

殷勤,杜尚广,张青,等.互叶白千层的快繁技术[J].江苏农业科学,2015,43(3):20-24.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.006

互叶白千层的快繁技术

殷勤,杜尚广,张青,罗丽萍

(南昌大学生命科学学院,江西南昌 330031)

摘要:为研究出一套完整的互叶白千层快繁技术体系,以互叶白千层幼苗茎段为外植体,分别以诱导率、增殖倍数、生根率为指标,采用正交试验对芽诱导培养基、丛生芽增殖培养基、生根培养基进行优化。结果表明,最佳诱导培养基为 MS + 0.01% 活性炭 + 0.1 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA,诱导率为 82.8%;最佳增殖培养基为 MS + 30 g/L 蔗糖 + 0.25 mg/L 6-BA,增殖倍数为 31 倍;最佳生根培养基为 1/2 MS + 30 g/L 蔗糖 + 0.1 mg/L NAA,生根率达 100%,移栽 30 d 后成活率达 80% 以上。研究结果为互叶白千层的工厂化育苗提供了技术参考。

关键词:互叶白千层;快速繁殖;正交试验;芽诱导;丛生芽增殖;生根

中图分类号: Q945.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0020-04

互叶白千层(*Melaleuca alternifolia*)为桃金娘科(Myrtaceae)白千层属(*Melaleuca*)常绿小乔木,原产于澳大利亚的新南威尔士州和新西兰的部分地区^[1],是近年我国成功引进的高价值经济植物及绿化树种。互叶白千层对污染物有很强的净化能力^[2-4],可用于构建植物浮床^[5]。互叶白千层的新鲜枝叶和树干提取的精油俗称茶树油,可以高效、无毒、无刺激地杀死人体皮肤表面的真菌和细菌^[6-9],并对某些病毒也有抑制作用^[10-11],是一种强效的抗菌剂^[12-17]、杀虫剂^[18-20]、芳香剂^[21]、防腐剂^[22],是不可多得的天然保健医药材料,广泛应用于制药、日化、食品、香料等行业。因此,种植互叶白千层具有巨大的生态和经济效益。

目前,国内外对互叶白千层的研究主要集中在其精油的提取、成分分析及作用等方面^[23-24],而对利用组织培养技术进行再生植株的研究较少,目前尚没有完整的快繁技术体系。依据精油化学成分含量的不同,互叶白千层分为 6 种^[25],其中仅松油醇-4 型优良品种提取的精油成分满足国际标准^[26]。为获得品种优良的互叶白千层,使用种子繁殖多败育,发芽率很低^[27],且后代易产生变异,难以保持亲本优良性状;扦插繁殖生根率虽高^[28],但成活率较低^[29]。组织培养既可以保持亲本的优良性状,又可以将获得的优良株系快速推广应用于生产,有望成为互叶白千层产业化育苗的主要繁殖手段。

本试验以互叶白千层茎段为材料,进行表面灭菌处理,对诱导培养基、增殖培养基、生根培养基进行筛选,并对试管苗驯化移栽,拟建立一套完整的互叶白千层快繁技术体系,为互叶白千层的优株选育提供理论依据,为其工厂化育苗提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

互叶白千层为温室栽培植株,株高 20 cm,由江西抚州市森源生物科技有限公司提供。

1.2 仪器

W-CJ-2FD 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司生产),LMQJ 型立式灭菌锅(山东新华医疗器械股份有限公司生产),JY2002 电子分析天平(精密科学仪器有限公司生产),JA1003N 电子天平(精密科学仪器有限公司生产)。

1.3 方法

1.3.1 外植体的表面灭菌及预处理 培养 60 d 的温室种植的互叶白千层幼苗,株高 30 cm,在 20 cm 处去顶。30 d 后,随机剪取 5 cm 的幼苗茎段,剪去部分叶片,用洗衣粉液浸泡 30 min,流水冲洗 2 h;70% 乙醇处理 30 s,无菌水洗 3 次,然后用 0.1% HgCl₂ 处理 3 min,无菌水洗 4 次,待用;去掉茎段顶部,剪取约 1 cm,含 4~5 个节点的茎段,接种到诱导培养基中。为了降低酚类物质氧化褐变引起的生长抑制,在第 3 天将茎段转接到新的培养基中。

1.3.2 诱导培养基的优化 采用 3 因素 4 水平 L₁₆(4³) 正交试验。各因素水平见表 1。共 16 组固体培养基,每组 8 瓶,每瓶 5 个茎段;30 d 后统计长芽的外植体数、芽数,并计算诱导率。诱导率的计算公式如下:

诱导率 = 诱导出芽的外植体数 ÷ 接种的外植体数 × 100%。

表 1 诱导培养基优化的 3 因素 4 水平正交试验表

水平	因素		
	A: 活性炭 (%)	B: 6-BA (mg/L)	C: NAA (mg/L)
1	0.01	0.1	0.05
2	0.03	0.5	0.10
3	0.05	1.0	0.15
4	0.07	1.5	0.20

收稿日期:2014-06-17

基金项目:江西省研究生创新专项资金(编号:YC2012-S019)。

作者简介:殷勤(1990—),女,云南曲靖人,硕士研究生,研究方向为植物资源开发与利用。E-mail: yinqin2012@163.com。

通信作者:罗丽萍,教授,研究方向为植物资源开发与利用。

E-mail: lluo2@126.com。

1.3.3 增殖培养基的优化 采用 3 因素 4 水平 $L_{16}(4^3)$ 正交试验。各因素水平见表 2。共 16 组液体培养基,每组 16 瓶,每瓶 5 个诱导出单芽的茎段;60 d 后统计丛生芽数,并计算增殖倍数。增殖倍数的计算公式如下:

增殖倍数 = 丛生芽数 ÷ 接种的外植体数 × 100%。

表 2 增殖培养基优化的 3 因素 4 水平正交试验表

水平	因素		
	A:蔗糖 (g/L)	B:6-BA (mg/L)	C:NAA (mg/L)
1	25	0.125	0
2	30	0.250	0.05
3	35	0.500	0.10
4	40	1.000	0.20

1.3.4 生根培养基的优化 采用 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验。各因素水平见表 3。共 9 组固体培养基,每组 10 瓶,每瓶 5 个幼枝茎段;30 d 后统计生根的外植体数,并计算生根率。生根率的计算公式如下:

生根率 = 生根的外植体数 ÷ 接种的外植体数 × 100%。

表 3 生根培养基优化的 4 因素 3 水平正交试验表

水平	因素			
	A:培养基	B:蔗糖 (g/L)	C:NAA (mg/L)	D:IAA (mg/L)
1	1/4MS	15	0	0
2	1/2MS	20	0.1	0.1
3	MS	30	0.5	0.5

1.3.5 移栽 生根培养 30 d 后,将试管苗转移到室外炼苗,散射光光照培养 10~20 d,当组培苗抽高生长,木质化程度加强时,即可移栽。取出试管苗,清洗根部,再用 0.1% 高锰酸钾溶液消毒 30 s,自来水清洗除去残留的高锰酸钾,然后把试管苗移栽至含基质(泥炭:珍珠岩=1:1)的花盆里,遮阳网遮阳,将 1 L 的塑料饮料容器底部剪掉,罩在试管苗上,保持幼苗周围湿润。14 d 后,遮阳网部分移除,容器一侧抬起以露出植物。再过 7 d 后,遮阳网移除,移走容器。移栽 30 d 后统计成活率。

1.4 培养条件

温度(25±2)℃,光照 12 h/d,光照强度 2 500~3 000 lx。诱导培养基、增殖培养基和生根培养基的基础培养基均为 MS 培养基,通过添加各种不同浓度的激素或蔗糖、MS 成分减半进行优化;固体培养基中加 7.0 g/L 琼脂,调 pH 值为 5.8;液体培养基不加琼脂,不调节 pH 值,实际测得 pH 值为 5.2。

2 结果与分析

2.1 诱导培养基的优化

互叶白千层茎段在诱导培养基上培养 30 d,统计结果见表 4。极差分析表明,3 个因素对互叶白千层芽诱导的影响大小依次为:NAA>活性炭 6-BA。随着 NAA 浓度的增加,诱导率呈下降趋势;当活性炭浓度为 0.01%、6-BA 浓度为 0.1 mg/L、NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,诱导出芽数是 2.46 个,诱导率是 82.8%。方差分析表明,3 个因素对诱导率及芽

数无显著影响(表 5、表 6)。

芽诱导主要是已有芽原基在解除顶端优势之后的萌发。本试验结果表明,不同培养基对外植体的诱导率及芽数无显著影响,最佳诱导效果的培养基为:MS+0.01% 活性炭+0.1 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA。

表 4 互叶白千层芽诱导的正交试验结果

处理	因素			诱导率 (%)	芽数 (个)
	A:活性炭	B:6-BA	C:NAA		
1	1	1	1	82.8	2.46
2	1	2	2	63.6	2.24
3	1	3	3	70.0	2.10
4	1	4	4	51.4	2.50
5	2	1	2	65.7	2.04
6	2	2	1	63.9	2.30
7	2	3	4	66.7	1.77
8	2	4	3	73.0	2.19
9	3	1	3	51.7	2.00
10	3	2	4	52.8	1.58
11	3	3	1	66.7	2.50
12	3	4	2	75.0	2.33
13	4	1	4	69.2	2.19
14	4	2	3	74.4	2.66
15	4	3	2	66.7	2.10
16	4	4	1	60.5	1.74
k_1 (诱导率)	67.0	67.4	68.5		
k_2 (诱导率)	67.3	63.7	67.8		
k_3 (诱导率)	61.6	67.5	67.3		
k_4 (诱导率)	67.7	65.0	60.0		
R	6.1	3.8	8.5		

表 5 互叶白千层芽诱导正交试验的诱导率的方差分析

来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F 值	显著性
模型	329.201	9	36.578	0.270	0.961
活性炭	101.177	3	33.726	0.249	0.860
6-BA	42.192	3	14.064	0.104	0.955
NAA	185.832	3	61.944	0.457	0.722
误差	813.484	6	135.581		
总计	70 588.110	16			

注:“*”表示差异显著,“**”表示差异极其显著。下同。

表 6 互叶白千层芽诱导正交试验的芽数的方差分析

来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F 值	显著性
模型	0.310	9	0.034	0.202	0.983
活性炭	0.148	3	0.049	0.290	0.832
6-BA	0.015	3	0.005	0.029	0.993
NAA	0.147	3	0.049	0.287	0.833
误差	1.025	6	0.171		
总计	76.543	16			

2.2 增殖培养基的优化

互叶白千层芽诱导后在液体培养基中增殖培养 60 d,增殖倍数的统计结果见表 7。极差分析表明,3 个因素对互叶白千层芽增殖的影响大小依次为:NAA>6-BA>蔗糖。随着 NAA 浓度的增加,增殖倍数呈下降趋势,当 NAA 浓度为 0 时

增殖倍数最高。随着 6-BA 浓度的增加,增殖倍数先增大后减小,当 6-BA 浓度达 0.250 mg/L 时增殖倍数最高,这可能是由于低浓度的 6-BA 促进细胞分裂,而高浓度的 6-BA 则抑制细胞分裂。随着蔗糖浓度的增加,增殖倍数先增大后减小,当蔗糖浓度达 30 g/L 时,增殖倍数最高。方差分析表明(表 8),NAA 对增殖倍数影响达显著水平($P < 0.05$)。互叶白千层芽增殖的最佳培养基组合为:MS + 30 g/L 蔗糖 + 0.25 mg/L 6-BA,增殖倍数达 31 倍。

表 7 互叶白千层芽增殖的正交试验结果

处理	因素			增殖倍数
	A:蔗糖	B:6-BA	C:NAA	
1	1	1	1	16.25
2	1	2	2	3.87
3	1	3	3	2.00
4	1	4	4	2.00
5	2	1	2	10.88
6	2	2	1	31.00
7	2	3	4	2.25
8	2	4	3	0.00
9	3	1	3	3.56
10	3	2	4	3.65
11	3	3	1	7.10
12	3	4	2	1.00
13	4	1	4	1.74
14	4	2	3	4.95
15	4	3	2	4.21
16	4	4	1	4.13
k_1 (增殖倍数)	6.03	8.11	14.62	
k_2 (增殖倍数)	11.03	10.87	4.99	
k_3 (增殖倍数)	3.83	3.89	2.63	
k_4 (增殖倍数)	3.76	1.78	2.41	
R	7.27	9.09	12.21	

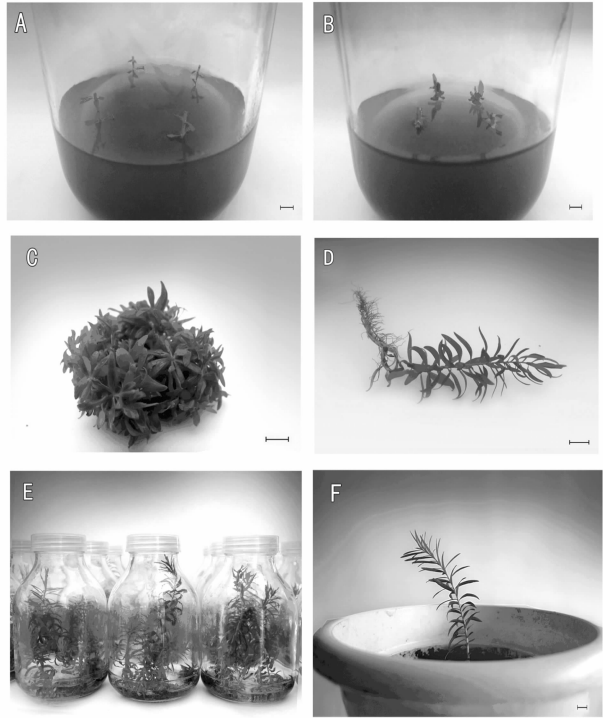
表 8 互叶白千层芽增殖正交试验的方差分析

来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F 值	显著性
模型	738.884	9	82.098	2.989	0.098
蔗糖	139.883	3	46.628	1.697	0.266
6-BA	201.075	3	67.025	2.440	0.162
NAA	397.926	3	132.642	4.829	0.049 *
误差	164.810	6	27.468		
总计	1 511.194	16			

List 等采用单因素试验获得的增殖培养基为 MS 固体培养基 + 1.0 mg/L BA,培养时间为 63 d,增殖倍数为 5.5 倍^[30]。De Oliveira 等同样用单因素试验获得的增殖培养基为 MS 液体培养基 + 0.25 mg/L BA,培养时间为 56 d,增殖倍数为 11.8 倍^[31]。樊吉尤等用不同激素组合进行试验,结果表明较好的激素组合是 0.8 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L 2,4-D,增殖倍数为 14.88 倍^[32]。本研究通过正交试验,获得了最佳的增殖培养基,增殖倍数达 31 倍,而且丛生芽较粗壮,呈深绿色(图 1-C),结果显著好于已往报道。主要原因有:(1)互叶白千层通常生长在沼泽中^[33],喜酸性或微酸性土壤^[34-35],本试验使用的液体培养基,pH 值为 5.2,适合其生

长;(2)以往研究一般在培养基中仅添加 NAA,本试验将其设定为因素之一,结果表明,NAA 与增殖倍数呈负相关,不加 NAA 的第 6 处理的培养基效果最佳;(3)本试验使用的是液体培养基,养分交换非常充分,营养物质可以更好地被吸收^[31]。

由表 7 可知,第 8 处理的培养基中外植体的增殖倍数为 0,观察发现该组培养基中的外植体无明显生长,逐渐变成褐色,可能原因是激素配比不利于芽的生长,同时液体培养基中氧气含量比较低,外植体易发生缺氧坏死。



A—带节茎段外植体;B—单芽;C—丛生芽;D—生根的试管苗;E—组培室培养的试管苗;F—移栽成活的植株。以上标尺均是 0.5 cm, E 中的组培瓶底部直径是 9 cm

图1 互叶白千层试管苗培育全过程

2.3 生根培养基的优化

生根培养 30 d 后,生根率统计结果见表 9。极差分析表明,对互叶白千层生根率的影响大小依次是:NAA > 基本培养基 = IAA > 蔗糖。由表 9 可知,所有培养基的生根率都在 80% 以上,第 6 处理的生根率和根系发达程度最高。观察可知,该处理试管苗根系发达,有 3 级根,一级根上生成粗细不同的二级根,并且在粗二级根上形成三级根,各级根上均有少量根毛;在以后炼苗时发现,这样的根系更加有利于移栽成活。因此,最佳生根培养基是含 30 g/L 蔗糖、0.1 mg/L NAA 和 0 mg/L IAA 的 1/2MS 培养基。

2.4 移栽

幼苗移栽是试管苗从实验室适宜生长环境到复杂外界环境,并发生从异养到自养的转变过程。因此,移栽前要进行炼苗,让试管苗更好地适应自然环境。在本试验中,经过炼苗,幼苗的地上、地下部分均具有较强木质化,移栽成活率达 80% 以上;其中,茎部粗壮、叶片浓绿、根系发达的幼苗,移栽时更易成活。

表 9 互叶白千层生根的正交试验结果

处理	因素				生根率 (%)	生根状况
	A:培养基	B:蔗糖	C:NAA	D:IAA		
1	1	1	1	1	96.1	根数多,细长
2	1	2	2	2	98.2	根数多,细短
3	1	3	3	3	81.8	根数多,细短
4	2	1	3	2	80.0	根数少,粗壮
5	2	2	1	3	93.0	根数少,粗壮
6	2	3	2	1	100.0	根数多,粗壮
7	3	1	2	3	98.1	根数少,粗壮
8	3	2	3	1	84.9	根数少,粗壮
9	3	3	1	2	98.1	根数少,细长
k ₁	92.0	91.4	95.7	93.7		
k ₂	91.0	92.0	98.8	92.1		
k ₃	93.7	93.3	82.2	91.0		
R	2.7	1.9	16.6	2.7		

3 结论

通过正交试验得出互叶白千层外植体的最佳诱导培养基为 MS + 0.01% AC + 0.1 mg/L 6 - BA + 0.05 mg/L NAA,诱导率达 82.8%;最佳增殖培养基为 MS + 30 g/L 蔗糖 + 0.25 mg/L 6 - BA,增殖倍数达 31 倍;最佳生根培养基为 1/2 MS + 30 g/L 蔗糖 + 0.1 mg/L NAA,生根率达 100%;移栽 30 d 后,成活率达 80% 以上。研究结果为互叶白千层的工厂化育苗提供了科学依据。

参考文献:

[1] Shabir G A. Method development and validation for the GC - FID assay of p - cymene in tea tree oil formulation[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2005,39(3/4):681 - 684.

[2] Bolton K E,Greenway M. A feasibility study of *Melaleuca* trees for use in constructed wetlands in subtropical Australia[J]. Water Science and Technology,1997,35(5):247 - 254.

[3] Bolton K E,Greenway M. Pollutant removal capability of a constructed *Melaleuca* wetland receiving primary settled sewage[J]. Water Science and Technology,1999,39(6):199 - 206.

[4] Bolton K E,Greenway M. Nutrient sinks in a constructed *Melaleuca* wetland receiving secondary treated effluent[J]. Water Science and Technology,1999,40(3):341 - 347.

[5] 李 彬,靖元孝,王忠正,等. 互叶白千层(*Melaleuca alternifolia*)浮床对生活污水净化效果研究初报[J]. 华南师范大学学报:自然科学版,2010(2):90 - 95.

[6] Catalán A,Pacheco J G,Martínez A,et al. *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*[J]. Oral Surgery,Oral Medicine,Oral Pathology,Oral Radiology,and Endodontology,2008,105(3):327 - 332.

[7] Ninomiya K,Maruyama N,Inoue S,et al. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component,terpinen - 4 - ol protect mice from experimental oral candidiasis[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin,2012,35(6):861 - 865.

[8] Benger S,Townsend P,Ashford R L,et al. An *in vitro* study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*[J]. The Foot,2004,

14(2):86 - 91.

[9] Liu J P,Yang M,Liu Y X,et al. Herbal medicines for treatment of irritable bowel syndrome[J]. Cochrane Database Syst Rev,2006,1(1):CD004116.

[10] Garozzo A,Timpanaro R,Stivala A,et al. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on influenza virus a/PR/8;study on the mechanism of action[J]. Antiviral Research,2011,89(1):83 - 88.

[11] Carson C F,Smith D W,Lampacher G J,et al. Use of deception to achieve double - blinding in a clinical trial of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil for the treatment of recurrent herpes labialis[J]. Contemporary Clinical Trials,2008,29(1):9 - 12.

[12] Pereira T S,De Sant'anna J R,Silva E L,et al. *In vitro* genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes[J]. Journal of Ethnopharmacology,2014,151(2):852 - 857.

[13] Santamaria J,Petermann K D,Scudeler Vedovello S A,et al. Antimicrobial effect of *Melaleuca alternifolia* dental gel in orthodontic patients[J]. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,2014,145(2):198 - 202.

[14] Thomsen N A,Hammer K A,Riley T V,et al. Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus* spp. to antimicrobials,triclosan,tea tree oil,terpinen - 4 - ol and carvacrol[J]. International Journal of Antimicrobial Agents,2013,41(4):343 - 351.

[15] 吴 岷,谢吉蓉,宋 琴,等. 茶树油作为天然抗菌剂的研究进展[J]. 中国药学杂志,2013,48(21):1803 - 1807.

[16] 曹 维,朱建梅,俞励平,等. 河源引种互叶白千层精油抗菌实验研究[J]. 中药材,2013,36(6):988 - 991.

[17] Cox S D,Mann C M,Markham J L,et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)[J]. Journal of Applied Microbiology,2000,88(1):170 - 175.

[18] Callander J T,James P J. Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*[J]. Veterinary Parasitology,2012,184(2/3/4):271 - 278.

[19] Iori A,Grazioli D,Gentile E,et al. Acaricidal properties of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree oil) against nymphs of *Ixodes ricinus*[J]. Veterinary Parasitology,2005,129(1/2):173 - 176.

[20] James P J,Callander J T. Dipping and jetting with tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil formulations control lice (*Bovicola ovis*) on sheep[J]. Veterinary Parasitology,2012,189(2/4):338 - 343.

[21] 田玉红,邹克兴,刘 政,等. 互叶白千层精油的提取工艺及其在卷烟中的应用研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(29):12543 - 12545.

[22] 刘布鸣,董晓敏,黄 艳,等. 互叶白千层的化学成分研究[J]. 中草药,2011,42(7):1282 - 1284.

[23] 肖凯军,李 琳,郭祀远,等. 互叶白千层油的提取和应用[J]. 食品科技,2000(1):12 - 13.

[24] 张燕君,古佛政. 互叶白千层精油的组分及抗菌作用[J]. 广东林业科技,1998,14(2):31 - 34.

[25] Homer L E,Leach D N,Lea D,et al. Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae)[J]. Biochemical Systematics and Ecology,2000,28(4):367 - 382.

[26] Essential oils - oil of *Melaleuca*, terpinen - 4 - ol type (tea tree oil). ISO - 4730 [R]. Geneva: International Organisation for Standardisation,1996.

李 芳. 基于多个核基因序列的 1 株皮伞属菌株的鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 24–25.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.007

基于多个核基因序列的 1 株皮伞属菌株的鉴定

李 芳

(滨州学院化学工程系, 山东滨州 256600)

摘要:提取在北京市房山地区野外环境中采集的 1 株野生菌子实体的基因组 DNA, 并以此为模板进行 ITS、LSU 和 SSU 片段的扩增、测序及比对分析。结果发现, 从菌丝体基因组 DNA 中扩增获得了 700 bp 左右的 ITS 片段、850 bp 左右的 LSU 片段和 1 800 bp 左右的 SSU 片段, 经序列测定及比对, 表明该真菌是 *Marasmiellus* 属菌株。建立了一种野生真菌快速、准确的鉴定方法。

关键词:皮伞属; 分子鉴定; ITS; LSU; SSU

中图分类号: S646.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0024-02

我国地域广阔, 野生食用菌资源丰富、种类繁多、分布广泛、蕴藏量大。野生食用菌分类鉴定是涉及资源保护利用及产业发展的一项基础性研究工作^[1]。随着分子生物学技术的广泛应用, 从分子的层面上对野生菌进行快速、有效的鉴定, 为野生菌的鉴定、开发及利用提供了很大的便利^[2]。本研究对北京市房山地区采集的 1 株野生菌进行分子鉴定, 并通过多个核基因序列的测定及比对分析, 从而对该野生菌株的遗传地位进行解析, 为该野生菌的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 子实体, 采集自北京市房山区东湖港风景区的野生菌。

1.1.2 试剂 基因组 DNA 提取试剂盒 Dneasy Plant Mini Kit 和凝胶回收试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit 购自德国 QIAGEN 公司; TaKaRa PCR Mix 购自大连宝生物公司; 琼脂糖购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 仪器 PCR 仪 (BIO-RAD, mycycler)、凝胶成像系统 (BIO-RAD)、电泳仪 (北京六一 DYY-III-12B)、离心机

(Eppendorf 5418)、移液器 (Eppendorf) 等。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取少量子实体于 1.5 mL 离心管中, 加入少量液氮, 研磨棒研磨至粉末状后, 利用 Dneasy Plant mini Kit 试剂盒 (QIAGEN, 货号: 69104) 说明书进行 DNA 的提取。

1.2.2 ITS-PCR 扩增 选取 ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 为引物^[3], 以所提基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min; 降至 4 °C 结束。反应体系为 50 μL。然后进行电泳检测。

1.2.3 LSU-PCR 扩增 选取 LR5 (5'-TCCTGAGG-GAAACTTCG-3', <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>) 和 LROR (5'-ACCCGCTGAACCTTAAGC-3', <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>) 为引物, 以所提基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 降至 4 °C 结束。反应体系为 50 μL。然后进行电泳检测。

1.2.4 SSU-PCR 扩增 选取 NS1 (5'-GTAGTCATATGCT-TGTCTC-3', <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>) 和 NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3',

收稿日期: 2014-04-17

作者简介: 李 芳 (1981—), 女, 山东滨州人, 硕士, 讲师, 从事分子生物学研究。E-mail: lifang1981@126.com。

[27] 周丽华, 张华通, 龚 峥, 等. 互叶白千层工厂化育苗技术[J]. 广东林业科技, 2001, 17(1): 16–19.

[28] 郭逸成. 互叶白千层扦插育苗技术研究[J]. 防护林科技, 2007(3): 26–27.

[29] 李晓林, 梁国鲁, 胡英浩, 等. 互叶白千层的扦插繁殖试验研究[J]. 西南园艺, 2003, 31(1): 16–18.

[30] List S E, Brown P H, Low C S, et al. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree) [J]. Animal Production Science, 1996, 36(6): 755–760.

[31] De Oliveira Y, Pinto F, Da Silva A L L, et al. An efficient protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 2010, 46(2): 192–197.

[32] 樊吉尤, 莫昭展, 杨 福, 等. 不同培养条件对互叶白千层丛生芽增殖的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(24): 14705–14707.

[33] Scheidt G N, Lopes Da Silva A L, De Oliveira Y, et al. In vitro growth of *Melaleuca alternifolia* Cheel in bioreactor of immersion by bubbles [J]. Pakistan Journal of Botany, 2011, 43(6): 2937–2939.

[34] Southwell I A, Stiff I A, Brophy J J. Terpinolene varieties of *Melaleuca* [J]. Journal of Essential Oil Research, 1992, 4(4): 363–367.

[35] 张 梅, 幸世林. 互叶白千层大棚引种育苗[J]. 林业实用技术, 2003(7): 21–22.