

斯巴坦蓝莓叶片离体再生研究

叶霞, 孙世海*, 郭茹, 华仁锐, 张桂霞

(天津农学院, 天津 300384)

摘要:以斯巴坦蓝莓试管苗叶片为试材, WPM为基本培养基, 研究细胞分裂素 ZT、TDZ 与生长素 IBA、NAA 的激素组合及暗培养时间对其叶片离体再生体系建立的影响。试验结果表明, 当 TDZ 为 0.02 mg/L、IBA 为 0.3 mg/L 时, 诱导产生平均芽数为 4.61, 在所有处理中最高, 且分化芽时间快, 芽丛密度大; 暗培养 20 d 的愈伤组织诱导率最高为 100%, 且愈伤组织体积最大。综合分析得出, 较适宜斯巴坦蓝莓叶片分化的培养基为 WPM+TDZ 0.02 mg/L+IBA 0.3 mg/L, 适宜斯巴坦蓝莓叶片愈伤组织诱导的暗培养时间为 20 d。

关键词:蓝莓; 叶片; 愈伤组织; 生长调节剂; 暗培养

中图分类号: S663.9

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)05-0050-03

Study on *in vitro* Regeneration of Blueberry Leaves from "Spartan"

YE Xia, SUN Shihai*, GUO Ru, HUA Renrui, ZHANG Guixia

(Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China)

Abstract: The effects of the hormone combination of cytokinin ZT, TDZ, auxin IBA, NAA and dark culture time on the establishment of regeneration system of *in vitro* leaves of "Spartan" blueberry were studied. The results showed that when TDZ was 0.02 mg/L and IBA was 0.3 mg/L, the average number of buds induced was 4.61, which was the highest in all treatments, and the time of bud differentiation was fast, and the density of bud cluster was large; the highest callus induction rate was 100% in dark culture for 20 d, and the largest callus. Comprehensive analysis showed that the suitable medium for leaf differentiation of "Spartan" blueberry was WPM + TDZ 0.02 mg/L + IBA 0.3 mg/L, and the suitable dark culture time for leaf callus induction of "Spartan" blueberry was 20 d.

Key words: Blueberry; Leaf; Callus; Growth regulator; Dark culture

越橘属于杜鹃花科越橘属植物, 为灌木小浆果果树^[1]。世界范围 400 余种, 我国约 91 种^[2]。我国长白山区浆果资源种类十分丰富, 有野生蓝莓 0.5 万 t^[3-4]。蓝莓口感酸甜, 果香诱人, 除鲜食外, 还用于果汁加工^[5]。蓝莓果中含有花色素苷、黄酮等多种多酚类生理活性成分, 联合国粮农组织将蓝莓列为人类五大健康食品之一^[6-7]。蓝莓主要分为高丛蓝莓(又有北高丛蓝莓和蓝高丛蓝莓之分)、矮丛蓝莓和兔眼蓝莓三大类型, 北高丛类型蓝莓平均单果粒重量较大^[8], 品质好, 其中斯巴坦是北高丛蓝莓主要栽培品种之一。用叶片进

行再生繁殖, 具有取材方便、操作简洁、节约材料、对植株和环境影响少等优点, 研究较多的外植体类型是子叶和下胚轴^[9], 认为子叶和下胚轴的再生能力最好。相对于子叶和下胚轴, 叶片作为遗传转化的外植体有其优势所在, 如叶片材料的获得较容易, 有利于遗传转化重复进行^[10], 对科研和生产均具有重要价值和意义^[11], 建立高效的离体叶片培养再生体系, 有利于植物的离体快繁。为此, 本试验利用组织培养的方法, 对斯巴坦蓝莓叶片培养、植物生长调节剂的组合等^[12]方面进行研究, 旨在为蓝莓分子生物学等研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以天津农学院植物组织培养室内继代 4 次的斯巴坦蓝莓试管苗叶片为试验材料, 于 2019 年 3 月在天津农学院耕稼楼组培实验室展开。

收稿日期: 2019-11-22

基金项目: 天津农学院研究生培养质量提升项目(2017YPY006);
天津市科技计划项目(17ZXBFNC00210)

作者简介: 叶霞(1995-), 女, 在读硕士, 主要从事植物组织培养与果树生产技术研究。

通讯作者: 孙世海, 男, 硕士, 教授, E-mail: sunshihai1980@sina.com

1.2 方法

将蓝莓试管苗的叶片剪下,横切主脉2~3刀形成伤口,以叶片背部接触培养基,接种在20种培养基中(表1),附加蔗糖20 g/L,琼脂8 g/L。经过20 d暗处理后移到光下培养,培养温度为25℃,光照时间12 h/d。每个处理接种5瓶,每瓶接种4个叶片,重复3次,45 d后统计愈伤组织分化率和平均再生芽数。愈伤组织分化率=(分化叶片外植体数/接种叶片外植体数)×100%;平均再生芽数=(总出芽数/出芽外植体数)×100%。

暗处理时间筛选试验是将蓝莓试管苗叶片按照上述方法形成伤口后,接种在WPM+1 mg/L ZT培养基中,暗处理时间分别为0、10、15、20 d。琼脂和蔗糖用量、培养条件及统计方法同上。

采用Excel 2010和SPSS 17.0统计软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 细胞分裂素种类及浓度对斯巴坦蓝莓叶片分化的影响

由表2可知,处理1至处理5叶片只产生愈伤组织,不分化芽,IBA为0.3 mg/L,ZT浓度较低时,愈伤组织诱导率较高,处理4愈伤组织诱导率最

表1 斯巴坦蓝莓叶片离体再生形成不定芽的配方 mg/L

处理	TDZ	ZT	IBA	NAA
1	0	0.2	0.3	0
2	0	0.5	0.3	0
3	0	1	0.3	0
4	0	2	0.3	0
5	0	3	0.3	0
6	0.02	0	0.3	0
7	0.05	0	0.3	0
8	0.1	0	0.3	0
9	0.5	0	0.3	0
10	1	0	0.3	0
11	0	0.2	0	0.3
12	0	0.5	0	0.3
13	0	1	0	0.3
14	0	2	0	0.3
15	0	3	0	0.3
16	0.02	0	0	0.3
17	0.05	0	0	0.3
18	0.1	0	0	0.3
19	0.5	0	0	0.3
20	1	0	0	0.3

高,达到91.67%,且愈伤组织为淡绿色,愈伤组织团块大,褐化率低;继续提高ZT浓度,愈伤组织诱

表2 不同植物生长调节剂组合对斯巴坦蓝莓叶片培养的影响

处理	愈伤组织诱导率(%)	平均出芽数(个)	愈伤组织诱导状态
1	66.67abcd	0.00c	愈伤组织量小,愈伤组织白色晶体,少部分褐化
2	62.50bcde	0.00c	叶片卷曲拱起,愈伤组织量小,愈伤组织淡黄色
3	58.33bcde	0.0c	叶片拱起,淡绿色愈伤组织,愈伤组织状态良好
4	91.67ab	0.00c	叶片卷曲拱起,淡绿色愈伤组织,表面轻微褐化
5	33.33def	0.00c	愈伤组织量小,叶片卷曲,愈伤组织绿色
6	33.33def	4.61a	愈伤组织量大,绿色,愈伤组织表面长出大量芽丛
7	33.33def	1.67abc	愈伤组织量小,绿色,叶片表面有许多芽点
8	16.67f	1.0bc	愈伤组织量小,绿色,愈伤组织中度褐化
9	37.50edef	0.33c	愈伤组织表面有芽点,愈伤组织褐化严重
10	20.83f	0.83bc	愈伤组织量小,愈伤组织表面有很多芽点
11	83.33ab	0.00c	叶片卷曲,愈伤组织量小,愈伤组织淡绿色
12	81.33ab	0.00c	叶片卷曲,愈伤组织量小,愈伤组织绿色
13	79.17ab	0.00c	叶片卷曲,愈伤组织量小,愈伤组织淡绿色
14	79.17ab	0.00c	叶片卷曲,愈伤组织量小,愈伤组织淡绿色
15	70.83abc	0.00c	叶片拱起,愈伤组织量小,愈伤组织黄绿色
16	29.17ef	3.56ab	叶片绿色,直接在叶片表面出芽
17	37.50edef	2.00abc	叶片拱起,表面有大量凸起的芽点,部分出芽
18	66.67abcd	1.33bc	愈伤组织量大,绿色,产生大量芽丛
19	100a	2.44abc	愈伤组织量大,绿色,产生大量芽丛
20	20.83e	0.67bc	愈伤组织量大,愈伤组织黄褐色,愈伤组织褐化严重

注:每个处理接种60片叶,同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05),下同

导率迅速下降。可以看出 ZT 可以诱导蓝莓叶片形成大量愈伤组织, NAA 有抑制 ZT 的作用。处理 6 至处理 10, 愈伤组织诱导率很低, 且愈伤组织团块小, 处理 6 平均出芽数最高, 为 4.61, 光培养 10 d 后愈伤组织表面产生浓密的芽点, 光培养 15 d 后愈伤表面长出绿色小芽, 此时必须转接到新培养基进行分化培养, 否则失去营养导致褐化死亡。处理 16 至处理 20, 随着 TDZ 浓度增大, 平均出芽数减少, 其中处理 16 和处理 17 诱导叶片不经过明显的愈伤组织形成过程直接出芽, 说明低浓度的 TDZ 可诱导叶片直接出芽。

2.2 暗处理时间对斯巴坦蓝莓试管苗叶片培养的影响

由表 3 可知, 斯巴坦蓝莓叶片愈伤组织诱导率随暗培养时间增加而增大, 20 d 为最佳, 达 100%, 愈伤组织量最大, 说明暗培养是斯巴坦蓝莓叶片愈伤组织诱导过程中极为重要的因素。

表 3 暗处理时间对蓝莓叶片培养的影响

暗培养 天数(d)	愈伤组织 诱导率(%)	愈伤诱导状态
0	58.33c	愈伤组织为黄色, 愈伤组织量小
7	91.65ab	愈伤组织为黄绿色, 愈伤组织量大
10	91.65ab	愈伤组织为黄绿色, 愈伤组织量大
20	100a	愈伤组织为淡绿色, 愈伤组织量大

3 讨论与结论

本试验结果表明, ZT 与 NAA 和 IBA 的激素组合中, 培养的叶片只产生愈伤组织, 没有分化芽, TDZ 与 IBA 的激素组合中, 产生愈伤组织并分化出大量不定芽, TDZ 和 NAA 的激素组合中处理产生大量愈伤组织, 且表面有大量芽点突起, 分化出芽的时间较长。可以看出 TDZ 较 ZT 对芽分化有更强的诱导作用, 在较低浓度下就能诱导叶片产生大量不定芽。在培养基中仅添加 0.9 $\mu\text{mol/L}$ TDZ, 2 种蓝浆果叶片的不定芽再生率可达 75%, TDZ 浓度低于本试验所设置的 TDZ 最低浓度^[13]。在蓝莓品种“蓝丰”叶片再生体系中, 1 $\mu\text{mol/L}$ TDZ 的诱导效果是 20 $\mu\text{mol/L}$ ZT 的 3 倍, 低浓度 TDZ 就能表现出极强的诱导作用^[14]。本研究中, 处理 6 培养基的 TDZ 浓度为 0.02 mg/L, 叶片平均不定芽数最高为 4.61。综上所述, TDZ 对叶片不定芽的诱导效果优于 ZT, 在 WPM+0.02 mg/L TDZ+0.3 mg/L IBA 的培养基中, 斯巴坦蓝莓叶片平均不定芽数最高, 为 4.61。因此培养基中细胞分裂素

与生长素的种类选择和浓度配比是影响斯巴坦蓝莓叶片不定芽再生的主要因素。

适当暗培养处理对叶片再生有显著促进作用^[15-18]。但暗培养时间不宜过长, 否则愈伤组织褐化严重将抑制芽的再生, 不定芽的再生率会大幅度下降。本研究发现适合斯巴坦蓝莓叶片再生的最佳暗培养时间为 20 d。由于暗培养的作用比较复杂, 其对再生诱导的作用机理尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴林, 张志东, 李亚东, 等. 越橘耐涝品种的筛选[J]. 吉林农业科学, 2002(2): 46-48, 50.
- [2] 吴林. 我国越橘栽培生理研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(4): 379-383, 388.
- [3] 宋洪伟, 张冰冰, 梁英海, 等. 东北地区主要野生浆果资源分布及利用研究[J]. 吉林农业科学, 2009, 34(3): 51-54.
- [4] 陈曦, 赵晨辉, 卢明艳, 等. 吉林省浆果资源及加工利用[J]. 吉林农业科学, 2014, 39(4): 71-74, 79.
- [5] 喻远东, 刘京红. 挤压膨化对蓝莓果渣中可溶性膳食纤维的影响研究[J]. 东北农业科学, 2019, 44(4): 98-103, 115.
- [6] 郑理乔, 黄成林, 刘华, 等. 兔眼蓝莓组织培养过程中褐化与生根问题的探讨[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(5): 777-782.
- [7] Vikram G, Madhusudhan K, Srikanth K, et al. Effect of plant growth regulators on in vitro organogenesis in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. Journal of Research in Biology, 2011, 1(4): 263-268.
- [8] 王雪松, 马文汉, 徐德冰, 等. 云南丽江 6 个蓝莓品种物候期和果实品质研究[J]. 东北农业科学, 2016, 41(6): 100-103.
- [9] 张玉英, 韦正乙, 王云鹏, 等. 番茄叶片高频再生体系的建立[J]. 吉林农业科学, 2014, 39(2): 78-82, 86.
- [10] 朱宏芬, 沈岚, 黄坚, 等. 兔眼蓝莓“灿烂”组织培养与植株再生研究[J]. 北方园艺, 2012(19): 105-107.
- [11] 李亚东, 刘海广, 张志东, 等. 蓝莓优质丰产栽培技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 2007: 1-7.
- [12] 邱义兰, 陈冰心, 廖丽娟, 等. 兔眼蓝莓离体叶片再生组织细胞学观察[J]. 生命科学研究, 2016, 20(6): 516-520.
- [13] Shibli R A, Smith M A L. Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (Ohelo) and *V. myrtillus* (Bilberry) leaf explants[J]. Hort Science, 1996, 31(7): 1225-1228.
- [14] Cao X L, Hammerschlagfa, Douglass L. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bluecrop [J]. Hort Science, 2002, 37(5): 819-821.
- [15] 周莉莉, 蔡斌华, 乔玉山, 等. 不同处理对丰水梨离体叶片不定芽再生的影响[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(2): 34-38.
- [16] 师校欣, 杜国强, 马俊莲, 等. 磨盘柿离体叶片愈伤组织发生及不定芽诱导[J]. 果树学报, 2004, 21(4): 376-378.
- [17] 李玉玲, 王三红, 刘莉莉, 等. 澳洲青苹离体叶片不定芽再生体系的建立[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(1): 48-52.
- [18] 张红梅, 王俊丽. 全明星草莓叶片再生体系的建立[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 75-76.

(责任编辑: 王昱)