

黑穗醋栗愈伤组织诱导研究

李金英, 赵春莉, 张馥茜, 张志东, 程国栋

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

摘要:以黑穗醋栗品种“寒丰”和“早生黑”的无菌组培苗为试材,选取叶片、叶柄及茎段为外植体,研究了不同外植体对愈伤组织诱导率的影响,以及不同植物生长调节剂及配比对愈伤组织诱导、继代及植株再生的影响。结果表明:叶柄为愈伤组织诱导最适宜的外植体;2,4-D在愈伤组织诱导可再生过程中起了明显的积极作用,适宜浓度为1.0 mg/L。黑穗醋栗叶片、叶柄和茎段不同程度的诱导出了愈伤组织;幼嫩的无芽茎段在适宜的培养基中通过愈伤组织途径,初步分化出了不定芽,为黑穗醋栗愈伤组织再生和遗传转化的研究奠定了一定基础。

关键词:黑穗醋栗;‘寒丰’;‘早生黑’;愈伤组织;诱导

中图分类号:S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)17-0087-04

黑穗醋栗(*Ribes nigrum* L.)属虎耳草科(Saxifragaceae)茶藨子属(*Ribes*)多年生丛生小灌木,英文名Blackcurrant,又名黑加仑,俗名黑豆,为具有特色的寒地小浆果,是一种很有开发利用前景的新型果树^[1-3]。黑穗醋栗营养丰富,而且具有医疗保健功效。果实为多汁浆果,味酸甜清香,富含糖、有机酸、矿质元素、多种维生素、花青素、活性矿物质及特殊芳香成分,具有很高的食用价值和药用价值。尤以维生素C和维生素P等生理活性物质的含量最为突出,每100 g鲜果中含维生素C 98~417 mg,属于富含维生素C的果品^[4-6]。同时,黑穗醋栗还是一种具有观赏价值的经济林木,可以美化环境。当前,对于黑穗醋栗的研究多集中在营养成分、化学成分、药理作用等方面,仅有少数关于黑穗醋栗组织培养的相关报道^[7-9]。该研究通过优化黑穗醋栗愈伤组织诱导和植株再生体系,以期在黑穗醋栗体细胞无性系变异筛选新品系、脱除病毒、种质保存及遗传转化等方面的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为黑穗醋栗品种“寒丰”和“早生黑”,取自吉林农业大学小浆果基地。试验所用的激素为BA、2,4-二氧苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)、调吡啉(CPPU)、吲哚丁酸(IBA)、TDZ等。MS培养基,添加琼脂

7 g/L、蔗糖30 g/L。培养条件为:温度25℃,光照强度约3 000 lx,光/暗周期为12 h/12h。

1.2 试验方法

愈伤组织诱导接种方式为叶柄水平放在培养基表面;叶片在接种前切去叶尖和叶基部,切割成0.5 cm²左右的小方块,并在叶片的近轴面中部横向划几刀,以不划断叶片为准。叶片近轴面朝上接种到培养基上;茎段斜插入培养基。试验中每个处理设3次重复,每个重复接种3瓶,每瓶接种3个材料,30 d左右调查愈伤组织的诱导率及生长状况。

1.2.1 激素种类及浓度对黑穗醋栗组培苗不同部位愈伤组织诱导的影响 以“寒丰”和“早生黑”组培苗的茎段、叶片和叶柄为愈伤组织诱导材料,以MS为基本培养基,分别添加不同浓度的2,4-D、NAA、CPPU。

1.2.2 BA与2,4-D、NAA激素组合对黑穗醋栗叶片愈伤组织诱导的影响 以“寒丰”和“早生黑”组培苗的叶片为愈伤组织诱导材料,以MS为基本培养基,分别添加不同浓度的BA、2,4-D和NAA。试验采取完全随机试验方法,共设为27个处理。

1.2.3 不同浓度CPPU对黑穗醋栗愈伤组织诱导的影响 试验以MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L为基本培养基,以“寒丰”叶片试材,CPPU的浓度梯度设为:0.2、0.4、1.0、2.0 mg/L。

1.2.4 愈伤组织两步诱导 以“寒丰”组培苗叶柄为材料,首先将叶柄培养在MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L培养基上,15 d后转接到MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L+AC 1.0 g培养基上诱导愈伤组织。

1.2.5 愈伤组织不定芽诱导与解剖结构观察 单因素完全随机试验:以“寒丰”和“早生黑”诱导出的愈伤组织

第一作者简介:李金英(1978-),女,吉林长春人,博士研究生,实验师,现主要从事植物组织培养及资源研究等工作。

责任作者:张志东(1962-),男,黑龙江肇源人,硕士,教授,硕士生导师,现主要从事果树生物技术等研究工作。E-mail: Currant1985@126.com。

基金项目:吉林省教育厅科研资助项目(吉教科合字[2011]第45号)。

收稿日期:2013-04-10

为试材,以 MS 为基本培养基进行不定芽诱导,不同浓度的 BA 分别与不同浓度的 2,4-D、NAA、TDZ 进行随机组合。无芽茎段愈伤组织不定芽诱导:以“早生黑”组培苗无芽茎段为试材,在 MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L 中进行诱导。试验中每处理设 3 次重复,每次重复 3 瓶,每瓶接种 3 个材料。30 d 左右调查不定芽诱导情况。诱导出的不定芽经石蜡切片镜检鉴定其再生植株与原诱导组织之间是否存在导管及筛管的连接,从而确定是否为独立个体。观察分析植株愈伤组织形态、褐化的愈伤组织形态、叶柄着生的愈伤组织形态等。

1.3 数据分析

诱导率=(形成愈伤组织的切块数/接种的切块数) $\times 100\%$,不定芽分化率=(分化出不定芽的愈伤组织的切块数/接种愈伤组织的切块数) $\times 100\%$ 。数据四舍五入保留整数位,利用 Excel 软件处理。

2 结果与分析

2.1 不同激素种类及浓度对黑穗醋栗组培苗不同部位愈伤组织诱导的影响

由表 1 可知,相同条件下,2 种基因型的植物诱导率存在一定差异,“寒丰”诱导情况相对较好。在 2,4-D 浓度为 1.0 mg/L 时愈伤组织诱导效果最理想,“早生黑”和“寒丰”的叶柄诱导率分别可达到 96%和 100%。同时最先诱导产生愈伤组织的部位也是叶柄,在叶柄的周围 10 d 左右产生白色或透明状愈伤组织,质地柔软疏松。叶片在 2,4-D 的作用下也能够产生愈伤组织,产生部位多集中在叶柄着生处和叶脉处,多为白色疏松组织。诱导出的这种愈伤组织不易进行切割,也不利于进行增殖

表 1 不同激素种类及浓度对愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Influence of different hormones and concentrations on callus induction rate

激素浓度 Hormones concentration /mg·L ⁻¹	“早生黑”愈伤组织诱导率 Induction rate for callus of ‘Fortodi’/%			“寒丰”愈伤组织诱导率 Induction rate for callus of ‘Hanfeng’/%		
	叶片 Leaf	叶柄 Petiole	茎段 Stem	叶片 Leaf	叶柄 Petiole	茎段 Stem
2,4-D 0.4	50	80	0	60	100	0
2,4-D 0.6	70	90	0	70	90	0
2,4-D 0.8	90	90	0	100	100	0
2,4-D 1.0	60	96	4	100	100	5
2,4-D 2.0	50	68	5	85	100	10
2,4-D 3.0	0	28	10	5	25	10
NAA 0.02	0	0	0	0	0	0
NAA 0.05	0	0	0	0	0	0
NAA 0.1	4	4	0	0	0	0
NAA 0.2	24	12	0	32	25	0
CPPU 1.0	0	0	0	0	0	0
CPPU 2.0	0	0	0	0	0	0
CPPU 3.0	0	0	0	0	0	0
CPPU 4.0	0	0	0	0	0	0
CPPU 5.0	0	0	0	0	0	0

培养。茎段仅有少量愈伤组织出现。CPPU 和 NAA 不适合单独用于愈伤组织诱导。

2.2 BA 与 2,4-D、NAA 激素组合对黑穗醋栗叶片愈伤组织诱导的影响

由表 2 可以看出,在 2,4-D、NAA 浓度为 0.2 mg/L 时无愈伤组织产生。2,4-D 浓度为 0.4 mg/L 和 0.6 mg/L 时不同程度诱导出了愈伤组织,其它激素组合中也不同程度诱导出了愈伤组织,其中 BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L 和 BA 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L 组合的诱导率相对较高但总体诱导率不足 50%。其中 BA 与 2,4-D 组合中,愈伤组织诱导时间长,结构小,增殖速度较慢,呈绿色,质地较硬,BA 与 NAA 组合中,愈伤组织多呈白色或透明状,不利于进行下一步的增殖培养。

表 2 BA、2,4-D 和 NAA 不同浓度组合对黑穗醋栗叶片愈伤组织诱导的影响

Table 2 Influence of different combinations of BA, 2,4-D and NAA on callus induction

激素配比 Hormone combination/mg·L ⁻¹			“早生黑”愈伤组织诱导率 Callus rate of ‘Fortodi’/%	“寒丰”愈伤组织诱导率 Callus rate of ‘Hanfeng’/%
BA	2,4-D	NAA		
1.0	0.2	0	0	0
1.0	0	0.2	0	0
1.0	0.4	0	20	20
1.0	0	0.4	27	33
1.0	0.6	0	13	20
1.0	0	0.6	13	20
2.0	0.2	0	0	0
2.0	0	0.2	0	0
2.0	0.4	0	13	13
2.0	0	0.4	13	40
2.0	0.6	0	0	7
2.0	0	0.6	13	27
3.0	0.2	0	0	0
3.0	0	0.2	0	0
3.0	0.4	0	7	13
3.0	0	0.4	7	13
3.0	0.6	0	7	0
3.0	0	0.6	7	7

2.3 不同浓度 CPPU 对黑穗醋栗愈伤组织诱导的影响

由图 1 可知,以添加 1.0 mg/L BA 和 1.0 mg/L

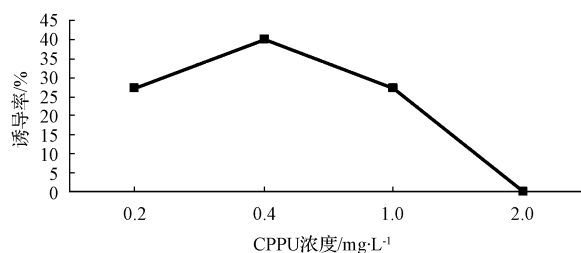


图 1 不同浓度 CPPU 对“寒丰”愈伤组织诱导的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of CPPU on callus induction of ‘Hanfeng’

2,4-D 的 MS 基本培养基,添加不同浓度的 CPPU,“寒丰”叶片能不同程度的诱导出愈伤组织。CPPU 浓度为 0.4 mg/L 时愈伤组织诱导率最高,可达 40%。愈伤组织首先出现在叶柄处,其次是叶脉处。试验中发现,愈伤组织在大量产生前就开始褐化,且褐化速度较快。

2.4 两步诱导法诱导愈伤组织

在以“寒丰”组培苗叶柄为材料诱导愈伤组织试验中,添加 BA 与 2,4-D 激素组合诱导出多为质地硬的绿色愈伤组织,但分化速度较慢,进而导致褐化。通过解

剖结构观察发现,褐变的细胞多由表及里扩散,多数无细胞核,极少细胞质,染色后细胞多为红色的球状小体,形态逐渐不完整(图 2)。在添加 BA 与 NAA 激素组合的培养基中,多为增殖培养不易成活的质地疏松的愈伤组织。因此根据实际情况采取两步诱导法,首先将叶柄培养在 MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L 培养基上,15 d 后转接到 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L+AC 1.0 g 培养基上,诱导出较大体积的绿色愈伤组织(图 3~4)。

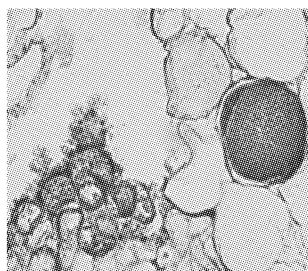


图 2 褐化愈伤组织

Fig. 2 Browning callus

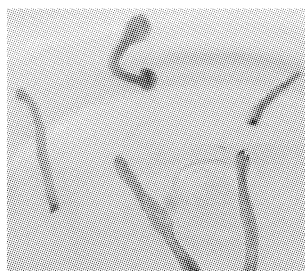


图 3 2,4-D 1.0 mg/L 的愈伤组织

Fig. 3 Callus in 1.0 mg/L 2,4-D medium



图 4 2 次诱导的愈伤组织

Fig. 4 Twice induced callus

2.5 愈伤组织不定芽的诱导

在单因子完全随机愈伤组织诱导试验中,“早生黑”愈伤组织由于长期处于密闭环境中湿度过大,发生霉变现象比较严重,各处理组合均未诱导出不定芽。

无芽茎段在 MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L 培养基中培养,茎段基部能够脱分化产生愈伤团块,经一

段时间的培养再生出了新的植株(图 5)。经过石蜡切片镜检发现愈伤团块中含有很多芽原基(图 6~7),新生植株没有发现与茎段之间存在筛管、导管的连接,说明它们是独立个体,而非茎段腋芽萌发,证明不定芽是由愈伤组织诱导产生的。



图 5 不定芽

Fig. 5 Adventitious buds

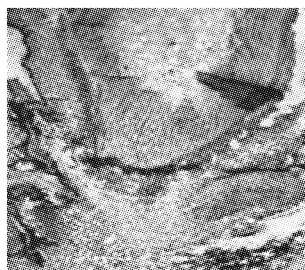


图 6 茎段与愈伤组织连接形式

Fig. 6 Connection forms of stem and callus

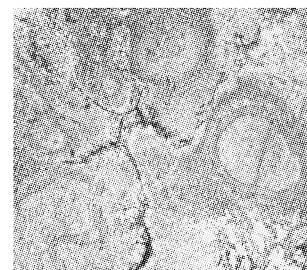


图 7 愈伤组织中的芽原基

Fig. 7 Buds primordia in callus

3 结论与讨论

在相同条件下,黑穗醋栗叶柄愈伤组织诱导率明显高于叶片和茎段,最高达 100%,较适合作为愈伤组织诱导材料。不同浓度的 2,4-D 均能不同程度诱导愈伤组织,以 2,4-D 1.0 mg/L 为最佳处理,NAA、CPPU 诱导效果不佳。通过两步诱导法,获得了较大体积且质量较好的利于进一步增殖和不定芽诱导的愈伤组织。幼嫩无

芽茎段产生的愈伤组织初步诱导出了不定芽。

愈伤组织培养过程中,两步诱导法可以有效提高愈伤组织诱导率和出芽率^[10]。常会发生停滞生长、逐渐褐化的现象,其原因之一是愈伤组织细胞中的叶绿体退化或变异,导致再生功能丧失。愈伤组织颜色的不同,代表其分化能力的差异。黄绿色愈伤组织形成较多分生组织,分化能力强,继续培养会有芽的分化,黄色愈伤组

组织分化较少,而褐色愈伤组织不分化最后死亡。褐色愈伤组织是由黄绿色愈伤组织经黄色或深绿色愈伤组织褐化来的,属于愈伤组织退化现象。可见以上组织的形态和内部结构决定了组织的分化能力^[11]。活性炭、PVP、维生素 C 和 AgNO₃ 均能不同程度地提高愈伤诱导率和降低褐化率^[12]。在组培过程中,防止外植体褐变的措施中,加入抗氧化剂或吸附剂是研究者常用的方法,而最理想的抗褐化剂是其在能控制褐化的同时又不能影响愈伤的正常生长,对愈伤组织生物量的积累具明显促进作用^[13-15]。在一定浓度范围内,活性炭可以发挥其吸附对外植体分化发育有害的物质的正效应吸附特性,避免吸附培养基中的生长调节物质的负效应,防止组织褐化^[16]。试验中发现,黑穗醋栗栽培品种的营养器官不易产生愈伤组织,褐变现象严重,褐变的愈伤组织结构中存在着大量的凋亡小体,在二次诱导过程中添加硝酸银和活性炭,较好效果。

黑穗醋栗愈伤组织诱导不定芽的试验中,无芽茎段部分愈伤组织诱导出了不定芽,但诱导率较低,数量较少,其它试验设计中均无不定芽产生。黑穗醋栗愈伤组织诱导不定芽的试验尚需进一步研究,从而使愈伤组织诱导技术更加完善,为黑穗醋栗植株快繁、种质保存及遗传转化等提供一定的参考。

参考文献

- [1] 白超,祖洪元,黄玉敏. 中国黑加仑浆果资源开发[J]. 酿酒,2008,35(2):10-12.
- [2] 刘彤,杨国慧,夏筱丽. 黑穗醋栗叶斑病原鉴定[J]. 东北林业大学

学报,2010,41(9):35-38.

- [3] 王福德. 黑穗醋栗的研究进展[J]. 黑龙江生态工程职业学院学报,2009,22(4):31-33.
- [4] 牛广财,严宝冬,朱丹,等. 响应面法优化黑加仑果醋的发酵条件[J]. 食品科学,2012,33(1):157-161.
- [5] 贾丽丽,路金才. 黑加仑的药用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2008(15):110-113.
- [6] 刘凤芝,杨晓华,赵文清,等. 11 个黑穗醋栗品种主要经济性状比较[J]. 中国林福特产,2010(2):332-335.
- [7] 赵锦,陈瑜,薛陈心,等. 波兰黑穗醋栗的组织培养[J]. 河北林果研究,2006,21(4):419-421.
- [8] 郭春慧,马凤桐. 黑穗醋栗试管苗生产工艺流程的研究[J]. 西北农业大学学报,1991,19(2):65-72.
- [9] 刘文萍. 黑穗醋栗的组织培养快繁技术[J]. 特种经济动植物,2005(2):5.
- [10] 洪春,夏阳,刘翠兰,等. Kan 对四倍体刺槐愈伤组织及不定芽诱导的研究[J]. 山东林业科技,2007(6):13-15.
- [11] 王桂兰,陈超,李伟,等. 红掌叶片愈伤组织和气生根再生团块的细胞学研究[J]. 园艺学报,2006,33(3):587-591.
- [12] 吕宗友,苏衍菁,赵国琦,等. 不同防褐化措施对苏丹草愈伤诱导以及抗褐化的效果研究[J]. 草业学报,2011,20(3):174-181.
- [13] 张艳丽,刘秀贤,王雁,等. 滇牡丹愈伤组织继代培养中的褐化防治[J]. 中南林业科技大学学报,2011,31(2):77-81.
- [14] 高蓉,赵博光. 防止黑松外植体及其愈伤组织褐变的方法[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2001,25(5):75-77.
- [15] 蒋光玉,胡燕梅. 胡椒薄荷叶片愈伤组织诱导与抗褐变的研究[J]. 武汉生物工程学院学报,2010,6(4):266-269.
- [16] 李桂荣,赵润洲,梁玉陈. 木立芦荟叶片愈伤组织诱导过程中防褐化的研究[J]. 西南农业学报,2007,20(4):702-705.

Study on the Callus Induction of Blackcurrant

LI Jin-ying, ZHAO Chun-li, ZHANG Fu-qian, ZHANG Zhi-dong, CHENG Guo-dong
(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking the plantlet of two varieties of blackcurrant 'Hanfeng' and 'Fortodi' as materials, with the leaves, the petioles and the stems as explants, the effect of explants on callus induction rate was studied, and the influence of different hormones and concentrations on callus induction, callus subculture and plant regeneration were investigated. The results showed that the petioles was the best explants for callus induction. The different concentration of 2,4-D that was used in callus growing had obvious effect on the callus differentiation, and the optimal concentration of 2,4-D was 1.0 mg/L. Callus could be induced by culturing leaves, petioles and stems of blackcurrant *in vitro*. The young stems could preliminary differentiate the adventitious buds in a suitable medium through callus. It laid a foundation for the blackcurrant callus regeneration and genetic transformation.

Key words: blackcurrant; 'Hanfeng'; 'Fortodi'; callus; induction