瓜花叶病毒衣壳基因根部扩增, 2 黄瓜花叶病毒衣壳基因茎段扩增, 3 烟草花叶病毒衣壳基因根部扩增, 4 烟草花叶病毒衣壳基因茎段扩增, M DL2000 Marker。

### 2.3 生姜组培种苗的扫描电镜检测

扫描电镜观察结果表明, 在组培苗茎段中基本无球形、杆状、卵圆形、丝状、冠状及蝌蚪形等规则形状的病毒颗粒, 而是清晰可见的表皮、微观组织等结构 (图 3)。

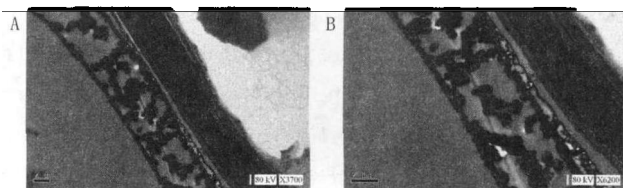


图 3 生姜组培苗茎段组织扫描电镜结果

## 3 讨论

目前, 植物感染的病毒及细菌的检测方法主要有生物学、血清学、分子生物学技术及电镜技术。生物学检

测方法的优点是简单、灵敏,仅需将少许属主病毒接种到指示植物,但缺点是受病毒滴度、环境和时间限制,病原确定的周期也较长。当前,血清学及分子生物学技术被认为是现代生物技术对病原检测最为适当的技术,特别是进行高通量、大规模的检测<sup>[5]</sup>。随着血清学检测技术的发展,特别是 ELISA 技术应用于病原检测,使病原检测取得了突破性的进展。但血清学检测方法也存在一定的缺点,不能在病毒发生的早期检测,受到病毒滴度的限制,此外血清学检测还受到抗体特异性的限制,此增加了检测的成本。以核酸为基础的 PCR 检测方法具有灵敏、特异、简单、快速、万能的特点,并且在属主的发病早期即能检测病原,在防治属主的进一步发病方面具有优势<sup>[6]</sup>。运用电镜技术则能直接观测病毒的形态大小,甚至病毒的浓度<sup>[7]</sup>,而超薄切片技术与扫描电镜技术的联用,可将感染病毒准确的定位于属主细胞或组织<sup>[5]</sup>。试验利用 PCR 技术对茎尖组培生姜种苗及培养基进行细菌 16S rRNA 检测,茎尖组培生姜种苗和培养基混合基因组不能扩增出 16S rRNA,而大肠杆菌标准菌株基因组能扩增出 16S rRNA,表明利用茎尖脱毒的组培技术培养的种苗可能不含细菌。参照辣椒、黄瓜花叶病毒 RNA 提取步骤<sup>[8]</sup>,用 Trizol 试剂提取茎尖组培生姜苗茎段 RNA,提取的 RNA 经电泳检测后无明显的 RNA 条带。利用 RT-PCR 检测黄瓜花叶病毒衣壳蛋白基因和烟草花叶病毒衣壳蛋白基因,PCR 产物电泳检测后也无目的条带。RNA 和衣壳蛋白基因检测结果皆为阴性,这一结果表明,茎尖生姜组培苗可能完全脱毒。运用超薄切片和扫描电镜技术联用直接观察茎段组织,茎段组织中无明显的球状、杆状、螺旋体及丝状的细菌及真菌存在<sup>[9]</sup>,也没有呈球形、杆状、砖形、冠状及蝌蚪形

等规则形状的病毒颗粒<sup>[10]</sup>,此外,生姜种植过程中易感染的烟草花叶病毒在电镜观察下为杆状<sup>[7]</sup>,黄瓜花叶病毒用醋酸铀染色后用扫描电镜观察为圆形<sup>[11]</sup>,且单个病毒形态表面为规则的六面体或五面体<sup>[12]</sup>。茎尖脱毒组培苗经微量、精准的 PCR、RT-PCR 及直观、准确的扫描电镜检测结果表明,茎尖脱毒的再生植株可能完全脱毒。

### 参考文献

- [1] Wang P, Hu C. Regeneration of virus-free plants through in vitro culture[J]. *Advances in Biomedical Engineering*, Volume 1980, 18: 61-99.
- [2] Dixon R A, Gonzales R A. Plant cell culture: a practical approach[M]. Oxford University Press, USA, 1994.
- [3] Sharma T R, Singh B M. High-frequency in vitro multiplication of disease-free Zingiber officinale Rosc[J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 17(1): 68-72.
- [4] 刘奕清, 陈泽雄, 吴中军. 生姜脱毒种苗移栽基质筛选及肥水调控研究[J]. *北方园艺*, 2010(2): 36-37.
- [5] López M M, Bertolini E, Olmos A, et al. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria[J]. *International Microbiology*, 2003, 6(4): 233-243.
- [6] Capote N, Bertolini E, Cambra M. Using RT-PCR for plant RNA virus detection[J]. *CAB international*, 2009, 53(4): 1-17.
- [7] Brenner S, Horne R W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1959, 34: 103-110.
- [8] 王飞, 姚明华. 辣椒黄瓜花叶病毒 RNA 提取及 RT-PCR 体系建立[J]. *湖北农业科学*, 2009(4): 776-777.
- [9] 周德庆. 微生物教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995: 10-11.
- [10] 谢天恩, 胡志红. 普通病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 46-47.
- [11] Palukaitis P, Roossinck M J, Dietzgen R G, et al. Cucumber mosaic virus[J]. *Adv. Virus Res.*, 1992, 41: 281-348.
- [12] Wikoff W R, Tsai C J, Wang G, et al. The structure of cucumber mosaic virus cryoelectron microscopy, X-ray crystallography, and sequence analysis[J]. *Virology*, 1997, 232(1): 91-97.

## Study on Tip-free and Tissue-culture of Fresh Ginger's Pathogeny Detection

HUANG Ke, LIU Yi-qing, CHEN Ze-xiong, TANG Jian-min

(Institute of Flower, Chongqing University of Sciences and Arts, The Characteristics of Plant Seedlings Research Center of Chongqing, Yongchuan, Chongqing 400210)

**Abstract:** Tip-free and tissue-culture fresh Ginger were used polymerase chain (PCR) reaction technique and scanning electron microscopy technology to detect pathogeny. The admixture genome DNA extracted from tissue-culture fresh Ginger's roots and solid medium were used universal primer of 16s RNA to clone 16s RNA, the results indicated no target pills were detected. RNA which were extracted from tissue-culture fresh Ginger's stems and roots by trizol did not detect by Gel electrophoresis. Tissue-culture fresh Ginger's stems were used scanning electron microscopy (SEM) to observe, the results revealed that there had no global, staff, oval, filamentous, coronal, Tadpole shape and other regulation shape virus particle, only epidermis, microtubule tissue and other structure. The study presume PCR technique and scanning electron microscopy technology were effective way to detect pathogeny of Tip-free and Tissue-culture fresh Ginger.

**Key word:** stem-free; tissue culture; bacteria; virus