

# 不同培养条件对蓝浆果离体叶片不定芽再生的影响

张祝丽, 姜燕琴, 於虹

(江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

**摘 要:**以南方高丛蓝浆果(*Vaccinium corymbosum* hybrids)品种“南月”(Southmoon)优选系 A18 离体叶片为试材,研究了不同细胞分裂素、蔗糖浓度、叶片放置方式、暗培养时间及叶片完整性对不定芽再生的影响。结果表明:TDZ 和 CPPU 对不定芽的诱导效果好于 ZT 和 2ip;在培养基中添加 20 g/L 蔗糖较利于不定芽的再生;外植体近轴面接触培养基不定芽再生效果好;离体叶片不经过暗培养及其创伤口大均有利于不定芽再生。

**关键词:**蓝浆果;离体叶片;培养条件;不定芽再生

**中图分类号:**S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)22-0104-04

蓝浆果属杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium* L.)小浆果类果树,又名越桔、蓝莓,其人工栽培始于北美,具有很高的营养价值和经济价值<sup>[1-3]</sup>。高频、高效离体叶片再生体系的建立既是蓝浆果快速繁殖的有效途径,也是体细胞突变和遗传育种研究的基础手段<sup>[4]</sup>。近年来蓝浆果离体叶片再生不定芽的研究已取得了一定进展,并应用于转基因实践,但仍存在不定芽再生率较低的问题<sup>[4-5]</sup>;且国内目前尚无关于蔗糖浓度对蓝浆果离体叶片不定芽再生影响的相关报道。该研究以课题组培育出的南方高丛蓝浆果品种“南月”优选系 A18 离体叶片为试材,研究了不同细胞分裂素、蔗糖浓度、离体叶片放置方式、暗培养时间及叶片完整性对不定芽再生的影响,以期建立高效、稳定的再生体系,为蓝浆果快速繁殖和遗传育种提供技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以南方高丛蓝浆果品种‘南月’优选系 A18 的组织培养苗为试验材料,来自江苏省中国科学院植物研究所组织培养实验室。选取培养 30 d 的 2~5 节无菌组培苗叶片为外植体,用解剖刀在其中脉处横伤 2 刀(不同切割方式处理除外)。基本培养基为 WPM,蔗糖浓度为 25 g/L(不同蔗糖浓度处理的除外),琼脂浓度为 5 g/L,

pH 5.3。

### 1.2 试验方法

以 WPM 为基本培养基,分别设置不同细胞分裂素、蔗糖浓度、叶片放置方式、暗培养时间和刻伤处理进行比较。

**1.2.1 细胞分裂素对不定芽再生的影响** 设置不同种类、不同浓度的细胞分裂素处理。其中,TDZ 的质量浓度为 0.5、1、2 mg/L,2ip 质量浓度为 4、8、16 mg/L,CPPU、ZT 的质量浓度均为 2、4、8 mg/L,以不添加任何细胞分裂素为对照(CK)。

**1.2.2 蔗糖浓度对不定芽再生的影响** 蔗糖浓度设置为 10、20、40 g/L,以不添加蔗糖为对照(CK)。

**1.2.3 叶片放置方式对不定芽再生的影响** 叶片放置方式分为近轴面接触培养基(反)与远轴面接触培养基(正)。

**1.2.4 暗培养时间对不定芽再生的影响** 暗培养时间分别为 0、7、14 d。

**1.2.5 叶片完整性对不定芽再生的影响** 叶片处理分为叶片背面中脉横伤 2 刀(刻)和叶片从中间切断(半),以不做任何处理为对照(全)。

每处理接种 16 枚叶片,各 3 次重复。5 周后统计再生率并描述不定芽色泽及密集程度。

### 1.3 数据分析

再生率 = 再生不定芽的叶片数/接种叶片数 × 100%。试验数据采用 Excel 2003 进行统计分析,采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞分裂素对不定芽再生的影响

从表 1 可以看出,接种 20 d 后经不同浓度 TDZ 处理的叶片在刻伤处及边缘均开始长出不定芽,所诱导出

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

**责任作者:**於虹(1968-),女,博士,研究员,现主要从事小浆果类果树的引种驯化和利用研究工作。E-mail:njyuhong@vip.sina.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:**2013-06-27

的不定芽密集且呈深绿色。0.5~2 mg/L 质量浓度的 TDZ 均能使 A18 再生率达 100%。与 TDZ 处理组相比, 2~4 mg/L 质量浓度的 CPPU 诱导不定芽所需时间较长, 诱导出的芽较稀疏, 颜色偏浅绿色, 愈伤组织较多, 不定芽再生率为 100%; 当浓度达到 8 mg/L 时, 愈伤组织出现时间与不定芽出现时间均晚 3 d, 相对于 2~4 mg/L, 其诱导出的愈伤和芽的颜色均偏嫩黄色, 不定芽再生率为 97.91%。在添加 ZT 的再生培养基中, 只能诱导叶柄产生圆球形愈伤组织, 而 2ip 处理的几乎没有任何再生反应。该结果表明, 不同细胞分裂素对叶片不定芽的诱导作用存在差异, 其中 TDZ 诱导不定芽再生能力最强, CPPU 其次, ZT 和 2ip 较差。

表 1 不同细胞分裂素对 A18 叶片不定芽再生的影响

处理组	质量浓度 /mg · L <sup>-1</sup>	不定芽出 现时间/d	不定芽密 集度	不定芽 色泽	接种叶数 /个	再生数 /个	再生率 /%
CK	0	无	无	无	48	0	0.00 <sup>b</sup>
TDZ	0.5	20	密集	深绿	48	48	100.00 <sup>a</sup>
	1	20	密集	深绿	48	48	100.00 <sup>a</sup>
	2	20	密集	深绿	48	48	100.00 <sup>a</sup>
CPPU	2	25	一般	浅绿	48	48	100.00 <sup>a</sup>
	4	25	一般	浅绿	48	48	100.00 <sup>a</sup>
	8	28	一般	嫩黄	48	47	97.91 <sup>a</sup>
ZT	2	无	无	无	48	0	0.00 <sup>a</sup>
	4	无	无	无	48	0	0.00 <sup>b</sup>
	8	无	无	无	48	0	0.00 <sup>b</sup>
2ip	4	无	无	无	48	0	0.00 <sup>b</sup>
	8	无	无	无	48	0	0.00 <sup>b</sup>
	16	无	无	无	48	0	0.00 <sup>b</sup>

注: 同列中不同小写字母表示各处理间差异显著( $P<0.05$ )。下同。

2.2 蔗糖浓度对不定芽再生的影响

从表 2 可见, 在质量浓度为 0~40 g/L 范围内, 随着蔗糖浓度的上升, 不定芽再生率呈先上升再下降趋势, 经不同浓度蔗糖处理, 再生不定芽出现时间较一致但形态特征差别较大。在对照(不添加蔗糖)培养基中, 叶柄基部膨大, 叶片呈深绿色, 但无不定芽长出; 经 10 g/L 蔗糖处理的叶片有不定芽出现, 不定芽密度一般, 叶柄基部膨大, 不定芽及叶片均为嫩绿色; 经 20 g/L 蔗糖处理的叶片所产生的不定芽较密, 呈嫩绿色; 而经 40 g/L 蔗糖处理的叶片所产生的不定芽密度低于 20 g/L 蔗糖处理的叶片而与 10 g/L 蔗糖处理的叶片相当, 但不定芽及

表 2 不同蔗糖浓度对不定芽再生的影响

蔗糖浓度 /g · L <sup>-1</sup>	不定芽出 现时间/d	接种叶 数/个	再生数 /个	再生率 /%	形态描述
0(CK)	无	48	0	0.00 <sup>b</sup>	叶柄愈伤膨大, 叶片颜色深绿
10	16	48	34	68.75 <sup>a</sup>	不定芽密度一般, 叶柄愈伤膨大, 不定芽及叶片颜色嫩绿
20	16	48	44	91.67 <sup>a</sup>	不定芽极密, 叶柄愈伤膨大, 不定芽及叶片颜色嫩绿
40	16	48	38	79.17 <sup>a</sup>	不定芽密度一般, 叶柄愈伤膨大, 不定芽及叶片颜色偏黄

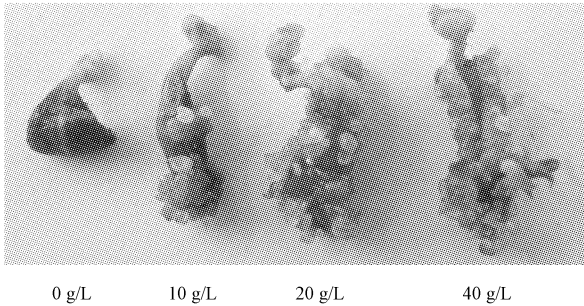


图 1 蔗糖浓度对不定芽再生的影响

叶片色泽偏黄(图 1)。该结果表明, 不同蔗糖浓度对离体叶片不定芽再生有一定影响, 以 20 g/L 蔗糖处理效果最好。

2.3 不同叶片放置方式对不定芽再生的影响

从表 3 可以看出, 外植体的远轴面接触培养基和近轴面接触培养基对不定芽的再生作用不同, 以远轴面接触培养基的叶片, 不定芽出现较早且密度极大, 但接种叶片的枯死率较高, 因而导致再生率较低, 不定芽及叶片呈嫩黄色。以近轴面接触培养基的叶片, 接种叶片枯死率低、不定芽再生率高且再生出的不定芽色泽较好, 但不定芽密度一般且出芽时间稍长(图 2)。即以外植体的近轴面接触培养基对不定芽的再生效果好。

表 3 不同叶片放置方式对不定芽再生的影响

叶片放置 方式	枯死率 /%	不定芽出 现时间/d	接种叶 数/个	再生数 /个	再生率 /%	形态描述
正	35.4 <sup>b</sup>	14	48	31	64.58 <sup>b</sup>	叶柄膨大, 芽极密, 不定芽及叶片呈嫩黄色
反	0 <sup>a</sup>	16	48	43	89.58 <sup>a</sup>	叶柄膨大, 芽密, 不定芽及叶片呈绿色

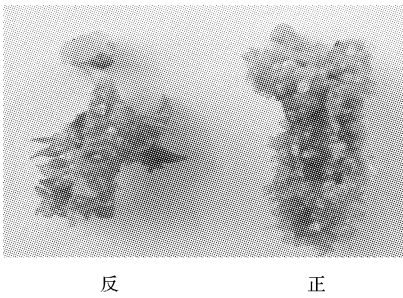


图 2 叶片放置方式对不定芽再生的影响

2.4 暗培养时间对不定芽再生的影响

由表 4 可知, 随着暗培养时间的增长, 离体叶片出芽时间逐渐推迟, 再生率也呈下降趋势, 其中暗培养时间为 0 d 时, 不定芽出现较早, 且再生率较高, 再生不定芽较密, 不定芽及叶片整体呈嫩黄色; 经 7 d 暗处理的离体叶片所产生的不定芽也较密, 不定芽及叶片呈浅绿色; 经 14 d 暗处理的离体叶片所产生的不定芽较稀疏, 叶片色泽较绿(图 3)。该结果表明, 暗培养不是蓝浆果离体叶片再生的必要因素, 但是经过一定时间的暗处理

表 4 不同暗处理时间对不定芽再生的影响

暗处理 时间/d	不定芽出 现时间/d	接种叶 数/个	再生数 /个	再生率 /%	形态描述
0	16	48	46	95.83 <sup>a</sup>	叶柄膨大,不定芽较密,不定芽及叶片呈嫩黄色
7	18	48	38	79.17 <sup>b</sup>	叶柄膨大,不定芽较密,不定芽及叶片呈浅绿色
14	19	48	33	68.75 <sup>c</sup>	叶柄膨大,不定芽较稀疏,不定芽及叶片呈绿色

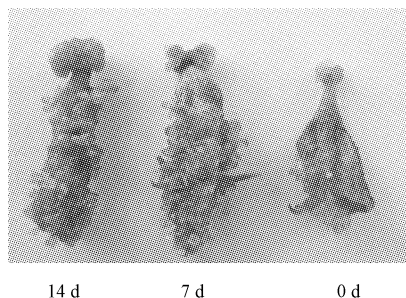


图 3 暗培养时间对不定芽再生的影响

可以提高再生不定芽的质量。

## 2.5 叶片完整性对不定芽再生的影响

由表 5 可知,不经刻伤处理的完整离体叶片出芽时间需 25 d,再生率极低且再生的不定芽极稀疏,所产生的不定芽及叶片颜色浓绿。经过刻伤处理的叶片不定芽出现时间为 14 d,再生率较高、不定芽较密,不定芽及叶片呈黄绿色。从中间切断的半张离体叶片不定芽出现时间需 12 d,再生率极高,不定芽及叶片呈浅黄色(图 4)。该结果表明,从再生率及不定芽质量方面看,经刻伤处理的叶片再生效果好。

表 5 叶片完整性对不定芽再生的影响

叶片完 整性	不定芽出 现时间/d	接种叶 数/个	再生数 /个	再生率 /%	形态描述
全(CK)	25	48	9	18.75 <sup>c</sup>	叶柄膨大,不定芽极稀疏,不定芽极 叶色浓绿
刻伤	14	48	44	89.5 <sup>b</sup>	叶柄膨大,不定芽较密,不定芽及叶 片颜色呈黄绿色
切断	12	48	48	100 <sup>a</sup>	叶柄膨大,不定芽密,有愈伤出现, 不定芽及叶片颜色呈浅黄色

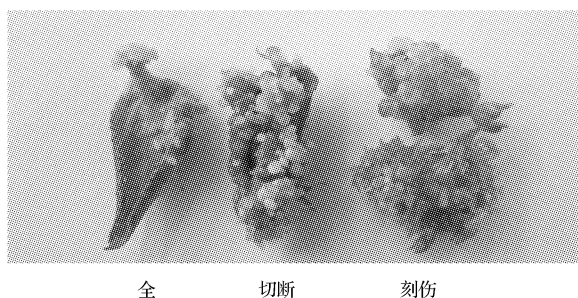


图 4 叶片完整性对不定芽再生的影响

## 3 讨论与结论

该研究表明,细胞分裂素类物质一般都具有调运营

养物质的作用,是影响蓝浆果离体叶片再生的重要因素<sup>[6]</sup>。在蓝浆果的组培中,目前使用的细胞分裂素类物质有 2ip、ZT、ZTR、TDZ、CPPU、6-BA 等,而效果比较显著的为 ZT、TDZ、2ip<sup>[7-8]</sup>。TDZ 是一种活性很高的类似细胞分裂素的化合物,它不仅能促进不定芽的增殖,而且能诱导愈伤组织和不定芽的再生<sup>[9]</sup>。TDZ 对欧洲越桔(Bilberry)和奥哈罗越桔(Ohelo)叶片诱导不定芽的效果好于 ZT 和 2ip<sup>[10]</sup>。在 1  $\mu$ M TDZ 的再生培养基上,每个‘蓝丰’(Bluecrop)叶片诱导丛生枝数是含 0.5  $\mu$ M TDZ 或 20  $\mu$ M ZR 的 3 倍,是含 5  $\mu$ M TDZ 的 9 倍。该研究中 TDZ 表现出较强的诱导作用也证明了这点。在蓝浆果的组培中,关于 CPPU 用于试验中的报道不多<sup>[11-12]</sup>,在该试验中 CPPU 诱导不定芽再生的能力仅次于 TDZ,这可能是由于 CPPU 具有高的细胞分裂素活性所致。国外关于 2ip 对蓝浆果离体叶片不定芽再生作用的研究较多,但国内较少<sup>[13-14]</sup>,该研究中发现其对蓝浆果不定芽再生的诱导作用不明显。

在蓝浆果的增殖研究中,使用的蔗糖浓度从 5 g/L<sup>[15]</sup>到 30 g/L<sup>[16]</sup>,而在进行叶片培养时,蔗糖含量可以略低。在培养基中添加不同浓度的蔗糖对蓝浆果叶片不定芽再生有一定的影响。Cao 等<sup>[17]</sup>研究了蔗糖对蓝浆果叶片再生的影响,发现在质量浓度为 29~58  $\mu$ mol 范围内,随着蔗糖浓度的升高,不定芽数目增加,但是长度并无变化,在该研究中也得出类似结论。

在许多植物的再生研究中都发现叶片的接种方向会影响再生效果,在蓝浆果叶片再生中也有相似情况。普遍认为远轴面接触培养基时叶片生长势比较好。对于哪种接种方式更有利于叶片的再生,研究人员都提出了各自的观点。马怀宇等<sup>[5]</sup>认为,越桔叶片放置方向对再生频率和不定芽数没有明显影响,而对再生出的不定芽以后的生长有影响,认为叶片不定芽大多数从叶片的远轴端发生,这对不定芽的生长不利。而陶建敏等<sup>[4]</sup>认为,远轴端接触培养基方式有利于不定芽的再生,这可能是由于叶背气孔多,角质层不发达,有利于营养的吸收。毕海涛<sup>[18]</sup>发现,叶片正面与反面接触培养基对叶片再生芽数的影响不大,但再生频率反面接触培养基明显高于正面,并且不定芽是从近轴端再生出来的,这可能与植物叶片的组织结构不同或者激素类型不同所致,这与该研究结论相似。Qu 等<sup>[19]</sup>发现,当近轴面接触培养基时,芽再生效果较好且观察到不定芽生长在近轴面。

在组织培养中光照也是重要的条件之一,暗培养一般诱导愈伤组织,而光培养诱导分化。在离体培养过程中,不同的物种、同一物种的不同外植体,甚至同一外植体的不同部位需光量均有不同。Cao 等<sup>[17]</sup>发现,不论 1 周或 2 周的暗培养,对叶片的再生均没有影响。而邢瑞丹等<sup>[20]</sup>在建立‘日出’(Sunrise)和‘乔治亚姆’(Geo)的叶



片再生体系时发现,接种后完全光照,叶片不定芽再生率较低,进行一定时间的黑暗处理,可明显提高叶片不定芽再生率,但暗培养时间过长,叶片伤口部位的愈伤旺盛,愈伤组织化严重,则反而抑制不定芽的再生,使不定芽形成数减少。陶建敏等<sup>[4]</sup>发现,诱导蓝浆果叶片不定芽再生不需要暗培养或只需短时间的暗培养。该研究认为,光照有利于不定芽的再生,但适度暗处理可以提高不定芽的质量。

在蓝浆果的叶片组培中,接种叶片有整张、半张、中脉处横切2刀、去叶梗和叶尖等处理。宋刚等<sup>[21]</sup>在研究高丛越橘叶片组培时,对比了几种切割和放置方式叶片的出愈率,发现整叶、中脉横切2刀、上表皮朝上接种出愈率最高。Callow等<sup>[22]</sup>在对北高丛进行叶片诱导时,发现受伤的叶片容易诱导出芽。陶健敏等<sup>[4]</sup>比较了整张叶片和半张叶片在组培中的不定芽再生,发现半张比整张叶片再生率强,认为可能是创伤口更利于叶片的再生,该研究也得出相同结论。该研究结论仅有关于A18离体叶片不定芽再生方面的情况,其它品种有待进一步探讨。

#### 参考文献

- [1] 顾嫻,贺善安. 蓝浆果与蔓越橘[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [2] 於虹,王传永,吴文龙. 蓝浆果栽培与采后处理技术[M]. 北京:金盾出版社,2003.
- [3] 李亚东,姜惠铁,张志东,等. 中国蓝莓产业化发展的前景[J]. 沈阳农业大学学报(社会科学版),2001,3(1):39-42.
- [4] 陶建敏,耿其芳,庄智敏,等. 蓝浆果叶片高效再生体系的建立[J]. 西北植物学报,2006,26(3):610-614.
- [5] 马怀宇,李亚东,刘庆忠,等. 高丛越橘离体叶片再生植株研究初报[J]. 东北农业大学学报,2004,32(5):212-215.
- [6] 周俊彦,郭夫兴. 苯基脲衍生物的细胞分裂素活性[J]. 植物生理学通讯,1990(4):7-13.
- [7] Rowland L J, Ogden E L. Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry[J]. Hort Science, 1992,27(10):1127-1129.
- [8] 崔广荣,陆峰,曹华龙,等. 蓝莓离体叶片胚状体高效发生及其组织学观察[J]. 激光生物学通报,2008,17(5):599-607.
- [9] Huettnerman C A, Preece J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1993,33:105-119.
- [10] 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.
- [11] 张桂芬,常中开. CPPU 应用研究概况[J]. 企业科技与发展,2010(23):22-24.
- [12] 韩婷婷,孙周平. 矮丛蓝莓叶片的愈伤组织诱导及植株再生[J]. 西北植物学报,2010,30(3):615-620.
- [13] Chandler C K, Draper A D. Effect on zeatin and Zip on shoot proliferation of three highbush blueberry clones *in vitro*[J]. Hort Science, 1986(21):1065-1066.
- [14] Shibli R A, Smith A L. Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (ohelo) and *V. myrtillus* (bilberry) leaf explants[J]. Hort Science, 1996,31(7):1225-1228.
- [15] Cao X, Liu Q, Rowland L J, et al. GUS expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing Agrobacterium-mediated gene transfer efficiency[J]. Plant Cell Reports, 1998(18):266-270.
- [16] Marcotrigiano M, McGlew S P, Hackett G, et al. Shoot regeneration from tissue-cultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*)[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1996,44:195-199.
- [17] Cao X, Hammerschlag F A. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry[J]. Hort Science, 2000,35:945-947.
- [18] 毕海涛. 越橘叶片离体再生与 BAOH 基因遗传转化的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2007.
- [19] Qu L P, Polashock J, Vorsa N, et al. A highly efficient *in vitro* cranberry regeneration system using leaf explants[J]. Hort Science, 2000,35(5):948-952.
- [20] 刑瑞丹,刘庆忠,陈新. 两个蓝莓品种离体叶片不定芽再生体系的建立[J]. 山东农业科学,2009(5):8-11.
- [21] 宋刚,徐银,宋金耀,等. 不同因素对高丛越橘叶片初代培养的影响[J]. 江苏农业科学,2010(4):44-45.
- [22] Callow P, Haghighi K, Giroux M, et al. *In vitro* shoot regeneration on leaf tissue from micropropagated highbush blueberry[J]. Hort Science, 1989(24):373-375.

## Effects of Different Culture Conditions on the Adventitious Bud Regeneration of Detached Leaves of Blueberries *in vitro*

ZHANG Zhu-li, JIANG Yan-qin, YU Hong

(Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

**Abstract:** The detached leaves of superior strain A18 selected from southern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) 'Southmoon' were used as the explants, the effect of different cytokinin, sugar concentration, inoculation method, dark periods and artificial leaf wounds on adventitious bud regeneration was studied. The results showed that the effects of TDZ and CPPU were better than ZT and Zip on adventitious bud regeneration; medium containing 20 g/L sugar was suitable for adventitious bud regeneration; the adaxial side in contact with the medium had greater effect; no darkness treatments and artificial leaf wounds were also favorable to regeneration.

**Key words:** blueberry; detached leaves; culture conditions; adventitious bud regeneration