

王俊刚,赵婷婷,杨本鹏,等. 甘蔗脱毒健康种苗中蔗糖转化酶表达分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):35-39.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.009

甘蔗脱毒健康种苗中蔗糖转化酶表达分析

王俊刚,赵婷婷,杨本鹏,蔡文伟,冯翠莲,曾 军,熊国如,张树珍

(中国热带农业科学院甘蔗研究中心/中国热带农业科学院热带生物技术研究所/

农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室,海南海口 571101)

摘要:甘蔗脱毒健康种苗能够有效提高植株生物量和糖分,而蔗糖转化酶则是甘蔗生长和蔗糖积累的关键酶。拟分析 3 种甘蔗蔗糖转化酶基因,即可溶性酸性转化酶(soluble acid invertase,简称 SAI)、可溶性中性转化酶(neutral invertase,简称 NI)和细胞壁酸性转化酶(cell wall-bound invertase,简称 CWI)基因在脱毒种苗、常规种苗全生育期的表达量差异。结果表明,细胞壁酸性转化酶主要在脱毒健康种苗拔节期未成熟叶片、茎及成熟期叶片、未成熟茎节中上调表达,尤其在成熟期未成熟茎节中大幅上调表达,促进茎节的快速生长和蔗糖的卸载及积累;液泡可溶性酸性转化酶 SAI、可溶性中性转化酶主要在成熟期叶片和未成熟茎节中上调表达,有利于促进成熟期脱毒健康种苗茎秆中糖分积累及对单糖的快速利用。进一步研究表明,脱毒处理可以提高甘蔗生长后期蔗糖转化酶的表达量,有利于生物量和蔗糖含量的增加,可能是脱毒健康种苗增糖增产的分子调节机制之一。

关键词:甘蔗;脱毒健康种苗;蔗糖转化酶;表达量

中图分类号: Q946.5;S566.101

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2017)21-0035-04

甘蔗是禾本科甘蔗属多年生草本 C_4 植物,是将光能转化为化学能效率最高的作物之一,是世界上重要的糖料作物和能源作物,约生产全球 70% 的食糖和 42% 的乙醇^[1]。蔗糖是甘蔗生产的主要物质,其合成和积累过程是一个系统的调控网络,涉及到各种蔗糖代谢相关酶、转运蛋白及信号分子等的调节作用^[2-3],而蔗糖转化酶能够催化蔗糖的水解,影响茎秆蔗糖含量^[4-5]。高等植物中含有多个编码蔗糖转化酶的基因,蔗糖转化酶既存在于光合组织中,也存在于非光合组织中,主要累积于细胞质、液泡和细胞间隙。高等植物中转化酶依据不同的溶解性、亚细胞定位和最适 pH 值,可以分为 3 种类型:(1)可溶性中性转化酶(neutral invertase,简称 NI),为非糖基化形式,存在于细胞质中,最适 pH 值为中性或弱碱性(pH 值 7.0~8.0),在植物组织中降解蔗糖满足代谢中对己糖的需求;(2)可溶性酸性转化酶(soluble acid invertase,简称 SAI),主要存在于液泡中,为糖基化形式,其活性最适 pH 值为酸性(4.5~5.0),参与调节光合作用产物在淀粉和蔗糖间的分配及控制蔗糖/己糖比率^[6-7];(3)细胞壁酸性转化酶(cell wall-bound invertase,简称 CWI),最适 pH 值为酸性(4.5~5.5),但有较高的 pI 值(9~10)。细胞壁转化酶则主要负责调节蔗糖从叶片(源)中输出的速率,是蔗糖源源不断

地向库细胞卸载的重要动力^[8-10],促进植物细胞从源代谢向库代谢的转变,有助于库器官的生长和代谢产物的长距离运输^[11-12]。

甘蔗多年宿根种植引起甘蔗品种退化,利用腋芽茎尖脱毒处理能够恢复母本性状,使甘蔗产量增加 20%~40%,含糖量增加 0.5~1.0 百分点^[13-15],但是有关从分子生物学水平研究脱毒处理对蔗糖转化酶表达量的影响还未见报道。本研究以已报道的 3 个甘蔗蔗糖转化酶为研究对象,从甘蔗生长的苗期、分蘖期、拔节期和成熟期对其表达量进行比较分析,探讨脱毒处理与蔗糖转化酶表达量之间的关系,以便从分子生物学层面上分析脱毒处理对转化酶表达量的影响,揭示脱毒健康种苗可能的增产增糖机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为新台糖 22 号品种腋芽脱毒健康种苗二代种茎苗和未脱毒新台糖 22 种茎,来源于中国热带农业科学院热带生物技术研究所甘蔗试验地。

1.2 试验地点

试验地点设在海南省临高县皇桐镇国家甘蔗产业技术体系试验站,土壤为红壤,肥力中等。

1.3 田间试验设计和管理

参照文献[15-16]的有关方法进行处理。

1.4 总 RNA 提取、定量与完整性检测

取从 10 个完整植株剥离的冻存样品进行研磨,用 TRIzol 法提取 RNA,TRIzol RNA 提取试剂购自 Aidlab(艾德莱)公司。用核酸分析仪(Eppendorf Biophotometer Plus)测定 260、280 nm 处的吸光度,以 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值估计总 RNA 的纯度,以 $D_{260\text{ nm}}$ 进行总 RNA 定量。用 1.0% 普通琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

收稿日期:2016-06-08

基金项目:国家“863”计划(编号:2013AA102604-1);海南省自然科学基金(编号:20163124);中央级公益科研院所基本业务费(编号:ITBB140503);现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-20-2-5)。

作者简介:王俊刚(1983—),男,湖北孝感人,博士研究生,助理研究员,研究方向为甘蔗生物技术。Tel:(0898)66987509;E-mail:wangjungang@itbb.org.cn。

通信作者:张树珍,博士,研究员,研究方向为甘蔗生物技术。Tel:(0898)66987509;E-mail:zhangsz2007@163.com。

1.5 第一链 cDNA 的合成

取 3 μg 甘蔗总 RNA 与 1 μL 反转录引物 (10 pmol/L) (Oligo - dT 接头引物) 混合, 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后, 立即放置于冰上, 然后加入 5 \times buffer、2.5 mmol/L dNTP 混合液、40 U/ μL RNase Inhibitor、5 U/ μL M - MLV 反转录酶, 反应体系为 25 μL 。反应过程如下: 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 5 min

后瞬时离心, 最后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 引物设计

根据公布的甘蔗蔗糖转化酶基因 *CWI* (GenBank 登录号: BU925833)、*NI* (GenBank 登录号: KC145797)、*SAI* (GenBank 登录号: AY302083) 序列, 利用 Primer5 设计引物, 内参 *GADPH* 基因引物参考文献 [17], 详见表 1。

表 1 引物序列、PCR 扩增基因片段和扩增效率

基因名称	登录号	引物序列 (5'→3')	扩增产物长度 (bp)	扩增效率
<i>CWI</i>	BU925833	F:TAATAAGTCGTTTCCAGTTT;R:CCATAGCCATTGTGTTAA	138	0.932
<i>NI</i>	KC145797	F:TTACTACTGGTTAGACTTCC;R:CGATTCAGGTATCACATTG	103	0.951
<i>SAI</i>	AY302083	F:TCTTCCGATTGATACTATTTC;R:TACAACTACAGGCTACAT	130	0.967
<i>GAPDH</i>	CA254672	F:CACGGCCACTGGAAG CA;R:TCCTCAGGGTTCCTGATGCC	101	0.994

注: F 表示上游引物, R 表示下游引物。

1.7 实时 PCR (Real - Time PCR) 扩增及数据分析

建立 20 μL 荧光定量 PCR 反应体系, 选用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (TaKaRa) 试剂盒, 按照说明书操作要求配制, 反应在 Mx3005PTM (Roche) 上完成, 每个处理设置 3 次重复, 扩增效率见表 1。以甘蔗 *GADPH* 基因为内参基因, 所有结果以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算相对定量值 [18]。

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度鉴定

不同组织以及不同生长时期的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果表明, 28S、18S 条带清晰可见, 无明显降解; $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值皆在 1.8 ~ 2.2 之间, 可用于下一步试验。

2.2 苗期甘蔗脱毒健康种苗中蔗糖转化酶基因表达分析

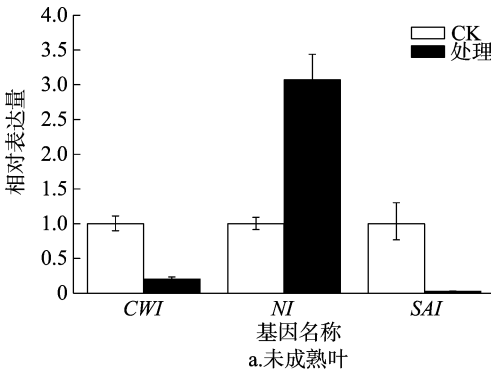


图 1 甘蔗苗期叶片中 *CWI*、*NI* 和 *SAI* 基因的相对表达量

Real - Time PCR 结果显示: *CWI*、*NI* 和 *SAI* 在苗期甘蔗叶片中均有表达; 在未成熟叶片中 *CWI* 表达量比对照约低 80%, *NI* 表达量比对照高 2 倍左右, *SAI* 表达量比对照低 97% 以上; 而在成熟叶片中, *CWI* 表达量差异不明显, *NI* 表达量比对照高 2 倍左右, *SAI* 表达量比对照高 1.5 倍左右 (图 1)。

2.3 分蘖期甘蔗脱毒健康种苗中蔗糖转化酶表达分析

约在甘蔗第 1 株分蘖苗长出 7 d 后, 对主茎甘蔗进行采样, 对甘蔗分蘖中期蔗糖转化酶基因表达特征进行分析。结果表明: 与常规种苗相比, 在分蘖期脱毒健康种苗中, *CWI* 在成熟叶片中上调表达, *NI*、*SAI* 在未成熟叶片中上调表达 (图 2)。

2.4 拔节期甘蔗脱毒健康种苗中蔗糖转化酶表达分析

与常规种苗相比, 在拔节期甘蔗脱毒健康种苗中, *CWI* 在

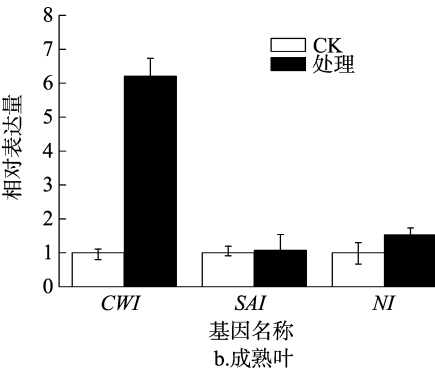
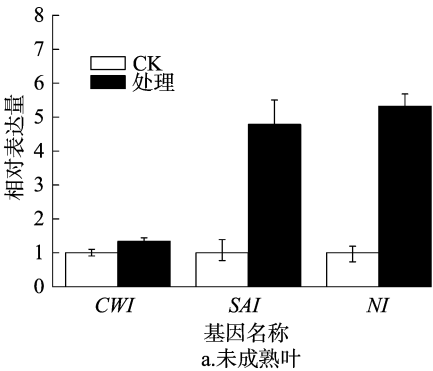
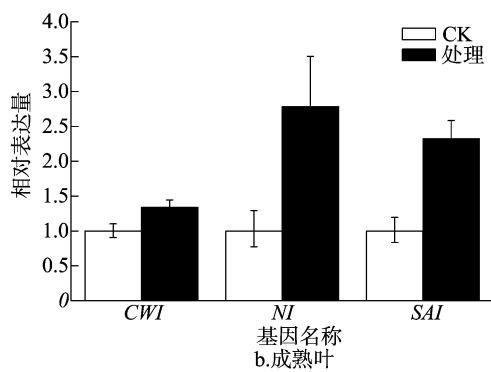


图 2 甘蔗分蘖期叶片中 *CWI*、*NI* 和 *SAI* 基因的相对表达量

未成熟叶片和茎节中上调表达,在未成熟叶片中 *CWI* 表达量上调约 2.5 倍, *CWI* 的表达量在 1~3 茎节中上调约 26 倍,在 4~5 茎节中的表达量上调约 21 倍,在 7~8 茎节中的表达量上调约 16 倍,在 10~11 茎节中的表达量上调约 5 倍,在

13~14 茎节中的表达量上调约 2 倍,在 16~17 茎节中的表达量上调约 1 倍; *NI* 在未成熟叶片中的表达量上调约 4.5 倍; *SAI* 在 7~8 茎节中的表达量上调约 3 倍(图 3)。

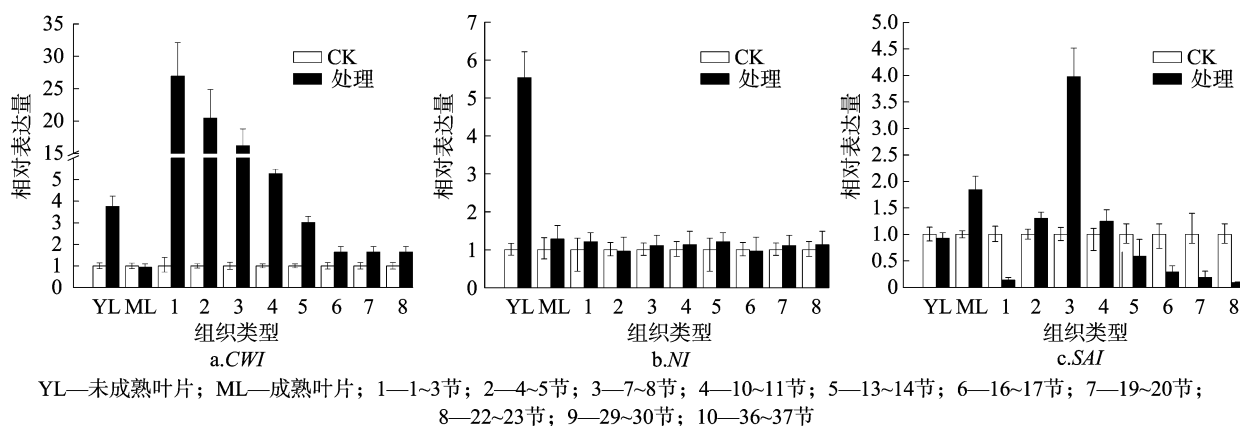


图3 甘蔗拔节期不同组织 *CWI*、*NI* 和 *SAI* 基因的相对表达量

2.5 成熟期甘蔗脱毒健康种苗蔗糖转化酶表达分析

与常规种苗相比,在成熟期甘蔗脱毒健康种苗中, *CWI*、*NI* 和 *SAI* 在叶片和未成熟茎节中得到大幅度上调表达,从而促进脱毒种苗生物量、糖分的增加。 *CWI* 在未成熟叶片中表达量上调近 50 倍,在成熟叶片中表达量上调近 90 倍,在 1~3 茎节中表达量上调近 65 倍,在 4~5 茎节中表达量上调近

25 倍; *NI* 在未成熟叶片中表达量上调约 3.5 倍,在成熟叶片中表达量上调近 52 倍,在 1~3 茎节中表达量上调约 120 倍,在 4~5 茎节中表达量上调近 40 倍; *SAI* 在未成熟叶片中表达量上调约 5.5 倍,在成熟叶片中表达量上调近 2.5 倍,在 1~3 茎节中表达量上调近 80 倍,在 4~5 茎节中表达量上调近 30 倍(图 4)。

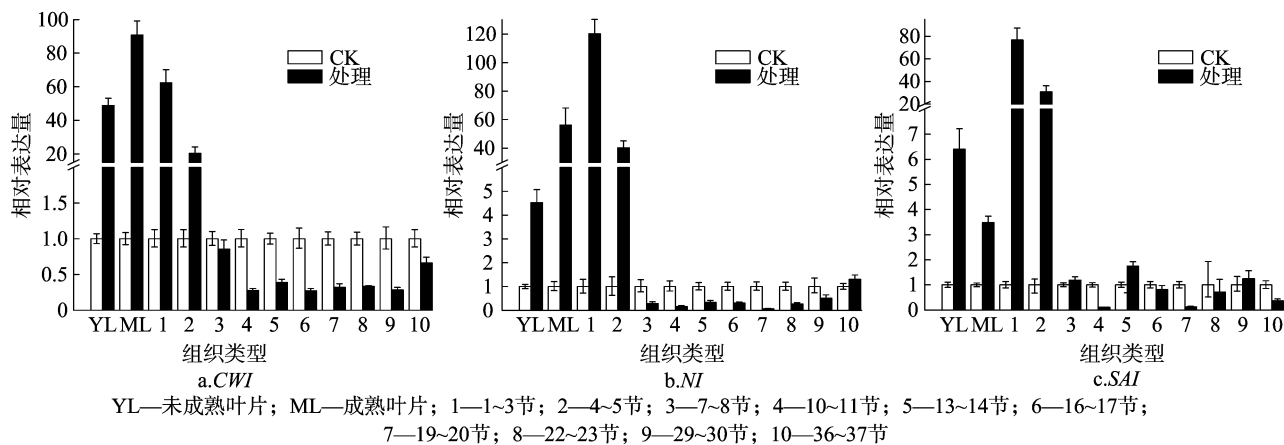


图4 甘蔗成熟期不同组织中 *CWI*、*NI* 和 *SAI* 基因的相对表达量

3 讨论

甘蔗脱毒健康种苗能够恢复甘蔗母本的性状,显著提高甘蔗产量,并有效增加蔗糖含量,从而延长优良甘蔗品种使用年限,而关于脱毒健康种苗增产增糖的分子机制仍不清楚。甘蔗蔗糖转化酶是影响甘蔗生长和糖分积累的关键酶之一^[19]。在库器官中,转化酶活性是影响蔗糖积累的先决条件^[20]。甘蔗中蔗糖转化酶基因为一种组成型表达基因,随着甘蔗组织成熟表达量逐渐降低^[21~22]。相关研究表明,不同蔗糖转化酶基因在甘蔗不同组织中的表达模式不同,对甘蔗生长和糖分积累的调节功能也不同^[23~24]。

细胞壁转化酶在碳水化合物分配及库器官发育中起重要调节作用,是韧皮部质外体卸载的关键基因^[25]。植物库器官

中细胞壁酸性转化酶的活性增强有利于蔗糖卸载及积累,同时有利于种子的形成^[26~27]。研究表明,成熟期甘蔗茎秆中,蔗糖的积累量与细胞壁转化酶活性呈正相关,表明 *CWI* 参与调节蔗糖积累^[3]。叶片中蔗糖转化酶可为甘蔗生长提供碳源,促进甘蔗快速生长。研究表明,在拔节期茎秆快速发育时期,脱毒健康种苗茎中 *CWI* 基因上调表达,有利于蔗糖的卸载及茎节的快速生长;在成熟期的脱毒健康种苗叶片和未成熟茎节中, *CWI* 基因大幅上调表达,进一步促进蔗糖的卸载、积累以及提高甘蔗的最终生物量,表明 *CWI* 是促进甘蔗健康种苗增产增糖的关键调节基因。

植物中 *SAI* 基因参与糖分积累以及渗透压的调节,尤其在己糖含量高的组织中高表达^[28~29]。牛俊奇等研究表明,甘蔗 *SoSAII* 基因在拔节期至生理成熟前期,在未成熟叶和成熟

叶中表达量高于老叶,茎秆中的表达模式为幼茎 > 成熟茎 > 老茎^[30]。在脱毒健康种苗中,在拔节期蔗糖快速积累的茎节、成熟期叶片、未成熟茎节中 *SAI* 基因上调表达,且在成熟期末成熟茎节中大幅上调表达,表明 *SAI* 促进这些组织中己糖的供给和利用,从而加速植株的碳利用^[31-32],提高生物量^[33]。

植物中中性转化酶功能仍不明确,可能参与细胞中葡萄糖稳态及糖信号形成^[34]。甘蔗茎秆中中性转化酶活性与蔗糖含量呈负相关^[35]。研究表明,叶片中 *SoNIN1* 基因比茎秆中的表达量高,分析认为,茎秆中中性转化酶低水平表达可能有利于蔗糖积累^[30]。本研究对中性转化酶基因表达分析表明,*NI* 基因主要在成熟期甘蔗脱毒健康种苗成熟叶片和未成熟茎节中大幅上调表达,表明 *NI* 可能在甘蔗成熟期促进叶片和未成熟茎节中蔗糖水解,从而促进细胞对葡萄糖的利用,加快植株生长。已有研究表明,在转甘蔗反义 *SN1* 基因植株中,中性酶活性受到抑制,导致蔗茎中己糖含量减少,蔗糖含量增加^[35]。进一步研究表明,经过脱毒处理的甘蔗种苗,能够显著改善成熟期叶片、未成熟茎节中中性转化酶基因的表达,可能有利于促进植株生物量的增加。

参考文献:

- [1] Manners J M. Functional genomics of sugarcane [J]. *Advances in Botanical Research*, 2011, 60: 89 – 168.
- [2] 王俊刚,赵婷婷,张树珍,等. 甘蔗体内的蔗糖转运与运输途径 [J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44 (3): 605 – 611.
- [3] Chandra A, Verma P K, Islam M N, et al. Expression analysis of genes associated with sucrose accumulation in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) varieties differing in content and time of peak sucrose storage [J]. *Plant Biology*, 2015, 17 (3): 608 – 617.
- [4] Lingle S E, Tew T L. A comparison of growth and sucrose metabolism in sugarcane germplasm from Louisiana and Hawaii [J]. *Crop Science*, 2008, 48 (3): 115 – 1163.
- [5] 潘有强,罗海玲,李杨瑞. 甘蔗节间蔗糖含量与和蔗糖代谢相关的 4 种酶活性之间的关系剖析 [J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43 (5): 861 – 864.
- [6] 潘秋红,张大鹏. 植物转化酶的种类、特性与功能 [J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40 (3): 275 – 280.
- [7] Zhu Y J, Albert H H, Moore P H. Differential expression of soluble acid invertase genes in the shoots of high – sucrose and low – sucrose species of *Saccharum* and their hybrids [J]. *Aust J Plant Physiol*, 2000, 27 (3): 193 – 199.
- [8] Foyer C H. The basis for source – sink interaction in leaves [J]. *Plant Physiol & Biochemistry*, 1987, 25: 649 – 657.
- [9] Miller E M, Chourey P S. The maize invertase – deficient miniature – 1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development [J]. *The Plant Cell*, 1992, 4 (3): 297 – 305.
- [10] Mirajkar S J, Suprasanna P, Vaidya E R. Spatial distribution and dynamics of sucrose metabolising enzymes in radiation induced mutants of sugarcane [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 100 (1/2/3): 85 – 93.
- [11] Rolland F, Baena – Gonzalez E, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57 (1): 675 – 709.
- [12] Deryabin A N, Burakhanova E A, Trunova T I. Apoplastic sugars and cell – wall invertase are involved in formation of the tolerance of cold – resistant potato plants to hypothermia [J]. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2015, 465 (1): 366 – 369.
- [13] Lee T S G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1987, 10 (1): 47 – 55.
- [14] 游建华,曾 慧,李 松,等. 甘蔗脱毒健康种苗田间比较试验 [J]. *中国糖料*, 2005 (2): 12 – 15.
- [15] 杨本鹏,张树珍,蔡文伟,等. 甘蔗健康种苗田间栽培主要农艺性状比较 [J]. *热带作物学报*, 2010, 31 (2): 117 – 175.
- [16] 杨本鹏. 糖料甘蔗栽培 [M]. 海口:南方出版社, 2008: 27 – 35.
- [17] Iskandar H M, Simpson S R, Casu R E, et al. Comparison of reference genes for quantitative real – time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22 (4): 325 – 337.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2012, 25 (4): 402 – 408.
- [19] Kalwade S B, Devarumath R M. Functional analysis of the potential enzymes involved in sugar modulation in high and low sugarcane [J]. *Appl Biochem and Biotechnol*, 2014, 172 (4): 1982 – 1998.
- [20] Ruan Y L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65: 33 – 67.
- [21] Pan Y Q, Luo H L, Li Y R. Soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase: key enzymes in regulating sucrose accumulation in sugarcane stalk [J]. *Sugar Technol*, 2009, 11 (1): 28 – 33.
- [22] Sachdeva M, Mann A P S, Batta S K. Sucrose metabolism and expression enzyme activities in low and high storing sugarcane genotypes of key sucrose [J]. *Sugar Technol*, 2003, 5 (4): 265 – 271.
- [23] 郭家文,刘少春,张跃彬,等. 成熟期不同基因型甘蔗糖分和叶片酶活性的变化 [J]. *中国糖料*, 2006 (3): 16 – 18, 21.
- [24] Verma A K, Solomon S, Verma P C, 等. 高、低糖甘蔗品种叶片转化酶活性与蔗糖代谢关系研究 [J]. *广西农业科学*, 2010, 41 (4): 313 – 318.
- [25] 卢合全,沈法富,刘凌霄,等. 植物蔗糖合成酶功能与分子生物学研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21 (7): 34 – 37.
- [26] Balibrea Lara M E, Gonzalez Garcia M C, Fatima T, et al. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin – mediated delay of senescence [J]. *Plant Cell*, 2004, 16 (5): 1276 – 1287.
- [27] Chen Z, Gao K, Su X, et al. Genome – wide identification of the invertase gene family in *Populus* [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (9): e0138540.
- [28] 王滕旭,李正国,杨迎伍,等. 哈姆林甜橙蔗糖合酶 I 和酸性转化酶基因表达与果实糖积累的关系 [J]. *热带作物学报*, 2010, 31 (5): 745 – 749.
- [29] Lin Y, Liu T, Liu J, et al. Subtle regulation of potato acid invertase activity by a protein complex of invertase, invertase inhibitor, and sucrose nonfermenting1 – related protein kinase [J]. *Plant Physiology* 2015, 168 (4): 1807 – 1819.
- [30] 牛俊奇, Phan T T, 邵 敏, 等. 甘蔗工艺成熟期转化酶及其抑制子与蔗糖积累的相关性研究 [J]. *西南农业学报*, 2015, 28 (4): 1606 – 1611.

周余华, 金文浩, 邹迎子. 撒瓦那柏芽诱导增殖试验[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(21): 39–41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.010

撒瓦那柏芽诱导增殖试验

周余华, 金文浩, 邹迎子

(江苏农林职业技术学院, 江苏镇江 212400)

摘要:以撒瓦那柏 1 年生茎尖作为外植体, 研究氯化汞对外植体的影响, 并筛选合适的初代和继代培养激素添加。结果发现, 对撒瓦那柏茎尖用 0.1% 氯化汞处理 7~8 min 灭菌效果最好, 用 MS 作为初代培养基, 添加 1 mg/L 6-BA 诱导率达 60%, 添加 0.05 mg/LNAA 诱导率达 80%; 以 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 为继代培养基, 诱导率达 79.5%。

关键词:撒瓦那柏; 灭菌; 芽诱导; 增殖培养

中图分类号: S687.04⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0039-03

撒瓦那柏(*Chamaecyparis pisifera* cv. *aurea*) 别称金色海岸线、金叶日本花柏、金叶撒瓦那扁柏, 为柏科扁柏属植物, 属于常绿彩化针叶树中的黄化品种。树皮呈薄片红褐色。鳞叶紧贴, 小枝下垂, 细长。3 月开花, 雌球花单生枝顶, 雄球花椭圆形, 雌雄同株, 球果 11 月成熟, 种子有棱角微扁卵圆形, 种鳞盾形木质。温带及亚热带树种, 性喜温暖湿润气候, 喜光, 抗寒耐旱耐半阴, 喜深厚沙壤土, 能适应平原环境。幼苗期每年的生长量较小, 到郁闭后才会进入旺盛生长阶段, 耐修剪。生长高度和蓬径均可达 1.2 m。原产日本, 我国北京、南京、青岛、庐山、上海、杭州等地均有栽培, 上海市绿化管理局推荐的新优植物品种名录中就有该种植物^[1]。撒瓦那柏姿态婆娑, 枝黄纤弱, 观赏价值良好, 可用于多种场合, 如在园林中可从植、群植、孤植于供庭园、门边、屋隅; 花园里可以将其布置成小土丘状, 新叶呈现明亮金黄色, 垂下的枝条好似一个小瀑布姿态优雅, 尽显品味, 可以给人带来惬意舒畅的感觉。因此, 撒瓦那柏是园林中色块运用、模纹镶拼、彩篱构建的绝佳材料, 是稀少的色彩稳定的柏科植物^[2-3]。然而, 由于其繁殖速度缓慢, 市场上还没有销售。

撒瓦那柏可以进行播种、扦插和压条繁殖, 但是都存在一定的不足, 因此通过组织培养加快撒瓦那柏的繁殖速度就成

为一条很重要的快捷途径。本研究对撒瓦那柏采用不同的氯化汞消毒时间, 启动培养和继代培养的培养基和激素添加, 确立最佳氯化汞消毒时间、最佳培养基及激素配比浓度, 为撒瓦那柏组织培养的进一步研究奠定良好基础, 为撒瓦那柏规模化生产和工厂化育苗提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所采用的材料来自江苏农林职业技术学院苗圃, 在连续放晴 4 d 后于 2015 年 3 月 7 日采集撒瓦那柏健壮 1 年生茎段的无病虫害外植体。

1.2 试验设计及方法

1.2.1 外植体的整理 摘取撒瓦那柏 1 年生枝条的茎尖, 剪切成长约 2.5 cm 的茎段, 放入白瓷缸中用加了少量洗衣粉的水搓洗 2 min, 将泡沫淘洗干净后于自来水下流水冲洗 12 h, 待进行消毒处理试验。

1.2.2 消毒处理 先用 75% 乙醇处理 30 s, 再用 0.1% 氯化汞(HgCl₂)进行消毒处理, 时间分别设置为 4、5、6、7、8、9 min 6 个处理, 最后用无菌水冲洗 4 次, 残留的水分用无菌滤纸吸取。将消毒完毕的茎尖置于无菌纸上, 用剪刀、镊子剪去茎尖的下端 0.2 cm, 以免影响其从培养基中吸收养分, 接种于 MS 培养基上, 每处理接种 20 瓶, 每个试管型组培瓶放 1 个外植体。培养基为 MS+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂。每隔 1 d 观察 1 次外植体的污染情况, 8 d 后对外植体的死亡率、污染率和成活率进行统计。

1.3 启动培养

筛选不同的培养基 MS、1/2MS、WPM, 选用不同的 6-BA 2005, 36(2): 106–109.

[34] Rose S, Botha F C. Distribution patterns of neutral invertase and sugar content in sugarcane internodal tissues[J]. Plant Physiol and Biochem, 2000, 38(11): 819–824.

[35] Debra R, Jens K, C B Frederik, et al. Reduced neutral invertase activity in the culm tissues of transgenic sugarcane plants results in a decrease in respiration and sucrose cycling and an increase in the sucrose to hexose ratio[J]. Funct Plant Biol, 2010, 37(1): 22–31.

收稿日期: 2016-06-02

基金项目: 江苏农林职业技术学院乡土树种种质资源创新团队项目 (编号: 2013td04)。

作者简介: 周余华(1964—), 男, 江苏泰兴人, 博士, 副教授, 主要从事园林植物生理生态研究及教学生产。E-mail: uua16hot@126.com。

[31] Andersen M N, Asch F, Wu Y, et al. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize[J]. Plant Physiology, 2002, 130(2): 591–604.

[32] 黄诚梅, 杨翠芳, 潘有强, 等. 可溶性酸性转化酶 SAI 基因在不同甘蔗基因型中表达分析[J]. 中国糖料, 2013(2): 21–24.

[33] 姚瑞亮, 李杨瑞, 黄玉辉, 等. 甘蔗生长后期乙烯利处理对节间转化酶活性的影响及与蔗糖分积累的关系[J]. 广西农业科学,