

# 乌饭树芽诱导体系的建立

张祝丽, 姜燕琴, 於虹

(合肥植物园, 安徽 合肥 230031)

**摘 要:**以乌饭树单芽茎段和幼嫩叶片为试材,通过比较不同消毒方法、取材部位、茎段放置方式以及激素对乌饭树初代培养的作用,研究了不同因素对其初代培养中芽诱导效果的影响。结果表明:75%酒精 30 s+0.1%升汞 6 min 消毒效果最佳,污染率为 0,褐化率较低,萌芽率较高,展叶天数较早,且消毒后的外植体生长状况最佳;乌饭树单芽茎段较其叶片用作试验材料较好;放置方式以茎段横置于培养基中较佳;相较其它激素,ZT 对乌饭树的诱导效果好,而各浓度的 ZT 中,以 4 mg/L 效果最佳。

**关键词:**乌饭树;初代培养;影响因素

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0079-04

乌饭树(*Vaccinium bracteatum* Thunb.)属杜鹃花科越桔属(*Vaccinium* L.)常绿灌木或小乔木,多分布于我国南方地区。其浆果、叶片的营养、药用价值极高,开发利用潜力巨大,且主干直立、枝叶茂密、叶色浓绿、果实艳丽美观,观赏价值极高,是园林绿化树种新秀<sup>[1-2]</sup>。目前,野生乌饭树在其分布区内零星分布,个体数量较少,加之人为干扰和果实鸟害、虫害的破坏,分布数量日益减少,若不加以保护、开发利用,很可能在其群落中渐失。

植物组织培养技术在均一化苗木快速繁殖、无病毒苗培养、遗传育种、突变体的选择和利用、细胞融合和 DNA 的重组上具有突出地位<sup>[3-6]</sup>。目前关于乌饭树的组培方面的研究较少,乌饭树的组培技术尚不成熟。该试验以乌饭树为试材,从消毒方法、材料放置方式、取材部位、激素等角度研究了影响其芽诱导的因素,以期对乌饭树工厂化育苗及遗传转化研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 选取乌饭树单芽茎段及幼嫩叶片为试验材料。

1.1.2 培养基 试验中使用的基本培养基为 WPM,在培养基中加入蔗糖 25 g/L、琼脂 7.5 g/L 和不同种类激素(表 4),pH 5.3。配制好的培养基经常规灭菌后备用。

**第一作者简介:**张祝丽(1985-),女,安徽安庆人,硕士,现主要从事蓝浆果组培等研究工作。E-mail:zhulizhang1107@163.com。

**基金项目:**国家农业部公益性行业(农业)科研专项资助项目(201103037);江苏省农业自主创新资助项目(CX(11)1011)。

**收稿日期:**2015-04-14

### 1.2 试验方法

1.2.1 消毒时间对初代培养的影响 剪取当年生的乌饭树幼嫩枝条,摘去叶子,用自来水加 1~2 滴洗洁精配制成洗洁精水溶液,洗净材料表面的灰尘,再用自来水冲洗干净。转到超净工作台上先用 75%酒精消毒 15 s 或 30 s,再用 0.1%升汞浸泡 6 min 或 9 min,具体组合见表 1。在此过程中,轻轻晃动三角瓶,接着用无菌水冲洗 8 次,每次 1 min,最后用无菌滤纸吸去外植体表面的水分。用解剖刀切取 1 cm 的单芽茎段接种到已灭菌的初代培养基上,每瓶接种 2 个外植体,每个处理接种 14 瓶。2 周后统计外植体的污染率、褐化率及膨大芽百分率,另外,记录展叶天数。

1.2.2 外植体的放置方式对初代培养的影响 取乌饭树的单芽茎段分别平放或竖插到培养基上。每瓶接种 2 个外植体,每个处理接种 14 瓶。2 周后统计污染率、褐化率及膨大芽百分率。5 周后统计成枝率、增殖倍数、多枝外植体率,观察新枝的生长状况。另外,在试验中记录展叶天数。

1.2.3 取材部位对初代培养的影响 取乌饭树的幼嫩枝条,摘去叶子,分为茎尖和单芽茎段(侧芽)2 个部分,消毒后接种到已灭菌的启动培养基上,每瓶接种 2 个外植体,每个处理接种 14 瓶。随后每 2~3 d 调查 1 次生长状况,包括茎基部是否膨大和萌芽天数。2 周后统计污染率、褐化率及膨大芽百分率。5 周后统计褐化率、成枝率和增殖倍数,观察新枝的生长状况。

1.2.4 不同激素对初代培养的影响 取乌饭树的单芽茎段接种在分别含 0.2 mg/L TDZ、3 mg/L ZT、2 mg/L CPPU、6 mg/L Zip 及不添加激素的 WPM 培养基上,

每瓶接种 2 个外植体,每个处理接种 14 瓶。随后每 2~3 d 调查 1 次生长状况,包括茎基部是否膨大和萌芽天数。2 周后统计污染率、褐化率及膨大芽百分率。5 周后统计褐化率、成枝率和增殖倍数,观察新枝的生长状况。

1.2.5 ZT 浓度对初代培养的影响 取乌饭树的单芽茎段接种在分别含 0、2、4、6 mg/L ZT 的 WPM 培养基上,每瓶接种 2 个外植体,每个处理接种 14 瓶。随后每 2~3 d 调查 1 次生长状况,包括茎基部是否膨大和萌芽天数。2 周后统计污染率、褐化率及膨大芽百分率。5 周后统计褐化率、成枝率和增殖倍数,观察新枝的生长状况。

1.2.6 培养条件 接种后置于培养室内培养,培养温度控制在  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照强度为 1 800~2 000 lx,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗。

### 1.3 项目测定

污染率(%)=污染的外植体的个数/接种的外植体的个数 $\times 100$ ,膨大芽百分率(%)=芽膨大的外植体的个数/接种的外植体的个数 $\times 100$ ,褐化率(%)=褐化/死亡的外植体的个数/接种或统计时外植体的个数 $\times 100$ ,成枝率(%)=成枝的外植体的个数/统计时外植体的个数 $\times 100$ ,增殖倍数=新枝的总数/统计时外植体的个数,产生多芽外植体的比率(%)=产生多芽外植体的个数/统计时外植体的个数 $\times 100$ 。

表 2 外植体放置方式对乌饭树初代培养的影响

放置方式	污染率/%	褐化率/%	膨大芽百分率/%	展叶天数/d	成枝率/%	多枝外植体率/%	增殖倍数	新枝生长状况
平放	0	35.71	64.29	20	55.56	0	0.56	长势好,叶大而绿
竖插	0	25.00	67.86	22	36.84	0	0.36	长势好,叶大而绿

### 2.3 取材部位对乌饭树初代培养的影响

以幼嫩叶片为外植体时,培养期间绝大多数材料逐渐褐化死亡。而以单芽茎段为外植体时,材料生长良好。接种 5 d 后茎段上的侧芽开始萌动;22 d 开始展叶

表 3 取材部位对乌饭树初代培养的影响

取材部位	污染率/%	褐化率/%	膨大芽百分率/%	展叶天数/d	成枝率/%	多枝外植体率/%	增殖倍数	新枝生长状况
单芽茎段	0	50.00	50.00	22.00	78.57	0	0.79	长势好,叶大而绿,节间短
幼叶	0	64.29	—	—	—	—	—	—

### 2.4 不同激素对初代培养的影响

从表 4 可知,经 ZT 和 2ip 处理的乌饭树单芽茎段能萌发成枝,其中,在质量浓度为 3 mg/L ZT 处理下,膨大芽百分率高、展叶天数早、成枝率高、增殖倍数较高且

表 4 不同激素对乌饭树初代培养的影响

激素/(mg·L <sup>-1</sup> )	污染率/%	褐化率/%	膨大芽百分率/%	展叶天数/d	成枝率/%	多枝外植体率/%	增殖倍数	新枝生长状况
0	0	0	0	—	—	—	—	—
TDZ 0.2	0	0	21.43	—	—	—	—	—
ZT 3	0	3.57	92.86	22	35.71	0	0.36	长势好,叶大而绿
CPPU 2	0	7.14	14.29	—	—	—	—	—
2ip 6	0	0	71.43	23	64.29	0	0.64	长势一般,叶大

## 2 结果与分析

### 2.1 消毒时间对初代培养的影响

由表 1 可知,75%酒精 30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液 6 min 组合的效果最好,污染率为 0,褐化率为 3.57%,膨大芽百分率达 96.43%,展叶天数 22 d。虽然 75%酒精 15 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液 6 min 组合消毒后,褐化率最低且膨大芽百分率最高,展叶天数也是最短,但消毒不彻底,污染率较高。其它 2 个组合消毒后褐化情况太严重。因此,75%酒精 30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液 6 min 组合对初代培养的效果最好。

表 1 消毒时间对乌饭树初代培养的影响

消毒时间 75%酒精+0.1% HgCl <sub>2</sub>	污染率 /%	褐化率 /%	膨大芽百分率 /%	展叶天数 /d
15 s+6 min	7.14	0	100.00	20
30 s+6 min	0	3.57	96.43	22
15 s+9 min	0	10.71	89.29	22
30 s+9 min	0	21.43	78.57	23

### 2.2 外植体放置方式对初代培养的影响

从表 2 可以看到,虽然竖插时褐化率、膨大芽百分率较高,但平放时的成枝率和增殖倍数均高于竖插时的,展叶时间也较早。综合来看平放的效果好于竖插的效果。

成枝,形态学下端长出嫩绿的愈伤组织;50 d 后成枝率达 78.57%,增殖倍数是 0.79 倍,新生枝节间较短,叶片大而绿,边缘有锯齿。

新枝生长状况良好。其它几种激素处理下,芽虽然能膨大但并未展叶,不能成枝。未添加任何激素情况下,侧芽不膨大、不展叶,逐渐枯萎。3 mg/L ZT 对乌饭树诱导效果最佳。

## 2.5 ZT 对乌饭树初代培养的影响

在未添加 ZT 的培养基上,乌饭树侧芽能膨大但不能成枝。经 2 mg/L ZT 处理下,乌饭树膨大芽百分率、成枝及生长情况良好。经 4 mg/L ZT 处理下,乌饭树膨

大芽百分率、成枝及生长情况达最佳状态。在 6 mg/L ZT 处理下,虽然诱导情况良好,但是有一定的褐化率,且各方面指标均不及 4 mg/L ZT 处理时。综合而言,4 mg/L ZT 较适宜诱导乌饭树。

表 5

ZT 对乌饭树初代培养的影响

ZT 浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	污染率/%	褐化率/%	膨大芽百分率/%	展叶天数/d	成枝率/%	多枝外植体率/%	增殖倍数	新枝生长状况
0	0	0	100.00	26	0	0	0	—
2	7.14	0	96.43	19	34.62	0	0.35	长势好,叶绿
4	0	0	100.00	19	89.29	10.71	1.00	长势好,叶绿
6	7.14	14.29	71.43	19	63.64	4.55	0.68	长势好,叶绿

## 3 讨论与结论

对于初代培养,消毒是很关键的一步。许多研究者在组培蓝浆果时都采用升汞消毒,效果很好,在乌饭树的组培上也见到用酒精和升汞来对外植体进行消毒<sup>[7]</sup>。但是升汞消毒后难以除去残余的汞,且升汞的毒害作用一般要经过一段时间培养后才会出现,为此消毒后要多次冲洗。70%的酒精比其它浓度的酒精有更强的杀菌力和穿透力,但不能彻底杀菌,一般不单独使用,由于它的湿润作用强,可排除掉材料上的空气,利于其它消毒剂的渗入,因此常用于表面消毒的第一步,与其它消毒剂配合使用,由于酒精穿透力强<sup>[8]</sup>,故应严格掌握好处理时间。该试验结果发现,75%酒精 30 s+0.1%HgCl<sub>2</sub> 6 min组合的效果最好,污染率、褐化率低,且侧芽生长状况良好。

乌饭树茎段较方便消毒,侧芽较易诱导,而叶片容易被消毒剂杀死,不易消毒,且在相同的消毒时间下褐化率增高<sup>[9-10]</sup>。在该试验中,叶片不适合用作诱导材料。有关外植体在培养基中的放置方式及低温预处理对初代培养影响的报道较少。总的来看,平放的效果好于竖插的效果,平放时的成枝率和增殖倍数均高于竖插时的,其原因则有待于进一步探讨。

激素在植物的组培中占有重要的地位<sup>[11-12]</sup>,在乌饭树的组培中用到的激素有 ZT 和 6-BA<sup>[9]</sup>,但据研究报道 6-BA 并不适合乌饭树的诱导,在越橘属的组培中常用的激素有 2ip 和 ZT<sup>[13-14]</sup>。对初代培养来说,2ip 的效果不如 ZT,且当 2ip 的浓度大于 15 mg/L 时对外植体有害<sup>[15]</sup>。近年来研究人员普遍采用 5 mg/L 2ip 和 2 mg/L ZT 的组合来诱导或增殖<sup>[16-17]</sup>。该研究中,对于乌饭树的初代培养以质量浓度为 4 mg/L ZT 效果较好。

该研究仅就部分因素对乌饭树的初代培养进行了研究,而关于如何完善乌饭树芽诱导体系及乌饭树的增殖和生根研究有待继续探索。

## 参考文献

- [1] 魏振承,张名位. 乌饭树属植物资源的营养功能及其开发应用[J]. 中国野生植物资源,2001(2):21-23.
- [2] 肖珊美. 开发乌饭树叶及果实的经济价值[J]. 中国林副特产,2001(4):36.
- [3] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991:138-146.
- [4] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京:农业出版社,1987:14-22.
- [5] 陈云志,何小弟,蒋佩尧,等. 杜鹃的组织培养[J]. 江苏农学院学报,1988,9(1):31-34.
- [6] 范玉清. 杜鹃几个栽培品种的苗诱导培养[J]. 园艺学报,1991,23(1):101-102.
- [7] 金炜,陈品良,顾烟,等. 植物激素对越橘组织培养中侧芽增殖的影响[J]. 植物学通报,1991,8(2):53-54.
- [8] 姜燕琴,於虹,宋鹏飞. 兔眼越橘芽诱导体系的建立[J]. 江苏农业科学,2010(3):53-56.
- [9] 谢远程. 乌饭树(*Vaccinium bracteatum*)生态学特性及其无性繁殖技术研究[D]. 南京:南京林业大学,2005:34-48.
- [10] 周长东. 乌饭树组织培养移栽技术研究[J]. 山西林业科技,2007(3):7-9.
- [11] SHEVADE A. *In vitro* shoot and floral organogenesis from stamen explants from a *Rhododendron* PJM group clone[J]. Scientia Horticulturae,1993,56:163-170.
- [12] REED B M, ABDELNOUR-ESQUIVEL A. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars[J]. Hort Science,1991,26(10):1320-1322.
- [13] REED B M, ABDELNOUR E A. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars[J]. Hort Science,1991,26(10):1320-1322.
- [14] BRISSETTE L, TREMBLAY L D. Micropropagation of lowbush blueberry from mature field-grown plants[J]. Hort Science,1990,25(3):349-351.
- [15] ECCHER T, NOE N. Comparison between 2ip and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) [J]. Acta Horticulturae,1989,241:185-191.
- [16] CAO X, HAMMERSCHLAG F A. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry[J]. Hort Science,2000,35:945-947.
- [17] CAO X, HAMMERSCHLAG F A, DOUGLASS L. A two step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. 'Bluecrop'[J]. Hort Science,2002,37:819-821.

Induction of Bud on *Vaccinium bracteatum* Thunb.

ZHANG Zhuli, JIANG Yanqin, YU Hong  
(Hefei Botanical Garden, Hefei, Anhui 230031)

DOI:10.11937/bfyy.201517021

# 宁夏羊角椒雄性不育基因 ISSR 的分子标记

颜秀娟<sup>1</sup>, 何鑫<sup>2</sup>, 王学梅<sup>1</sup>, 高晶霞<sup>1</sup>

(1. 宁夏农林科学院 种质资源研究所, 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏森林病虫害防治检疫总站, 宁夏 银川 750001)

**摘要:**以宁夏羊角椒雄性不育系为试材,应用 ISSR 技术,对其不育系及其相应的可育系基因组 DNA 进行了比较分析,从 50 条随机引物中筛选了 35 条引物在两系之中都获得了 ISSR-PCR 扩增产物。结果表明:在不育系中获得 4 条稳定扩增的特异片段 ISSR-10<sub>850</sub>、ISSR-13<sub>850</sub>、ISSR-14<sub>800</sub> 和 ISSR-15<sub>180</sub>,初步认定这可能是导致宁夏羊角椒雄性不育系花粉败育的不育基因相关的分子标记。

**关键词:**宁夏羊角椒;雄性不育;ISSR 标记

**中图分类号:**S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0082-03

宁夏羊角椒雄性不育系是宁夏农林科学院种质资源研究所辣椒课题组田间发现的自然突变的不育系资源。经过多代的回交,已获得了稳定的两用系资源。该试验通过 ISSR 技术对其进行分子标记研究,进而对宁夏羊角椒雄性不育系与其可育系的基因差异进行初步研究。ISSR(Inter-simple sequence repeat)标记方法是近年来在微卫星技术上发展起来的一种新型分子标记技术<sup>[1]</sup>。由于 ISSR 技术不仅可以快速、高效和灵敏地检测出基因组 DNA 的多态性,有很好的重复性,而且操作简单、成本较低,已被广泛地应用于动植物的基因定位和遗传多样性研究,以及种质资源鉴定方面的研究<sup>[2-5]</sup>。该试验通过 ISSR 标记技术,筛选与宁夏羊角椒雄性不育基因连锁分子标记片段,以期在分子水平上进一步探索宁夏羊角椒雄性不育系的败育机制,同时为分子标记辅助育种选育奠定理论基础。

**第一作者简介:**颜秀娟(1981-),女,吉林长春人,硕士,助理研究员,研究方向为辣椒育种与栽培。E-mail:aixin0516@163.com

**基金项目:**宁夏农林科学院自主研发资助项目(NKYG14-14, NKYG-15-01)。

**收稿日期:**2015-04-24

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

宁夏羊角椒雄性不育系及其可育系,由宁夏农林科学院种质所提供。引物及 PCR 扩增试剂购自上海捷瑞生物工程有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 参考改良 CTAB 法<sup>[6]</sup>提取基因组 DNA,用 100  $\mu$ L 的 TEbuffer,加入 1/100 体积的 RNaseA(10 mg/mL),37℃温浴 30 min。用核酸蛋白检测仪检测 DNA 纯度与浓度,并将浓度稀释到 100 ng/ $\mu$ L,保存于-20℃用于后续试验。

**1.2.2 ISSR-PCR 扩增体系和扩增程序** ISSR 扩增体系(20  $\mu$ L)含有:10×Buffer 2  $\mu$ L,40~50 ng DNA 模板、引物 0.5  $\mu$ mol/L、dNTPs 200  $\mu$ mol/L、Taq DNA 聚合酶 1.5 U。ISSR 的扩增程序如下:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,42℃退火 45 s(不同引物设定不同退火温度),72℃延伸 90 s,35 个循环;72℃延伸 10 min;4℃保存。

**1.2.3 ISSR-PCR 扩增产物检测** 采用分离和分析 DNA 常用的琼脂糖凝胶电泳的方法。扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,用 DNA ladder Marker(100 bp)

**Abstract:** The tender leaves and single-bud stem segment of *Vaccinium bracteatum* Thunb. were used as the explants to study the effect of different factors on bud induction by comparing the function of different disinfection methods, material parts, the way of placement and hormone. The results showed that a combination way of 30 seconds with 75% alcohol and then 6 minutes with 0.1% mercuric chloride reached the best effect; the single-bud stem segment was more suitable than tender leaves as the explants; the single-bud stem segment transverse in the culture medium was better; the ZT had better induction effect than other hormones, and the concentration of 4 mg/L was the best.

**Keywords:** *Vaccinium bracteatum* Thunb.; initial culture; influencing factors