

野生黑果越橘组培快繁技术研究

韩阳花

(新疆农业职业技术学院,新疆 昌吉 831100)

摘要:为了促进蓝莓种质资源的保护和开发利用,以黑果越橘茎段为材料,进行了离体培养和植株再生的研究。结果表明:茎段外植体用 0.1% HgCl₂ 消毒 8~10 min 为宜,最佳的丛生芽诱导培养基为改良 WPM+ ZT2.0 mg·L⁻¹,丛生芽的诱导率达到 55.17%,且苗健壮;最佳的增殖培养基为改良 WPM+ ZT1.0 mg·L⁻¹,增殖倍数为 5.26。采用 IBA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹ 浸泡水苔,包裹试管苗基部进行瓶外生根,生根率可达 91.71%。

关键词:黑果越橘;离体快繁;激素

中图分类号:S663.9 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2016)03-0012-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.03.0012

黑果越橘(*Vaccinium myrtillus* L.)是杜鹃花科越橘属的一种野生小灌木,在我国仅新疆有部分分布^[1]。黑果越橘具有抗寒能力强,果大酸甜适口,可作为北方蓝莓品种改良的重要亲本,属于国内稀缺的野生蓝莓资源。蓝莓果实因富含花青素,具有许多保健功能,近年来越来越受到人们的关注,蓝莓种苗的需求也越来越多。目前,蓝莓

种苗主要依靠植物组织培养技术进行快繁,研究黑果越橘茎段的组织培养不但能够为蓝莓快繁生产提供一定的数据参考,而且在蓝莓种质资源的保护和开发利用方面具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料采自喀纳斯景区与哈巴河县牧区交界的山坡,海拔 2 100~2 200 m,分布在浓密的落叶松针叶林下。野外用周围伴生的苔藓包裹根系,实验室内 4℃ 的冰箱下保存 7 d。

改良 WPM 是以 Ca(NO₃)₂·4H₂O 684 mg·L⁻¹, KNO₃ 190 mg·L⁻¹, C₁₀H₁₃FeN₂NaO₈ 73.4 mg·L⁻¹

收稿日期:2016-01-28
基金项目:新疆维吾尔自治区高校科研计划青年教师科研启动基金资助项目(XJEDU2012S049)
作者简介:韩阳花(1979-),女,四川省西充县人,硕士,讲师,从事资源植物开发利用及植物组织培养研究。E-mail:hhh_535@163.com。

Bioinformatics Analysis of the RNA-binding Protein GRMZM2G052926 Gene in Maize

SUN Pei-yuan¹, WANG Jun-qiang¹, HAN Ye-hui¹, YU Yun-kai¹, XU Jian¹, ZHOU Chao¹, LI Xin²
(1. Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161041; 2. Wuchang Rice Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Wuchang, Heilongjiang 150229)

Abstract: In order to study the regulatory mechanism of the maize RNA-binding protein in the maize growth and development, taking a RNA-binding protein GRMZM2G052926 gene as materials, its characters, including the physical and chemical properties, transmembrane domain, subcellular localization, functional domain plus the secondary structure were studied by bioinformatics tools. The results showed that this RNA-binding protein was an unstable hydrophilic acidic protein containing an open reading frame of 1 335 bp. The molecular weight of the protein containing two RRM super families was 38. 301 1 kDa. It was no signal peptide, no transmembrane domain, located in the cytoplasm, and contained random coil, alpha-helix, extended strand and beta turn. The phylogenetic results showed that GRMZM2G052926 protein from Zea mays and Os05g0437300 protein from Oryza sativa were the nearest in genetic relationship, reaching to 87%.

Keywords: maize; RNA-binding protein; GRMZM2G052926 gene; bioinformatics analysis

和盐酸硫胺素 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 代替原 WPM 培养基中的 K_2SO_4 、 CaCl_2 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{-EDTA}^{[2]}$ 。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒与接种 将采集的枝条去叶片、留叶柄,剪切成 $4\sim 5\text{ cm}$ 长的茎段,用洗衣粉水涮洗 $5\sim 10\text{ min}$,然后置于流水下冲洗 $1\sim 2\text{ h}$,再在无菌条件下用 75% 酒精浸泡 30 s ,无菌水冲洗 1 次,然后用 0.1% HgCl_2 浸泡,最后用无菌水漂洗 10 次,在无菌滤纸上吸干表面的水分后,剪切成长 $0.5\sim 1.0\text{ cm}$ 带腋芽的茎段接种于改良 WPM 空白培养基上。 0.1% HgCl_2 浸泡的时间分别为 3、5、8、10 min,每个时间处理接种 30 个外植体,每瓶只接一个外植体,10 d 后统计污染率,45 d 后统计成活率。

污染率(%) = 污染数/接种数 $\times 100$

成活率(%) = 成活数/(接种数-污染数) $\times 100$

1.2.2 丛生芽的诱导培养 将外植体萌发出的短枝,切成 1 cm 左右至少带有一个腋芽的茎段,接种到丛生芽诱导培养基上,培养条件为温度 $23\sim 27^\circ\text{C}$,光强 $2\ 000\sim 3\ 000\text{ lx}$,光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

丛生芽诱导培养以改良 WPM 为基本培养基,分别附加浓度为 0 、 1.0 、 2.0 、 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ZT。每种培养基接种 6 瓶,每瓶 5 个,共 30 个茎段。培养 56 d 后,统计丛生芽的诱导率、丛生芽上的有效枝数(1 cm 以上的枝条算有效枝)以及丛生芽生长的状况^[3]。

丛生芽的诱导率(%) = 分化出丛生芽的外植体/(外植体接种数-污染数) $\times 100$

丛生芽有效枝数 = Σ 单个丛生芽有效枝数量/分化出丛生芽的外植体

1.2.3 增殖培养 将诱导培养的丛生芽切成高 1 cm 左右的茎段,转接到增殖培养基上。培养室内的环境条件同 1.2.2。增殖培养基选用改良 WPM 附加不同浓度激素,共设置 4 个处理,每个

处理接种 10 瓶,每瓶接种 3 个茎段,重复 3 次。培养 56 d 后,统计增殖倍数,有效枝数,有效枝高度^[4-5]。

增殖倍数 = 新转接短枝数/原种数;

有效枝数统计方法同 1.2.2;

有效枝高度 = Σ 单个有效枝高度/有效枝数

1.2.4 瓶外生根培养 从壮苗培养基中,选取高 $3\sim 4\text{ cm}$ 健壮的试管苗,从丛生芽低端剪下;将下端 1 cm 左右处的叶片减掉,用消过毒且浸泡不同激素浓度的水苔包裹住下端,保证至少有 $1\sim 2$ 个芽包裹在水苔中。选用的激素及浓度分别为:IBA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、IBA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、IBA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、IBA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;同时设置清水浸泡水苔为对照。30 d 后调查生根率、生根数量及根长^[6]。

生根率(%) = 生根的试管苗数/移栽总数 $\times 100$;

根的条数 = Σ 单个生根试管苗根的条数/生根的试管苗数

根长 = Σ 单个生根试管苗的平均根长/生根的试管苗数

1.2.5 统计方法 所得数据采用 Excel 软件用邓肯氏新复极差法进行比较,显著水平 $P\leq 0.05$,极显著水平 $P\leq 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 0.1% HgCl_2 消毒时间对外植体消毒效果的影响

由表 1 可以看出, 0.1% HgCl_2 消毒时间由 3 min 提升到 8 min 后,污染率由 40% 下降到 10% ,污染率明显降低;而 10 min 的污染率为 6.7% ,与 8 min 比较,略有提高。从成活率的高低来看, 8 min 的成活率最高,达到了 100% ,但和 10 min 成活率 96.4% 的结果相比,差异并不明显。从试验结果来看,黑果越橘茎段外植体 0.1% 升汞消毒的最佳时间为 $8\sim 10\text{ min}$ 。

表 1 0.1% HgCl_2 不同消毒时间对外植体消毒效果的影响

Table 1 The effect of different sterilization time of 0.1% HgCl_2 on disinfection effect for explant

消毒时间/min Sterilization time	接种数/株 The experiment number	污染数/株 Pollution number	成活数/株 Survival number	污染率/% Pollution rate	成活率/% Survival rate
3	30	12	9	40.0	50.0
5	30	7	18	23.3	78.3
8	30	3	27	10.0	100.0
10	30	2	27	6.7	96.4

2.2 ZT 浓度对黑果越橘茎段丛生芽诱导的影响

黑果越橘茎段外植体接种到不同诱导培养基上培养 14 d 左右,腋芽膨大萌发;49~56 d 后部

分腋芽分化出丛生芽,同时部分茎基部愈伤组织上也有不定芽丛生,形成无菌短枝型丛生芽。对比不同 ZT 浓度下的 4 种培养基丛生芽的生长情况见表 2。

表 2 ZT 浓度对黑果越橘茎段丛生芽诱导的影响

Table 2 The effect of ZT concentration on inducing clustered shoots of *Vaccinium myrtillus* L. stem section

ZT/(mg·L ⁻¹)	丛生芽的诱导/% Inducing clustered shoots	丛生芽有效枝数/株 Effective branches number of clustered shoots	丛生芽生长状况 Growth status of clustered shoots
0	3.33	2.00 bB	健壮,无愈伤组织产生
1.0	24.14	2.14 abAB	健壮,少数苗基部有愈伤组织
2.0	55.17	2.31 aAB	健壮,多数苗基部有愈伤组织
3.0	82.14	2.70 aA	有轻微玻璃化产生,愈伤组织多

不同大小写字母表示在 0.01、0.05 水平差异显著。下同。
Different capital letters and lowercases mean significant difference at 0.01 and 0.05 level. The same below.

从表 2 可以看出,ZT 能够显著的提高黑果越橘丛生芽的诱导效率,当 ZT 浓度 3.0 mg·L⁻¹时,丛生芽的诱导率最高,可达到 82.14%。各浓度下,丛生芽上的有效枝数量多数为 2 株,最多为 4 株,从该指标平均值来看,当 ZT 浓度为 3.0 mg·L⁻¹时,其丛芽有效枝数量最多,达到 2.70 株,极显著高于对照(ZT 0 mg·L⁻¹)2.00 株;当 ZT 浓度为 2.0 mg·L⁻¹时,其丛生芽有效枝平均值为 2.31 株,显著高于对照,但 ZT3.0 mg·L⁻¹和 ZT2.0 mg·L⁻¹相比,它们之间的丛生芽有效枝数量差异不显著。从丛生芽生长状况来看,当 ZT 达到 3.0 mg·L⁻¹时,会导致轻微的玻璃化问题,

影响原种苗的品质,其它处理则表现为种苗健壮;愈伤组织是分化丛生不定芽的前提,对材料增殖有很重要的意义,随着 ZT 浓度的增加,丛生芽基部的愈伤组织数量有所增加。综合考虑各项指标,诱导黑果越橘茎段产生丛生芽的最佳 ZT 浓度为 2.0 mg·L⁻¹。

2.3 不同激素对黑果越橘增殖的影响

黑果越橘丛生芽短枝接种到继代培养基上后,7 d 左右可见到短枝上的芽萌发,新萌发的芽体呈红色,30~40 d 后可分化长出新梢,60 d 后可以转接。不同增殖培养基的增殖效果见表 3。

表 3 不同激素对黑果越橘增殖效果的影响

Table 3 The effects of different hormones on proliferation of *Vaccinium myrtillus* L.

激素/(mg·L ⁻¹) Hormones	增殖倍数 Proliferation times	有效枝数/株 Effective branches number	有效枝高度/cm Effective branches height	生长状况 Growth status
ZT1.0	5.26 aA	2.78 abAB	1.98 aA	健壮,叶色浓绿
ZT2.0	5.54 aA	3.25 aA	1.73 aAB	健壮,叶色浓绿
ZT1.5+BA0.5+NAA0.05	2.98 bB	2.35 bB	1.31 bB	叶枯黄,生长不良
BA0.5+NAA0.05	1.51 cC	1.51 cC	1.06 bB	叶枯黄较多,易老化

从表 3 可以看出,当单独使用 ZT,浓度为 1.0 mg·L⁻¹和 2.0 mg·L⁻¹时,在增殖倍数、有效枝数、有效枝高度以及生长状况方面不存在显著差异;当激素为 ZT1.5 mg·L⁻¹+BA0.5 mg·L⁻¹+NAA0.05 mg·L⁻¹时,增殖倍数、有效枝数、有效枝高度均出现极显著的下降,试管苗的总体生长情况出现生长不良的情况;当激素为 BA0.5 mg·L⁻¹+NAA0.05 mg·L⁻¹时,各项评价指标均处于最低

水平。从上述结果中,可以初步推断,BA 和 NAA 对黑果越橘增殖培养不利,而且在此阶段它们对 ZT 的作用存在一定的抑制作用。综上所述,从节约生产成本的角度考虑,黑果越橘最佳的增殖培养基为改良 WPM+ ZT1.0 mg·L⁻¹,增殖倍数为 5 倍左右。

2.4 生长素对黑果越橘生根的影响

黑果越橘试管苗移栽后,15 d 左右可以看到

有新叶生长,取出后可见根原基在芽苗基部及腋芽周围形成,继续培养至 30 d,调查不同激素处理下的生根情况(见表 4)。

从表 4 可以看出,4 个生根试验处理和对照(清水)均存在极显著差异;其中,IBA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹的生根率最高,达到 91.71%,极显著高于其它处理;其生根数量也是最多的,达到 7.13 条,与 IBA 1.0 mg·L⁻¹差异不显著,但与其它处理差异显著;其平均根长为 2.83 cm,仅次于 IBA 1.0 的 3.12 cm,二者根长差异不显著。综上所述,诱导黑果越橘试管苗生根的最佳激素组合为 IBA0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹。

表 4 生长素对黑果越橘生根的影响
Table 4 The effects of auxin on root of *Vaccinium myrtillus* L.

激素/(mg·L ⁻¹) Auxin	生根率/% Rooting rate	根的数量/条 Root number	根长/cm Root length
IBA1.0	87.89 bB	6.86 aA	3.12 aA
IBA0.5	81.68 dD	5.94 bAB	1.86 bB
IBA1.0+NAA 0.5	83.34 cC	4.83 cB	1.54 bB
IBA0.5+NAA 0.5	91.71 aA	7.13 aA	2.83 aA
清水(CK)	0 eE	0 dC	0 cC

3 结论与讨论

试验研究表明,ZT 对黑果越橘茎段丛生芽诱导和增殖有很大的影响,丛生芽诱导阶段 ZT 的适宜浓度为 2.0 mg·L⁻¹,丛生芽增殖阶段 ZT 的适宜浓度为 1.0~2.0 mg·L⁻¹,考虑到反复使用高浓度激素增殖会造成试管苗品质下降,同时从节约生产成本的角度上考虑,建议增殖阶段的 ZT 浓度控制在 1.0 mg·L⁻¹;BA 和 NAA 与 ZT

共同使用时,对黑果越橘瓶苗增殖产生一定拮抗作用;IBA 能够很好地诱导黑果越橘试管苗生根,单独使用 0.5~1.0 mg·L⁻¹的 IBA,生根率能够达到 80%以上,配合等浓度的 NAA 后,生根率可以提高到 90%以上,这与张彩玲等人的研究结果基本一致。

黑果越橘在增殖培养初期,植株常常会发红,新生的嫩芽也为红色,考虑到其阴生生境的特点,降低培养时的光照强度,植株发红的情况得到一定缓解。植株发红与植物体内的花青素含量有关,当植物体内糖含量积累时,会形成较多的花青素,使植株呈紫红色。降低光照强度,一定程度上减少了光合作用,使得体内糖浓度降低,花青素的含量随之降低,从而缓解了植株发红的问题。

资料显示,蓝莓的生长周期长,大约为 48~56 d,株高增长速度缓慢,节间距离短,在一定程度上限制了增殖的速度,这可能与养分摄取不均衡有关。适当降低 C/N 比,能够解决这个问题,而蓝莓这方面的研究还比较少见,可以作为增殖培养基优化的一个方面来考虑。

参考文献:

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第三册)[M]. 北京:科学出版社,2001:212.
[2] 孙阳. 蓝莓果实香气成分及微繁殖技术的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2008.
[3] 赵鑫. 优质蓝莓转 LEA 基因及耐寒性分析研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2011.
[4] 姜丽琼,肖前刚,李文俊,等. 蓝莓 H34 组培快繁技术[J]. 林业科技开发,2014,28(2):89-92.
[5] 汤伟华. 蓝莓茎段初代培养技术[J]. 湖北农业科学,2012,58(6):192-193.
[6] 张彩玲,朱延明,曹天旭. 蓝莓“美登”组培快繁及瓶外生根技术的研究[J]. 特产研究,2012,51(1):44-47.

Study on Technology of Tissue Culture and Rapid Propagation of *Vaccinium myrtillus* L.

HAN Yang-hua

(Xinjiang Agricultural Vocational Technological College,Changji,Xinjiang 831100)

Abstract: In order to promote the protection and development utilization of blueberry germplasm resources, taking stem section as explants, the tissue culture and plantlet regeneration of *Vaccinium myrtillus* L. were studied. The results showed that the stem section disinfected with 0.1% for HgCl₂ for 8 to 10 min, the best multiple shoot clumps induction media was the improved WPM+ZT2.0 mg·L⁻¹, induction of the rate was 55.17%; The best proliferation medium was the improved WPM+ZT1.0 mg·L⁻¹, proliferation ratio was 5.26. The rooting rate was up to 91.71% using sphagnum as transplant matrix when sphagna was soaked by IBA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹.

Keywords: *Vaccinium myrtillus* L.; tissue culture and rapid propagation; hormone