

# 树莓、黑莓组织培养及遗传转化研究进展

蒋桂华, 吴延军\*, 谢 鸣, 韩文节, 孙崇波, 黄普乐, 张惠琴

(浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

**摘 要:** 树莓和黑莓是悬钩子属(*Rubus* L.)栽培果树的 2 大类, 近年来树莓、黑莓成为国内新兴的重要浆果。综述了两莓组织培养和基因转化的研究进展, 重点介绍了茎尖、叶片、胚和原生质培养及两莓在基因转化方面的成就, 分析了基因型、培养基及附加物、培养条件等对两莓组织培养成苗的影响, 并对影响两莓农杆菌介导法转化效率的因素进行阐述, 最后对两莓组织培养及遗传转化研究重点提出了建议。

**关键词:** 树莓; 黑莓; 组织培养; 遗传转化

**中图分类号:** S663.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9980(2006)04-593-06

## Advances in research on raspberry and blackberry tissue culture and genetic transformation

JIANG Gui-hua, WU Yan-jun\*, XIE Ming, HAN Wen-jie, SUN Chong-bo, HUANG Pu-le, ZHANG Hui-qin

(Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou Zhejiang 310021 China)

**Abstract:** Raspberries and blackberries are two main fruit berries in *Rubus* L. Nowadays they are two new and very important berry crops in China. Advances in research on their tissue culture and genetic transformations are reviewed in this article. Various explants such as shoots, leaves, embryos and protoplast *in vitro* establishment were highlighted. The effects of genotype, medium and its supplements, culture conditions are mainly analyzed for the success of receiving plantlets. *In vitro* transformation of raspberries and blackberries by using *Agrobacterium tumefaciens* is also introduced; the facts which affect the transformation efficiency are discussed. Focal points of future research are suggested as well.

**Key Words:** Raspberry; Blackberry; Tissue culture; Genetic transformation

树莓(raspberries)和黑莓(blackberries)是悬钩子属(*Rubus* L.)半灌木性果树主要栽培类型的 2 大类, 前者主要分布在温带地区, 后者分布在暖温带至亚热带地区<sup>[1]</sup>, 树莓、黑莓浆果甜而芳香, 营养丰富, 可鲜食也可制作果酱。果实中 VitE 和 SOD 含量为水果之最, 属高钾低钠果品<sup>[2]</sup>。树莓、黑莓所含的鞣化酸抗癌物质大大高于核桃、草莓和越橘等具有抗癌作用, 可预防啮齿动物食道癌和结肠癌的发生<sup>[3]</sup>, 且有止渴、除痰、发汗、活血的效用, 是重要的功能及保健水果, 是极具发展前途的果树及药用植物。

近年来我国先后从国外引进若干树莓、黑莓栽培品种, 树莓、黑莓生产及科研发展受到了广泛关注, 成为果品研究的新热点<sup>[4]</sup>。在我国树莓、黑莓方面的研究仍处于初级阶段, 各地优良品种的苗木较缺乏, 在一定程度上成为发展树莓、黑莓种植业发展

的制约因子之一, 同时有关进一步的生物技术研究相对落后。本项目组也先后进行过树莓、黑莓组织培养方面的研究, 部分结果已进行了报道<sup>[5-6]</sup>。本文着重介绍国内外两莓在组织培养及遗传转化方面的研究现状, 并结合我们的研究工作予以展望, 以期组织培养育苗, 并为通过基因操作改良树莓、黑莓种质提供参考。

## 1 组织培养

### 1.1 国外研究进展

树莓、黑莓在欧美国家商品化栽培较早, 相应的组织培养工作起步也早, 研究多集中在组织培养快速繁殖、叶片培养、胚培养、原生质体培养等方面, 其中又以茎尖培养和叶片培养的研究较为丰富(表 1)。

#### 1.1.1 茎尖培养 组织培养快速繁殖以获得苗木和

收稿日期: 2006-02-15 接受日期: 2006-06-12

基金项目: 浙江省农业科学院人才引进资助项目。

作者简介: 蒋桂华, 男, 学士, 主要从事浆果研究。Tel: 0571-86404118, E-mail: jianggh@zaas.ovg

\* 通讯作者。Author for correspondence. Tel: 0571-86404118, E-mail: wyjwjht@163.com

茎尖脱毒为目的。树莓、黑莓的快繁研究使用材料非常广泛,报道材料中涉及多种基因型。同一基因型,不同培养基激素,培养效果不同。相同激素,不同基因型培养效果也不同。Erig 等<sup>[6]</sup>研究发现,培养基中含 2 mmol/L BA 不含 IBA 时萌芽率最高;不含 IBA 或 IBA 浓度为 1 mmol/L 时根平均重量减轻。IBA 为 1 mmol/L, BA 为 5.9 mmol/L 快繁速率降低,只含 5.1 mmol/L BA 增加快繁速率。可见对于选定的基因型,激素配比对培养效果至关重要。除以上激素外,也有使用 CPPU 的,低浓度的 CPPU 可以促进快繁和器官发生<sup>[7-8]</sup>。

除快繁外,茎尖脱毒也是其研究的内容之一。茎尖脱毒生根时使用 1/2 MS 培养基并附加 1~2 mg/L IBA、0.1 mg/L GA 和 1.0 g/L 的活性炭效果最好<sup>[9]</sup>。在喷雾光温室中 95% 的无菌苗可以成活,经脱毒培养的树莓初步检测未带病毒。

有研究<sup>[10-11]</sup>显示组织培养快繁育苗(TC)与自根苗(RS)在田间表型、藤体生长等性状方面存在差异,TC 育苗对红树莓品种 Norna 的越冬性有促进作用,冬季寒冷季节时,有 15.4% 的自根苗因冻致死,而 TC 繁育者不仅没有受冻,且表现出树藤大小和数量增多的特性。在开花与果实性状、果实产量与重量方面 TC 苗与 RS 苗没有差异。这在一定程度上说明了树莓组织培养育苗比自根苗更具有优势,这也为我国两莓生产中使用组织培养育苗提供了一定的依据。

1.1.2 叶片培养 叶片再生系统是基因转化的最佳受体系统,因此叶片的培养历来就备受重视。树莓和黑莓的叶片培养国外发展较快。叶片培养可以直接出芽再生也可以经过愈伤组织途径获得再生,再生途径不同再生效率不同。Popescu 等<sup>[12]</sup>研究来源于叶片的愈伤组织再生率最高,在 2,4-D 为 2.2 mmol/L 且 BA 为 13.3 mmol/L 时可以达到 100%,而相同培养基上的叶片直接再生率仅达到 46.7%~73.3%,远低于愈伤组织途径。单个愈伤组织平均再生芽数为 3.8 个也明显高于直接再生时单个叶片再生芽数。

基因型和激素影响叶片再生。相同条件下供试的 22 个品种,只有 8 个品种可以获得不定芽<sup>[13]</sup>。Mezzetti 等<sup>[14]</sup>研究结果可见树莓与黑莓的培养差异较大,BA 与 IBA 组合可以提高树莓不定芽诱导率,但高浓度的 BA 却降低黑莓不定芽的诱导,附加 IBA 更阻碍了黑莓不定芽产生;对黑莓愈伤组织诱导合适的培养基并不适合于树莓愈伤组织的诱导,最终仅品种 Hull Thornless 的愈伤组织在 BA 为 10

mmol/L 的培养基中诱导出不定芽<sup>[15]</sup>。培养基中附加激素 TDZ 效果好于 BA,但各个品种对 TDZ 反应的最适浓度不同<sup>[16]</sup>。以红树莓快繁植株的带叶柄叶片培养在含 1~2 mg/L TDZ 或 0.5 mg/L TDZ+1 mg/L IBA 的改良 MS 培养基上可以产生不定芽,不定芽最高发生率为 70%(3.7 个/外植体),不定芽发生率与培养基中的琼脂浓度无关<sup>[13]</sup>。Meng 等<sup>[17]</sup>使用黑莓品种 Marion,筛选出最佳培养程序为外植体先在含有 TDZ 的培养基上预培养 3 周,转入再生培养基(WPM+5 mmol/L BA+0.5 mmol/L IBA)暗中培养 1 周,后转到光下(16 h), $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$  培养 4 周,此培养程序最高再生率为 70% 的叶片外植体可以形成 40% 的不定芽,而使用品种 Canby 最终获得了 54% 的叶片再生率,单个叶片可以获得 4.1 个不定芽<sup>[18]</sup>。

基本培养基类型也会对培养效果产生影响。基本培养基 MS 和 N6 上的培养效果好于在 1/2 MS、Anderson 和 WPM 上的培养<sup>[13]</sup>。树莓品种 Canby 和黑莓品种 Jewel Black 在相同的培养基中可以获得近似培养效果,但所需培养时间不同。Canby 叶片先培养在 MS+0.1 mg/L BA+1 mg/L IBA 后转入 1 mg/L BA+0.1 mg/L IBA 中培养 17 d 后可以诱导愈伤组织,此愈伤组织继代培养 39 d 后转入含 4.5 mg/L BA+0.5 mg/L IBA 中培养,最终在培养了 17 周时产生了不定芽。在相同培养基上黑莓品种 Jewel Black 也可以形成不定芽,只是形成的时间有差异,分别为 12、26 d 和 20 周<sup>[19]</sup>。

培养条件也可以影响叶片不定芽再生率<sup>[15,20]</sup>。培养在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度为 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  时再生率及单个叶片可再生不定芽数均高于培养在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度为 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  或 80  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  时。暗中培养 1 周、2 周或 3 周与光下相比,不定芽再生率无异,但是降低单个外植体上再生的不定芽数,培养温度对红树莓 Comet 不定芽发生率无影响<sup>[13]</sup>。

除培养途径、基因型、培养基、培养条件外,外植体的生理状态和来源也会对再生产生影响,如顶端 2 片初展开叶的再生率及单个叶片可再生数目最高<sup>[15]</sup>。未带叶柄叶片与带叶柄叶片对不定芽发生率无影响<sup>[13]</sup>。在这些影响因素中,基因型和培养基是影响再生率的关键,而培养条件如光照(光暗周期、光强、光照时间)、温度的影响相对较小。但是为了得到重演性好的高效再生体系,关于培养条件如光质、极端培养温度、各阶段培养时间的研究还应进一步加强。

1.1.3 胚、子叶培养 两莓胚培养经过分化途径获

得再生植株大体可以通过器官的直接再生、诱导愈伤组织的再分化和体细胞胚胎发生等途径完成。培养自花授粉 28 d 黑莓的未成熟胚, 带胚乳未成熟胚, 培养过程中可以观察到子叶的直接器官再生和经愈伤组织途径的间接器官再生。其中 Hull Thornless 可以经过胚状体途径获得再生植株, 且起源于同一胚的再生植株在形态方面存在差异<sup>[21]</sup>。

激素同样影响培养效果, 在诱导黑莓器官发生方面 TDZ 比 BA 更有效, 对子叶最适 TDZ 浓度分别集中在 5~10 mmol/L, 但不定芽发生的最高浓度为 0.5~5.0 mmol/L<sup>[22]</sup>。与基因型、培养基成分不同, 培养环境的光强对培养效果影响较小。来源于黑莓×黑莓、黑莓×树莓和树莓×树莓杂交组合的子叶, 光照强度从 0~81  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  到荧光并不影响其器官发生率, 连续 2 周的暗培养也没有提高叶片外植体的再生率。

1.1.4 原生质体培养 树莓和黑莓原生质体培养报道较少, 原生质体的分离与最初外植体类型及所用的裂解条件相关。悬浮细胞的原生质体获得率远远高于叶片的获得率。在果胶酶、纤维素酶等的作用下叶片组织及悬浮细胞均分离出原生质体。这 2 种来源的原生质体在相同品种看护细胞存在下经固体培养可以获得愈伤组织并有细胞分化, 但最终仅在这些愈伤组织中观察到根组织的分化<sup>[23]</sup>。Mezzetti 等<sup>[24]</sup> 1999 年采用树莓品种 Autumn Bliss (PF) ( $2n=2x=14$ ) 和黑莓品种 Hull Thornless ( $2n=4x=28$ ) 的叶片和悬浮细胞建立了有效的原生质分离和培养程序并在不同的植物生长激素的调节下可以培养成植株。PEG 预处理时间和继代培养基影响原生质体融合。在固体培养基中培养 3~4 个月可以产生六倍体愈伤组织, 经 RAPD、GISH 和 FISH 技术证实六倍体中存在异核细胞。

表 1 国外树莓、黑莓组织培养一览表  
Table 1 Summary of culture studies on raspberry and blackberry

外植体 Explants	种/品种① Species/ variety	基本培养基 Base medium	植物生长调节剂 PGR②	再生方式及培养效果③ Ways or rate of regeneration	参考文献 References
带芽茎段、茎尖等 Stem segments and tips	Tupy(BB)	MS	BA, IBA	芽萌发	6
	Glen Prosen, Glen Moy, Glen Magna(RRB)	MS	CPPU	Shoot proliferation 分别为 32%, 38%, 72%	7
	Tayberry, Loch Ness(BB)	MS	CPPU	Frequencies of 32, 38 and 72% 分别为 38% 和 46%	8
	Willamette(RB)	改良 MS	IBA, GA	Frequencies of 38 and 46% 获得未带病毒再生植株	9
	Cayuga(RB) Autumn Bliss(RB); Chester and Hull Thornless(BB)	Lee and Fossard MS	2, 4-D, BA BA, IBA, TDZ, BA	Virus-free planting DO: 46.7%~73.3%; OCI: 100% 形成愈伤组织, 个别分化成芽 Indirect shoot formation	12 14-16
叶片、叶柄 Leaf and petiole	Comet(RRB)	MS, N6, 1/2MS, WPM and Anderson	TDZ, IBA	MS 和 N6 上的培养效果较好 More shoots on MS and N6 media than on the others	15
	Marion(BB)	WPM	IBA, BA	获得再生程序, 达 70% Under these conditions, 70%	17
	Canby(RB); Jewel Black(BB)	MS	IBA, BA	OCI; 2 品种培养效果相似但培养时 间有差异 OCI; similar culture procedure, different days	19
胚、子叶 Embryos, cotyledons	Hull Thornless, Thornfree and Comanche(BB)	MS	IAA, NAA, 2, 4-D, 2iP, BA, ZT, GA <sub>3</sub>	DO, OCI, SE	21
	Hull Thornless(BB)	MS	TDZ, BA	DO	22
原生质 Protoplast	Autumn Bliss(RB); Hull Thornless and Chester(BB)	MS	NAA, BA	愈伤组织分化出根 Callus differentiated root formation	23
	Autumn Bliss(RB); Hull Thornless(BB)	MS	NAA, BA	原生质体融合再生植株 Plant regeneration from the fusion calluses	24

注: ①RB-树莓; RRB-红树莓; BB-黑莓; ②PGR-植物生长调节剂; ③再生方式; DO-直接器官再生; OCI-经愈伤组织途径再生; SE-胚状体途径。下同。

Note: ①RB-raspberry; RRB-red raspberry; BB-blackberry ②PGR-plant growth regulator; ③Ways of regeneration; DO-direct organogenesis; OCI-organogenesis after callus induction; SE-somatic embryogenesis. The same as below.

## 1.2 国内研究进展

与国外树莓、黑莓的研究相比较, 国内研究起步

晚, 研究少, 有关生物技术方面的研究多以提供优良品种苗木为目的, 开展快速繁殖研究<sup>[25-30]</sup>, 其它外植

体类型的研究很少。快速繁殖的外植体多为顶芽、茎尖、茎段(半木质花茎段)等。基本培养基多使用 MS,也有使用 WPM、Anderson 4,激素有 BA、NAA、GA<sub>3</sub> 和 IBA 等等。研究表明,激素浓度和种类与所用外植体的类型和品种有关。赤霉素、生长素和细胞分裂素组合对芽的生长和增殖具有显著的影响,当 GA<sub>3</sub> 浓度为 3 mg/L 时,平均每个外植体增殖小苗均在 12 个以上。外植体的生长状态对芽的生长和增殖也有明显的作用,以 1 年中处在不同生长状态下的树莓带芽茎段为外植体进行培养,开始萌发的春梢茎段的芽分化率最高(91.7%)。基本培养基以 MS 最好,如在 MS、1/2MS、WPM、Anderson 4 种基本培养基中培养 40 d 后,芽诱导率分别为 90.48%、64.4%、61.7%、67.5%。因此,在诱导芽时多使用 MS 培养基,在生根时多使用 1/2MS。为了进一步提高再生率也有试验添加了 CH<sub>2</sub>。特殊研究使用 TiO<sub>2</sub> 和 K<sub>2</sub>Ti<sub>4</sub>O<sub>9</sub> 纳米颗粒处理树莓组织培养材料,结果表明纳米粒子对组织培养树莓无菌苗根的生长无影响,可促进树莓叶片再生芽的发育<sup>[29]</sup>。叶片培养中,我们以黑莓品种赫尔试管苗叶片为外植体实现了叶片的直接再生,最高再生率可以超过 90%<sup>[31]</sup>。我国两莓组织培养还有非常广阔的空间。

## 2 遗传转化

两莓的遗传转化研究多采用农杆菌介导法,尚未见使用其它转化方法的研究(表 2)。农杆菌介导法转化效率与菌株类型有关。用 35 种农杆菌感染 10 种不同的树莓,基因型不同的树莓对农杆菌的反应有着明显差异,树莓品种 Canby、Skeena 和 Rakaia 是大多数供试菌株的寄主,农杆菌菌株(C58, 13335, 11325 and TR105)可以感染大多数的活体供试植物材料,但离体时感染能力大幅度降低,最有效

菌株为 A208、A281、ACH5、C58 和 TR105<sup>[32]</sup>。C58 对活体和离体叶圆片诱导的能力均最强,在携带 pBI121 的 LBA4404 菌株感染的 270 个外植体中获得了 1 转基因芽,转基因材料采用 Kan(30 mg/L)筛选并经 GUS 活性检测和 Southern 杂交证实<sup>[33]</sup>。

农杆菌介导法转化效率也与报告基因和筛选方式有关。用 *hpt* 做筛选基因成活率高于用 *nptII*<sup>[34]</sup>。也有使用 GUS 报告基因的<sup>[35]</sup>。以直径为 10 mm 的叶圆片为外植体培养,培养基中添加 500 mg/L Cef 时并不降低再生率;农杆菌感染后,同时添加 40 mg/L 或以上浓度的 Kan 则再生率中等降低<sup>[33]</sup>。也有研究表明 Kan 10 mg/L 时就显著降低了子叶外植体的再生率,当 Kan 为 50 mg/L 时完全阻止了器官发生<sup>[16]</sup>。

转化方法中有试验使用树莓品种 Meeker 叶盘与已被农杆菌感染过的树莓(品种 Stolichnaya)愈伤组织共培养,获得了外源基因<sup>[36]</sup>。

功能基因的转化使两莓遗传转化研究发生了质的飞跃。功能基因的转化成功实例少,但都得到了转基因植株,其中转 *DefH9-iaaM* 基因还研究了目的基因在转基因植株中的表达。Mathews 等<sup>[34]</sup>1995 年用含有二元表达载体 pAG1452 或 pAG1552 的根癌农杆菌 EHA105 转化树莓 Meeker, Chilliwack 和 Canby 的叶片和叶柄,成功转化了 SAMase 基因。在二元表达载体中 SAMase 基因由特异启动子 E4 调控。转化叶片后,筛选培养基的初代再生芽原基中含有转化细胞和非转化细胞,但在随后的筛选培养中起源于初代再生芽继代培养产生的再生叶柄、节点和叶片均没有产生转化克隆。转化叶柄后,以 *hpt* 为筛选基因,3 品种转化率分别为 49.6%、0.9% 和 8.1%。Southern 杂交证明了外源基因已经整合到植物基因组中,218 株(161 株 MK, 4 株 CH, 53 株 CY)转基因植株已移栽大田。此研究同时反映了品种、转化外

表 2 树莓、黑莓遗传转化研究  
Table 2 Summary of transformation studies on raspberry and blackberry

种/品种① Species/ variety	外植体 Explants	菌株 Bacterial strains	目的基因 Target gene	质粒 Vector	参考文献 References
Canby, Skeena, Rakaia(RB)	叶盘 Leaf discs	C58、13335、11325、TR105、A208、A281、 ACH5、C58 和 LBA4404 等 35 个菌株 35 strains of <i>Agrobacterium</i> spp. Tumour	NPT II, GUS	pBI121	33
RRB, RB × BB 杂交种 RRB, RB × BB hybrids	叶片、茎段 Leaf, stem segments	LBA4404	NPT II, GUS	pBI121.X	35
Meeker(RB)	叶盘 Leaf discs	*	Isopentenyltransferase	CB1346	36
Meeker, Chilliwack, Canby(RB)	叶片和叶柄 Leaf and petiole	EHA105	SAMase	pAG1452, pAG1552	34
Ruby(RB)	叶盘 Leaf discs	GV2260	NPT II, <i>DefH9-iaaM</i>	pBin 19	37-39

注: \* - 与已被农杆菌感染过的树莓(品种 Stolichnaya)愈伤组织共培养。

Note: \* - Cocultivation leaf discs with transformed calluses of raspberry cv. Stolichnaya.

植株及筛选基因对最终的转化率都有影响。另一例是 Mezzetti 等<sup>[37-39]</sup>于 2002 年和 2004 年相继报道的 DefH9-*iaaM* 基因的转化。DefH9-*iaaM* 基因可在胎座及胚珠中表达,从而促使生长素合成,与植物的单性结实有关。研究使用了含双元载体 pBin 19 的农杆菌菌株 GV2260,携带 nptII 和 DefH9-*iaaM* 基因,转化树莓品种 Ruby,转化植株和对照株经相同方式繁殖并转入温室和大田。转基因植株中 DefH9-*iaaM* 基因的表达增加了单个花序的坐果率(果实数目)和单株的成花数,果实重量、果实数目,最终增加了树莓的产量,且不降低果实的含糖量。此结果不仅获得了 Ruby 的 GM (genetically modified) 植株,而且促进对控制浆果品质及果实发育关键物质的了解。可见功能基因的转化报道虽少,但研究完善,实验结果好,这为后人进行此方面的研究提供了范例。

### 3 结论和展望

组织培养是遗传转化、品质改良的基础。国内外在树莓、黑莓组织培养方面均作了大量工作,尤其是国内虽然起步晚,但在组织培养快繁育苗(TC)方面发展迅速。分析国内外研究可见,研究多集中于基因型和培养基对培养结果的影响,相对属于组织培养的基本内容。品种多具有地方特色,这虽然有利促进发展地方经济和科研水平,但研究的可比性、重演性降低。作者认为今后应从以下几个方面加强两莓的组织培养研究:1)探索多种外植体类型,提高叶片再生率。两莓组织培养中有关茎尖快繁的研究较丰富,但一些外植体类型如花药尚未涉及,有些外植体类型如原生质仅见少量报道,这些外植体类型的培养尚有许多空白。叶片培养需进一步提高再生率及重演性并细化研究,如研究叶位、生理状态及来源、叶片培养中放置方式、培养条件及时间等对再生率的影响,尽快使叶片培养程序化,为建立高效的遗传转化体系打下基础。2)开展野生树莓、黑莓资源的组织培养。这不仅有利于野生资源的保存,更为从中选择优良株系提供可能。

在遗传转化方面作者认为今后应重点进行如下方面的研究:1)尝试多种转化方法,不仅仅局限于农杆菌法。树莓、黑莓的基因转化多采用农杆菌法,完全可以参考其它树种采用多种遗传转化技术,如基因枪法、PEG 化学介导法、花粉管通道法等等,也可以采用农杆菌介导法与其它方法相结合。2)建立完善的遗传转化体系。树莓、黑莓基因转化虽已有成功实例,但遗传转化体系建立的研究很少,仅见筛选菌

株类型方面的研究,有必要在建立良好受体系统的基础上针对转化方法建立不同的遗传转化体系,探讨合适的转化条件及筛选方法,提高转化效率。3)加速功能基因的转化,树莓、黑莓基因转化的研究转化的报告基因较多,而功能基因转化很少,可以开展多种目的性状的转化研究,如提高树莓、黑莓的适应性,增强抗逆性,改良品质及抗病抗虫性能。进一步加快从树莓、黑莓中克隆功能基因、采用特异启动子转化两莓 4)开展转化植株的后续研究,研究转化目的基因的表达及稳定性等,为科学研究成果向大田生产转化提供基础。

纵观国内外两莓组织培养及遗传转化研究可见,不同的基因型、培养基、培养条件所得结果各异。大多数研究的取材具有地方特色。我国大规模的生产栽培尚处于起步阶段,研究多限于快繁研究,更要加强适合我国的栽培品种研究。我国的树莓、黑莓组织培养及遗传转化工作还有非常广阔的空间,尤其是我国悬钩子属两莓种质资源丰富,完全可以发展从野生种中筛选优良性状者进行组织培养育苗,使其可以尽快进入生产。同时开展叶片等其它外植体类型的培养研究,建立高效的再生体系,可以为两莓的个别性状改良提供基础。

基于以上目的,本项目组进行了树莓、黑莓引进材料的快速繁殖及试管苗移栽试验,获得了理想结果,现在我们的快繁苗已广泛应用了浙江省树莓、黑莓生产育苗,为进一步的扩大生产积累了丰富经验。同时开展黑莓叶片器官发生和离体再生研究,叶片直接再生率可以超过 90%,这是据我们所知黑莓叶片器官直接发生再生率的最高结果。此再生体系具有操作简单、再生率高和重演性好的特点,现在我们在前期工作的基础上,同时借鉴国外有关树莓、黑莓基因遗传转化的研究,开展了黑莓遗传转化研究,其结果将会进一步报道。

#### 参考文献 References:

- [1] HE S A, GU Y, SUN Z J, et al(贺善安,顾嫻,孙醉君,等). Theoretic guide to blackberry introduction[J]. Journal of Plant Resources and Environment(植物资源与环境), 1998, 7(1):1-9. (in Chinese)
- [2] GUO J Z, PENG S B, CHEN T S(郭军战,彭少兵,陈铁山). Nutrition analysis of the introduced varieties of raspberry and blackberry in the fresh fruit[J]. Journal of Northwest Forestry University(西北林学院学报), 2004, 19(1):108-109. (in Chinese)
- [3] HUANG C S, HUANG Y, LI J X, et al. Inhibition of benzo(a)pyrene diol-epoxide-induced transactivation of activated protein 1 and nuclear factor kappa B by black raspberry extracts[J]. Cancer-Research, 2002, 62(23): 6857-6863.
- [4] LIU J H, ZHANG Z J(刘建华, 张志军). Status and Outlook of Bramble Industrialization[J]. Tianjin Agricultural Sciences(天津园艺科学), 2004, 10(3):45-47. (in Chinese)

- [5] ZHANG H Q, XIE M, JIANG G H, et al(张慧琴, 谢鸣, 蒋桂华, 等). Studied on transplant adaptability of raspberry tube plantlets[J]. Journal of zhejiang Agricultural Sciences(浙江农业科学), 2002(3): 118-119. (in Chinese)
- [6] ERIC A C, ROSSI A, FORTES G R. 6-Benzylamino purine and indol butyric acid on the *in vitro* multiplication of blackberry (*Rubus idaeus*), cv. Tupy[J]. Ciencia Rural, 2002, 32(5): 765-770.
- [7] MILLAN M B, GRAHAM J. Organogenesis and micropropagation in red raspberry using forchlorfenuron (CPPU)[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 1999, 74(2): 219-223.
- [8] MILLAN M B. Regeneration of *Rubus in vitro* using forchlorfenuron (CPPU) [J]. Revista de la Facultad de Agronomia Universidad del Zulia, 1998, 15(3): 242-248.
- [9] RUZIC, LAZIC T. Micropropagation of raspberry cv Willamette *in vitro*[J]. Jugoslovensko Vocarstvo, 2004, 38(1/2): 109-117.
- [10] BITE A, PETREVICA L. The influence of *in vitro* propagation on the field behaviour of red raspberry variety Norma [J]. Acta Horticulturae, 2002(585): 615-619.
- [11] PETREVICA L, BITE A. Effect of *in vitro* multiplication on field performance of raspberry cultivar Norma[J]. Acta Horticulturae, 2001(560): 547-550.
- [12] POPESCU A N, ISAC V. High frequency shoot regeneration from leaf-derived callus in raspberry (*Rubus idaeus* L.)[J]. Acta Horticulturae, 2000, 538(2): 667-670.
- [13] JOHANNE C, COUSINEAU, DANIELLE J, et al. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Historical Archive), 1991, 27(3): 249-255.
- [14] MEZZETTI B, SAVINI G, CARNEVALI F, et al. Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry[J]. Biologia Plantarum, 1997, 39(1): 139-150.
- [15] ŽIŽ TURK B A, HARRY J, SWARTZ, et al. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of *Rubus genotypes*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture(Historical Archive), 1994, 38(1): 11-17.
- [16] FIOLA J A, HASSAN M A, SWARTZ H J, et al. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 20(3): 223-228.
- [17] MENG R G, CHEN T H H, FINN C E, et al. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of Marion blackberry[J]. HortScience, 2004, 39(2): 316-320.
- [18] OWENS y de N C, CONNER A J. Comparison of *in vitro* shoot regeneration protocols from *Rubus* leaf explants [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1992, 20(4): 471-476.
- [19] JANECKOVA M, MYSLIVECKOVA J. Shoot formation de novo in callus cultures of raspberries and blackberries *in vitro*[J]. Zahradnictvi, 1996, 23(4): 137-139.
- [20] MCNICOL R J, GRAHAM J. *In vitro* regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 21(1): 45-50.
- [21] CANTONI L, BERARDI G, ROSATI P. Organogenesis and somatic embryogenesis from immature embryos of blackberry[J]. Acta Horticulturae, 1993(352): 37-42.
- [22] FIOLA J A, HASSAN M A, SWARTZ H J, et al. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 20(3): 223-228.
- [23] HUY B P, LANDI L, TURASCHIO L, et al. Protoplast isolation, culture, and cell differentiation in raspberry and blackberry cultivars (*Rubus* spp.)[J]. Angewandte-Botanik, 1997, 71(3/4):131-137.
- [24] MEZZELLI B, LANDI L, PHAN H B, et al. Protoplast technology and regeneration studies for *Rubus* breeding[J]. Acta Horticulturae, 1999, (505): 215-222.
- [25] SONG Y B, LIU Z Y, DAI H P(宋艳波, 刘振宇, 代汉平). Study on proliferation of blackberry in tubes[J]. Journal of Shanxi Agricultural University(山西农业大学学报), 2003(1):56-59. (in Chinese)
- [26] FU J M, GAO X H, YANG S B, et al(傅建敏, 高筱慧, 杨绍彬, 等). Study on micro-reproduction technology on blackberry[J]. Economic Forest Researches(经济林研究), 2003, 21(4):54-56. (in Chinese)
- [27] DONG Y Z, WANG X W, JIANG P X(董玉芝, 王晓炜, 蒋萍新). *Rubus idaeus* L. tissue culture and its plants ratooning[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University(新疆农业大学学报), 2003, 26(1): 28-30. (in Chinese)
- [28] XIAO Y P, WANG Z Z, ZHANG Z Q, et al. (肖娅萍, 王喆之, 张志勤, 等). Establishment of plantlet regeneration system of *Rubus idaeus*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 2001, 32(8): 738-741. (in Chinese)
- [29] LI D L, LI D, WANG X(李大力, 李丹, 汪信). Effects of inorganic nanoparticles on human cell's reproduction and bramble tissue culture[J]. Journal of Xuzhou Normal Uni(Natural Sciences)(徐州师范大学学报:自然科学版), 2002, 20(2):51-53. (in Chinese)
- [30] LI C Y, WANG W X, XIANG S Q, et al(李春艳, 汪卫星, 向素琼, 等). Studied on raspberry *in vitro* culture and micro-reproduction[J]. China South Fruits(中国南方果树), 2005, 34(3):71-72. (in Chinese)
- [31] WU Y J, XIE M, JIANG G H, et al(吴延军, 谢鸣, 蒋桂华, 等). *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaves of Blackberry (*Rubus occidentalis* L.). Journal of Fruit Science(果树学报), 2006, 23(3):468-470. (in Chinese)
- [32] NOVOA C O y de, CONNER A J. Responses of *Rubus* genotypes to strains of *Agrobacterium*[J]. Journal of Genetics and Breeding, 1991, 45(4): 359-368.
- [33] FARIA M J S S de, DONNELLY D J, COUSINEAU J C. Adventitious shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of red raspberry [J]. Arquivos de Biologiae Tecnologia, 1997, 40(3): 518-529.
- [34] MATHEWS H, WAGONER W, COHEN C, et al. Efficient genetic transformation of red raspberry, *Rubus idaeus* L.[J]. Plant Cell Reports (Historical Archive), 1995, 14(8):471-476.
- [35] GRAHAM J, MCNICOL R J, KUMAR A. Use of the GUS gene as a selectable marker for *Agrobacterium* -mediated transformation of *Rubus*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 20(1): 35-39.
- [36] JANECKOVA M, FRIEDRICH A. *In vitro* cocultivation of leaf discs with transformed raspberry callus - possible method of genetic transformation[J]. Vedecke-Prace-Ovocnarske, 1996(15): 17-20.
- [37] MEZZETTI B, LANDI L, PANDOLFINI T, et al. The defH9-iaaM auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry[J]. BMC-Biotechnology, 2004, 4(4): 79-82.
- [38] MEZZETTI B, COSTANTINI E, CHIONCHETTI F, et al. Genetic transformation in strawberry and raspberry for improving plant productivity and fruit quality[J]. Acta Horticulturae, 2004(649): 107-110.
- [39] MEZZETTI B, LANDI L, SPENA A. Biotechnology for improving *Rubus* production and quality [J]. Acta Horticulturae, 2002(585): 73-78.