

doi:10.11937/bfyy.20181428

生长调节剂对笃斯越橘愈伤组织芽分化的影响

李 征, 高庆玉, 张丙秀, 张 宇, 张 昭

(东北农业大学 园艺园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:以质地紧实、绿色且有活力的笃斯越橘优系 SL-1 的叶片和无芽茎段的愈伤组织为试材,利用 WPM 改良培养基,采用单因子变量和多因素正交组合的试验方法,研究了 3 种细胞分裂素 TDZ、ZT、6-BA,2 种生长素 IBA、NAA 和蔗糖在不同浓度不同组分下对笃斯越橘优系 SL-1 的叶片和无芽茎段 2 种愈伤组织分化芽的影响,以期对笃斯越橘种质资源保存和优系筛选提供参考。结果表明:单独使用细胞分裂素诱导愈伤组织分化再生时,ZT 较 TDZ 和 6-BA 更加适宜愈伤组织诱导分化,且最佳浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,叶片和茎段愈伤组织分化率分别可达 85.67%和 89.00%;同时使用 TDZ、ZT、IBA 和 NAA 时,叶片愈伤组织诱导效果优于茎段愈伤组织,分化率最高可达 100.00%和 93.00%,其最佳组分均为 TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +ZT $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IBA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;蔗糖浓度对于叶片和茎段愈伤组织芽分化也有影响,且最适蔗糖浓度分别为 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。综上所述,叶片愈伤组织更加适合分化芽的形成,且最佳培养基为 WPM 培养基+蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +琼脂 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +ZT $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IBA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:笃斯越橘;愈伤组织;生长调节剂;分化芽

中图分类号:S 663.904⁺.3 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2018)22-0029-08

笃斯越橘(*Vaccinium uliginosum* L.)是我国特有野生蓝莓品种,又名“都柿”^[1],主要分布于内蒙古、黑龙江、吉林长白山等地区,果实为蓝紫色,且具有多种优异品质特性,营养丰富,花青素成分较高,被联合国粮农组织列为人类五大健康食品之一^[2],因保护视力的作用被誉为“飞行员的早餐”^[3]。笃斯越橘因其特殊的生活习性,自然条件下,人工繁育困难,使得野生资源开发利用价值受到极大的限制;随着国内外学者对其它蓝莓品

种组培研究的不断深入,目前关于笃斯越橘愈伤组织诱导和组培苗生根的相关报道日益增加^[4-7],但关于愈伤组织诱导芽分化的报道较少。愈伤组织再生不定芽不仅可以扩大不定芽的繁殖系数,还可为导入外源基因、保存种质资源提供材料基础^[8-11]。该试验研究了 3 种细胞分裂素 TDZ、ZT、6-BA,2 种生长素 IBA 和 NAA 及蔗糖在不同浓度不同组分条件下,对笃斯越橘优系 SL-1 叶片和无芽茎段愈伤组织芽分化的影响,以期获得最佳的外源激素配比和最佳的愈伤组织外植体,为今后笃斯越橘种质资源的保存和优系筛选提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试野生笃斯越橘优系 SL-1 脱毒无菌组培苗由黑龙江省伊春市选育。

第一作者简介:李征(1993-),女,硕士研究生,研究方向为果树栽培育种及生物技术。E-mail:1076274503@qq.com.

责任作者:高庆玉(1960-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为果树育种栽培及育种。E-mail:gaoqingyu@tom.com.

基金项目:公益性行业(农业)科研专项资助项目(201103037)。

收稿日期:2018-07-03

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料的制备

该试验于2017年3—10月在东北农业大学园艺园林学院进行。将笃斯越橘无菌脱毒苗在无菌组培室培养20 d后,选取长势较好的叶片和无芽茎段作为试材。叶片只留叶中部分5 mm×5 mm,切取无芽茎段约1 cm。试验所用培养基在121 ℃、131 kPa 灭菌锅灭菌20 min后待用。

1.2.2 愈伤组织的获取

将处理好的叶片和茎段接种到WPM培养基+蔗糖20 g·L⁻¹+琼脂8 g·L⁻¹,附加外源激素ZT 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹,在pH 5.2~5.4,温度23~25 ℃,光照强度1 300 lx,光照时间10 h·d⁻¹的组培室中培养30 d后,选择愈伤组织绿色、紧致且有活力的,将其切成5 mm×5 mm的小块待用。

1.2.3 细胞分裂素 ZT、TDZ、6-BA 不同浓度对愈伤组织分化率和分化情况的影响

将处理好的叶片和无芽茎段愈伤组织,分别接种到WPM培养基+蔗糖20 g·L⁻¹+琼脂8 g·L⁻¹,在pH 5.2~5.4,温度23~25 ℃,光照强度1 300 lx,光照时间10 h·d⁻¹条件下诱导培养。ZT 分别设0.0、1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹ 4种浓度;TDZ 分别设0.0、1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹

4个浓度;6-BA 分别设0.0、1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹ 4个浓度。

每组试验处理15个愈伤组织,30 d后调查诱导分化芽的情况并统计分化率。其中分化芽的情况包括:分化芽的多少、大小,愈伤组织是否褐化,分化叶片的大小以及叶片颜色。分化率(%)=分化外植体个数/处理外植体总个数×100^[12]。

1.2.4 TDZ、ZT、IBA、NAA 不同组合对愈伤组织分化芽的影响

将处理好的叶片和无芽茎段愈伤组织,分别接种到WPM培养基+蔗糖20 g·L⁻¹+琼脂8 g·L⁻¹,在pH 5.2~5.4,温度23~25 ℃,光照强度1 300 lx,光照时间10 h·d⁻¹条件下诱导培养。设置TDZ 4个浓度分别为0.1、0.5、1.0、3.0 mg·L⁻¹;ZT 设4个浓度分别为0.0、0.5、1.0、3.0 mg·L⁻¹;IBA 设4个浓度分别为0.00、0.05、0.10、0.30 mg·L⁻¹;NAA 设4个浓度分别为0.00、0.05、0.10、0.30 mg·L⁻¹;正交组合如表1所示,每组处理15个愈伤组织,重复3次。连续观察并详细记录外植体的长势,包括愈伤组织是否褐化,分化苗的颜色、多少^[12],并统计3次重复的分化率并求出均值。分化率(%)=分化外植体个数/处理外植体总个数×100^[12]。

表1 正交实验设计

Table 1 Design of orthogonal experiments

mg·L⁻¹

处理 Treatments	TDZ 浓度 Concentration of TDZ	ZT 浓度 Concentration of ZT	IBA 浓度 Concentration of IBA	NAA 浓度 Concentration of NAA
1	0.1	0.0	0.00	0.00
2	0.1	0.5	0.05	0.05
3	0.1	1.0	0.10	0.10
4	0.1	3.0	0.30	0.30
5	0.5	0.0	0.05	0.10
6	0.5	0.5	0.00	0.30
7	0.5	1.0	0.30	0.00
8	0.5	3.0	0.10	0.05
9	1.0	0.0	0.10	0.30
10	1.0	0.5	0.30	0.10
11	1.0	1.0	0.00	0.05
12	1.0	3.0	0.05	0.00
13	3.0	0.0	0.30	0.05
14	3.0	0.5	0.10	0.00
15	3.0	1.0	0.05	0.30
16	3.0	3.0	0.00	0.10

1.2.5 ZT、IBA 和蔗糖不同组分对愈伤组织分化芽的影响

将处理好的叶片和无芽茎段愈伤组织,分别接种到 WPM 培养基+琼脂 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,在 pH 5.2~5.4,温度 $23 \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,光照强度 $1\ 300 \text{ lx}$,光照时间 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 条件下诱导培养。ZT 设 3 个浓度分别为 1.0、2.0、3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; IBA 设 3 个浓度分别为 0.01、0.05、0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 蔗糖设 3 个浓度分别为

15、20、25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 对 ZT 浓度、IBA 浓度和蔗糖浓度进行正交实验如表 2 所示,每组 15 个外植体,接种 30、60 d 后各调查一次诱导分化情况,重复 3 次,详细观察记录 30 d 和 60 d 后叶片和茎段愈伤组织生长情况,包括分化芽的多少、高度、增殖个数以及分化苗叶片的大小、颜色,统计分化情况,并求出 3 次重复分化率的平均值。分化率(%) = 分化外植体个数/处理外植体总个数 $\times 100$ [12]。

表 2 正交实验方案

Table 2 Design of orthogonal experiments

处理 Treatments	ZT 浓度 Concentration of ZT /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IBA 浓度 Concentration of IBA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	蔗糖浓度 Concentration of sucrose /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	1.0	0.01	15
2	1.0	0.05	20
3	1.0	0.10	25
4	2.0	0.01	20
5	2.0	0.05	25
6	2.0	0.10	15
7	3.0	0.01	25
8	3.0	0.05	20
9	3.0	0.10	15

1.3 数据分析

利用 Excel 2013 软件进行统计和绘制图表,采用 SPSS 21 软件进行数据方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同细胞分裂素 ZT、TDZ、6-BA 不同组分对愈伤组织分化芽的影响

2.1.1 不同 ZT 浓度对愈伤组织分化的影响

由表 3 可知,叶片和茎段愈伤组织的诱导分

化率随着 ZT 浓度的增加呈现先升后降的趋势,且均在 ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下达到最佳效果。叶片愈伤组织分化率在 ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下诱导率达 85.67%,且芽多呈现鲜绿色,与其它浓度下处理差异显著;茎段愈伤组织在 ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下分化率达 89.00%,芽呈绿色,且发芽的叶片很大。综上所述,叶片和茎段愈伤组织分化诱导最佳 ZT 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,且茎段愈伤组织分化效果优于叶片愈伤组织。

表 3 不同 ZT 浓度对外植体分化的影响

Table 3 Effect of different concentrations of ZT on explants differentiation

外植体 Explants	ZT 浓度 Concentration of ZT/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	分化率 Differentiation rate/%	分化情况 Differentiation state
叶片愈伤组织 Leaf callus	0.0	0.00d	褐化严重,无分化
	1.0	$70.00 \pm 0.18\text{b}$	切口芽多,鲜绿色
	2.0	$85.67 \pm 0.12\text{a}$	切口芽多,鲜绿色
	3.0	$47.00 \pm 0.82\text{c}$	切口稍褐化,发芽叶尖发红
茎段愈伤组织 Stem callus	0.0	$6.33 \pm 0.18\text{b}$	芽小,发芽叶片发红
	1.0	$87.00 \pm 0.41\text{a}$	芽深绿色,发芽叶片大,黄色愈伤
	2.0	$89.00 \pm 0.82\text{a}$	芽绿色,发芽叶片大
	3.0	$32.33 \pm 0.28\text{b}$	芽绿色,叶片稍小

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters show significant difference after the same column data ($P < 0.05$). The same below.

2.1.2 不同浓度 TDZ 对愈伤组织诱导分化芽的影响

如表 4 可知,叶片和茎段愈伤组织的诱导分化率随着 TDZ 浓度的增加呈现先升后降的趋势,

最佳处理为 TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,最佳外植体为叶片愈伤组织,分化率为 60.00%,愈伤组织深绿色,分化芽较多,与其它处理差异显著。

表 4 不同 TDZ 浓度对外植体分化的影响

Table 4 Effect of different concentrations of TDZ on explants differentiation

外植体 Explants	TDZ 浓度 Concentration of TDZ/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	分化率 Differentiation rate/%	分化情况 Differentiation state
叶片愈伤组织 Leaf callus	0.0	0.00c	褐化严重,无分化
	1.0	60.00±1.22a	叶片深绿色,芽多
	2.0	22.00±0.16b	切口边稍褐化,芽少,突起多
	3.0	20.33±0.18b	表面全是芽
茎段愈伤组织 Stem callus	0.0	6.33±0.25b	芽小,浅绿色
	1.0	42.00±1.08a	芽小,绿色,愈伤变大
	2.0	19.33±0.29b	芽小,深绿色,愈伤变大
	3.0	21.67±0.37b	芽小,浅绿色

2.1.3 不同浓度 6-BA 对愈伤组织诱导分化的影响

由表 5 可知,接种的叶片愈伤组织不分化,且存在不同程度的褐化情况,无芽茎段愈伤组织分化率随着 6-BA 浓度的增加呈先升高后下降趋

势,且 6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时分化率最高,但仅为 17.00%,且分化芽较小。综合分析,2 种外植体的愈伤组织分化率均很低,即添加 6-BA 不利于叶片和茎段愈伤组织诱导分化。

表 5 不同 6-BA 浓度对外植体分化的影响

Table 5 Effect of different concentrations of 6-BA on explants differentiation

外植体 Explants	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	分化率 Differentiation rate/%	分化情况 Differentiation state
叶片愈伤组织 Leaf callus	0.0	0.00c	褐化严重,无分化
	1.0	0.00c	褐化不严重,无分化
	2.0	0.00c	少许褐化,无分化
	3.0	0.00c	褐化严重,无分化
茎段愈伤组织 Stem callus	0.0	6.33±0.18b	芽小,浅绿色,愈伤稍变大
	1.0	17.00±0.82a	芽小,绿色
	2.0	5.67±0.04b	芽小,绿色
	3.0	5.33±0.24b	芽小,浅绿

2.2 不同外源激素 TDZ、ZT、IBA、NAA 正交组合对愈伤组织分化芽的影响

由表 6 可知,笃斯越橘优系 SL-1 叶片和茎段愈伤组织分化最佳组合均为 12 号处理(TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、ZT $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),分化率显著高于其它处理。叶片愈伤组织深绿色、无褐化且长势最好,分化率最高达 100%;茎段愈伤组织绿色、分化苗多且长势较好,分化率达 93.00%。同比之下,叶片愈伤组织诱导分化芽的效果优于

叶片愈伤组织。

由表 7 可知,A、B、C、D 4 个因素均达到 0.05 的差异显著水平。均方 $\text{SD} > \text{SB} = \text{SC} > \text{SA} = \text{IBA}$,影响叶片再生的主次因素为 $\text{NAA} > \text{ZT} > \text{TDZ}$,ZT 在诱导中起关键促进作用,但细胞分裂素 NAA 表现出明显抑制叶片愈伤组织分化芽的形成;茎段愈伤组织分化芽过程中,NAA 表现出明显抑制作用,细胞分裂素 ZT 和 IBA 在茎段愈伤组织再生芽诱导过程中起主要促进作用。

表 6 分化正交实验结果

Table 6 Analysis result of orthogonal on differentiation culture medium

处理 Treatments	叶片愈伤组织生长状态 Leaf callus growth state	叶片愈伤组织分化率 Differentiation rate of leaf callus/%	茎段愈伤组织生长状态 Stem callus growth state	茎段愈伤组织分化率 Differentiation rate of state callus
1	愈伤深绿色,芽多	80.00b	愈伤绿色,分化多	30.00c
2	愈伤黄绿色,无芽	0.00e	愈伤黄绿色,无分化	0.00d
3	愈伤黄绿色,无芽	0.00e	愈伤浅绿色,有些褐化	0.00d
4	愈伤颗粒状,无芽	0.00e	愈伤黄色,稍褐化	0.00d
5	愈伤水渍状,无芽	0.00e	愈伤黄绿色,褐化严重	0.00d
6	愈伤水渍状,无芽	0.00e	愈伤黄绿色,稍褐化	0.00d
7	愈伤绿色,全是芽	73.00b	愈伤无褐化,芽多	72.00b
8	愈伤黄绿色,水渍状有白色突起	29.00d	愈伤少,褐化	0.00d
9	愈伤水渍化,无芽	0.00e	愈伤褐化严重	0.00d
10	愈伤水渍化,无芽	0.00e	愈伤褐化严重	0.00d
11	愈伤水渍化,无芽	0.00e	愈伤黄绿色	0.00d
12	愈伤深绿色,分化苗多长势好	100.00a	愈伤绿色,分化苗多长势好	93.00a
13	愈伤黄色,无芽	0.00e	愈伤黄色	0.00d
14	愈伤黄色,有芽	59.00c	愈伤绿色	0.00d
15	愈伤黄色,无芽	0.00e	愈伤水渍化	0.00d
16	愈伤黄绿色,无芽	0.00e	愈伤黄色	0.00d

表 7 分化率方差分析结果(叶片和茎段)

Table 7 Variance analysis result of differentiation rate (leaf and stem)

外植体 Explants	变异来源 Source of variation	平方和 Sum of square	均方 Mean square	F 值 F value
叶片 Leaf	处理总效应	3.382a	0.282	28.247
	TDZ	0.383	0.128	12.808
	ZT	0.397	0.132	13.260
	IBA	0.397	0.132	13.260
	NAA	2.115	0.705	70.653
	误差	0.339	0.010	
茎段 Stem	处理总效应	3.382a	0.282	28.247
	TDZ	0.383	0.128	12.808
	ZT	0.397	0.132	13.260
	IBA	0.397	0.132	13.260
	NAA	2.115	0.705	70.653
	误差	0.339	0.010	

由表 8 可知,叶片愈伤组织诱导最优组分为 TDZ 0.5 mg · L⁻¹ 或 1.0 mg · L⁻¹、ZT 3.0 mg · L⁻¹、IBA 0.05 mg · L⁻¹ 或 0.3 mg · L⁻¹、NAA 0.00 mg · L⁻¹;茎段愈伤组织诱导最佳组合为: TDZ 0.5 mg · L⁻¹ 或 1.0 mg · L⁻¹、ZT 3.0 mg · L⁻¹、IBA 0.05 mg · L⁻¹ 或 0.3 mg · L⁻¹、NAA 0.00 mg · L⁻¹。与方差分析结果一致。

2.3 ZT、IBA 和蔗糖不同组分对愈伤组织分化的影响

由表 9 可知,愈伤组织诱导 30 d 后,茎段愈伤组织诱导优于叶片,且最佳诱导组合为 9 号,即:ZT 3.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.5 mg · L⁻¹ + 蔗糖 15 g · L⁻¹,分化率可达到 61%;叶片的最佳诱导

表 8 4 因素 4 水平的 Duncan's 检验(叶片和茎段)

Table 8 Duncan's four levels test for four factors (leaf and stem)

外植体 Explants	A 因素 A factor		B 因素 B factor		C 因素 C factor		D 因素 D factor	
	水平	平均值	水平	平均值	水平	平均值	水平	平均值
叶片 Leaf	0.1	0.201ab	0.0	0.185b	0.00	0.231a	0.00	0.781a
	0.5	0.225a	0.5	0.133b	0.05	0.250a	0.05	0.087b
	1.0	0.250a	1.0	0.213b	0.10	2.204a	0.10	-0.036c
	3.0	0.148b	3.0	0.323a	0.30	0.168a	0.30	0.022c
茎段 Stem	0.1	0.075b	0.0	0.046b	0.00	0.101b	0.00	0.489a
	0.5	0.181a	0.5	0.003b	0.05	0.233a	0.05	0.072b
	1.0	0.233a	1.0	0.206b	0.10	-0.029b	0.10	-0.036bc
	3.0	0.000b	3.0	0.233a	0.30	0.184a	0.30	-0.042c

表9 30 d后分化情况
Table 9 Differentiation status after 30 days

处理 Treatments	叶片愈伤组织分化率 Differentiation rate of leaf callus/%	分化情况 Differentiation state	茎段愈伤组织分化率 Differentiation rate of state callus/%	分化情况 Differentiation state
1	3	愈伤组织绿色,0.5 cm,增殖2个	45	愈伤组织绿色,1~2 cm,增殖2~5个
2	6	愈伤组织绿色,0.5 cm,增殖3个	50	愈伤组织绿色,1~2 cm,增殖3~6个
3	0	愈伤组织绿色无分化	41	愈伤组织绿色,1~2 cm,增殖3~4个
4	2	愈伤组织绿色,0.5 cm,增殖1个	48	愈伤组织绿色,1~2 cm,增殖2~5个
5	0	愈伤组织绿色无分化	15	愈伤组织绿色,0.5 cm,增殖1~3个
6	11	愈伤组织绿色,0.5 cm,增殖2~5个	39	愈伤组织绿色,1~2 cm,增殖2~5个
7	0	愈伤组织绿色无分化	22	愈伤组织绿色,1 cm,增殖1~3个
8	0	愈伤组织绿色无分化	32	愈伤组织绿色,1~2 cm,增殖2~4个
9	3	愈伤组织绿色,0.5 cm,增殖2个	61	愈伤组织绿色,1~2 cm,增殖2~5个

组合为6号,只有11%。诱导培养60 d后的调查结果显示,叶片愈伤组织分化率明显提高,叶片愈伤组织分化率最低的是7号组合即:ZT 3.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.01 mg · L⁻¹ + 蔗糖 25 g · L⁻¹ 可以达到83%,但褐化严重,苗长势均低于2 cm;茎段愈伤组织分化率稳定提高,且4号组合提高至最高,提

高至79%,其组合为:ZT 2.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.01 mg · L⁻¹ + 蔗糖 20 g · L⁻¹。对比30、60 d的调查结果表明,茎段愈伤组织诱导体优于叶片愈伤组织诱导,但叶片最佳处理诱导率略高于茎段愈伤组织。

表10 60 d后分化情况
Table 10 Differentiation status after 60 days

处理 Treatments	叶片愈伤组织分化率 Differentiation rate of leaf callus/%	分化情况 Differentiation state	茎段愈伤组织分化率 Differentiation rate of state callus/%	分化情况 Differentiation state
1	2fg	褐化严重,几乎全褐化,2~4 cm,增殖5个	56d	分化苗绿色,2~6 cm,增殖6~8个
2	7e	褐化严重,1~5 cm,增殖7~14个	67b	分化苗绿色,2~7 cm,增殖6~10个
3	0h	褐化严重,几乎全褐化,无分化苗	44e	分化苗绿色,2~7 cm,增殖5~11个
4	4ef	褐化严重,几乎全褐化,1 cm,增殖数个	79a	分化苗发红,2~6 cm,增殖2~8个
5	15d	有褐化1/3,1~3 cm,增殖2~10个	27f	分化苗发红,2~5 cm,增殖4~10个
6	25c	长势好,1~3 cm,增殖1~7个	53d	分化苗发红,2~4 cm,增殖2~8个
7	83a	褐化严重,长势低1~2 cm,增殖2~5个	21g	分化苗成簇,茎发红1~2 cm,增殖4~10个
8	18d	低于1 cm,增殖6个	22g	分化苗成簇,长势弱,1~3 cm,增殖苗3~8个
9	41b	分化苗低1 cm,增殖2~5个	63c	分化苗纤细,顶部发红,2~4 cm,增殖9~10个

由表11可知,A、B、C 3个因素在叶片和茎段愈伤组织诱导中均达到5%差异显著水平。在叶片愈伤组织分化芽过程中,均方 SA > SC > SB,即作用大小为 ZT > 蔗糖 > IBA;在茎段愈伤组织分化芽过程中,ZT起主导作用,且次要因素为:蔗糖 > ZT > IBA,即蔗糖在茎段愈伤组织分化芽过程中起主要作用。

由表12可知,叶片愈伤组织分化中,A因素3.0 mg · L⁻¹平均值最大,且为47.6%;B因素0.01 mg · L⁻¹均值最大,且差异性显著;C因素为25 g · L⁻¹均值最大。茎段愈伤组织分化过程

中,A因素1.0 mg · L⁻¹平均值最大,且为53.3%;B因素0.10 mg · L⁻¹平均值最大为53.0%;C因素20 g · L⁻¹均值最大,且与其它组间差异显著。

综合表11~12分析可知,叶片愈伤组织诱导分化最优组合为蔗糖 25 g · L⁻¹ + ZT 3.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.01 mg · L⁻¹,且这组最佳配比与其它组分之间差异显著。茎段愈伤组织分化芽的最佳配比为蔗糖 20 g · L⁻¹ + ZT 1.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.01 mg · L⁻¹。

表 11 60 d 分化率方差分析结果

Table 11 The variance analysis result of differentiation rate after 60 days

外植体 Explants	变异来源 Variation source	平方和 Sum of square	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
	处理总效应	1.238a	0.206	9.068	0.000
叶片愈伤组织 Leaf callus	A ZT	0.954	0.447	20.973	0.000
	B IBA	0.117	0.058	2.569	0.102
	C 蔗糖	0.167	0.083	3.663	0.044
	误差	0.455	0.023		
	处理总效应	1.035a	0.173	441.945	0.000
茎段愈伤组织 Stem callus	A ZT	0.218	0.109	278.947	0.000
	B IBA	0.114	0.057	146.594	0.102
	C 蔗糖	0.703	0.351	900.294	0.044
	误差	0.008	0.000		

表 12 A、B、C 3 因素 3 水平 Duncan's 检验 (叶片和茎段)

Table 12 Duncan's three levels test for three factors A, B, C (leaf and stem)

外植体 Explants	A 因素 A factor		B 因素 B factor		C 因素 C factor	
	水平	平均值	水平	平均值	水平	平均值
叶片 Leaf	1.0	0.031b	0.01	0.298a	15	0.152c
	2.0	0.149b	0.05	0.137b	20	0.174b
	3.0	0.476a	0.10	0.221ab	25	0.329a
茎段 Stem	1.0	0.553a	0.01	0.519a	15	0.434b
	2.0	0.530b	0.05	0.387b	20	0.694a
	3.0	0.350c	0.10	0.530a	25	0.307c

3 结论与讨论

植物激素对蓝莓组培苗的离体再生有着不可或缺的作用,其中细胞分裂素对外植体离体再生有至关重要的作用,影响外植体的分化和再生,促进物质运转和积累,单独使用细胞分裂素就可以使无根植株快速生根,促使植物叶片或者茎段及其它外植体再生分化成植株^[13-16]。该试验以笃斯越橘优系 SL-1 的叶片和无芽茎段诱导的愈伤组织为外植体,使用 WPM 培养基,探讨 3 种细胞分裂素 TDZ、ZT、6-BA 单因素梯度浓度对愈伤组织再生分化芽的影响。结果表明,在相同培养条件下,3 种细胞分裂素对愈伤组织再生分化芽的效果依次为:ZT>TDZ>6-BA,ZT 较其它 2 种细胞分裂素更加适宜诱导笃斯越橘优系 SL-1 叶片和茎段愈伤组织分化芽,且最适浓度为 2.0 mg·L⁻¹。

植物生长素和细胞分裂素以不同比例混合使用时,会影响植物分化的方向和结果,不同激素以及不同浓度都会产生不同的结果。以笃斯越橘优系 SL-1 的叶片和无芽茎段诱导的愈伤组织为外植体,使用 WPM 培养基,对 ZT、TDZ、IBA、NAA

4 种激素进行正交实验,结果表明,细胞分裂素 ZT 3.0 mg·L⁻¹+TDZ 0.05 mg·L⁻¹+生长素 IBA 0.1 mg·L⁻¹,这一组合有利于分化芽的形成,且诱导率高,长势好;NAA 明显抑制愈伤组织分化,且使愈伤组织褐化变黄。这一结果与吴光洪等^[17]探讨兔眼蓝莓叶片再生过程的结果相似,TDZ 在叶片诱导再生芽时起关键作用,细胞分裂素 ZT 可以促进细胞的纵向伸长,即促进再生植株长高,以弥补 TDZ 诱导不定芽矮化的情况,同时也发现 NAA 不适宜诱导愈伤组织分化芽的形成,这一结果与该试验结果一致。

纪纯阳等^[18]分析杨树离体再生过程中发现,蔗糖浓度会影响再生体系的建立,高浓度蔗糖抑制茎段愈伤组织芽分化。该试验对 3 个因素蔗糖和 ZT 及 IBA 进行正交实验。结果表明,蔗糖浓度会影响愈伤组织芽分化,且高浓度抑制作用较明显,与纪纯阳等^[18]分析结果相似。

综上所述,该试验探究了不同生长素和赤霉素对笃斯越橘优系 SL-1 叶片和无芽茎段愈伤组织 2 种外植体诱导分化芽的影响,结果表明,叶片愈伤组织优于无芽茎段愈伤组织,且最佳的组合组分为:WPM 培养基+蔗糖 20 g·L⁻¹+琼脂 8 g·L⁻¹+TDZ 1.0 mg·L⁻¹+

ZT 3.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.05 mg · L⁻¹。细胞分裂素 NAA 和 6-BA 的使用浓度比例和主要作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] 翁海龙,王福德,王鑫,等. 笃斯越橘优良品种“紫水晶”的选育与栽培技术[J]. 林业科技, 2015, 40(4): 6-8.
- [2] 陈安平,黄勇军,汪胜峰. 市售蓝莓类产品的原花青素含量测定[J]. 食品研究与开发, 2016(1): 170-173.
- [3] 吴知凡. 鍱针点穴结合穴位敷贴和视力训练治疗近视的临床和实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [4] 甄成,毕显禹,李淑娟,等. 杂种蓝莓(野生×‘美登’)组培快繁[J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(5): 29-33.
- [5] 张舵,杨艳敏,魏永祥,等. 激素配比和 pH 值对蓝莓试管苗增殖生长的影响[J]. 北方果树, 2015(3): 13-14.
- [6] 陈原国,马鹏,王语,等. 不同激素配比对两个蓝莓品种组织培养的影响[J]. 枣庄学院学报, 2016, 33(2): 87-91.
- [7] 李亚东. 越橘(蓝莓)栽培与加工利用[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2001.
- [8] 刘庆忠,赵红军,郑亚芹,等. 高灌蓝莓微体繁殖技术研究初报[J]. 落叶果树, 2001, 33(5): 1-3.
- [9] 刘永富,陈建军,吴俊遥,等. 笃斯越橘组培繁殖育苗技术研究初报[J]. 吉林林业科技, 2008, 37(4): 40-43.
- [10] 李冰,苏上,王丽金,等. 笃斯越橘高效再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2017(11): 124-129.
- [11] LIU C, CALLOW P, ROWLAND L J, et al. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern highbush blueberry cultivars[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2010, 103(1): 137-144.
- [12] 张宇. 笃斯越橘再生体系初步研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- [13] 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.
- [14] 梁文卫,宋鹏慧,阎聪,等. 美登蓝莓试管苗瓶内快速生根试验[J]. 中国果树, 2015(4): 44-47.
- [15] 陶兴魁,陈峰,赵志祥,等. 蓝莓茎段丛生芽诱导最适培养基的筛选研究[J]. 科技视界, 2015(1): 96.
- [16] 杨瑞琴. 蔓越橘茎段离体快速繁殖与叶片再生体系建立[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [17] 吴光洪,孙英坤,陈林敬,等. 兔眼蓝莓‘粉蓝’叶片直接诱导丛生芽再生技术体系的建立[J]. 植物生理学报, 2016(3): 372-380.
- [18] 纪纯阳,白冰,杨占旭,等. pH 值与蔗糖浓度对 108 杨离体再生的影响[J]. 辽宁林业科技, 2007(5): 39-40.

Effect of Growth Regulator on Bud Differentiation of Callus of *Vaccinium uliginosum* L.

LI Zheng, GAO Qingyu, ZHANG Bingxiu, ZHANG Yu, ZHANG Zhao

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Callus explants of the leaf and stem segments without buds of *Vaccinium uliginosum* L. SL-1, which were compact, green and energetic, were used as the test materials in WPM medium. The effect of TDZ, ZT and 6-BA, growth regulators of IBA, NAA and sucrose in different concentrations on bud differentiation were studied by using the single-factor variable and multi-factor orthogonal combination method in order to provide a reference for the preservation of germplasm resources and the selection of superior system in the future. The results showed that by using ZT alone to induce callus differentiation buds, ZT was more suitable for callus differentiation bud than TDZ and 6-BA, and the best concentration was 2.0 mg · L⁻¹, the callus differentiation rate of leaf and stem was up to 85.67% and 89.00%. When using TDZ, ZT, IBA and NAA, differentiation rate of leaf callus was better than that in the stem segment callus, and the rate of differentiation was up to 100.00% and 93.00%. The best components were TDZ 1.0 mg · L⁻¹ + ZT 3.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.05 mg · L⁻¹ + NAA 0 mg · L⁻¹. Sucrose concentration had effect on the bud differentiation of callus of leaf and stem segment, the best sucrose concentrations were 25 g · L⁻¹ and 20 g · L⁻¹. In conclusion, leaf callus was more suitable for differentiation bud formation, and the best medium was WPM + sucrose 20 g · L⁻¹ + agar 8 g · L⁻¹ + TDZ 1.0 mg · L⁻¹ + ZT 3.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.05 mg · L⁻¹.

Keywords: *Vaccinium uliginosum* L.; callus; growth regulator; differentiation bud