

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 Sigma 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)℃,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)℃、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.

的 CQWL 培养基进行增殖培养。经 3 次检测的脱毒蓝莓苗按同样方法进行增殖。

1.4 再生植株 RT-PCR 快速检测

1.4.1 脱细菌与真菌检测 利用 DNA 基因组试剂盒提取经茎尖脱毒的蓝莓组培苗及培养基中可能存在的细菌基因组 DNA。称取 0.3 g 组培苗的根,液氮研磨,将粉末转移至预热 A 液,涡旋振荡器振荡,称取 0.3 g 培养基于预热 A 液中充分溶化,65 ℃ 水浴至少 5 min;13 000 r/min 离心 5 min;取 350 μL 上清液至离心管中,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 μL 氯仿,振荡 30 s,13 000 r/min 室温离心 5 min;上清液转移至新的离心管中,加入 2 倍体积的无水乙醇,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 μL TE 缓冲液溶解。

采用 16S rRNA 通用引物 F:5′-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3′、R:5′-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3′^[10],以提取物为基因组 DNA 模板,进行 16S rRNA 扩增;采用真菌核糖体基因转录间隔区通用引物 ITS1:5′-TCCGTAGGT GAACCTGCGG-3′、ITS2:5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′^[6]对病原菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增体系为:ddH₂O 17.5 μL,10 × Buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 1.5 μL,引物各 0.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,Taq 酶 0.5 μL,总 DNA 1 μL。反应条件为:95 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 40 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 80 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,采用紫外分光光度计检测。

1.4.2 脱病毒检测 分别取 0.5 g 蓝莓组培苗的根和茎段,放入用液氮预冷的研钵中,加入液氮快速磨成粉末状;转移至 1.5 mL 无核糖核酸内切酶(RNase)的离心管中,按 0.1 g 组织样品加入 1 000 μL TRIzol 的量添加 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 μL,轻轻摇匀,静置 5 min,10 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min;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 μL,洗涤提取物,干燥;用 50 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解提取物,电泳检测。分别用蓝莓枯焦病毒衣壳蛋白基因 V1:5′-TGTGTC AAACAATATGGC-3′、V2:5′-GCATTTTCGATGATTGCGG-3′^[11],蓝莓急性坏死病毒衣壳蛋白基因(GenBank:KF031042.1)设计引物 V3:5′-ATGACGTCAATGGCTTCCGCAC-3′、V4:5′-CTAACCTAACGTGCTTGAAGTTC-3′ 和反转录 cDNA 模板进行病毒衣壳蛋白基因扩增;5 μL PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,采用紫外分光光度计检测。

2 结果与分析

2.1 蓝莓外植体的诱导增殖

经 CQWL+3.0 mg/L ZT 培养基诱导 1 周,蓝莓幼芽开始启动(图 1-A);经 30 d 继代培养,蓝莓幼芽诱导率为 43.2%;经培养 3 代,蓝莓出现丛生芽、顶芽生长,新梢健壮有活力(图 1-B),此时增殖系数约为 3。



A. 蓝莓诱导培养

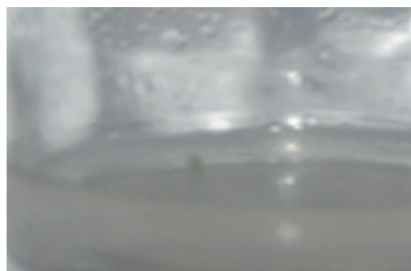


B. 蓝莓增殖培养

图1 蓝莓诱导增殖培养

2.2 茎尖剥离与增殖

显微镜下将顶芽剥为 0.3~0.5 mm 的茎尖,并插入诱导培养基中(图 2-A)诱导培养 4 周,蓝莓茎尖不形成愈伤组织,而是直接发育成完整植株,新生顶芽长势较快,形成 3 个茎段新梢,叶片墨绿(图 2-B)。



A. 剥离茎尖插入诱导培养基



B. 茎尖诱导培养4周

图2 蓝莓茎尖的诱导培养4周

2.3 蓝莓茎尖 RT-PCR 快速检测

试验结果表明,以茎尖脱毒蓝莓组培种苗的根和固体培养基为混合物提取的基因组 DNA 作为模板,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,即茎尖繁殖不含致病的细菌(图 3-A);以茎尖脱毒蓝莓组培种苗的根和固体培养基为混合物提取的基因组 DNA 作为模板,不能扩增出 rDNA-ITS 序列,即茎尖繁殖不含致病的真菌(图 3-

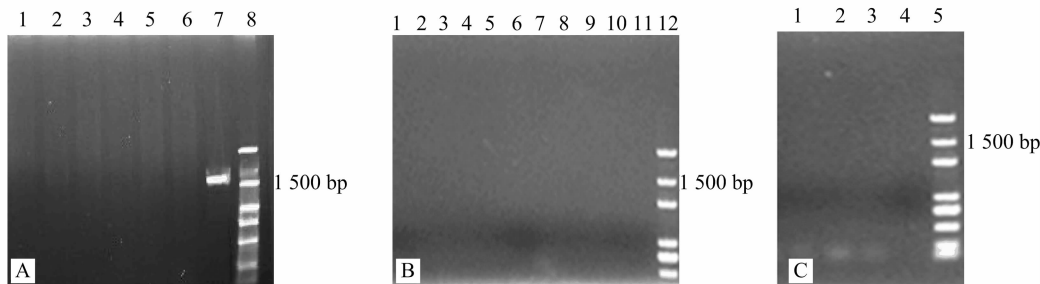


图3 蓝莓茎尖脱毒 RT-PCR 快速检测
A.细菌16S rRNA PCR 扩增结果(1、2、3、4、5、6—茎尖混合基因组扩增结果,7—大肠杆菌标准菌株16S rRNA 扩增结果,8—marker); B.真菌 rDNA-ITS PCR 扩增结果(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11—茎尖混合基因组扩增结果,12—marker); C.蓝莓焦枯病毒和蓝莓急性坏死病毒衣壳蛋白扩增结果(1、2—蓝莓焦枯病毒衣壳蛋白扩增结果,3、4—蓝莓急性坏死病毒衣壳蛋白扩增结果,5—marker)

图3 蓝莓茎尖脱毒 RT-PCR 快速检测

B);茎尖脱毒苗中不含蓝莓焦枯病毒和急性坏死病毒(图3-C)。

2.4 蓝莓茎尖脱毒的增殖繁育

由图4可见,茎尖脱毒材料经3代连续培养,植株健壮,叶片绿色,顶芽直立生长,侧芽萌发伸长;植株发育正常,增殖系数可达5。

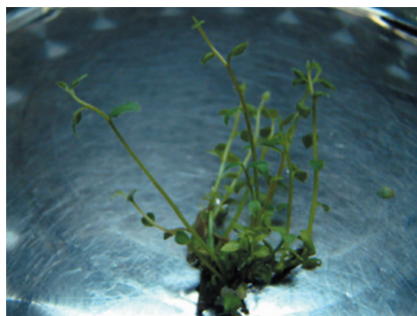


图4 脱毒蓝莓茎尖的增殖培养

3 结论与讨论

目前,植物病毒及细菌的检测方法主要有生物学、血清学、分子生物学及电镜技术^[12-13]。生物学检测简单、灵敏,仅需将少许宿主接种到指示植物即可,但缺点是受病毒滴度、环境、时间限制,病原确定的周期相对较长。以核酸为基础的PCR检测方法具有灵敏、特异、简单、快速的特点,且在宿主发病早期即能检测病原,已在马铃薯、甘薯、柑橘等病毒检测^[14-16]中广泛应用。本研究利用PCR技术,对茎尖脱毒的蓝莓种苗及培养基进行细菌16S rRNA检测,结果表明,茎尖脱毒蓝莓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,说明利用脱毒组培技术培养的茎尖种苗不含细菌。对真菌核糖体基因转录间隔区扩增结果为阴性,结果表明,茎尖脱毒蓝莓不含真菌病原;参照RNA提取步骤,用Trizol试剂提取茎尖脱毒蓝莓苗茎段的RNA,经RT-PCR检测,结果表明,PCR产物电泳检测无目的条带,检测结果为阴性,这说明茎尖脱毒蓝莓有可能完全脱毒。因此,以此为依据建立的蓝莓良种茎尖脱毒技术可用于蓝莓的离体快繁。

参考文献:

[1]杨燕林,和志娇,王朝文,等. 云南蓝莓病虫害调查及防治方法

- [J]. 植物保护,2014,40(4):153-156,197.
- [2]余磊,赵建荣,Impaprasert R,等. 蓝莓枝枯病原菌鉴定[J]. 植物病理学报,2013,43(4):421-425.
- [3]严雪瑞,周源,赵睿杰,等. 蓝莓叶穿孔病菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 北方园艺,2014(16):123-127.
- [4]Liu Y H, Lin T, Ye C S, et al. First report of *Fusarium* wilt in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) caused by *Fusarium oxysporum* in China[J]. Plant Disease,2014,98(8):1158.
- [5]徐成楠,王亚南,胡同乐,等. 蓝莓炭疽病原菌鉴定及致病性测定[J]. 中国农业科学,2014,47(20):3992-3998.
- [6]赵洪海,岳清华,梁晨. 蓝莓拟盘多毛孢枝枯病的病原菌[J]. 菌物学报,2014,33(3):577-583.
- [7]Martin R R, Bristow P R, Wegener L A. Scorch and shock: emerging virus diseases of highbush blueberry and other *Vaccinium* species[J]. Acta Horticulturae,2006(715):463-467.
- [8]傅俊范,彭超,严雪瑞,等. 蓝莓根癌病发生调查及病原鉴定[J]. 吉林农业大学学报,2011,33(3):283-286,292.
- [9]Wang P J, Hu C Y. Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture[J]. Advances in Biochemical Engineering,1980,18:61-99.
- [10]Song J, Lee S C, Kang J W, et al. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2004,54(1):203-209.
- [11]Demarsay A, Hillman B I, Petersen F P, et al. First report of blueberry scorch virus on highbush blueberry in Connecticut and Massachusetts[J]. Plant Disease,2004,88(5):572.
- [12]刘健,张德咏,张松柏,等. 湖南和福建辣椒上辣椒斑疹病毒的检测及系统发育分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):184-185.
- [13]曹冬梅,李鑫,孙晓菲,等. 黄瓜绿斑花叶病毒荧光纳米颗粒试纸条的研制[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):152-154.
- [14]罗文彬,李华伟,汤浩,等. 马铃薯5种病毒多重PCR检测技术的建立及应用[J]. 园艺学报,2015,42(2):280-288.
- [15]李怀情,牛力立,赵伍敏,等. 紫云甘薯组培脱毒及离体快繁技术研究[J]. 种子,2014,33(10):131-132,134.
- [16]陶珍珍,李中安,贾敏,等. T3基因型柑橘衰退病毒实时荧光定量RT-PCR检测体系的建立及应用[J]. 园艺学报,2015,42(1):183-190.