

野生茅莓快繁体系的初步建立

张启春, 韩翔, 赵阳, 王楠, 李云晓, 张国海

(河南科技大学 林学院 河南 洛阳 471003)

摘 要:以野生茅莓枝条为试材,运用组织培养技术,对野生茅莓植株再生进行研究。结果表明:野生茅莓组织培养最佳取材季节是4月份,该时期外植体污染率最低;带有1个饱满腋芽的半木质化茎段是组织培养的理想外植体;带腋芽茎段最佳灭菌方式为75%乙醇30 s+0.5% NaClO 20 min;诱导侧芽的最适启动培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 0.5 mg/L+活性炭1.0 g/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L;芽的最适增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+活性炭1.0 g/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L;最适生根培养基为1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+活性炭1.0 g/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L。试管苗练苗移栽成活率为76.7%。

关键词:野生;树莓;快繁;枝条

中图分类号:Q 949.751.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)01-0133-04

树莓(*R. idaeus* L.)是蔷薇科(Rosaceae)悬钩子属(*Rubus* L.)植物,为多年生落叶果树。全球共有700余种,我国有194种88变种。树莓在国际上被誉为“黄金浆果”,可供食用、药用和提取有效成分制作护肤品^[1]。我国北自大兴安岭,南至海南岛,东至台湾,西至新疆均有野生树莓分布。目前树莓组织培养技术研究主要集中在国外引进品种上,对国内丰富的野生树莓资源却缺乏足够的重视,而组织培养技术对野生树莓种质资源保存和开发利用具有重要意义^[1-7]。现以树莓的野生种茅莓为试材,对其快繁条件进行筛选,以期建立野生树莓的快繁体系和野生树莓资源的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为河南科技大学试验田内的野生茅莓,以其带有饱满腋芽的健壮枝条为外植体。试验于2009年5月至2010年7月进行。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的表面消毒 将去除叶片枝条剪成3 cm左右的小段,流水冲洗1 h后,使用中性洗涤剂仔细刷洗茎段表面及腋芽,并冲洗干净。在无菌条件下,将材料

放入75%酒精中浸泡30 s,再转入NaClO溶液中消毒,取出后用无菌水冲洗5次,每次3 min。将外植体剪成1 cm左右带有生长点的小段接种到启动培养基上,每个培养瓶接种1个外植体。

1.2.2 培养基和培养条件 启动培养、增殖培养用MS作为基本培养基,生根培养使用1/2MS作为基本培养基,再附加蔗糖30 g/L、琼脂7.5 g/L、活性炭1.0 g/L。pH 6.0 温度25℃,光照强度2 000 lx,光照时间16 h。接种40 d后统计各项观察指标。

1.2.3 不同方法消毒 在4月,剪取半木质化带腋芽茎段作为外植体。再用0.1%、0.5%、1.0%的NaClO溶液各消毒10、20、30 min。

1.2.4 不同类型外植体消毒 在4月,分别选取茎尖、未木质化茎段、半木质化茎段作外植体,再分别用0.5%的NaClO溶液消毒20 min。

1.2.5 不同取材季节外植体消毒 分别在4、6、8、10月,剪取半木质化带腋芽茎段作外植体,再分别用0.5%的NaClO溶液消毒20 min。

1.2.6 启动培养 以半木质化枝条上带有1个饱满腋芽的茎段为外植体接种到含有不同激素浓度配比的MS培养基上进行启动培养。

表1 启动培养基配方

启动培养基配方	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	KT/mg·L ⁻¹
1	0.1	0.1	—
2	0.5	0.1	—
3	2.0	0.1	—
4	0.5	0.1	0.1
5	0.5	0.1	0.5
6	0.5	0.1	2.0

第一作者简介:张启春(1986-),男,在读本科,现研究方向为园艺生物技术。E-mail: zhangqichunyu@126.com。

通讯作者:张国海(1962-),男,硕士,教授,现主要从事果树种质资源方面的研究工作。E-mail: zgh_ly@163.com。

基金项目:河南科技大学大学生研究训练计划资助项目(SRTP-2010093)。

收稿日期:2010-10-25

1.2.7 增殖培养 将新长出的健壮芽转接到含有不同激素浓度配比的 MS 培养基上进行增殖培养。

表 2 增殖培养基配方

增殖培养基配方	6-BA/ mg · L ⁻¹	IBA/ mg · L ⁻¹
1	0.5	0.1
2	0.5	0.2
3	0.5	0.5
4	1.0	0.1
5	1.0	0.2
6	1.0	0.5
7	2.0	0.1
8	2.0	0.2
9	2.0	0.5

1.2.8 生根培养 将新长出的健壮芽转接到含有不同浓度 NAA 的 1/2MS 培养基上进行生根培养, NAA 浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L。

1.2.9 移栽 在组培室将培养瓶盖拧开练苗 3 d 后, 将培养基洗掉, 移栽到经过高压灭菌的培养土(蛭石:腐殖土=1:1)中, 共移栽 30 株。在空气湿度 70%左右、温度 25℃、光照 2 000 lx 条件下, 每天光照 16 h。

2 结果与分析

2.1 不同方法消毒对消毒效果的影响

从表 3 可知, NaClO 浓度的增加和消毒时间的增加, 都会使外植体污染率降低, 死亡率升高。用 0.1%的 NaClO 溶液消毒 10 min, 污染率最高, 死亡率最低。用 1.0%的 NaClO 溶液消毒 30 min, 污染率最低, 死亡率最高。综合考虑, 用 0.5% NaClO 溶液消毒 20 min, 外植体存活率最高, 是较理想的消毒处理方法。

表 3 不同方法消毒对消毒效果的影响

NaClO 浓度 / %	消毒时间 / min	污染率 / %	死亡率 / %	存活率 / %
0.1	10	76.7	0	23.3
	20	73.3	0	26.7
	30	66.7	0	33.3
0.5	10	43.3	3.3	53.4
	20	30.0	3.3	66.7
	30	30.0	6.7	63.3
1.0	10	33.3	30.0	36.7
	20	26.7	36.7	36.6
	30	26.7	40.0	33.3

2.2 不同类型外植体对消毒效果的影响

从表 4 可知, 从茎尖、未木质化茎段到半木质化茎段随着生长时间增加污染率升高, 死亡率降低, 存活率升高, 生长状况变好。综合考虑, 半木质化的带腋芽茎段存活率最高, 是组织培养的理想外植体材料。污染率

升高可能是生长时间长, 外植体带菌多的缘故。死亡率降低, 可能是因为随着生长时间变长, 木质化程度增加, 外植体能更好的抵御消毒液的伤害。由于木质化茎段的腋芽逐渐退化、死亡, 不宜作为外植体使用, 所以在这步试验中没有使用完全木质化茎段。

表 4 不同类型外植体对消毒效果的影响

位置	木质化程度	芽生长状况	污染率/ %	死亡率/ %	存活率/ %
茎尖	未木质化	很慢且细弱	10.3	63.3	26.4
茎段	未木质化	很慢且细弱	16.5	43.3	40.2
茎段	半木质化	较快且健壮	30.0	3.3	66.7

2.3 不同取材季节对消毒效果的影响

从表 5 可知, 在 0.5%的 NaClO 消毒 20 min 条件下, 季节变化对死亡率变化的影响不大。在 4 月污染率最低, 可能是温度较低导致杂菌活力也较低, 室外材料带菌较少的缘故。而 6、8、10 月污染率较高, 这可能是在高温季节细菌、真菌大量繁殖, 室外材料带菌较多的缘故。综合考虑, 在 4 月外植体存活率最高, 因此 4 月左右是选取外植体的理想时期。

表 5 不同取材季节对消毒效果的影响

月份	污染率/ %	死亡率/ %	存活率/ %
4	30.0	3.3	66.7
6	57.3	2.5	40.2
8	61.3	2.8	35.9
10	58.7	3.7	37.6

2.4 不同启动培养基配方对外植体芽萌发的影响

从表 6 可知, 6-BA 浓度不高于 0.5 mg/L 的情况下, 对芽的萌发生长有促进作用, 但浓度达到 2.0 mg/L 时, 对芽的萌发生长作用由促进转为抑制。KT 可以明显缩短芽开始萌动时间, 不同浓度 KT 对缩短芽开始萌动时间的影响变化不大, 但当 KT 浓度达到 2.0 mg/L 时对芽的生长有抑制作用。6-BA、NAA 和 KT 对芽的增殖没有明显的作用, 这可能与选用的外植体已经含有 1 个饱满腋芽有关。综合考虑, 6-BA 0.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L 和 KT 0.5 mg/L 是启动培养基的较理想激素组合。

表 6 不同启动培养基配方对外植体芽萌发的影响

启动培养基配方	芽数 / 个	芽长 / cm	芽开始萌动时间 / d	芽生长状况
1	1	1.5	15 d 左右	健壮
2	1	3.0	15 d 左右	健壮
3	1	2.5	15 d 左右	苗细弱黄化
4	1	4.0	5 d 左右	健壮
5	1	4.5	5 d 左右	健壮
6	1	2.5	5 d 左右	粗壮但黄化

2.5 不同增殖培养基配方对芽增殖的影响

从表 7 可知,随着 6-BA 浓度增高、6-BA 与 IBA 的比值越大,增殖系数也增大。当 6-BA 浓度达2.0 mg/L、分化系数在 4.8 以上时,增殖芽会出现细弱黄化的现象。从增殖系数和生长状况考虑,6-BA 1.0 mg/L、IBA 0.2 mg/L是芽增殖培养基的较理想激素组合。

表 7 不同增殖培养基配方对芽增殖的影响

增殖培养基配方	增殖系数	生长状况
1	1.5	健壮
2	1.7	健壮
3	1.2	一般
4	3.7	健壮
5	4.1	健壮
6	3.4	一般
7	6.3	细弱
8	5.5	细弱
9	4.8	细弱黄化

2.6 不同浓度 NAA 对生根的影响

从表 8 可知,当 NAA 浓度不高于 0.5 mg/L 时,随着浓度的升高,平均生根数增加,根系也较粗壮。但当 NAA 浓度高于 0.5 mg/L 时,随着浓度的升高,平均生根数减少,根系变得细小,须根数也很少。从生根数和根系生长状况考虑,NAA 生根培养适宜浓度为 0.5 mg/L。

表 8 不同浓度 NAA 对生根的影响

NAA/mg · L ⁻¹	平均每株生根数/条	根系生长状况
0.1	2.3	粗壮
0.2	3.1	粗壮
0.5	4.2	粗壮
1.0	2.6	细小
2.0	1.7	细小

2.7 试管苗的移栽

经室内培养 20 d 再移到室外继续培养,室外培养 20 d 后统计总成活率为 76.7%。这可能是由于突然由室内转到室外培养时,环境过渡太快,叶面蒸腾增加,根系吸水不足,造成部分根系较弱的苗木萎蔫死亡。

3 结论与讨论

从污染率、死亡率和存活率方面综合考虑,用 0.5% 的 NaClO 溶液消毒 20 min 是较理想的消毒方法,半木质化的带饱满腋芽的茎段为野生茅莓组织培养的理想外植体材料,4 月左右是选取外植体的理想时期。试验结论与王岳英^[2] 的相近。即使 4 月剪取半木质化带腋芽茎段,以 0.5% NaClO 处理 20 min 存活率也仅有 66.7%。

启动培养基以 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 0.5 mg/L+活性炭 1 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.5 g/L 为宜,5 d 左右就可萌发,芽长达4.5 cm,叶绿色,生长健壮,是较理想的启动培养基。试验结论与袁艺等^[3] 的有一定的差别,可能是由于种类不同的缘故。试验发现外植体所带腋芽越饱满则其萌发越快,故该试验均选用带有饱满腋芽的外植体。

芽增殖的培养基以 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+活性炭 1 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.5 g/L 为宜,增殖系数可达到 4.1 且生长健壮,是较理想的芽增殖培养基。试验结论与安伟等^[4] 的相近。

生根培养基以 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+活性炭 1 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.5 g/L 为宜,生根系数可达 4.2 且根系生长粗壮,是较理想的芽增殖培养基。试验结论与王岳英等^[2] 的相近。

4 展望

树莓在栽培中一般采用扦插、压条、分株和根蘖等无性繁殖方法,但长期的田间无性繁殖,使病毒积累,危害加重,导致产量下降,品质变劣,给生产造成重大的经济损失。通过组织培养,可以对植株进行脱毒复壮,保持植物的优良特性和性状,防止品种过快退化。因此,对树莓的组织培养技术进行研究,可以迅速提供大量优质苗木,促进树莓新品种的选育,推动树莓产业更快更好的发展^[8]。希望该试验的结论对野生树莓资源的开发利用能起到一定的参考作用。

参考文献

[1] 徐桂娟,罗晓芳,姚洪军.黑树莓的组织培养与快速繁殖[J].北京林大学学报,2001,24(1): 99-100.

[2] 王岳英.树莓组织培养最佳外植体材料试验[J].山西林业科技,2009,38(2): 12-13.

[3] 袁艺,李纯,张扬,等.树莓组织培养及植株再生[J].激光生物学报,2007,16(3): 334-337.

[4] 安伟,李亚东,张志东,等.红宝玉树莓的茎段培养及试管繁殖[J].吉林农业大学学报,2002,24(3): 43-45,56.

[5] 李媛媛,郭修武,代汉萍,等.秋福红树莓叶片离体再生植株研究[J].果树学报,2008,25(6): 868-871.

[6] 蒋小满,柏新富,赵建萍.黑莓的组织培养快速繁殖技术[J].北方园艺,2007(10): 173-175.

[7] 毕海林,徐中志,和加卫,等.野生树莓组织培养技术研究[J].中国野生植物资源,2007,26(2): 68-69.

[8] 李维林,李海燕,王小敏,等.黑莓和树莓组织培养研究进展[J].林业科技开发,2009,23(3): 9-14.

树莓果实总 RNA 提取方法的比较研究

刘 丹¹, 高庆玉¹, 张丙秀¹, 焦奎宝²

(1. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 浆果所, 黑龙江 绥化 152204)

摘 要: 比较了 SDS 法和 Trizol 法提取树莓果实总 RNA 的效果。结果表明: Trizol 法提取的 RNA 经电泳检测, 未见条带, 说明 Trizol 法并不适合富含多糖多酚的树莓。SDS 方法提取树莓果实总 RNA 完整性好, 28S 和 18S 条带清晰, OD_{260}/OD_{280} 值为 1.83, 在 1.7~2.0 之间, OD_{260}/OD_{230} 值为 2.01。结果证明, SDS 法提取的总 RNA 可直接用于分子克隆等分子生物学实验。

关键词: 树莓; 总 RNA; SDS 法; Trizol 法

中图分类号: S 663.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0136-03

树莓(*Rubus* spp. Raspberry)为聚合果, 果实柔软多汁, 色泽鲜艳, 味酸甜而富芳香, 其 VE 和 SOD 的含量为水果之最, 属高钾低钠果品^[1], 有止渴、除痰、发汗、活血等功效。树莓不仅适于鲜食和加工而且是重要的功能及保健水果, 在食用及药用等方面极具发展前途。随着生物技术的进步和发展, 人们对植物的许多生理特性进

行到了分子水平的研究, 进行 Northern 杂交分析、cDNA 文库构建等分子生物学研究均需要高质量的 RNA^[2], 而由于材料本身的内源 RNA 酶和外源 RNA 酶的影响, RNA 的提取条件比 DNA 要苛刻得多。关于树莓果实组织 RNA 提取的研究未见报道。Trizol 是一种新型总 RNA 抽提试剂, 内含异硫氰酸胍等物质, 能迅速破碎细胞, 抑制细胞释放出的核酸酶^[3], 具有步骤简单、配制试剂少等优点^[4], 是近年应用较多的植物 RNA 提取方法。SDS 法也是提取果实 RNA 常用的方法之一, 在果树组织 RNA 提取中应用较多。现采用 SDS 及 Trizol 法对树莓果实 RNA 的提取进行研究, 旨在选择一种提取高质量 RNA 的方法, 为后续分子试验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介: 刘丹(1984-), 女, 在读硕士, 现主要从事果树生物技术研究工作。

通讯作者: 高庆玉(1960-), 男, 博士, 教授, 现主要从事逆境生理及果树栽培教学与科研工作。E-mail: gaoqingyu@tom.com。

基金项目: 国家公益性行业农业科研专项基金资助项目(ny-hyzx07-028)。

收稿日期: 2010-10-22

Initial Establishment of Rapid Propagation of Wild *Rubus parvifolius* Linn

ZHANG Qi-chun, HAN Xiang, ZHAO Yang, WANG Nan, LI Yun-xiao, ZHANG Guo-hai

(Forestry College of Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan 471003)

Abstract: With the branch of wild *Rubus parvifolius* Linn. as test material, through tissue culture technology, plantlet regeneration of wild *Rubus parvifolius* Linn. was studied. The results indicated that the optimal time of drawing material for wild *Rubus parvifolius* Linn. tissue culture was April; during this period, the contamination rate of explant was the lowest; the semi-lignified stem with an axillary bud was the ideal explant for tissue culture; the optimal sterilizing treatment for the stem with an axillary bud was 75% alcohol 30 s + 0.5% NaClO 20 min; The optimal medium for starting training was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 0.5 mg/L+active carbon 1.0 g/L+sucrose 30 g/L+agar 7.5 g/L; The optimal medium for bud proliferation was MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+active carbon 1.0 g/L+sucrose 30 g/L+agar 7.5 g/L; The optimal medium for rooting was 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+active carbon 1.0 g/L+sucrose 30 g/L+agar 7.5 g/L; 76.7% plantlets survived after acclimatization and transplanted.

Key words: wild; raspberry; rapid propagation; branch