

半夏茎尖脱毒培养及病毒检测

王宝霞¹, 齐永红², 肖雅尹¹, 崔丽艳¹, 王德富^{1,*}, 牛颜冰^{1,*}

¹山西农业大学生命科学学院, 山西太谷030801

²山西省果业工作站, 太原030001

摘要: 以半夏(*Pinellia ternata*)茎尖为外植体, 研究不同生长调节物质浓度配比对半夏茎尖脱毒苗诱导效果的影响。在单因素试验基础上, 分别选取6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)和2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)三个最优诱导浓度设计 $L_9(3^2)$ 正交试验, 以确定茎尖愈伤组织诱导的最适培养基, 并利用分子生物学方法对脱毒苗进行病毒检测, 结果表明: 当6-BA浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 2,4-D浓度为 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织诱导率最高。正交试验得出诱导愈伤的最佳培养基配方为 $\text{MS}+1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂+ $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, 并可一次性成苗。该培养基所诱导的脱毒苗经斑点酶联免疫吸附法(DOT-ELISA)和反转录PCR检测后, 烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)和大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV)脱毒率均达到100%。

关键词: 半夏; 茎尖培养; 脱毒苗; 病毒检测

半夏(*Pinellia ternata*)为天南星科(Araceae)半夏属多年生草本植物, 主产于河南、湖北、贵州、四川、山西等地(郭巧生2007)。半夏以干燥块茎入药, 具有燥湿化痰、抗溃疡、降血脂、解毒等功效(曾伟权2015; 黄芳等2011)。近年来, 随着半夏人工种植规模不断扩大, 加之半夏主要通过块茎和珠芽进行营养繁殖, 在长期的无性繁殖过程中病毒会逐年积累, 导致半夏生产上病毒病危害愈发严重, 已对半夏产量和品质造成严重影响, 甚至造成种质退化。现已知对半夏危害最严重的病毒种类有烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)(刘文洪等2004)和大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV)(申屠苏苏2006)。目前, 关于病毒病害的防治还没有特别有效的治疗药物, 为了更好地开发、利用、保护种质资源, 开展半夏脱毒苗的培养工作尤为重要。

茎尖脱毒培养技术主要是利用植物茎尖分生组织生长速度快、病毒积累效率低的特性, 在无菌环境下, 通过光学显微镜将茎尖消毒后剥离, 脱去根茎以及含病毒、细菌性病害、真菌等残渣部分, 随后将其接种于培养基中诱导愈伤组织, 继而转移至培养瓶中进行丛生芽分化, 最终生成无毒苗。目前利用该技术已获得甘薯(*Ipomea batatas*)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)、‘红富士’苹果(*Malus pumila* cv. Red Fuji)、北碚榕(*Ficus beipeiensis*)等多种植物无毒苗(陈玉霞等2016; 朱娇等2017; 谢璇

等2015; 张艳玲等2015), 但有关半夏茎尖脱毒培养鲜有系统报道。

本研究通过不同生长调节物质水平正交试验和采用石蜡切片法对其愈伤组织进行细胞形态学观察, 筛选出适宜半夏茎尖分生组织一次性培养成苗的最佳培养基配方, 并利用斑点酶联免疫吸附法(dotenzyme-linked immunosorbent assay, DOT-ELISA)和反转录PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术进行半夏无毒苗病毒含量检测, 成功获得半夏无毒组培苗, 为半夏优质种苗再生体系的建立提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

半夏[*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.]块茎采自山西新绛县, 待其萌发后在超净工作台内进行消毒处理, 在光学显微镜下用解剖刀切取0.4~0.5 mm的三裂茎尖(图1)以备培养。

1.2 方法

1.2.1 不同生长调节物质单一水平对半夏愈伤组织的诱导

以 $\text{MS}+7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂+ $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖为基础培养基, 将上述剥离的茎尖接种于含不同浓度(0.3、0.8、

收稿 2018-09-04 修定 2018-10-09

资助 国家自然科学基金(31601612)。

* 共同通讯作者: 王德富(wanderful226@aliyun.com)、牛颜冰(niuyanbingbest@163.com)。

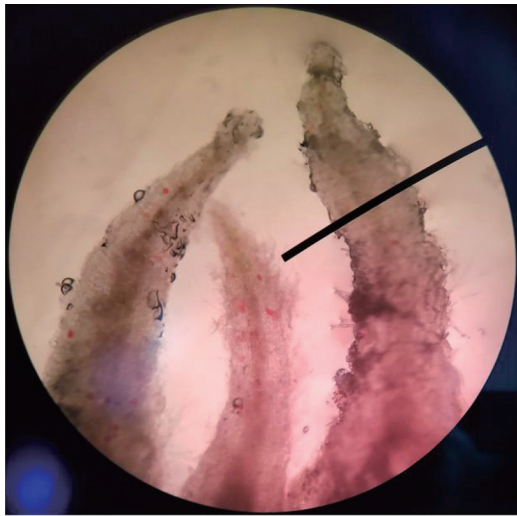


图1 三裂茎尖

Fig.1 Three-lobed stem tip

1.5、2.0、2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)或2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)的MS培养基, 培养30 d后进行愈伤诱导率的统计分析。每个激素处理接种5皿, 每皿接种6个茎尖。

1.2.2 6-BA和2,4-D不同水平对半夏愈伤组织的诱导

以1.2.1节试验结果为基础, 设置6-BA和2,4-D两个变量因素, 建立 $L_9(3^2)$ 正交试验表(表1), 每个处理接种6个培养皿, 每皿接种6个茎尖, 培养30 d后进行愈伤诱导率的统计分析。

1.2.3 茎尖愈伤组织细胞形态观察

参照李正理(1996)的方法对1.2.2节诱导形成的愈伤组织进行希夫试剂-爱氏苏木精(Schiff-Ehrlich)染色, 利用石蜡切片法对染色后的组织进行细胞结构形态观察。

1.2.4 DOT-ELISA检测

参照郑光宇等(1988)的方法并加以优化, 利用

表1 $L_9(3^2)$ 正交试验因素水平表Table 1 $L_9(3^2)$ orthogonal design of factors and levels

培养基编号	6-BA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2,4-D浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
A	0.6	1.8
B	0.6	2.0
C	0.6	2.2
D	1.2	1.8
E	1.2	2.0
F	1.2	2.2
G	1.5	1.8
H	1.5	2.0
I	1.5	2.2

DOT-ELISA对半夏脱毒组培苗进行病毒检测, 单克隆抗体为SMV、CMV和TMV。

1.2.5 RT-RCR检测

以脱毒组培苗为实验组, 田间感病半夏为阳性对照组, 健康半夏为阴性对照组, 取各组幼嫩叶片各0.1 g提取总RNA后进行反转录, 利用特异引物(SMV-CP-F: 5'-AGGCAAGGAAAAGGAAGGAGACA-3'; SMV-CP-R: 5'-GCCTTTCAGTATTTTCG-GAGTTGG-3'; CMV-CP-F: 5'-TCTATCACCTG-AAACCACCG-3'; CMV-CP-R: 5'-TGAAGTACCA-GCTCATCCGTCT-3'; TMV-CP-F: 5'-AAGAGTG-ATGTCCGCAAAG-3'; TMV-CP-R: 5'-TTCTAGTGT-CGAATGCACCTA-3')进行RT-PCR检测, 具体反应体系和程序参照牛颜冰等(2010)的方法。

2 实验结果

2.1 2,4-D或6-BA单因素处理对愈伤组织诱导的影响

以MS+7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂+30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖为基础培养基, 将三裂茎尖放置在添加不同浓度的2,4-D或6-BA培养基中进行愈伤的诱导。结果发现(表2), 随着2,4-D浓度增大, 愈伤组织诱导率也在增加, 当浓

表2 单一因素对半夏愈伤诱导率的影响

Table 2 Effect of single factor on the induction rate of callus of *P. ternata*

处理	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数	2,4-D愈伤组织形成数	2,4-D诱导率/%	6-BA愈伤组织形成数	6-BA诱导率/%
B1	0.3	30	15	50.0	10	33.3
B2	0.8	30	19	63.3	24	80.0
B2	1.5	30	25	83.3	28	93.3
B4	2.0	30	27	90.0	18	60.0
B5	2.5	30	27	90.0	16	53.3

诱导率=愈伤形成数/接种数 \times 100%。

度为 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,愈伤诱导率高达90.0%,且形成带有少许芽点、质地疏松的乳白色愈伤组织。而随着6-BA浓度的增加,愈伤组织的诱导率呈S型变化。低浓度时茎尖几乎处于萌发状态,愈伤组织极少形成,当浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织诱导率高达93.3%,形成带有瘤状、质地致密的黄绿色愈伤组织。

2.2 不同浓度组合对愈伤组织诱导和增殖的影响

从图2和表3可以看出,不同浓度组合的6-BA和2,4-D对半夏愈伤组织诱导的影响不同。将三裂茎尖接种在9种不同培养基中培养30 d后发现,愈伤组织诱导效果最好的培养基分别为B、C、E、H,其中培养基B、C的愈伤组织颗粒呈乳白色疏松状且均匀一致,而E、H为淡绿色的坚硬愈伤组织。保持6-BA浓度不变,2,4-D浓度达到 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织诱导率最高。而当2,4-D浓度继续增

加时,愈伤组织的萌发速度降低,诱导率也随之下落。当6-BA浓度大于 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2,4-D浓度为 1.8 和 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,主要促进芽的分化,抑制愈伤组织形成,形成带有芽点且坚硬的淡绿色愈伤组织,其愈伤长势优劣依次为 $\text{E}>\text{H}>\text{D}>\text{G}$ 。因此可以得出,适合愈伤组织悬浮培养的最佳培养基配方为B,而适宜半夏组培一次性成苗的培养基配方为H。

2.3 愈伤组织的器官分化分析和细胞形态结构观察

将愈伤组织采用B和H配方进行分化培养,发现愈伤组织在培养基H中培养7 d就可分化出幼嫩小芽,培养20 d时其茎粗壮,须根多,叶片大且颜色深绿(图3);而愈伤组织在B培养基中分化速度相对较晚,10 d左右才分化出绿色芽点,15 d左右芽点增多并开始生成不定芽,30 d左右分化出幼嫩的不定根。

将培养基B和H诱导的愈伤组织制成石蜡切

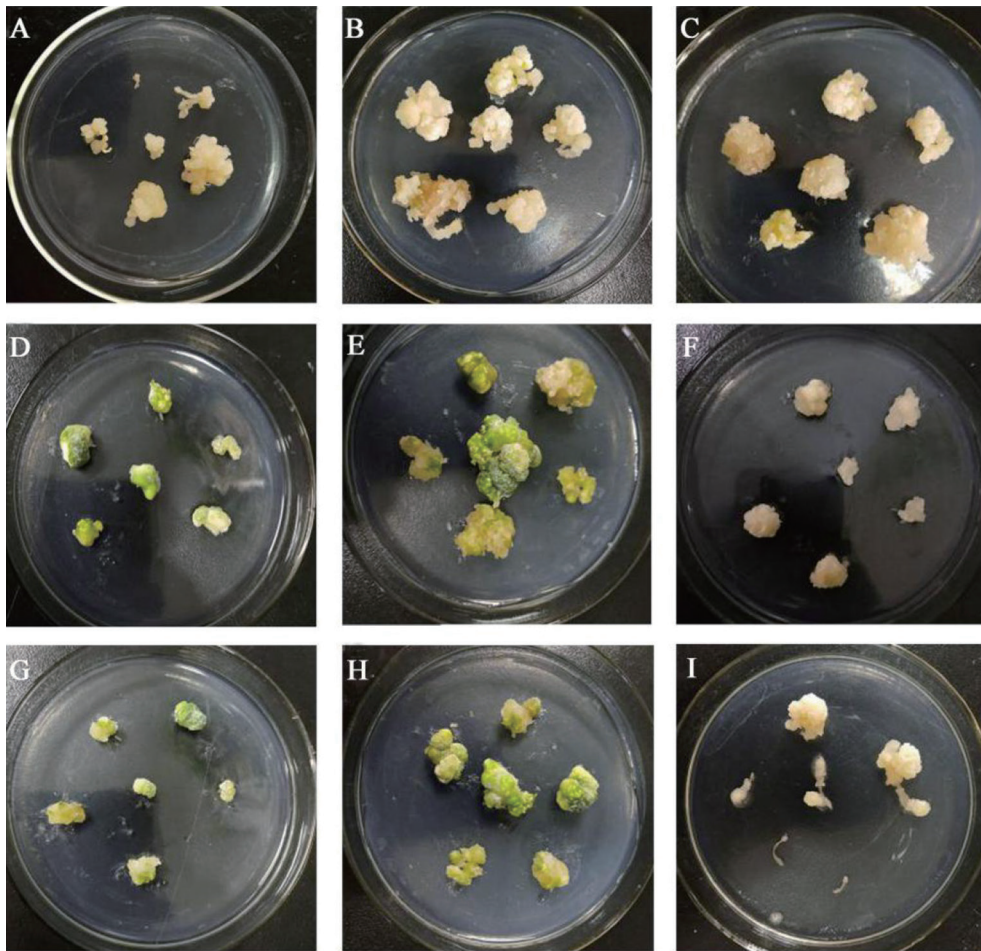


图2 愈伤组织长势结果

Fig.2 The results of the calluses growth

表3 6-BA和2,4-D不同浓度组合对半夏茎尖愈伤诱导的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA and 2,4-D on callus induction of *P. ternata*

编号	接种数	形成愈伤组织数	诱导率/%	颜色	质地	生长情况
A	36	21	58.3	乳白色	外软内硬	+
B	36	33	91.7	乳白色	疏松	++++
C	36	29	80.5	乳白色	疏松	++++
D	36	25	69.4	淡绿色	致密	+++
E	36	31	86.1	淡绿色	致密	++++
F	36	27	75.0	乳白色	疏松	+++
G	36	20	55.6	淡绿色	致密	++
H	36	32	88.9	淡绿色	致密	++++
I	36	17	47.2	乳白色	疏松	+

“+”越多,表示愈伤组织生长情况越好;+:生长情况差;+:生长情况一般;+++ :生长情况好;++++:生长情况最好。



图3 丛生芽诱导结果

Fig.3 The results of induction of cluster buds

片,在透射显微镜下观察发现,培养基H(图4-B)诱导的愈伤组织细胞体积较小,细胞核染色较深且大而明显,细胞间排列紧凑且形状较规则,有较明显的胚性愈伤组织形态,分生和分裂能力较强;而培养基B(图4-A)诱导的愈伤组织细胞核较小,愈伤组织染色较浅且细胞体积较大。因此再次证明MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+7 g·L⁻¹琼脂+30

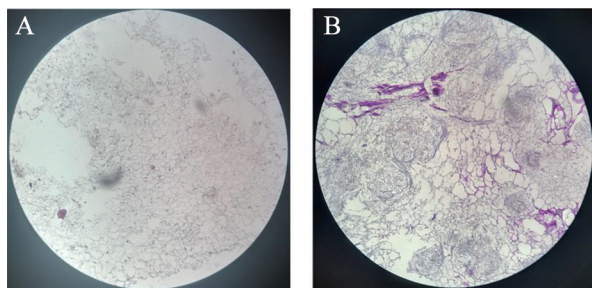


图4 不同植物生长调节物质诱导的愈伤组织细胞形态学观察

Fig.4 Morphological observation of calluses induced by different plant growth regulators

A: MS+0.6 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D; B: MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D。

g·L⁻¹蔗糖是适宜诱导半夏茎尖愈伤一次性成苗的最佳培养基。

2.4 半夏茎尖脱毒苗病毒检测

利用SMV、CMV、TMV单克隆抗体,对培养基B和H所诱导的半夏无毒苗每一次随机抽取10份进行酶联免疫检测,重复4次。由表4可见,样品B的阳性反应中只有6% CMV检出率,样品H的阳性检出率为0。

同时,以培养基B和H所诱导的半夏无毒苗为材料,利用RT-PCR方法对其进行病毒检测,图5显示,阳性对照均检测出TMV (435 bp)、SMV (733 bp)和CMV (396 bp),阴性对照未检测出任何特异性条带。与对照相比,培养基H均未检测出特异性高亮度条带,说明培养基H所诱导的半夏无毒苗成功脱除SMV、CMV和TMV,脱毒率达到100.0%;培养基B则含少量的CMV病毒,即大约400 bp处检测出微弱的特异性亮度条带片段,说明培养基B所诱导的无毒苗脱毒不彻底。

3 讨论

半夏作为一种大宗常用中药材,由于其主要

表4 酶联免疫检测结果

Table 4 The detection results of enzyme-linked immunoassay

病毒	样品数	阳性反应数	阳性检出率/%
SMV (培养基B)	33	0	0
CMV (培养基B)	33	2	6
TMV (培养基B)	33	0	0
SMV (培养基H)	32	0	0
CMV (培养基H)	32	0	0
TMV (培养基H)	32	0	0

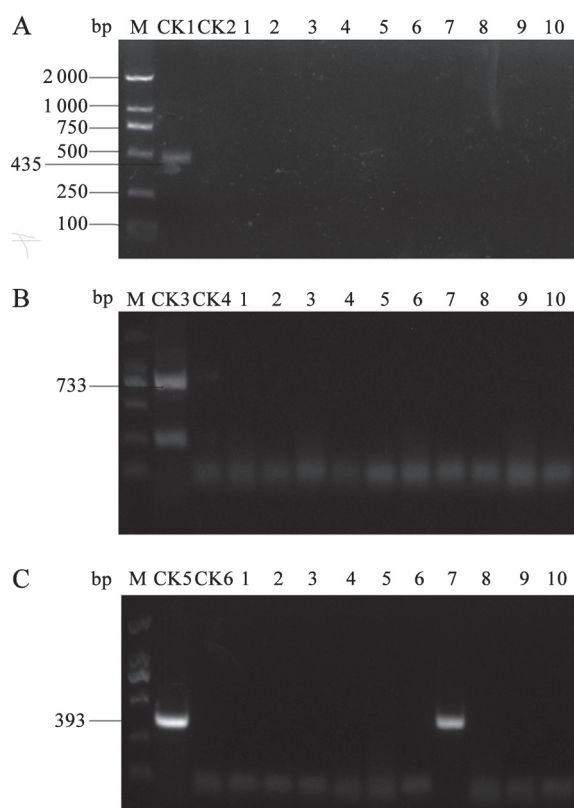


图5 部分RT-PCR检测结果

Fig.5 A part of RT-PCR test results

A: TMV病毒检测; B: SMV病毒检测; C: CMV病毒检测; M: marker; CK1、CK3和CK5: 阳性对照; CK2、CK4和CK6: 阴性对照; 1~5: 培养基H诱导的半夏组培苗; 6~10: 培养基B诱导的半夏组培苗。

通过块茎进行营养繁殖, 容易造成病毒逐年积累, 在长期的人工栽培过程中极易造成种质退化, 导致产量和品质急剧降低, 无法满足医药市场的需求。目前对于半夏病毒病害的防治还没有特别安全有效的方法, 而半夏脱毒苗的培养成为解决半夏病毒病最经济、有效、安全的途径。关于半夏植物组织再生培养, 大多学者主要以叶柄、叶片作为研究对象(任家惠等1983; 程霞英和杨宗岐2013; 林秋月等2014), 同时也有一些学者利用块茎、珠芽对半夏进行再生快繁培养研究并取得成功(朱鹏飞等1985; 潘卫仓和刘菊英2009)。自1934年White首次发现植物茎尖存在生长快、生存率高、病毒含量少等优点后, 植物茎尖脱毒技术开始逐渐应用到多种植物的脱毒培养中(王蒂和陈劲枫2014)。目前关于半夏茎尖脱毒技术鲜有相对系统的报道。为彻底解决半夏病毒病危害严重问题,

本试验利用茎尖脱毒技术, 研究了6-BA和2,4-D两种激素不同浓度对比对半夏茎尖愈伤组织诱导效果的影响, 并对不同激素水平诱导条件下形成的愈伤组织进行了细胞形态学观察, 成功建立了能够一次性成苗且快速、高效的茎尖诱导半夏无毒苗再生体系。

同时, 本研究发现不同生长调节物质浓度适当配比是诱导半夏茎尖愈伤组织快速形成且一次性成苗的关键因素。6-BA和2,4-D单独使用, 对诱导愈伤组织的形成均达不到最佳效果, 尽管随着2,4-D浓度不断增大, 愈伤组织诱导率与之成正比, 但浓度过高易导致褐化, 因此需要找到最适宜的浓度范围。而6-BA在半夏茎尖愈伤组织诱导时, 其诱导率呈S型变化, 低浓度6-BA的愈伤组织诱导率较低, 浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 诱导率达到最高。但当6-BA和2,4-D以适当浓度配比使用时, 对愈伤组织诱导具有明显增效作用, 即在MS培养基中添加 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D时, 对半夏茎尖愈伤组织的诱导效果达到最佳且能够一次性成苗, 该结果与一些研究者的研究结果相一致(周宜君等2007; 彭向前和张文会2011)。此外, 本实验采用RT-PCR和酶联免疫相结合的方法对随机抽取的脱毒苗进行相关病毒含量检测, 结果发现培养基H比培养基B诱导的组培苗脱毒更加彻底, 可能是因为高浓度6-BA可加快茎尖细胞的分裂速度, 提高愈伤组织化程度, 抑制了病毒向茎尖部位的移动或积累。该方法检测效率高, 用时短, 在体外能迅速、特异地对样品进行识别, 且对材料要求不高, 对大量样品进行快速检测更具优势。

参考文献(References)

- Chen YX, Qiu JH, Zheng CC, et al (2016). Research on the virus-free culture technique of sweet potato stem apical meristem. *J Anhui Agr Sci*, 44 (13): 135-137, 219 (in Chinese with English abstract) [陈玉霞, 邱建辉, 张朝臣等(2016). 甘薯茎尖脱毒培养技术研究. *安徽农业科学*, 44 (13): 135-137, 219]
- Cheng XY, Yang ZQ (2013). Optimization study of callus induction on *Pinellia ternata*. *Tianjin Agr Sci*, 19 (9): 4-6 (in Chinese with English abstract) [程霞英, 杨宗岐(2013). 半夏愈伤组织诱导优化研究. *天津农业科学*, 19 (9): 4-6]
- Guo Q (2007). *Resources of Chinese Medicine*. Beijing: Higher Education Press (in Chinese) [郭巧生(2007). *药用植物资源学*. 北京: 高等教育出版社]

- Huang F, Li B, Tian S, et al (2011). Research progress in pharmacological actions and insecticidal activities of *Rhizoma arisaematis* and *Rhizome pinellia*. *Guizhou Agr Sci*, 39 (10): 108–112 (in Chinese with English abstract) [黄芳, 李波, 田珊等(2011). 天南星和半夏的药理作用及抗虫活性研究进展. *贵州农业科学*, 39 (10): 108–112]
- Li Z (1996). *Plant Tissue Production*. Beijing: Peking University Press, 130–139 (in Chinese) [李正理(1996). *植物组织制片学*. 北京: 北京大学出版社, 130–139]
- Lin QY, Zeng WY, Li TP, et al (2014). Screening of optimal medium for callus inducing and redifferentiation of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. *Hubei Agr Sci*, 53 (13): 3183–3186 (in Chinese with English abstract) [林秋月, 曾万勇, 李天佩等(2014). 半夏愈伤组织诱导与分化最适培养基筛选. *湖北农业科学*, 53 (13): 3183–3186]
- Liu W, Chen J, Li Y (2004). Molecular identification of Araceae-infecting viruses and their ecology. *Chin J Appl Ecol*, 15 (4): 566–570 (in Chinese with English abstract) [刘文洪, 陈集双, 李永伟(2004). 侵染天南星科植物病毒的分子鉴定及其生态学研究. *应用生态学报*, 15 (4): 566–570]
- Niu YB, Yao M, Wang DF, et al (2011). Identification of the pathogenic virus on *Ailanthus altissima*. *Acta Phytopathol Sin*, 41 (4): 437–440 (in Chinese with English abstract) [牛颜冰, 姚敏, 王德富等(2011). 臭椿病毒病原原鉴定. *植物病理学报*, 41 (4): 437–440]
- Pan WC, Liu JY (2009). Induction of callus and regeneration *Pinellia ternata* in Tianshu. *North Hortic*, (11): 221–223 (in Chinese with English abstract) [潘卫仓, 刘菊英(2009). 半夏愈伤组织的诱导及植株的再生研究. *北方园艺*, (11): 221–223]
- Peng XQ, Zhang WH (2011). Technology system for stem-apex meristem culture and rapid propagation of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. *J Jinggangshan Univ-Nat Sci*, 32 (2): 46–49 (in Chinese with English abstract) [彭向前, 张文会(2011). 半夏的分生组织培养与快速繁殖技术研究. *井冈山大学学报(自然科学版)*, 32 (2): 46–49]
- Ren J, Chen K, Xu Q (1983). Induction of test-tube seedling organs in *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. *Plant Physiol Commun*, (4): 44–48 (in Chinese) [任家惠, 陈克润, 徐琼芳(1983). 三叶半夏试管苗器官的诱导. *植物生理学通讯*, (4): 44–48]
- Shen-Tu SS (2006). Detection of viruses infecting *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. and phylogenetic study on *Soybean mosaic virus* (dissertation). Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [申屠苏苏(2006). 侵染半夏的病毒检测与大豆花叶病毒的分子系统学研究(学位论文). 杭州: 浙江大学]
- Wang D, Chen J (2014). *Plant Tissue Culture*. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [王蒂, 陈劲枫(2014). *植物组织培养*. 第2版. 北京: 中国农业出版社]
- Xie X, Xu K, Xie MX, et al (2015). Optimization of rapid micropropagation system of apple meristem-tip culture. *Plant Physiol J*, 51 (12): 2152–2156 (in Chinese with English abstract) [谢璇, 许轲, 谢闻新(2015). 苹果茎尖培养快繁体系的优化. *植物生理学报*, 51 (12): 2152–2156]
- Zeng W (2015). Talking about the research progress of *Pinellia ternata*. *Shandong J Anim Sci Vet Med*, 36 (12): 65–66 (in Chinese) [曾伟权(2015). 浅谈半夏研究进展. *山东畜牧兽医*, 36 (12): 65–66]
- Zhang YL, Tang CY, He F, et al (2015). Tissue culture and rapid propagation of rare and endangered *Ficus beipeiensis*. *Plant Physiol J*, 51 (4): 471–475 (in Chinese with English abstract). [张艳玲, 唐澄莹, 何夫等(2015). 珍稀濒危植物北碚榕的组培快繁. *植物生理学报*, 51 (4): 471–475]
- Zheng G, Kosiratana W, Gumpf DJ (1988). Detection of plant viruses using dot-immunobinding assay. *Chin J Virol*, 4 (2): 151–156 (in Chinese with English abstract) [郑光宇, Kosiratana W, Gumpf DJ (1988). 应用斑点免疫结合法检测植物病毒. *病毒学报*, 4 (2): 151–156]
- Zhou YJ, Zhou SC, Liu Y, et al (2007). Influences of plant growth regulations on induction and differentiation of plant callus. *J Minzu Univ China (Nat Sci)*, 16 (1): 23–27 (in Chinese with English abstract). [周宜君, 周生闯, 刘玉等(2007). 植物生长调节剂对植物愈伤组织的诱导与分化的影响. *中央民族大学学报(自然科学版)*, 16 (1): 23–27]
- Zhu J, Ma L, Liu F, et al (2017). Establishment and optimization of regeneration system for virus-free shoot tip of *Phalaenopsis amabilis*. *Shandong Agr Sci*, 49 (6): 60–63 (in Chinese with English abstract) [朱娇, 马蕾, 刘芳等(2017). 蝴蝶兰茎尖脱毒再生体系建立与优化. *山东农业科学*, 49 (6): 60–63]
- Zhu P, Mao W, Wang D, et al (1985). Regenerated plants obtained from tissue culture of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. *Plant Physiol Commun*, (3): 26 (in Chinese) [朱鹏飞, 毛文岳, 王殿久等(1985). 三叶半夏组织培养获得再生植株. *植物生理学通讯*, (3): 26]

Virus-free culture and virus detection of stem tip of *Pinellia ternata*

WANG Bao-Xia¹, QI Yong-Hong², XIAO Ya-Yin¹, CUI Li-Yan¹, WANG De-Fu^{1,*}, NIU Yan-Bing^{1,*}

¹College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

²Fruitry Station of Shanxi Province, Taiyuan 030001, China

Abstract: The stem tips were taken as explants to study the induction effects of different hormone concentrations on virus-free stem tips of *Pinellia ternata* seedlings. On the basis of single factor experiment, $L_9(3^2)$ orthogonal test of 6-benzylamino adenine (6-BA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with three optimal concentrations was conducted to screen the optimal medium of callus induction, followed by molecular detection of the virus condition of virus-free seedlings. The results showed that the callus induction rate was the highest when the concentration of 6-BA was $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 2,4-D was $1.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The optimum medium for callus induction was $\text{MS}+1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar+ $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sugar, which could induce the seedlings at one step. After reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and dot-enzyme-linked immunosorbent assay (DOT-ELISA) detection, the virus-free rate of *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Soybean mosaic virus* (SMV) reached 100%.

Key words: *Pinellia ternata*; stem tip culture; virus-free seedlings; virus detection

Received 2018-09-04 Accepted 2018-10-09

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31601612).

*Co-corresponding authors: Wang DF (wanderful226@aliyun.com), Niu YB (niuyanbingbest@163.com).