

宁梦雅,殷芳芳,胡丽鹏,等. 珍珠菜组培快繁体系研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):45-49.

珍珠菜组培快繁体系研究

宁梦雅,殷芳芳,胡丽鹏,林夏珍

(浙江农林大学,浙江临安 311300)

摘要:以珍珠菜种子为材料进行消毒及无菌苗培养,再以消毒后萌发的无菌苗的叶片、茎段和带叶腋茎为外植体,开展丛生芽的诱导、增殖培养、生根培养和移栽驯化技术研究。结果发现,珍珠菜种子最佳消毒方式为 5% 次氯酸钠消毒 10 min,最适丛生芽诱导部位为叶片,丛生芽诱导最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L;其次为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L。最适珍珠菜增殖的培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L,其次为 MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 2.0 mg/L。最适生根培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L,其次为 1/2MS+NAA 1.0 mg/L。最适珍珠菜移栽驯化的方法为开瓶驯化 5 d 后种植于蛭石:珍珠岩:泥炭(1:1:1)基质中。本研究结果为利用组织培养技术实现珍珠菜快速繁殖和人工扩大栽培奠定了良好基础。

关键词:珍珠菜;组织培养;丛生芽诱导;增殖培养;生根培养;移栽驯化

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0045-04

珍珠菜(*Lysimachia clethroides*)为报春花科珍珠菜属珍珠菜亚属植物,别称矮桃、珍珠草(湖南),调经草、尾脊草(贵州),刺鸡尾、劳伤药、伸筋散、九节莲(云南),产于浙江省各地。生于山坡林缘和草丛中等湿润处,垂直分布上限可达海拔 2 500 m。华东、华中、华南、西南、华北及东北均有分布^[1-2]。珍珠菜为长日照植物,需低温处理打破根茎休眠,总状花序顶生、常转向一侧,可作为切花应用,也是良好的夏季草本地被花卉资源^[3-4]。珍珠菜的生物学特性、化学成分和药用的研究也多见报道。珍珠菜的组织培养研究不仅可以满足化学成分和药用的需要,丰富园林地被植物种类,满足园林绿化快速成型的要求,还可为珍珠菜的分子育种奠定基础^[5]。本试验研究了种子消毒、芽诱导与增殖生根等培养条件,建立了珍珠菜完整的植株再生体系,大大缩短了培养时间、提高了增殖系数、降低了成本,为珍珠菜规模化生产提供了科学依据^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为采自浙江省杭州市临安市清凉峰珍珠菜当年生种子,通风干燥后 4℃ 冰箱内冷藏。无菌叶片、茎段和带叶腋茎均取自种子萌发出的无菌苗。

1.2 方法

1.2.1 种子消毒 挑选颗粒饱满无病虫害的种子,纱布包裹流水冲洗 2 h 后,置于超净工作台上,用 75% 乙醇浸泡并振荡 30 s,并用无菌水冲洗 3 次后,用 5% 次氯酸钠和 2% 次氯酸钠各浸泡振荡 5、10、15、20 min,每次消毒后均用无菌水冲洗 3 次。将消毒处理后的种子接种于 MS 空白培养基上,消毒处

理 20 粒种子,3 次重复试验。30 d 后统计污染率和萌发率。

1.2.2 丛生芽诱导 将种子萌发的无菌苗叶片、茎段和带叶腋茎剪成 5 mm×5 mm 左右小块,接种于 6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L)、KT(2.0、3.0、4.0 mg/L)和 NAA(0.05、0.1、0.5 mg/L)的 2 因素 3 水平完全试验培养基中,分别为 C1(6-BA+NAA)、C2(KT+NAA)组合。每处理 20 个材料,3 次重复。30 d 后统计诱导率和诱导系数。

1.2.3 丛生芽增殖 诱导出的丛生芽小苗长到 2~3 cm 后切成单芽并转接到添加了 6-BA(0.1、0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L)和 KT(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L)的单因素培养基,以及 6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L)、KT(2.0、3.0、4.0 mg/L)和 NAA(0.05、0.1、0.5 mg/L)的 2 因素 3 水平完全试验培养基中。每处理 20 个材料,3 次重复。30 d 后观察并统计增殖系数。

1.2.4 生根培养 丛生芽长到 2~3 cm 高时切成单芽转接到添加 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L NAA、IBA 的 1/2MS 生根培养基上培养,对照为 1/2MS 空白培养基。每处理 20 个材料,3 次重复。40 d 后观察并统计生根率、平均根数和根长。

1.2.5 移栽驯化 参照文献[7]的方法,在 9—10 月,将生根的组培苗放在自然光下封口炼苗 3 d,再打开瓶盖分别炼苗 0、1、3、5、7 d。然后移栽至蛭石:珍珠岩:泥炭(1:1:1)基质中,研究不同炼苗时间对珍珠菜组培苗移栽成活的影响。将在自然光条件下炼苗 3 d 后、打开瓶盖炼苗 5 d 的组培苗移栽至以下 5 种基质中:(1)珍珠岩:蛭石(1:1),(2)泥炭,(3)蛭石:泥炭(1:1),(4)珍珠岩:泥炭(1:1),(5)蛭石:珍珠岩:泥炭(1:1:1),研究不同基质对珍珠菜试管苗移栽成活的影响。每处理均套袋保持湿度,7 d 后除去。每处理 20 个材料,3 次重复,30 d 后统计成活率。

1.3 培养条件

除特殊说明外,基本培养基为 MS,培养基中添加蔗糖 30 g/L,琼脂 7.0 g/L,pH 值 5.8。温度(25±2)℃,光照时间 12 h/d,光照强度 2 000~2 500 lx。

1.4 数据采集与分析方法

数据计算与统计采用 Excel 2003;采用 SPSS 17.0 进行方

收稿日期:2013-12-17

作者简介:宁梦雅,女,河北永清人,硕士研究生,从事珍珠菜组织培养技术研究。E-mail:ningmengya@126.com。

通信作者:林夏珍,博士,教授,硕士生导师,从事园林植物栽培与管理研究。E-mail:linxz100@sohu.com。

差分析。污染率 = 污染种子数 / 种子总数 × 100% ; 萌发率 = 萌发种子数 / 种子总数 × 100% ; 诱导率 = 诱导出丛生芽的外植体数 / 外植体总数 × 100% ; 诱导系数 = 诱导出的丛生芽数 / 外植体总数 × 100% ; 增殖系数 = 产生的新苗数 / 接种苗数, 有效芽长 > 0.5 cm ; 生根率 = 生根苗数 / 接种苗数 × 100% ; 平均根数 (条) = 总根数 / 生根苗数 ; 平均根长 (cm) = 总根长度 / 总根数 ; 成活率 = 移栽成活苗数 / 移栽苗总数 × 100% 。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方式对珍珠菜种子萌发率与污染率的影响

消毒后的种子接种于 MS 空白培养基上 1 d 后开始出现污染现象, 15 d 后不再有污染现象出现。种子接种 9 d 开始萌发, 萌发时间主要集中在接种后的 9 ~ 18 d。培养 30 d 统计的污染率和萌发率见表 1, 可以看出, 不同消毒处理之间差异显著, 污染率随着消毒时间的增长而下降, 而种子萌发率则呈先上升后下降的趋势。5% 次氯酸钠消毒 10 min 时, 污染率为 7.50%, 萌发率为 15.0%, 消毒效果最好。

2.2 不同激素组合对丛生芽诱导的影响

将无菌材料接种到培养基上, 接种 7 d 后大部分叶片反卷, 切口处膨大增厚, 10 d 开始在叶片切口处产生大量芽点, 后逐渐发育成丛生芽。大部分茎段在接种 10 d 左右开始膨大, 切口处生有少量芽点后形成丛生芽, 少量茎段上产生绿色颗粒状组织, 但无进一步分化。大部分带叶腋茎接种后 6 d 在叶腋处长出嫩芽, 后逐渐长成苗, 切口处也会产生少量丛

表 1 不同消毒方式下珍珠菜种子的污染率和萌发率统计

消毒剂种类	消毒时间 (min)	污染率 (%)	萌发率 (%)
5% 次氯酸钠	5	12.50 ± 2.50abAB	10.00 ± 4.33abAB
	10	7.50 ± 2.50bcdABC	15.00 ± 4.33aA
	15	5.00 ± 2.50cdBC	10.00 ± 2.50abAB
	20	2.50 ± 0.00dC	2.50 ± 2.50cB
2% 次氯酸钠	5	15.00 ± 5.00aA	5.00 ± 2.50bcB
	10	10.00 ± 4.33abcABC	7.50 ± 4.33bcAB
	15	7.50 ± 5.00bcdABC	10.00 ± 5.00abAB
	20	5.00 ± 2.50cdBC	2.50 ± 0.00cB

注: 同列数据后不同小写、大写字母表示在 0.05、0.01 水平上差异显著。下同。

生芽。

由表 2 可看出, 叶片接种到 2 种激素的培养基上培养 30 d 后, 诱导率均差异显著, C1 组合诱导效果明显高于 C2 组合, 其中 C17 组合 (6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L) 中叶片诱导率达到 100.00%。茎段在 C1 组合培养下诱导率差异显著, C2 组合诱导率差异不显著, 且 2 种组合诱导率均不高。带叶腋茎接种到 2 种激素组合的培养基上后, 诱导率均差异显著, C2 组合诱导效果略高于 C1 组合, 其中在 C25 (KT 3.0 mg/L + NAA0.1 mg/L) 中诱导率最高为 73.33%。综合比较, 诱导效果最好的无菌材料为珍珠菜叶片, C17 为诱导最佳培养基。

表 2 不同无菌材料在激素组合下诱导丛生芽的诱导率

组合	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	NAA (mg/L)	叶片诱导率 (%)	茎段诱导率 (%)	带叶腋茎诱导率 (%)
C11	0.5		0.05	23.33 ± 2.89fE	6.67 ± 5.77cdBC	60.00 ± 5.00aA
C12	0.5		0.1	56.67 ± 2.89eD	10.00 ± 0.00bcdABC	50.00 ± 10.00aAB
C13	0.5		0.5	13.33 ± 5.77fE	3.33 ± 5.77dC	6.67 ± 2.89eE
C14	1.0		0.05	80.00 ± 5.00bcBC	10.00 ± 0.00bcdABC	35.00 ± 10.00bBC
C15	1.0		0.1	70.00 ± 8.66cdCD	13.33 ± 2.89abcdABC	23.33 ± 5.77bcdCDE
C16	1.0		0.5	60.00 ± 5.00deD	23.33 ± 5.77aA	13.33 ± 5.77deDE
C17	2.0		0.05	100.00 ± 0.00aA	16.67 ± 10.41abcABC	20.00 ± 10.00cdeCDE
C18	2.0		0.1	86.67 ± 11.55bAB	20.00 ± 0.00abAB	26.67 ± 5.77bcdCD
C19	2.0		0.5	66.67 ± 5.77deCD	16.67 ± 7.64abcABC	30.00 ± 10.00bcCD
C21		2.0	0.05	56.67 ± 2.89aA	3.33 ± 5.77aA	53.33 ± 7.64bcB
C22		2.0	0.1	30.00 ± 0.00bB	6.67 ± 2.89aA	30.00 ± 10.00deCD
C23		2.0	0.5	23.33 ± 7.64bcBC	3.33 ± 5.77aA	10.00 ± 10.00fE
C24		3.0	0.05	16.67 ± 5.77cdeCD	6.77 ± 2.89aA	43.67 ± 7.77bcdBC
C25		3.0	0.1	20.00 ± 0.00cdBCD	10.00 ± 10.00aA	73.33 ± 5.77aA
C26		3.0	0.5	3.33 ± 2.89fE	6.67 ± 5.77aA	40.00 ± 10.00cdBC
C27		4.0	0.05	13.33 ± 5.77deCDE	10.00 ± 5.00aA	20.00 ± 5.00efDE
C28		4.0	0.1	10.00 ± 0.00efDE	6.67 ± 5.77aA	56.67 ± 7.64bAB
C29		4.0	0.5	3.33 ± 5.77fE	3.33 ± 5.77aA	50.00 ± 5.00bcB

由表 3 可看出, 叶片诱导丛生芽诱导系数在 2 种激素组合下均差异显著, 且 C1 组合诱导效果明显高于 C2 组合, 其中在 C14 (6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L) 中叶片诱导系数最高为 12.0。茎段在 C1 组合中的诱导系数差异较显著, 在 C2 组合下差异不显著, 且 2 种组合下诱导系数均不高。带叶腋茎在 2 种激素组合下差均较显著, 且 C1 组合诱导效果略高于 C2 组合, 其中 C11 (6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L) 处理诱导系数最高为 1.37。综合比较结果显示, 诱导丛生芽最好的无菌材料为珍珠菜叶片, C14 (6-BA 1.0 mg/L + NAA

0.05 mg/L) 为最佳诱导培养基。

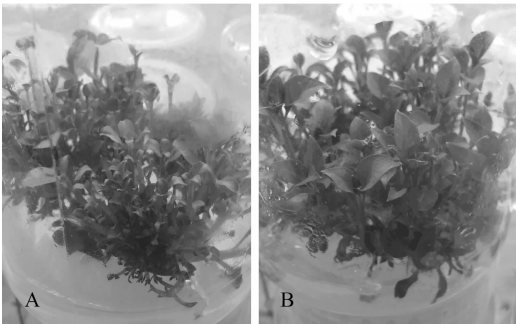
综合比较诱导率和诱导系数 2 个指标, 珍珠菜叶片为诱导丛生芽最佳外植体, C14 为丛生芽诱导最佳培养基, 其次为 C17 (图 1)。

2.3 丛生芽增殖结果

将丛生芽单芽接种到增殖培养基上, 5 d 后大部分芽下部叶腋处长出 1 ~ 2 个叶腋芽, 10 d 左右切口膨大并凸起成芽点, 后渐增殖成芽。培养 30 d 统计的增殖系数, 结果见表 4 和表 5。

表 3 不同无菌材料在不同激素组合下诱导丛生芽的诱导系数

组合	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	NAA (mg/L)	叶片诱导系数	茎段诱导系数	带叶腋茎诱导系数
C11	0.5		0.05	0.47 ± 0.25eE	0.07 ± 0.06cB	1.37 ± 0.72aA
C12	0.5		0.1	2.37 ± 0.35dD	0.13 ± 0.06bcB	0.90 ± 0.30abcABC
C13	0.5		0.5	0.27 ± 0.21eE	0.03 ± 0.06cB	0.20 ± 0.26dC
C14	1.0		0.05	12.00 ± 0.50aA	0.13 ± 0.06bcB	0.67 ± 0.31bcdABC
C15	1.0		0.1	4.00 ± 0.40cC	0.20 ± 0.17bcAB	1.20 ± 0.00abAB
C16	1.0		0.5	2.23 ± 0.68dD	0.50 ± 0.10aA	0.30 ± 0.35cdC
C17	2.0		0.05	11.10 ± 0.78aA	0.33 ± 0.23abAB	0.37 ± 0.21cdBC
C18	2.0		0.1	6.20 ± 0.95bB	0.47 ± 0.06aA	0.47 ± 0.21cdBC
C19	2.0		0.5	3.00 ± 0.72cdCD	0.33 ± 0.15abAB	0.87 ± 0.12abcABC
C21		2.0	0.05	1.40 ± 0.61aA	0.03 ± 0.06aA	0.53 ± 0.25abcABC
C22		2.0	0.1	0.63 ± 0.06bcBC	0.07 ± 0.06aA	0.30 ± 0.10cdBC
C23		2.0	0.5	0.53 ± 0.49bcBC	0.03 ± 0.06aA	0.10 ± 0.10dC
C24		3.0	0.05	0.23 ± 0.12cBC	0.07 ± 0.06aA	0.60 ± 0.26abcABC
C25		3.0	0.1	0.33 ± 0.25bcBC	0.13 ± 0.15aA	0.93 ± 0.23aA
C26		3.0	0.5	0.07 ± 0.12cC	0.10 ± 0.10aA	0.40 ± 0.10bcdABC
C27		4.0	0.05	0.90 ± 0.10abAB	0.23 ± 0.40aA	0.23 ± 0.23cdBC
C28		4.0	0.1	0.43 ± 0.35bcBC	0.07 ± 0.06aA	0.73 ± 0.32abAB
C29		4.0	0.5	0.07 ± 0.12cC	0.03 ± 0.06aA	0.63 ± 0.29abcABC



A—MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 培养基;
B—MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 培养基

图1 珍珠菜丛生芽诱导

表 4 不同细胞分裂素对丛生芽增殖的影响

细胞分裂素	浓度 (mg/L)	增殖系数	苗生长状况
6-BA	0.1	0.97 ± 0.06eG	苗较壮,无根
	0.5	7.27 ± 0.64bBC	苗壮,无根
	1.0	9.00 ± 0.95aA	苗壮,无根
	2.0	8.67 ± 0.61aAB	苗较壮,无根
	3.0	6.30 ± 0.40bCD	苗弱,无根
KT	1.0	4.00 ± 0.85cEF	苗壮,无根
	2.0	4.87 ± 0.74cDE	苗较壮,无根
	3.0	4.37 ± 0.65cE	苗较壮,无根
	4.0	4.07 ± 0.40cE	苗壮,无根
	5.0	3.93 ± 0.80cEF	苗壮,无根
CK		2.43 ± 0.67dFG	苗较壮,少量根

2.3.1 不同细胞分裂素对丛生芽增殖的影响 由表 4 可看出,添加了细胞分裂素 6-BA 和 KT 的培养基增殖效果高于无激素 MS 培养基。6-BA 增殖系数差异极显著,KT 增殖系数差异不显著,且 6-BA 增殖效果高于 KT,苗生长健壮。处理 Z13(6-BA 1.0 mg/L)为最佳增殖培养基。

2.3.2 不同激素组合对丛生芽增殖的影响 由表 5 可看出,Z1 组合(6-BA + KT)增殖效果差异显著,Z2 组合(6-BA + NAA)、Z3 组合(KT + NAA)增殖效果差异极显著,且 Z1 增殖系数高于 Z2、Z3 组合。增殖效果最好的为 Z14(6-BA 1.0 mg/L + KT 2.0 mg/L)。

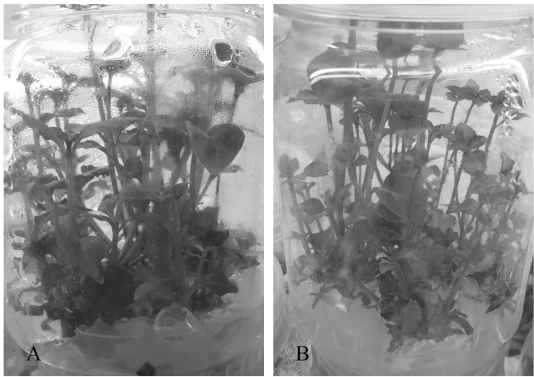
表 5 不同激素组合对丛生芽增殖的影响

组合	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	NAA (mg/L)	增殖系数	苗生长状况
Z11	0.5	2.0		3.27 ± 0.15cC	苗较壮,无根
Z12	0.5	3.0		3.30 ± 0.40cC	苗较壮,无根
Z13	0.5	4.0		4.97 ± 0.25bB	苗较壮,无根
Z14	1.0	2.0		8.67 ± 0.60aA	苗壮,无根
Z15	1.0	3.0		8.10 ± 0.72aA	苗壮,无根
Z16	1.0	4.0		5.07 ± 0.67bB	苗壮,无根
Z17	2.0	2.0		5.37 ± 0.40bB	苗较壮,无根
Z18	2.0	3.0		5.77 ± 0.72bB	苗较壮,无根
Z19	2.0	4.0		8.63 ± 0.31aA	苗较壮,无根
Z21	0.5		0.05	2.97 ± 0.55dD	苗壮,少量根
Z22	0.5		0.1	1.97 ± 0.06eDE	苗较壮,少量根
Z23	0.5		0.5	1.10 ± 0.40fE	苗较壮,少量根
Z24	1.0		0.05	4.90 ± 0.10cC	苗壮,少量根
Z25	1.0		0.1	4.20 ± 0.44cC	苗较壮,少量根
Z26	1.0		0.5	1.17 ± 0.35fE	苗较壮,无根
Z27	2.0		0.05	7.70 ± 0.36aA	苗壮,无根
Z28	2.0		0.1	6.63 ± 0.40bB	苗壮,无根
Z29	2.0		0.5	2.70 ± 0.75deD	苗弱,少量根
Z31		2.0	0.05	3.33 ± 0.23cC	苗较壮,少量根
Z32		2.0	0.1	1.10 ± 0.26eEF	苗弱,少量根
Z33		2.0	0.5	0.67 ± 0.31eF	苗弱,少量根
Z34		3.0	0.05	6.43 ± 0.32aA	苗壮,少量根
Z35		3.0	0.1	2.70 ± 0.62cCD	苗较壮,无根
Z36		3.0	0.5	1.27 ± 0.21deEF	苗弱,少量根
Z37		4.0	0.05	5.00 ± 0.61bB	苗较壮,少量根
Z38		4.0	0.1	6.47 ± 0.50aA	苗壮,少量根
Z39		4.0	0.5	1.97 ± 0.47dDE	苗弱,少量根

综合考虑增殖系数与苗生长状况,细胞分裂素 6-BA 1.0 mg/L 为最佳增殖培养基。其次为 Z14(6-BA 1.0 mg/L + KT 2.0 mg/L),试管苗生长情况如图 2。

2.4 不同生长素对生根培养的影响

将珍珠菜无菌苗接种到生根培养基后,10 d 左右大部分苗靠近培养基处茎上生少量不定根,且切口膨大,慢慢形成凸起,后逐渐在凸起上生不定根。培养 40 d 统计生根率、平均



A— MS+6-BA 1.0 mg/L 培养基;
B— MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 2.0 mg/L 培养基
图2 珍珠菜丛生芽增殖情况

根数和平均根长,结果(表 6)表明,添加生长素 NAA 和 IBA 的生根率差异显著,处理间平均根数和平均根长差异显著,但

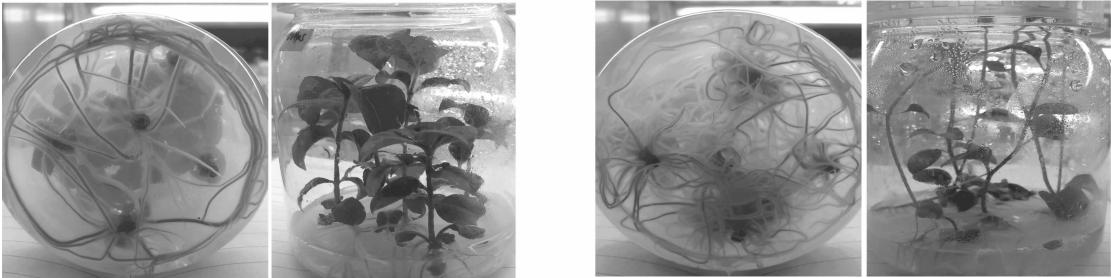
只有一部分浓度范围生根率和平均根数高于对照组。NAA 和 IBA 诱导下生根率相似,NAA 培养基上苗的平均根数高于 IBA 培养基上的苗,但 NAA 培养基上的苗平均根长与相同浓度 IBA 处理差异不显著。综合考虑生根率、平均根数、平均根长和根生长状况,最佳生根培养基为 1/2MS + NAA 0.5 mg/L,其次为 1/2MS + NAA 1.0 mg/L(图 3)。

2.5 开瓶时间与基质类型移栽驯化结果

由表 7 可看出,1、3、5、7 d 的开瓶处理间成活率差异不显著,较 0 d 开瓶差异显著,其中开瓶时间为 5 d 成活率最高,达到 100.00%。0 d 成活率最低,为 75.00%。由表 7 还可看出,5 种基质成活率差异不显著,其中基质(5)蛭石:珍珠岩:泥炭(1:1:1)成活率最高,达到 100.00%。而基质(2)泥炭成活率最低,为 85.00%。综合考虑不同开瓶时间和基质栽培,珍珠菜移栽驯化的方法为幼苗在自然光照射下培养 3 d 后,再开瓶驯化 5 d,最后种植于蛭石:珍珠岩:泥炭(1:1:1)基质中。

表 6 不同生长素对生根培养的影响

生长素	浓度(mg/L)	生根率(%)	平均根数(条)	平均根长(cm)	根生长状况
NAA	0.1	78.33 ± 5.77bcABC	3.49 ± 0.41cCD	4.40 ± 1.25aA	苗壮,根粗,须根较多
	0.5	88.33 ± 5.77abAB	6.47 ± 1.44aAB	3.14 ± 0.39bABC	苗壮,根较粗、须根较多
	1.0	71.67 ± 2.89cdBCD	6.95 ± 0.55aA	2.57 ± 0.67bcBCD	苗较壮,根较粗、须根多
	2.0	60.00 ± 5.00deFDE	6.08 ± 0.68abAB	1.92 ± 0.11cdCDE	苗较壮,根较粗、须根较多
	3.0	53.33 ± 5.77fE	5.44 ± 0.58abABC	1.44 ± 0.13deDE	苗弱,根细、须根少
IBA	0.1	73.33 ± 7.64cBCD	3.09 ± 0.80cD	3.49 ± 1.05abAB	苗壮,根粗、须根少
	0.5	91.67 ± 5.77aA	4.46 ± 0.70bcBCD	2.86 ± 0.28bcBCD	苗壮,根较粗、须根较多
	1.0	73.33 ± 7.64cBCD	5.42 ± 1.17abABC	1.93 ± 0.26cdCDE	苗壮,根较粗、须根少
	2.0	66.67 ± 10.41cdeCDE	6.18 ± 1.05abAB	1.44 ± 0.07deDE	苗较壮,根较粗、须根少
	3.0	56.67 ± 2.89fDE	5.44 ± 0.94abABC	0.77 ± 0.20eE	苗较壮,根细、须根少
CK		71.67 ± 10.41cdBCD	4.53 ± 1.12bcBCD	3.34 ± 0.37bABC	苗壮,根较粗,须根少



A. 1/2MS+NAA 0.5 mg/L培养基 B. 1/2MS+NAA 1.0 mg/L培养基
图3 珍珠菜生根培养情况

表 7 移栽驯化结果

不同开瓶时间(d)	成活率(%)	不同基质	成活率(%)
0	75.00 ± 10.00bB	1	90.00 ± 5.00abA
1	90.00 ± 5.00aAB	2	85.00 ± 8.66bA
3	95.00 ± 8.66aA	3	90.00 ± 5.00abA
5	100.00 ± 0.00aA	4	95.00 ± 5.00abA
7	95.00 ± 5.00aA	5	100.00 ± 0.00aA

3 结论与讨论

3.1 结论

珍珠菜种子最佳消毒方式为 5% 次氯酸钠消毒 10 min,

最适丛生芽诱导的部位为叶片,丛生芽诱导最佳培养基配方为添加 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L 的 MS 培养基,其次为添加 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L 的 MS 培养基。最适增殖培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L,其次为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + KT 2.0 mg/L 培养基。最适生根培养基为 1/2MS + NAA 0.5 mg/L,其次为 1/2MS + NAA 1.0 mg/L。珍珠菜移栽驯化的方法为幼苗在自然光照射下培养 3 d 后再开瓶驯化 5 d,最后种植于蛭石:珍珠岩:泥炭(1:1:1)基质中。

3.2 讨论

试验中虽得出了种子的最佳消毒方法,但种子萌发率很低,这可能是因为珍珠菜种子较小,种皮较薄,在消毒剂浸泡过程中伤害到了种胚,致使种子不能萌发死亡,以后的试验可

韦琴,吴士筠,梅辉,等. 鸡 α 干扰素在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达及抗病毒功能初探[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):49-51.

鸡 α 干扰素在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达及抗病毒功能初探

韦琴¹, 吴士筠¹, 梅辉², 叶斌³

(1. 武汉长江工商学院工学院,湖北武汉 430065; 2. 武汉生物工程学院生物科学与技术系,湖北武汉 430415;

3. 武汉瑞阳生物科技有限公司,湖北武汉 430070)

摘要:为了研究鸡 α 干扰素(ChIFN α)基因的特性和功能,将鸡 α 干扰素的 DNA 序列克隆到巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)分泌表达载体 pPIC9K 中,并转化入巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株,用 PCR 技术鉴定阳性转化子。重组菌株 GS115/pPIC9K-IFN α 用 1% 甲醇诱导后,分泌表达重组蛋白,斑点杂交(dot-blot)检测 IFN α 具有免疫原性。细胞病变抑制法表明,表达产物有明显的抗鸡 H9N2 亚型禽流感病毒活性。

关键词:鸡 α 干扰素;巴斯德毕赤酵母;免疫原性;细胞病变抑制法

中图分类号: S852.65⁺7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0049-03

干扰素(interferon, IFN)是一类具有广谱抗病毒活性的细胞因子,能调节机体免疫反应^[1]。 α 干扰素是由能在脊椎动物各种类型的细胞中增殖的病毒诱导白细胞产生的^[2],其主要活性是抗病毒。Sekellick 等于 1994 年克隆表达了鸡的 α 干扰素(ChIFN α)基因^[3],其后的文献也报道了红色原鸡中命名为 IFNA1、IFNA2 和 IFNA3 的干扰素基因序列^[4-5]。到目前为止,已知 ChIFN α 的抗病毒能力较强,比 ChIFN β 强 20 倍左右。对于巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的研究起始于 1970 年左右。巴斯德毕赤酵母是甲醇营养型酵母中的一类

能够利用甲醇作为唯一碳源和能源,大量合成外源蛋白质的酵母菌,因此,该酵母引起了人们的兴趣和关注,得到了广泛的研究和应用。目前有关细胞因子在巴斯德毕赤酵母中获得表达的报道屡见不鲜^[6-9]。

我国养禽业经过近 30 年的持续稳步增长,已成为世界上最大的养禽国之一。禽病大规模暴发会给我国养禽业带来巨大的经济损失,因此,利用干扰素基因结合基因工程手段生产生物制剂,来预防和治疗禽类的各种病毒传染病具有重要意义。本研究以质粒 pPIC9K 为骨架,成功构建了巴斯德毕赤酵母表达载体 pPIC9K-IFN α ,在巴斯德毕赤酵母菌 GS115 中获得了分泌表达的重组干扰素,并进一步探讨了其抗病毒活性。

收稿日期:2013-12-24

作者简介:韦琴(1981—),女,湖北天门人,硕士,讲师,主要从事生物化学与分子生物学方向的研究。E-mail:53471348@qq.com。

以探索较温和的消毒方法。由于同一植物的不同组织和器官,其再生能力有很大差距,并非所有的部位都能顺利分化出芽。因此,在组织培养试验中选择合适的外植体类型是试验成功的重要条件之一,而培养基质和培养条件也在组织培养过程中起重要作用^[8-9]。本试验选择珍珠菜的叶片、茎段和带叶腋茎为外植体,且结果为叶片为诱导丛生芽最佳外植体。在诱导丛生芽过程中,细胞分裂素与生长素组合有利于丛生芽的生成,其中细胞分裂素的浓度增高诱导效果随之增高,且 6-BA 效果明显好于 KT,而细胞分裂素或生长素两两组合不利于丛生芽诱导。珍珠菜的增殖过程中,细胞分裂素和生长素的组合效果比细胞分裂素组合效果差。在移栽驯化过程中,0 d 开瓶时间由于植株还没有由异养转成自养模式,无法从基质中吸取营养与水分,所以移栽后植株易死亡,成活率低。而开瓶 7 d 后,可能基质污染影响到根系,造成植株死亡,成活率降低。在基质组合中,蛭石:珍珠岩:泥炭(1:1:1)透气透水性最好,最利于植株生长,而泥炭基质透气性差,水分不易流失导致根部腐烂,植株死亡。本试验成功地建立了珍珠菜组织培养与植株再生技术体系,对快速繁殖珍珠菜优良品种和种质资源的离体保存具有重要意义。

参考文献:

- [1] 陈封怀,胡启明. 中国植物志:第 59 卷第 1 册[M]. 北京:科学出版社,1989:102-103.
- [2] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志:第五卷山柳科·茄科[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1989:59-60.
- [3] Iversen R R, Weiler T C. Strategies to force flowering of six herbaceous garden perennials[J]. HortTechnology, 1994, 4(1): 61-65.
- [4] Lewis P M A A, Garner J M. Cooling accelerates flowering of *lysichiton clethroides* Duby[J]. HortScience, 1999, 34(2): 239-241.
- [5] 阙怡,李厚华,付婉艺,等. 西府海棠组织培养体系的建立与优化[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(5): 87-90.
- [6] 邹利娟,吴庆贵,罗明华. 罗勒组培快繁技术研究[J]. 中药材, 2013, 36(5): 702-705.
- [7] 李京,张建瑛,张妍妍,等. “美登”蓝莓组培苗移栽技术研究[J]. 北方园艺, 2013(13): 36-38.
- [8] 陈雪鹏,吴珏,李雪珂,等. 芙蓉菊组培快繁技术的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(7): 100-104, 127.
- [9] 全妙华,欧立军,贺安娜,等. 天门冬组培快繁技术研究[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1599-1603.