

高媛,孙牧笛,徐全智,等.苦豆子愈伤组织诱导及细胞悬浮培养体系的建立[J].江苏农业科学,2017,45(14):27-31.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.008

苦豆子愈伤组织诱导及细胞悬浮培养体系的建立

高媛,孙牧笛,徐全智,陈亚萍,顾沛雯

(宁夏大学农学院,宁夏银川 750021)

摘要:以苦豆子子叶和胚轴为材料,对苦豆子愈伤组织诱导和继代增殖的最佳培养条件进行研究,旨在建立苦豆子悬浮细胞体系。结果发现,子叶和胚轴为愈伤组织生成的最佳外植体,愈伤组织最佳诱导培养基是 MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA;最佳继代增殖培养基是 MS+1.0 mg/L NAA+4.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D。以胚轴诱导的愈伤组织是细胞悬浮培养的理想材料,初始接种量 10%~20%,添加 3% 蔗糖,有利于悬浮细胞体系的生成。

关键词:苦豆子;愈伤组织;悬浮培养;子叶;胚轴;诱导培养基;继代增殖培养基;初始接种量

中图分类号:S567.904.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)14-0027-04

苦豆子(*Sophora alopecuroides*)豆科槐属,是我国西北荒漠区广泛分布的一种重要沙生药用植物^[1],以全草、根、种子入药,味极苦,性寒,民间用其根治喉痛、咳嗽、痢疾及湿疹等^[2]。喹诺里西啉生物碱和类黄酮是其重要的活性成分,已有研究报道,喹诺里西啉生物碱是一种安全无毒的生物杀虫剂,在医药上苦豆子具有清热解毒、祛风除湿、止痛杀虫、增强免疫等多种生理活性^[3]。通过刈割苦豆子植株提取有效活性物质是目前常用的方法,但苦豆子野生资源有限,且不利于人工栽培,势必造成野生资源枯竭,影响生态平衡^[4]。因此,合理开发利用苦豆子资源是其长足发展的重要途径。

植物细胞悬浮培养是指将单个游离细胞或小细胞团在液体培养基中进行培养增殖的技术。目前,利用悬浮细胞培养来生产次生代谢物已广泛应用于各类药用植物中。1997年,许建锋等首次开展了高山红景天悬浮细胞培养^[5]。2010年,姜新超对岷江百合进行愈伤组织的诱导时发现,悬浮细胞系建立的关键在于挑选适于悬浮细胞培养的愈伤组织^[6]。2014年,赵继鹏等建立了曼地亚红豆杉细胞悬浮体系,发现接种量和激素配比起着至关重要的作用^[7]。迄今为止,国内外有关药用植物悬浮细胞培养方面的研究越来越多,红豆杉、甘草、半夏等都有相关的报道^[8-10]。关于苦豆子愈伤组织培养已有大量报道,但暂无人建立苦豆子悬浮细胞系。本研究以苦豆子发芽籽粒的子叶、胚轴和胚根为外植体,研究苦豆子愈伤组织诱导、继代增殖培养条件,建立苦豆子悬浮细胞培养体系,为进一步研究苦豆子悬浮细胞培养生产次生代谢产物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生苦豆子豆荚采自宁夏灵武白芨滩国家自然保护区。

收稿日期:2016-04-13

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260452)。

作者简介:高媛(1988—),女,山东日照人,硕士研究生,主要从事植物保护等研究。E-mail:elfish521@163.com。

通信作者:顾沛雯,博士,教授,硕士生导师,主要从事植物保护等研究。E-mail:gupeiwen2013@126.com。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导培养

1.2.1.1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响 挑选饱满、无病虫害的甜豆种子,80%硫酸浸泡 2 h 软化种皮,无菌水冲洗并浸泡 2 h。用体积分数为 75% 的乙醇消毒 1 min,无菌水冲洗 3 次,5% 次氯酸钠溶液浸泡 10 min,无菌水冲洗 3 次,置于铺有无菌滤纸的培养皿中,温度为(25±2)℃,暗培养 24 h 后,光周期为 12 h/d,培养 3~5 d 催芽。将子叶、胚轴和胚根用灭菌刀划上切口后,接种于添加激素(0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D)的 MS 培养基上诱导愈伤组织。每种处理接种 60 块外植体,上述培养条件培养 25 d 后统计愈伤组织的诱导率,观察愈伤组织的生长状况。愈伤组织诱导率=诱导愈伤组织数/接种组织数×100%。

1.2.1.2 不同激素配比对苦豆子愈伤组织诱导的影响 将子叶和胚轴分别接种于添加 2,4-D(0.1、0.5、1.0、1.5 mg/L)、6-BA(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)和 NAA(0.1、0.5、1.0 mg/L)组成的 26 种 MS 培养基上,每个处理接种 60 块外植体,在温度为(25±2)℃、光照时间 12 h/d 条件下培养 25 d,统计愈伤组织的诱导率及其生长状况。

1.2.2 愈伤组织的增殖培养 将生长旺盛的愈伤组织转接至添加 2,4-D(0.2、0.5、1.0 mg/L)、6-BA(0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L)和 NAA(0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L)组成的 7 种 MS 培养基上进行增殖培养,计算愈伤组织的增殖系数并记录愈伤组织的生长状态。增殖系数=收获鲜质量/接种鲜质量。

1.2.3 悬浮细胞系的建立 选用子叶诱导增殖培养 4 次的愈伤组织和胚轴诱导生成的愈伤组织,接种于含有“1.2.2”节筛选出的最佳激素配比的 MS 液体培养基中,100 mL 锥形瓶中加入 30 mL MS 液体培养基,置 110 r/min 的恒温摇床上,在温度(25±1)℃下黑暗培养 12 h 后,光照黑暗交替 12 h/d。每隔 5 d 继代 1 次,吸取约 10 mL 的培养物,接种到新鲜培养基中,连续培养 2~3 代,得到悬浮细胞。

1.2.3.1 初始接种量对悬浮细胞系的影响 以胚轴诱导的愈伤组织为悬浮细胞系材料,按不同梯度接种量接种至添加

最佳激素配比的 MS 液体培养基中,7 d 后收获观察悬浮细胞的生长情况。

1.2.3.2 不同浓度抗氧化剂对悬浮细胞系的影响 以胚轴诱导的愈伤组织为悬浮细胞系材料,分别添加质量浓度 10、30、50 mg/mL 的蔗糖以及 10、20 mg/mL 的维生素 C,7 d 后收获观察悬浮细胞的生长情况。

1.2.4 悬浮细胞系生长量的测定 接种 0.3 g 悬浮细胞于培养液体积为 30 mL 的 100 mL 锥形瓶中,每 2 d 取样 1 次,每次取 3 瓶,将悬浮细胞培养液倒入布氏漏斗减压抽滤,抽干水分测定鲜质量,连续测定 7 次绘制生长曲线。

1.2.5 悬浮细胞系 pH 值的测定 每 2 d 取 1 次悬浮细胞培养液,用 pH 计测量其酸碱度的变化,并绘制 pH 曲线。

1.2.6 悬浮细胞系蔗糖含量的测定 利用硫酸蒽酮法测定悬浮细胞系蔗糖含量,蔗糖标准曲线 $y = 0.0077x + 0.0244$ ($r^2 = 0.9965$),线性关系良好。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

以子叶为外植体的诱导率高达 88.3%,生长状态良好,愈伤组织呈嫩绿色,表面松软结构紧实;其次,以胚轴为外植体的诱导率为 83.3%,组织膨大疏松,颜色浅绿或淡黄;以胚

根为外植体的诱导率仅为 23.3%,生长速度慢,分化困难,不易进行增殖培养(表 1)。

表 1 不同外植体诱导愈伤组织的效果

外植体	接种数	诱导数	诱导率 (%)	生长情况
子叶	60	53	88.3	表面松软,结构紧实,嫩绿色
胚轴	60	50	83.3	结构松软且散,浅绿色
胚根	60	14	23.3	结构疏松,黄色

2.2 不同激素对比对愈伤组织诱导的影响

NAA 在苦豆子愈伤组织的诱导上起着重要作用,未添加 NAA 的愈伤组织生长情况并不理想,仅在子叶切口边缘长出愈伤组织,一般质地较硬,诱导效果不理想。添加 0.1~0.5 mg/L NAA、1.5~2.0 mg/L 6-BA、0.5~1.0 mg/L 2,4-D,对苦豆子子叶愈伤组织的诱导效果较好,诱导率相对较高,说明 NAA、6-BA、2,4-D 激素组合容易诱导出愈伤组织。从诱导率及愈伤组织的形态和生长状况综合来看,诱导子叶愈伤组织的最佳培养基是 MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA,愈伤组织表面松软,质地紧实,呈淡绿色(表 2)。此外,用上述培养基进行胚轴愈伤组织的诱导,诱导率高达 100%,为质地疏松的淡黄色愈伤组织。

表 2 不同激素配比对苦豆子子叶愈伤组织诱导的影响

激素配比 (mg/L)	愈伤组织数 (块)	诱导率 (%)	愈伤组织生长情况和形态特征
NAA 0.1 + 6-BA 0.5	60	100.0	生长情况良好,质地疏松、水渍状,淡绿色
NAA 0.2 + 6-BA 0.5	57	95.0	生长情况良好,质地疏松,黄色
NAA 0.5 + 6-BA 0.5	58	97.0	生长情况良好,质地疏松,淡黄色
NAA 1.0 + 6-BA 0.5	60	100.0	生长情况一般,质地疏松,近褐化
NAA 0.1 + 6-BA 1.0	57	95.0	生长情况良好,质地疏松,淡绿色
NAA 0.2 + 6-BA 1.0	55	92.0	生长情况良好,质地疏松,淡绿色
NAA 0.5 + 6-BA 1.0	48	80.0	生长情况良好,质地疏松,淡黄色
NAA 1.0 + 6-BA 1.0	49	82.0	生长情况良好,质地疏松,鲜绿色
NAA 0.1 + 6-BA 1.5	58	97.0	生长情况一般,质地疏松,淡黄色
NAA 0.2 + 6-BA 1.5	50	83.0	生长情况一般,质地疏松,淡黄色
NAA 0.5 + 6-BA 1.5	49	82.0	生长情况一般,质地疏松,淡黄色
NAA 1.0 + 6-BA 1.5	51	85.0	生长情况一般,结构致密,翠绿色
NAA 0.1 + 6-BA 2.0	59	98.0	生长情况一般,结构致密,绿色
NAA 0.2 + 6-BA 2.0	48	80.0	生长情况一般,质地疏松,淡绿色
NAA 0.5 + 6-BA 2.0	39	65.0	生长情况一般,灰黄色
NAA 1.0 + 6-BA 2.0	40	67.0	生长情况一般,质地疏松,淡黄色
2,4-D 0.1 + 6-BA 0.5	46	77.0	生长情况一般,质地坚硬,绿色
2,4-D 0.5 + 6-BA 0.5	44	73.0	生长情况一般,质地坚硬,绿色
2,4-D 0.5 + 6-BA 1.0	41	68.0	生长情况一般,质地坚硬,绿色
2,4-D 0.1 + 6-BA 0.5 + NAA 0.1	26	43.0	生长情况较差,生长缓慢,质地疏松,黄色
2,4-D 0.5 + 6-BA 0.5 + NAA 0.5	38	63.0	生长情况一般,结构致密,绿色
2,4-D 0.5 + 6-BA 1.0 + NAA 0.5	59	99.0	生长状况良好,表面疏松,结构紧实,淡绿色
2,4-D 1.0 + 6-BA 1.0 + NAA 0.5	46	77.0	生长情况一般,结构致密,绿色
2,4-D 1.0 + 6-BA 1.5 + NAA 0.5	50	83.0	生长情况一般,结构致密,绿色
2,4-D 1.5 + 6-BA 1.0 + NAA 0.5	25	41.0	生长状况较差,生长缓慢,结构紧实,绿色
2,4-D 1.5 + 6-BA 1.0 + NAA 1.0	10	17.0	几乎不被诱导分化

2.3 愈伤组织的增殖培养

2,4-D 在愈伤组织增殖生长过程中起着重要作用,未添加 2,4-D 的愈伤组织严重褐化。当 6-BA 浓度为 4.0 mg/L、2,4-D 浓度为 1.0 mg/L、NAA 浓度为 1.0 mg/L

时,愈伤组织的继代增殖系数达到 2.4,愈伤组织质地疏松、颜色淡绿。从愈伤组织的形态、生长状况和增殖系数综合来看,最佳增殖培养基为 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 4.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA(表 3)。

表 3 不同激素配比对苦豆子愈伤组织增殖的影响

激素配比 (mg/L)	平均接种鲜质量 (g)	平均收获鲜质量 (g)	增殖系数	生长情况
2,4-D 0.5+6-BA 2.0+NAA 0.5	4.5	9.1	2.0	质地疏松,淡黄色
2,4-D 1.0+6-BA 4.0+NAA 1.0	4.6	11.0	2.4	质地疏松,淡绿色
2,4-D 1.0+6-BA 1.0+NAA 0.5	5.1	9.2	1.8	结构致密,深绿色
2,4-D 0.2+6-BA 4.0+NAA 1.0	7.4	9.3	1.3	质地疏松,淡黄色
6-BA 0.5+NAA 0.1	2.1	0	0	褐化,泥膏状
6-BA 0.5+NAA 0.2	2.5	0	0	褐化,泥膏状
6-BA 0.5+NAA 0.5	1.9	0	0	褐化,泥膏状

2.4 悬浮细胞系的建立

以胚轴愈伤组织为材料(图 1-A1),在 MS+1.0 mg/L 2,4-D+4.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 培养基中培养后 4 d 起,培养液逐渐开始浑浊,呈现淡黄色黏稠状(图 1-

A2),镜检可观察到分散的细胞及正在分裂的细胞团(图 1-A3);而以子叶愈伤组织为材料培养悬浮细胞,前 3 d 细胞保持鲜绿色,7 d 后悬浮细胞逐渐褐化死亡并聚集下沉。



A1—以胚轴愈伤组织为材料建立悬浮细胞系; A2—以胚轴愈伤组织为材料建立悬浮细胞系的显微结构; A3—以子叶愈伤组织为材料建立悬浮细胞系

图 1 悬浮细胞系的建立

2.4.1 初始接种量对悬浮细胞系的影响 接种量为 4.77 g 时,7 d 后悬浮细胞系净生长量最高达 5.24 g,且悬浮细胞培养液自 2 d 起开始出现浑浊,逐渐变为淡黄色黏稠液体,显微镜检可以观察到大量分散性良好的细胞;其次为接种量

3.31 g,悬浮细胞系净生长量达 3.59 g;接种量分别为 1.62、7.53 g 时,悬浮细胞净生长量均较低(表 4)。可见,当接种量在 10%~20% 时,有利于悬浮细胞体系的生成。

表 4 不同接种量对悬浮细胞系的影响

平均接种 鲜质量(g)	接种率 (%)	平均收获鲜 质量(g)	鲜质量净生 长量(g)	悬浮细胞生长情况
1.62	5.4	2.85	1.23	培养液较澄清,5 d 后出现较少浑浊,悬浮细胞团生长缓慢,生长后期有褐化现象
3.31	11.0	6.90	3.59	2 d 后培养液开始浑浊,4 d 后转为黄绿色,培养液较为黏稠
4.77	15.9	9.01	5.24	2 d 后培养液黄绿色,黏稠状
7.53	25.1	8.17	0.64	4 d 后培养液过于黏稠,细胞生长缓慢,生长后期有褐化现象,死亡细胞聚集下沉

2.4.2 不同浓度抗氧化剂对悬浮细胞系的影响 添加维生素 C 可在短时间内保持悬浮细胞系的鲜活状态,但会抑制其生长分化;添加 10~50 mg/mL 的蔗糖在一定程度上能防止悬浮细胞褐化,其中添加 30 mg/mL 的蔗糖效果最好,悬浮细胞系净生长量达 2.59 g(表 5)。

2.5 悬浮细胞系的生长特征

培养前 2 d 细胞鲜质量变化不明显,有一定延迟期。接种后 3 d 细胞迅速生长,8 d 时细胞鲜质量达最大值,与培养初期相比增长约 3 倍,细胞生长进入稳定期(图 2)。

2.6 悬浮细胞系 pH 值的变化

苦豆子悬浮细胞在培养的前 2 d,pH 值较初始值有明显的下降,由 5.6 降至 5.35,随着培养时间的延长,pH 基本保持在 5.3~5.5 之间(图 3)。

2.7 悬浮细胞系糖含量的变化

悬浮细胞培养液中总糖浓度在培养前 2 d 出现急剧下降趋势,由 30 mg/mL 降至 10 mg/mL 左右,随着培养时间的延

表 5 不同浓度抗氧化剂对悬浮细胞系的影响				
抗氧化剂	浓度 (mg/mL)	愈伤组织悬浮细胞鲜质量(g)		
		平均 接种量	7 d 后平均 收获量	鲜质量净 生长量
维生素 C	0	3.63	4.12	0.41
	10	3.56	3.10	-0.46
	20	3.71	3.14	-0.49
蔗糖	0	3.59	4.59	1.00
	10	3.53	5.23	1.70
	30	3.31	5.90	2.59
	50	3.19	4.56	1.37

长,培养液中的蔗糖逐渐减少,10 d 后消耗殆尽(图 4)。

3 讨论与结论

在植物离体培养过程中,外植体的内源激素不断发生变化,向培养基中添加不同种类和浓度的生长调节物质,可以改变外植体的激素水平,从而影响外植体的生长状况。基本培

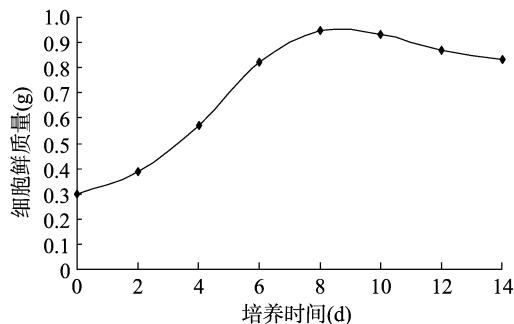


图2 苦豆子悬浮细胞生长曲线

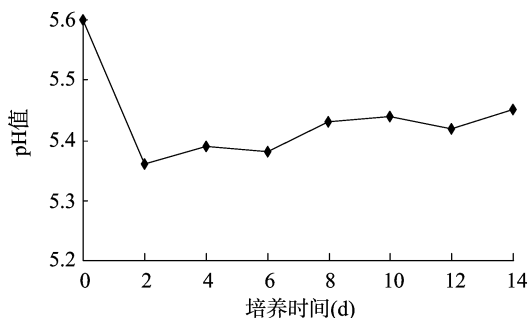


图3 苦豆子悬浮细胞系 pH 值的变化曲线

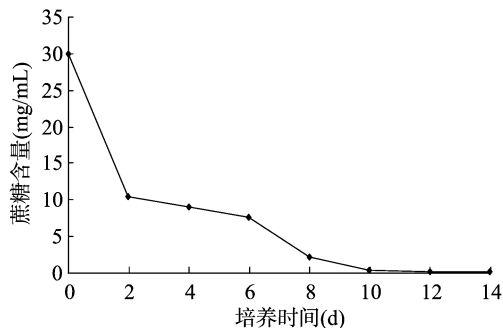


图4 苦豆子悬浮细胞系蔗糖含量变化曲线

培养基类型、外植体种类、激素水平等均影响着愈伤组织的诱导,其中激素水平对愈伤组织诱导的影响最为复杂^[11]。本试验在已有研究基础上,开展了不同激素种类及配比对苦豆子愈伤组织诱导及继代培养的影响,并建立苦豆子悬浮细胞培养体系。苦豆子子叶和胚轴均适合诱导生成愈伤组织,以 MS + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D 激素配比效果最佳,其细胞组织状态及长势最好。在苦豆子愈伤组织诱导过程中,NAA 是必不可少的,添加适量的 NAA 能促进细胞分裂与生长,诱导愈伤组织效果明显,但浓度不宜过高。一般情况下进行愈伤组织继代培养时,采用与诱导培养基即可使愈伤组织大量增殖,但也有研究指出继代培养须要适当调整激素配比,才能保证愈伤组织的增殖和生长^[12]。本试验发现,2,4-D 和 6-BA 在苦豆子愈伤组织继代培养中起着重要的作用,如不添加 2,4-D 愈伤组织容易褐化死亡,这可能与 2,4-D 和 6-BA 能有效加快植物细胞生长、延缓蛋白质和叶绿素降解相关^[13]。本试验以 MS + 1.0 mg/L NAA + 4.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L 2,4-D 激素配比的愈伤组织继代增殖效果最好,愈伤组织生长旺盛,颜色为黄绿色,质地疏松,易分散。

建立良好的悬浮细胞培养体系是进行大规模细胞培养的 necessary 准备,愈伤组织良好的松散性、较强的增殖和再生能力是细胞悬浮培养的前提条件。本试验采用苦豆子胚轴诱导愈伤组织,在诱导当代获得结构松散、单细胞比例高、分散性好的愈伤组织在 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 4.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA 液体培养基中培养后 2 d 起,培养液开始浑浊,培养后 4 d 呈现淡黄色黏稠状,生长培养后 8 d 即可获得稳定的悬浮细胞系。这与徐世千等关于百里香悬浮细胞系研究的报道^[12]相似。初始接种量是悬浮细胞培养过程中的重要指标,合适的细胞起始浓度,有利于相邻细胞的信号分子量在短时间达到细胞生长的需求。初始密度过高,细胞的快速生长会大量消耗培养基中的养分,导致细胞过早衰老,褐化死亡。初始浓度过低不利于细胞间信号传递,从而抑制细胞生长^[14]。在进行苦豆子细胞悬浮培养过程中,初始接种量控制在 10% ~ 20% 间,均可以获得较为稳定的悬浮细胞系。防褐化试剂可以有效抑制细胞的褐化,延长细胞的生长周期,且一些防褐化试剂可以促进细胞的生长和次生代谢物含量的提高^[15]。蔗糖是细胞生长的重要碳源,适宜浓度的蔗糖能提高培养细胞的生长速率并防止褐化。在苦豆子细胞悬浮系培养中添加 30 mg/mL 蔗糖,有利于苦豆子细胞生物量增加并降低褐化率。苦豆子悬浮细胞的生长周期较短,约为 10 d,液体培养基的 pH 值和蔗糖含量呈现一定的波动,生长前期 pH 值明显下降,可能与植物细胞快速吸收培养液中的氮素有关,pH 值的下降为水解酶提供了适宜的环境^[16],使细胞充分水解培养液中的糖分,为细胞的生长和代谢提供能量。

本试验通过对苦豆子愈伤组织的诱导及起始细胞密度和培养周期对细胞悬浮培养影响的研究,初步建立了苦豆子细胞悬浮培养体系,要获得更高产喹诺里西啶生物碱的苦豆子悬浮细胞系,碳源浓度、培养基成分及诱导前体等将是进一步试验要考虑的重要因素。

参考文献:

- [1] 张守润,纪 瑛,蔺海明. 施氮对苦豆子生物性状和生物量积累动态的响应[J]. 草业科学,2008,25(3):37-42.
- [2] 贝盖临,张 欣,曹君迈,等. 苦豆子不同外植体愈伤组织的诱导研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(1):61-62.
- [3] 王立强,杨 军,王光碧,等. 苦豆子愈伤组织的诱导与继代培养的去褐化研究[J]. 西华师范大学学报(自然科学版),2008,29(4):421-425,430.
- [4] 曹有龙,李晓莺,罗 青,等. 苦豆子的组织培养及植株再生的研究[J]. 广西植物,2010,30(1):102-105.
- [5] 许建峰,韩爱明,冯朴荪. 高山红景天细胞悬浮培养生长和营养成分摄取动力学及其计量关系[J]. 应用与环境生物学报,1997,3(2):100-105.
- [6] 姜新超. 百合悬浮细胞体系的建立及植株再生[D]. 北京:中国农业科学院,2010.
- [7] 赵继鹏,杨淑慎. 曼地亚红豆杉细胞悬浮培养体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(1):189-195.
- [8] 李永成. 东北红豆杉悬浮细胞与内生真菌在紫杉醇合成中相互关系的研究[D]. 无锡:江南大学,2009.
- [9] 包金龙. 甘草细胞悬浮培养系的建立与悬浮细胞中活性成分分析[D]. 包头:内蒙古科技大学,2010.

庞敏,黄科,刘奕清,等. 蓝莓茎尖脱毒繁育技术的建立[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):31-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.009

蓝莓茎尖脱毒繁育技术的建立

庞敏¹,黄科^{1,2},刘奕清^{1,2},王微¹

(1. 重庆文理学院林学与生命科学学院,重庆永川 402160;

2. 重庆文理学院特色植物研究院/重庆市特色种苗工程技术研究中心,重庆永川 402160)

摘要:分别采用细菌 16S rRNA、真菌 rDNA-ITS 通用引物对蓝莓茎尖脱毒苗基因组 DNA 进行扩增,结果表明,细菌 16S rRNA、真菌 rDNA-ITS 序列扩增结果均为阴性;Trizol 提取蓝莓茎尖脱毒苗 RNA 用于病毒衣壳蛋白基因扩增,结果均为阴性;茎尖脱毒蓝莓经离体快繁,增殖系数可达 5。

关键词:蓝莓;茎尖脱毒;扩增;繁殖系数

中图分类号: S663.904⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0031-03

蓝莓为杜鹃花科蓝莓属 (*Vaccinium* spp.) 小灌木水果,因所含花青素生理活性好于其他植物且具特色保健功能而风靡全球。我国从 20 世纪 80 年代开始引种栽培蓝莓,由于其病害发生率高且严重而导致减产^[1]。引起蓝莓发病主要的真菌性病原有葡萄座腔菌科真菌 *Neofusicoccum parvum* 和 *N. austral*、细极链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、炭疽病菌 (*Colletotrichum*)、棒状拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis clavispora*) 等^[2-6],能引起蓝莓叶片或枝条发病,使蓝莓叶片出现不规则坏死斑点,斑点边缘为棕褐色、棕红色或黑色,枝顶芽枯萎、死亡或主干枯萎等;蓝莓主要病毒病害有蓝莓枯焦病毒 (blueberry scorch virus, BLS_{CV})、蓝莓急性坏死病毒 (blueberry shock virus, BLS_{HV})^[7]。另外,蓝莓还受蓝莓根瘤病的危害^[8]。

传统的蓝莓繁育方式为分株、扦插等,不仅耗时、耗工,而且种苗不均一、携带病原,而通过植物分生组织或愈伤组织育苗可去除植物中已感染的病毒^[9]。因此,本研究建立蓝莓茎尖脱毒繁育技术,一方面可去除其致病病原物,另一方面可为蓝莓生产提供“种源可靠,数量充足”的良种,以满足蓝莓迅

猛发展之需。

1 材料与方法

1.1 试验材料

“夏晋蓝”(sharpblue)蓝莓,由重庆市天沛农业科技有限公司种质资源圃提供,选取 2012 年春季新生无病虫害、生长健壮的幼嫩新梢作为外植体。植物激素玉米素 (Zeatin, ZT),购自 Sigama 化学试剂中国代理公司;DNA 聚合酶,购于 Promega 公司;DNA 基因组试剂盒,购于 Omega 公司;扩增引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 外植体的诱导

将采集到的外植体剪除叶片,剪成 5~6 cm 茎段,用清水洗净;超净工作台上用 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 3 min,置于无菌水中浸泡 3~5 min,用无菌水清洗 3~5 次;切成带 1~2 个叶腋的茎段,接种于添加 3 mg/L ZT 的 CQWL 培养基上培养,培养条件为温度 (25±2) °C,光照度 30~50 μmol/(m²·s)、光照 10 h/d;诱导幼芽连续培养 2 代,每代时间约为 30 d,转至添加 1.5 mg/L ZT 的 CQWL 培养基上,每瓶接种无菌芽 6 株,连续继代培养 3 代。

1.3 茎尖剥离与增殖

将从生不定芽从基部单个分离,并自芽基部以上 0.5 cm 左右处切断;解剖镜下用无菌解剖刀小心逐层剥离外层叶鞘,直至露出长 0.3~0.5 mm 的茎尖;用未使用过的无菌解剖刀将茎尖从母体材料上切下,立即接种于茎尖伸长诱导培养基中, (25±1) °C、光照强度 10~20 μmol/(m²·s)、光照 12 h/d 条件下进行培养,将获得的芽接种到添加 1.5 mg/L ZT

收稿日期:2016-11-11

基金项目:重庆市委民生项目(编号:CSTC2016SHMSZX80041);重庆市教委科研项目(编号:KJ1401116)。

作者简介:庞敏(1981—),女,山东新泰人,讲师,从事植物组织培养研究。E-mail:50563820@qq.com。

通信作者:黄科,副教授,从事经济林培育工作。E-mail:shanbnm@126.com。

[10]刘永红. 半夏块茎与细胞培养体系的建立及主要生物碱的代谢调控研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2009.

[11]Zhang C H, Mei X G, Liu L, et al. Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(19): 1561-1564.

[12]徐世千,李晓东,张建国. 百里香愈伤组织的诱导及细胞悬浮培养体系的建立[J]. *西北农业学报*, 2011, 20(10): 112-119.

[13]陈亚萍,高媛,顾沛雯. 苦豆子愈伤组织的诱导和去褐化处理

[J]. *北方园艺*, 2014(16): 96-99.

[14]Mukherjee S, Ghosh B, Jha S. Establishment of forskolin yielding transformed cell suspension cultures of *Coleus forskohlii* as controlled by different factors[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 76(1): 73-81.

[15]郭艳,杨海玲. 植物组织培养中的褐化现象及解决途径[J]. *山西农业科学*, 2009, 37(7): 14-16, 31.

[16]宁文,徐红,曹日强. 真菌诱导对滇紫草细胞色素形成的影响(简报)[J]. *植物生理学通讯*, 1994, 30(5): 348-350.