

甜樱桃茎尖培养及 PNRSV 的 RT-PCR 检测

代红艳¹ 张志宏¹ 吴禄平¹ 侯义龙^{1,2} 吕德国¹

(¹ 沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161; ² 大连大学生物工程学院, 大连 116622)

摘要: 研究了茎尖大小、接种方式、培养基成分、试材基因型对甜樱桃品种茎尖培养的影响。1 年生成熟枝条上茎尖成苗率为 8.3 % ~ 23.7 %, 嫩梢上的茎尖成苗率为 27.3 % ~ 37.5 %。利用 RT-PCR 技术对部分甜樱桃试管苗进行了早期病毒鉴定, 筛选出一些不带李坏死环斑病毒 (PNRSV) 的甜樱桃试管苗, 并证明甜樱桃试管苗微茎尖培养不能有效脱除 PNRSV。

关键词: 甜樱桃; 茎尖培养; 病毒; RT-PCR

中图分类号: S 662.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 01-0087-03

1 目的、材料与方法

甜樱桃组织培养的研究始于 20 世纪 80 年代^[1], 其离体繁殖成功的报道^[1~4]不多, 这反映出甜樱桃的离体繁殖比较困难, 而且以往的报道均未涉及甜樱桃组培是否能够脱毒的问题。本研究以我国主栽的和从国外引进的一些品种为试材, 对影响其茎尖培养的多种因素进行试验, 并利用逆转录多聚酶链式反应 (RT-PCR) 技术对试管苗进行樱桃的主要病毒李坏死环斑病毒 (*Prunus necrotic ring spot virus*, PNRSV)^[5]的检测, 以期为我国甜樱桃无病毒苗工厂化生产积累经验。

甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 试材取自大连市凌水镇和沈阳农业大学园艺学院温室, 冬季取材为 1 年生成熟枝条; 夏季取材剪取嫩梢。品种有: 红灯、乌梅早生、顽童、雷尼尔、砂蜜豆、高砂等。按常规程序制作培养基。试材的消毒方法: 洗涤剂水浸 3 min 后流水冲洗 60~90 min, 70 % 酒精浸泡 30 s, 0.1 % 二氯化汞消毒 15 min, 无菌水冲洗 4 次, 无菌水浸泡 20 min, 无菌水冲洗 4 次, 接种。培养条件为: 温度 23~25 °C, 光强 2 000~2 500 lx, 光照时间 16 h/d。

甜樱桃叶片总 RNA 提取方法见文献 [6]。逆转录反应体系为: Buffer (1 ×), 引物 1 (5' ACGCGCAAAAGTGTCGAAATCTAAA 3') (1 μmol/L), 总 RNA 模板 (约 100 ng), M-MLV 逆转录酶 (40 U), dNTP (0.25 mmol/L), RNasin (40 U), MgCl₂ (1.5 mmol/L), 反应体积 10 μL。逆转录反应程序: 37 °C 2 h, 95 °C 5 min 灭活逆转录酶, 4 °C 保存。PCR 反应在 MJ PTC-150 热循环仪上进行, 反应体积为 25 μL, 包括逆转录产物 10 μL, 引物 1 和引物 2 (5' TGGTCCCACTCAGAGCTCAACAAAG 3') 各 1 μmol/L, dNTP (0.2 mmol/L), Ex Taq 酶 2 U。程序为: 94 °C 1 min, 55 °C 2 min, 72 °C 2 min, 35 个循环, 72 °C 5 min。扩增产物在 1.5 % 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶中含溴乙锭, 浓度 0.5 μg/mL。

2 结果与分析

2.1 取材时期和消毒接种方式对甜樱桃茎尖培养的影响

冬季和夏季两个时期枝条的茎尖均能分化成试管苗。夏季取材, 可供接种的茎尖数较少 (顶端生长点较适合于接种), 但成苗率较高 (27.3 % ~ 37.5 %); 冬季取材, 枝条上可供接种的茎尖数较多 (顶芽和侧芽的生长点均可以接种), 但成苗率低 (8.3 % ~ 23.7 %)。

以甜樱桃红灯品种 1 年生枝条为试材, 研究了 3 种消毒接种方式对其茎尖培养的影响。处理 1: 将单芽茎段纵切, 对有芽部分进行消毒, 接种时剥掉芽鳞片和外部叶原基; 处理 2: 将芽从枝条上削

收稿日期: 2002-03-12; 修回日期: 2002-07-23

下来(带一定木质部),去掉芽鳞片和茎表皮后消毒,接种时剥除外外部叶原基;处理 :将芽从枝条上切下来,不带木质部,剥除芽鳞片,消毒后直接接种。结果表明:处理 的污染率非常高,达 47.4 %,而且未污染芽也全部不能萌发;处理 和处理 萌发率和成苗率差异不大(萌发率分别为 75.0 %, 71.8 %;成苗率分别为 23.3 %, 25.0 %),但是处理 的污染率(20.0 %)比处理 (2.5 %)高。综合来看,处理 效果最好。

2.2 基因型对甜樱桃茎尖接种成活率的影响

5 个甜樱桃品种的 1 年生成熟枝条茎尖相比,红灯的成苗率最高,达 23.7 %;砂蜜豆次之,为 18.0 %;而雷尼尔、高砂、大紫较低,在 10 %左右。3 个品种夏季嫩梢的茎尖成苗率分别是:雷尼尔 37.5 %,顽童 28.6 %,乌梅早生 27.3 %。

2.3 培养基成分对甜樱桃茎尖培养的影响

从基本培养基的种类和培养基中激素的种类两个方面进行试验。结果表明:基本培养基中大量元素对甜樱桃茎尖的成苗率有一定影响,其中 MS 培养基效果最好。MS 和 WPM' (WPM 大量元素 + MS 微量元素和有机成分)培养基上的新梢状态相似,基部有瘤状愈伤组织;Knop' (Knop 大量元素 + MS 微量元素和有机成分)培养基上的新梢基部发褐,无愈伤组织,而且叶片较小,叶色发黄。

通过比较 23 个激素配方发现,培养基中只以 BA 作为细胞分裂素物质效果不好,虽然茎尖可以正常萌发,但是 1 个月以后多数出现枯顶现象,最终死亡,而附加一定浓度的 ZT 后可大大提高茎尖成活率。生长素类物质和赤霉素对于茎尖的初期分化培养不是必需的,但在继代培养过程中需要添加。

2.4 甜樱桃试管苗的微茎尖培养

从甜樱桃试管苗上直接剥取的 0.5 mm 的微茎尖在附加激素的培养基上可以分化成苗。从表 1 可以看出,试管苗微茎尖的成苗率很高,最高可达 71.1 %,远远高于田间枝条茎尖的成苗率。比较

表 1 甜樱桃试管苗微茎尖分化情况

| Table 1 Proliferation and shoot forming of minor shoot tip removed from in vitro plantlet of sweet cherry | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|-----|-----|-----|-----|--|--|------------------------------------|--|--|------------------------------------|--|--|------------------------------------|
| 浓度 Concentration (mg/L) | | | | | | 乌梅早生 Wumei zaosheng | | | 顽童 Wantong | | | 巨红 Juhong | | |
| | | | | | | 接种数 No. of inoculated shoot tip | 萌发率 Rate of proliferation (%) | 成苗率 Rate of shoot forming(%) | 接种数 No. of inoculated shoot tip | 萌发率 Rate of proliferation (%) | 成苗率 Rate of shoot forming(%) | 接种数 No. of inoculated shoot tip | 萌发率 Rate of proliferation (%) | 成苗率 Rate of shoot forming(%) |
| BA | GA | ZT | IBA | TDZ | LH | 48 | 97.9 | 58.3 | 99 | 58.6 | 26.3 | 49 | 89.8 | 24.5 |
| 1.0 | - | 0.3 | 0.1 | - | 200 | 45 | 93.3 | 71.1 | 60 | 88.3 | 60.0 | 54 | 85.2 | 51.9 |
| - | - | - | 0.1 | 2.0 | 200 | 45 | 26.7 | 22.2 | 37 | 45.9 | 21.6 | 40 | 62.5 | 22.5 |

注:培养基为 MS。Note:Medium were MS.

了 3 种培养基,其中以 MS + BA 1.0 mg/L + ZT 0.3 mg/L + IBA 0.1 mg/L + LH 200 mg/L 培养基比较适合甜樱桃试管苗的微茎尖分化培养。

2.5 甜樱桃试管苗 PNRSV 检测

从甜樱桃试管苗提取总 RNA 比从田间叶片提取容易,而且 RNA 的提取量也较大。利用 RT-PCR 技术可稳定地从甜樱桃试管苗中检测到 PNRSV (图 1),并鉴定出了 4 个品种的 15 个不带 PNRSV 的试管菌株系。从图 1 可以看出,甜樱桃品种顽童的普通试管苗(泳道 3)和微茎尖培养后获得的试管苗(泳道 2)均能扩增出大小为 449 bp 的 PNRSV 的特异片段,这表明利用试管苗

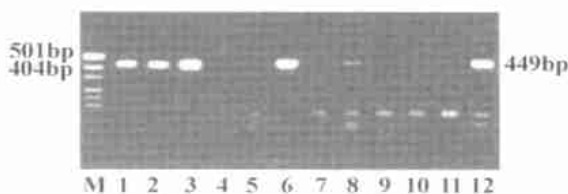


图 1 利用 RT-PCR 检测甜樱桃试管苗中的 PNRSV

M. DNA 分子量标记, 1. 乌梅早生, 2. 顽童试管苗微茎尖培养获得的苗, 3. 顽童, 4. 高砂, 5. 巨红, 6. 抉择, 7. 早红宝石, 8~12. 红灯的 5 个株系。

Fig. 1 Detection of PNRSV in shoots in vitro of sweet cherry

M. DNA size marker, 1. Wumei zaosheng, 2. shoot regeneration from minor shoot tip of Wantong, 3. Wantong, 4. Gaosha, 5. Juhong, 6. Jueze, 7. Zao hongbaoshi, 8-12. Lines of Hongdeng.

微茎尖培养技术并不能有效脱除 PNRSV。

参考文献:

- 1 Snir I. In vitro propagation of sweet cherry cultivars. HortScience, 1982, 17: 192 ~ 193
- 2 Preiewek- Kozlina B. Jelaska S. Microclonal propagation of *Prunus avium* L. Acta Hort. , 1987, 212: 599 ~ 602
- 3 韩文璞. 甜樱桃的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 1994, 30 (2): 119 ~ 120
- 4 阎贤伟. 甜樱桃茎尖培养和快速繁殖研究. 园艺学报, 1990, 17 (4): 275 ~ 280
- 5 Kolber M, Nemeth M, Krizbai L, et al. Detectability of *Prunus* necrotic ringspot virus and Plum pox virus by RT-PCR, ELISA and indexing on woody indicators. Acta Hort. , 1998, 472: 243 ~ 247
- 6 侯义龙. 果树主要病毒 RT-PCR 检测体系的建立、优化及病毒特异 DNA 片段克隆测序研究: [博士学位论文]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2000. 14

In Vitro Shoot Tip Culture of Sweet Cherry Cultivars and Detection of PNRSV by RT-PCR

Dai Hongyan¹, Zhang Zhihong¹, Wu Luping¹, Hou Yilong^{1,2}, and L üDeguo¹

(¹ College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; ² College of Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract : The effects of size of inoculated shoot tip, method of inoculation, medium and genotype on shoot tip culture of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars were studied. The rate of shoots forming from tips of one-year-old twigs was low, 8.3 % to 23.7 %, while the rate of shoots forming from tips of actively growing shoots was higher, 27.3 % to 37.5 %. *Prunus* necrotic ringspot virus (PNRSV) was detected early in some of sweet cherry plantlets in vitro with RT-PCR technique. Plants free of PNRSV were found. It was proved that PNRSV could not be eliminated effectively from sweet cherry plantlets in vitro by culture of minor shoot tip.

Key words : Sweet cherry; Shoot tip culture; Virus; RT-PCR

新书推荐

《英汉生物学词汇》(第二版)

本书是《英汉生物学词汇》1983年版的增修订本,是一部综合生物学各分支学科词汇的大型工具书。收有动物学、植物学、人体解剖学、组织胚胎学、微生物学、遗传学、细胞学、生物化学、生物物理学、时间生物学、生物工程、分子生物学、生态学等学科以及医学、农学的词汇,共约130 000条。定价:99元(含邮费)

《汉英生物学词汇》

本书是一部汉英对照的中型工具书。收有动物学、植物学、人体解剖学、组织胚胎学、微生物学、遗传学、细胞学、生物化学、生物物理学、时间生物学、生物工程、分子生物学、生态学等学科以及医学、农学的名词,共约14万条。定价:106元(含邮费)

《英汉生物化学及分子生物学词典》

本词典收集生物化学、分子生物学及与其相关的细胞生物学、免疫学、遗传学、微生物学及医药学等方面词条约21 000条,大部分词条附有简明释义。书中还收录一些缩写词和同义词,供读者查阅文献、翻译文章使用。定价:88元(含邮费)

以上工具书可供大专院校师生、生物学各专业科技人员以及有关信息资料和翻译工作者参考。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街12号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编100081。