

· 基础研究 ·

蓝莓离体叶片胚状体高效发生及其组织学观察

崔广荣, 陆峰, 曹华龙, 刘森才, 丁为群, 张子学

(安徽科技学院植物科学系, 安徽凤阳 233100)

摘要:以高灌蓝莓试管苗叶片为外植体,以改良 WPM 为基本培养基,研究了外源激素 TDZ、ZT 及其组合对离体叶片胚状体发生的影响,同时也探讨了蔗糖浓度、水解酪蛋白、椰汁等对胚状体发生、丛芽形成的影响。结果表明:不同浓度的外源激素 TDZ、ZT 及其组合对胚状体的发生频率、丛芽的形成和生长起重要作用;蔗糖浓度对胚状体的发生及丛芽的生长影响较大,而添加有机质则对胚状体的发生及丛芽的生长没有明显影响。适合高灌蓝莓叶片胚状体发生及成苗的培养基为 WPM + TDZ 0.04 mg/L + ZT 0.25 ~ 2.0 mg/L + 蔗糖 20 ~ 40 g/L,而培养基 WPM + ZT 0.5 ~ 1.0 mg/L + 蔗糖 20 g/L 适合于丛芽继代生长。组织学观察表明,蓝莓叶片胚状体发生主要起源于叶上表皮细胞和部分叶肉细胞,可能为多细胞起源,历经多细胞原胚、原球胚、梨形胚、心形胚、子叶胚等发育阶段,并能直接发育成苗。

关键词:蓝莓; 组织培养; 胚状体; 组织学观察

中图分类号:Q631; Q943.1

文献标识码:A

文章编号:1007-7146(2008)05-0599-09

High Efficient Somatic Embryogenesis on Leaf Explants of Blueberry *in vitro* Culture and Histological Observations

CUI Guang-rong, LU Feng, CAO Hua-long, LIU Miao-cai, DING Wei-qun, ZHANG Zi-xue
(The School of Plant Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China)

Abstract: The tube plantlet leaves of blueberry were used as explants to culture in the modified WPM basal medium which contained different kinds of plant hormones, different concentrations of sucrose and organic matter. The effects of different concentrations of two kinds of plant hormones TDZ (thidiazuron), ZT (zeatin) and their combinations on somatic embryogenesis and crowd shoots growth were studied *in vitro* culture. Meanwhile, the influences of the concentrations of sucrose (w/v), coconut water (v/v) and casein hydrolysate on somatic embryogenesis and crowd shoots formation were also studied. The results showed that different concentrations of cytokinins TDZ and ZT played an important role in the somatic embryogenesis and crowd shoots growth. The concentration of sucrose had a marked effect on embryoid formation and crowd shoots growth. However, adding organic matter of coconut water and casein hydrolysate had no evident effect on embryoid formation and crowd shoots growth. The optimum medium for somatic embryogenesis is WPM + TDZ 0.04 mg/L + ZT 0.25 ~ 2.0 mg/L + sucrose 20 ~ 40 g/L while the medium WPM + ZT 0.5 ~ 1.0 mg/L + sucrose 20 g/L was suitable for crowd shoots growth. The results of histological observations indicated that somatic embryos originated from upper epidermis cells and mesophyll cells. The course of somatic embryos development, which included the phases of multicellular proembryo, pear-shaped embryo, globular embryo, heart-shaped embryo and cotyledon-

收稿日期:2008-01-10;修回日期:2008-04-16

基金项目:安徽省自然科学基金项目(070411010);安徽省教育厅省级自然科学基金项目(KJ2007B053)

作者简介:荣(1964—),男,副教授,主要从事植物生物技术相关的教学和研究工作。(电话)13855066873;(电子邮箱)cuiqr@ah163.com

shaped embryo etc., was similar to other plants. Finally, the somatic embryos became crowd shoots and plantlets.

Key words: blueberry; plant tissue culture; embryoid; histological observation

蓝莓(blueberry)又名越橘,为杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium*)植物,为多年生落叶或长绿灌木类果树。高灌蓝莓(highbush blueberry)原产美国,其蓝色浆果富含多种维生素及微量元素,具有抗氧化、抗衰老、预防多种老年性疾病,因此被认为是集营养和保健于一身的果树新品而风靡欧美^[1-3]。近年来,我国多个省的不同地区也进行了引种和栽培^[2-3]。植物组织培养技术是实现植物快速繁殖和工厂化育苗的重要途径。国外开展高灌蓝莓组织培养进行快速繁殖的研究相对较早,已经对多个品种的离体培养进行了广泛的研究^[1, 4-10],近几年国内在这方面的研究工作也陆续开展^[2, 11-14],但国内外有关高灌蓝莓叶片离体胚状体直接发生、植株高效再生及其组织学观察尚未见报道。胚状体(embryoid)又名体细胞胚胎(somatic embryo, SE),是植物组织培养过程中植株再生的重要途径之一^[15-22]。通过体细胞胚胎直接发生途径再生植株,可避免或减少愈伤组织培养再生途径而产生的对种苗优良性状不利的无性系变异,并可通过生物反应器实现大规模的繁殖及人工种子的研制^[16-17]。本研究通过外源激素的调控、蔗糖浓度的调节和有机质的添加,优化蓝莓离体叶片体细胞胚胎发生及植株再生体系,利用组织切片方法,揭示体细胞胚胎发生发育的组织学特征,为进一步利用蓝莓离体叶片培养进行转基因研究、化学诱变新种质及蓝莓体细胞胚胎发生发育机理研究奠定基础,为蓝莓工厂化育苗及人工种子的研制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料为通过茎段培养获得的试管苗,品种为“蓝丰(bluecrop)”。基本培养基为改良的WPM(Lloyd & McCown, 1980),主要激素为TDZ(thidiazuron)、ZT(zeatin),购于上海稼丰园艺用品公司。

1.2 方法

1.2.1 材料培养及统计 将继代培养2个月的试管苗叶片切下,切去叶柄和少量的叶尖部分,随机接种于含有不同浓度激素组合的改良WPM(Lloyd & McCown, 1980)培养基中(各处理激素浓度及组合见表1),在激素处理筛选的基础上,再依次进行蔗糖浓度和添加有机质(各处理的浓度分别见表2、3)的培

养和筛选。培养基pH值高压蒸汽灭菌前用1.0 mol/L的KOH调节至5.4。每个处理10瓶,每瓶接种5个叶片,培养室温度为(25±1)℃。30 d统计叶片丛芽(胚状体发育形成)发生率,45 d后继代培养丛芽,使苗长高,继代培养25 d统计每个叶片相应形成的苗数(苗高>0.5 cm才计入)。各阶段培养的光照周期为12/12 h,光照强度为1 500 Lx~2 000 Lx。数据分析采用邓肯氏测验法(Duncan' Test)。

1.2.2 石蜡切片制作及拍照 以1.1.1中筛选的最佳培养基进行胚状体诱导,接种后每隔5 d取样进行切片制作,以进行叶片细胞组织动态变化观察。石蜡切片制作参照参考文献[18]方法并略作修改,切片厚度为8 μmol/L,番红、固绿染色,OLYMPUS(型号为U-CMAD3,日本)显微镜观察、数码拍照。培养材料拍照用数码相机拍照。

2 结果与分析

2.1 外源激素对叶片胚状体发生及成苗的影响

表1的结果显示,不使用任何外源激素的处理I-1无胚状体的发生和苗的产生,而单独使用1种激素或2种激素均能诱导出胚状体,表明两种外源激素TDZ和ZT对高灌蓝莓叶片离体胚状体的发生均起着重要作用。单独使用TDZ时,各处理(处理I-2~5)间胚状体形成率差异显著,胚状体最高形成率可达90%;单独使用ZT时,胚状体发生率除了处理I-6与11间无显著差异外,各处理(处理I-6、11或16、21)间也存在显著差异,但最高形成率仅为38%,从丛芽45 d的生长状况来看,TDZ浓度达0.02%~0.04%时,形成的丛芽密而多(图版II-A、B),而ZT在所有的浓度下,丛芽相对稀少,在低浓度时叶片仅有少数植株形成而无丛芽产生。显然在胚状体发生作用过程中,TDZ的作用效应比ZT强得多。虽然单独使用ZT形成的丛芽数少或不形成丛芽,但形成的苗相对较为健壮且苗相对较高,处理I-11、16尤为突出,可用于苗继代生长培养使用。在2种激素组合使用的情况下,表现出明显的协同效应^[21],且随着2种激素浓度的提高,胚状体发生率有逐渐增高的趋势,但在TDZ浓度达到0.04%时,增加并不明显,即使ZT的浓度为0.25%,胚状体发生率也能达到96%,继代培养使芽苗长高的情况也无差异,因为在此激素浓度组合的条件下,培养45 d

的叶片表面的不定芽已经相当的密集(图版Ⅱ-B), 过于密集的丛芽可能是芽苗难以长高的一个原因。整体上来看, 在本试验条件下, 高灌蓝莓叶片离体培养胚状体诱导较为容易, 最高诱导率可达100%, 芽点状突起产生的时间较短(离体培养13 d ~ 14 d),

在基本培养基 WPM 中添加 0.04 mg/L TDZ 和 0.25 ~ 2.0 mg/L ZT 的条件下, 均可高效诱导出胚状体并直接成苗, 继代生长 20 d, 单片叶平均形成的高于 0.5 cm 的苗的株数最高可达 22.8。另外, 在所有的处理中均没有愈伤组织产生。

表1 外源激素对胚状体形成及成苗的影响

Tab. 1 Effects of hormones on embryoid formation and plantlets regeneration

| 处理号 No. of treatments | 激素浓度(mg/L) Concentrations of hormones | | 胚状体形成率(%) 及差异 Ratio of embryoid formation and differences | 芽点突起形成 的时间 Beginning time of shoots formation | 丛芽生长状况 State of crowd shoots growth | 单叶片平均 形成苗数 Shoots number of single leaf segment |
|-----------------------------|--|-------|---|---|---|--|
| | TDZ | ZT | | | | |
| I-1 | 0.000 | 0.000 | 0 ^f | | | |
| I-2 | 0.005 | 0.000 | 26 ^e | 14 | 稀、少 | 3.3 ^d |
| I-3 | 0.010 | 0.000 | 60 ^c | 13 | 稀、少 | 7.8 ^c |
| I-4 | 0.020 | 0.000 | 74 ^{bc} | 13 | 较密、多 | 7.7 ^c |
| I-5 | 0.040 | 0.000 | 90 ^{ab} | 13 | 较密、多 | 13.4 ^b |
| I-6 | 0.000 | 0.250 | 4 ^f | 15 | 无从芽 | 1.9 ^e |
| I-7 | 0.005 | 0.250 | 38 ^d | 13 | 稀、较少 | 3.9 ^d |
| I-8 | 0.010 | 0.250 | 62 ^c | 13 | 较密、多 | 13.5 ^b |
| I-9 | 0.020 | 0.250 | 82 ^b | 13 | 密、多 | 17.0 ^{ab} |
| I-10 | 0.040 | 0.250 | 96 ^a | 13 | 密、多 | 22.8 ^a |
| I-11 | 0.000 | 0.500 | 18 ^{ef} | 13 | 无从芽 | 2.4 ^e |
| I-12 | 0.005 | 0.500 | 40 ^d | 13 | 稀、较少 | 3.8 ^d |
| I-13 | 0.010 | 0.500 | 72 ^{bc} | 13 | 较密、多 | 5.1 ^{cd} |
| I-14 | 0.020 | 0.500 | 78 ^{bc} | 13 | 密、多 | 14.4 ^b |
| I-15 | 0.040 | 0.500 | 98 ^a | 13 | 密、多 | 22.6 ^a |
| I-16 | 0.000 | 1.000 | 20 ^{ef} | 13 | 丛芽少 | 3.5 ^d |
| I-17 | 0.005 | 1.000 | 38 ^d | 13 | 稀、少 | 7.6 ^c |
| I-18 | 0.010 | 1.000 | 72 ^{bc} | 13 | 较密、多 | 12.9 ^b |
| I-19 | 0.020 | 1.000 | 82 ^b | 13 | 密、多 | 19.9 ^a |
| I-20 | 0.040 | 1.000 | 98 ^a | 13 | 密、多 | 20.8 ^a |
| I-21 | 0.000 | 2.000 | 38 ^d | 13 | 丛芽少 | 4.0 ^d |
| I-22 | 0.005 | 2.000 | 58 ^c | 13 | 较稀、较多 | 8.0 ^c |
| I-23 | 0.010 | 2.000 | 80 ^b | 13 | 密、多 | 14.3 ^b |
| I-24 | 0.020 | 2.000 | 90 ^{ab} | 13 | 密、多 | 20.1 ^a |
| I-25 | 0.040 | 2.000 | 100 ^a | 13 | 密、多 | 22.5 ^a |

注:基本培养基为 WPM + 蔗糖 20 g/L; a, b, c, d, e 表示在 5% 水平上差异显著。单叶片形成苗数计算时, 死亡的叶片不计入(表 2, 3 同)。

Note: Basal medium is WPM + sucrose 20 g/L; a, b, c, d, e represent significant differences at 5% level. Death leaves didn't calculate in number of leaves forming shoots (same as table 2, 3).

2.2 蔗糖浓度对叶片胚状体发生的影响

表 2 的结果表明, 蔗糖对蓝莓离体叶片胚状体的发生影响较大。无糖培养基中培养的叶片无胚状体和芽的形成, 并逐渐黄化, 其余各处理中均能形成胚状体和丛芽, 但丛芽的数量、生长状态、单叶片成

苗数的差异较大。在低浓度处理 II-2 中, 苗玻璃化状况较为严重, 芽数量相对也较少; 在高浓度处理 II-6 中, 形成的芽苗畸形、呈僵化状态, 且不定芽出现的时间也相对较迟; 在处理 II-4, 5 中形成的芽多而密, 且颜色呈正常的绿色, 继代成苗数也较

多。可见蔗糖这个碳源和能源为蓝莓叶片胚状体发生所必须,其不同浓度所形成的不同渗透压对不定芽的生长发育也产生重大影响,适合蓝莓叶片离体

培养的蔗糖浓度为 20 ~ 40 g/L。各处理叶片及芽生长状况见版图 I -A ~ F。

表 2 蔗糖浓度对胚状体形成及成苗的影响

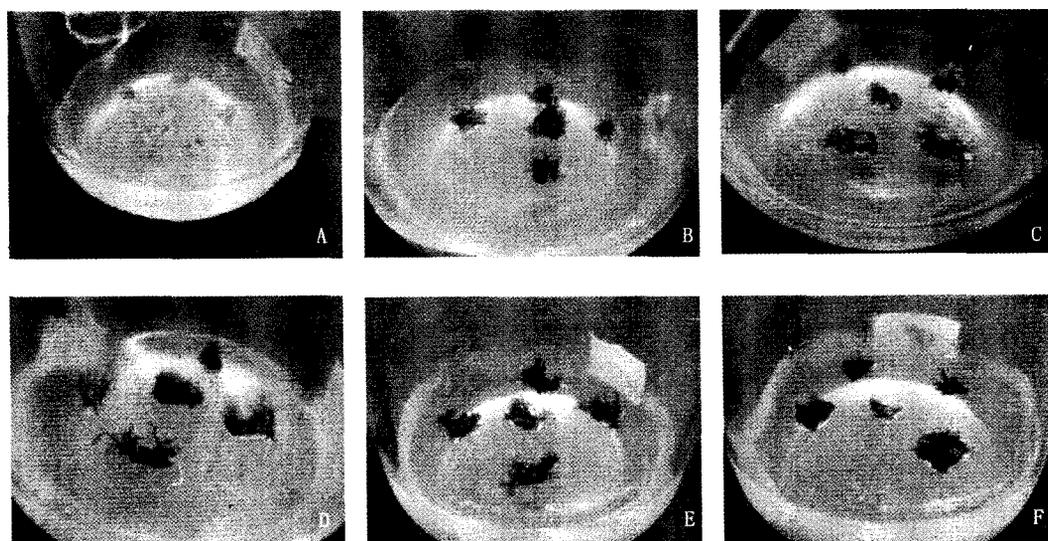
Tab. 2 Effects of sucrose concentrations on embryoid formation and plantlets regeneration

| 处理号 No. of treatments | 蔗糖浓度(g/L) Concentrations of sucrose | 胚状体形成率(%) 及差异 Ratio of embryoid formation and differences | 芽点突起形成 的时间 Beginning time of shoots formation | 丛芽生长状况 State of crowd shoots growth | 单叶片平均 形成苗数 Shoots number of single leaf segment |
|-----------------------------|---|---|--|---|--|
| II-1 | 0.0 | 0 | | | |
| II-2 | 5.0 | 88.0 ^{ab} | 13 | 芽数较少,部分出现玻璃化, 浅绿色芽 | 6.3 ^b |
| II-3 | 10.0 | 98.0 ^a | 13 | 芽数较少,生长正常, 浅绿色芽 | 7.3 ^b |
| II-4 | 20.0 | 100 ^a | 13 | 芽数多而密,生长正常, 绿色芽 | 23.7 ^a |
| II-5 | 40.0 | 98.0 ^a | 13 | 芽数多而密,生长正常, 黄绿色芽 | 24.1 ^a |
| II-6 | 80.0 | 90.0 ^{ab} | 17 | 芽数较多,似僵化,畸形, 黄绿色芽 | 9.4 ^b |

注:基本培养基为 WPM + TDZ 0.04 mg/L + ZT 0.25 mg/L; a、b 表示在 5 % 水平上差异显著。

Note: Basal medium is WPM + TDZ 0.04 mg/L + ZT 0.25 mg/L; a, b, represent significant difference at 5 % level.

图版 I (Plate I)



图版 I 说明: A. 蔗糖浓度为 0 g/L 时叶片生长状况; B. 蔗糖浓度为 5 g/L 时叶片生长状况; C. 蔗糖浓度为 10 g/L 时叶片生长状况; D. 蔗糖浓度为 20 g/L 时叶片生长状况; E. 蔗糖浓度为 40 g/L 时叶片生长状况; F. 蔗糖浓度为 80 g/L 时叶片生长状况。

Explanation of plate I: A. Leaves growth in the medium containing 0 g/L sucrose; B. Leaves growth in the medium containing 5 g/L sucrose; C. Leaves growth in the medium containing 10 g/L sucrose; D. Leaves growth in the medium containing 20 g/L sucrose; E. Leaves growth in the medium containing 40 g/L sucrose; F. Leaves growth in the medium containing 80 g/L sucrose.

2.3 添加有机质对叶片胚状体发生的影响

从表 3 可见, 添加有机质水解酪蛋白和新鲜椰汁对蓝莓叶片胚状体发生、不定芽的生长及单片叶平均成苗数没有显著影响, 只是在添加椰汁后芽苗

的颜色变深, 表明蓝莓叶片离体培养对添加有机质不敏感, 这与文心兰、蝴蝶兰等洋兰^[18,21]叶片离体诱导胚状体有着较大的差异。具体原因有待于进一步研究。

表 3 有机质对胚状体形成及成苗的影响

Tab. 3 Effects of organic matter on embryoid formation and plantlets regeneration

| 处理号 No. of treatments | 有机质 Organic matter | | 胚状体形成率 (%) 及差异 Ratio of embryoid formation and differences | 芽点突起形成 的时间 Beginning time of shoots formation | 丛芽生长状况 Condition of crowd shoots growth | 单叶片平均形成苗数 Shoots number of single leaf segment |
|-----------------------------|---|------------------------------|--|--|---|--|
| | 水解酪蛋白 (g/L) Casein hydrolysate | 椰汁 (V/V) Coconut water | | | | |
| Ⅲ-1 | 1.0 | | 100 | 13 | 芽数多, 生长正常, 绿色芽 | 23.0 ^a |
| Ⅲ-2 | 2.0 | | 98 | 13 | 芽数多, 生长正常, 绿色芽 | 22.7 ^a |
| Ⅲ-3 | 4.0 | | 100 | 13 | 芽数多, 生长正常, 绿色芽 | 23.4 ^a |
| Ⅲ-4 | 1.0 | 5 % | 98 | 13 | 芽数多, 生长正常, 深绿色芽 | 23.5 ^a |
| Ⅲ-5 | 2.0 | 10 % | 98 | 13 | 芽数多, 生长正常, 深绿色芽 | 22.9 ^a |
| Ⅲ-6 | 4.0 | 20 % | 96 | 13 | 芽数多, 生长正常, 深绿色芽 | 24.5 ^a |

注: 基本培养基为 WPM + TDZ 0.04 mg/L + ZT 0.25 mg/L + sucrose 20 g/L; a 表示在 5 % 水平上差异显著。

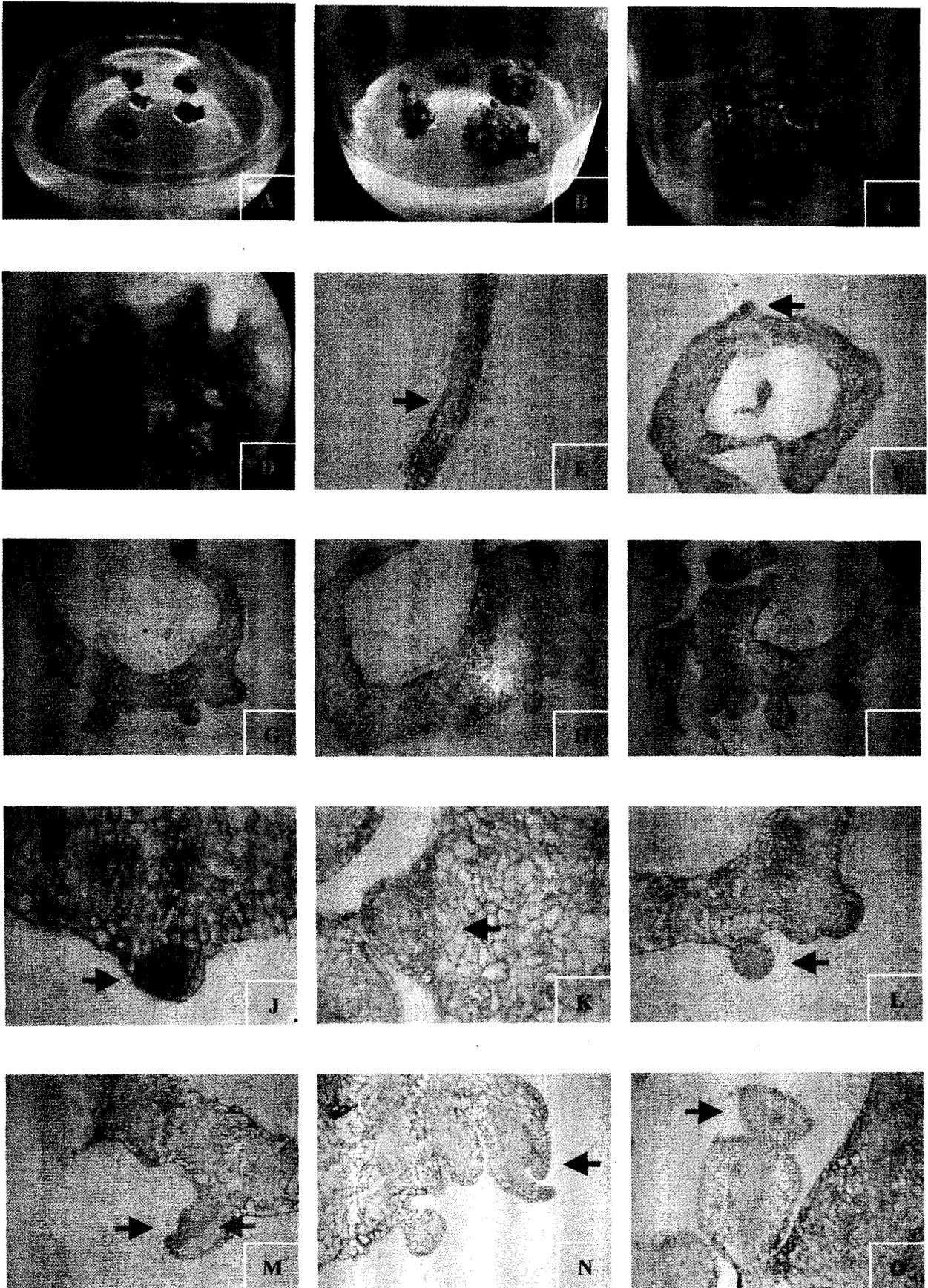
Note: Basal medium is WPM + TDZ 0.04 mg/L + ZT 0.25 mg/L + sucrose 20 g/L; a represent significant difference at 5 % level.

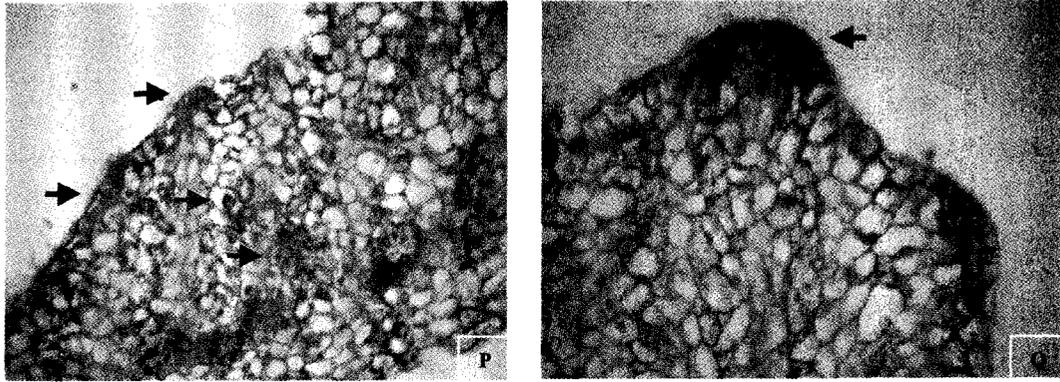
2.4 蓝莓离体叶片胚状体发生发育的细胞组织学特征

图版 II-E~I 组织切片图片表明, 胚状体在 25 d 内基本完成其发生、发育和形成芽的全过程。叶片离体培养 5 d 时, 叶片少数的表皮细胞核开始变大, 但并不明显 (图版 II-E 箭头所示); 叶片培养至 10 d 时, 叶片表面已经出现突起 (图版 II-F 箭头所示), 这是叶表皮细胞起源的多细胞原胚, 图象倍数放大 (图版 II-J) 后可以清楚地看到, 此时的多细胞原球胚已经与周围的组织有着明显的界限, 细胞核大、核质浓厚、细胞相对较小, 与周围组织界限明显, 符合典型的体细胞胚胎的特征。实际上叶片细胞在离体培养的 5~10 d 内发生着较为复杂的变化, 进一步放大倍数的图版 II-P、Q 结构 (培养 10 d 的切片) 可以清楚地说明这一点。细胞表皮出现了大量的胚性细胞 (黑色箭头所示), 同时在叶肉组织中也存在一些散在的胚性细胞团和单个胚性细胞 (红色箭头所示), 这说明离体培养叶片胚状体的起源既可以是叶片表

皮细胞也可以是叶肉细胞, 也可以是表皮细胞和叶肉细胞共同起源的 (图版 II-Q)。但后期的组织切片显示, 胚状体以叶表皮细胞起源或表皮细胞与其下方联系紧密的叶肉细胞共同起源为主, 在叶肉组织内部很少发现结构明显的胚状体结构 (图版 II-K 箭头所示叶肉细胞起源的梨形胚)。在胚状体起初发生的区域, 往往是多个胚性细胞一起 (图版 II-Q), 既有叶肉细胞 (红色箭头所示) 又有表皮细胞 (黑色箭头所示), 但看不出这些细胞是由单个细胞分裂而形成的多细胞原胚, 由此可以推测, 蓝莓离体叶片体细胞胚胎的发生可能是多细胞起源的。叶片培养至 15 d 时, 叶片表面的突起更加明显, 有类似于不定芽体的出现, 图版 II-G 的组织结构显示, 胚状体此时已经有球形胚和心形胚产生, 放大倍数图片 L 和 M (黑色箭头所示) 清楚地显示球形胚和心形胚的结构。这两种胚与母体组织的结构界限更加明显, 在胚体联系部位的其它细胞大而组织结构松散, 心形胚内部形成典型的“Y”形的微管组织雏形 (图版 II-M、O 红

图版 II (Plate II)





图版 II 说明: A. 培养 25 d 的丛芽; B. 培养 45 d 的丛芽; C. 丛生芽苗继代生长; D. 解剖镜下叶表面及伤口处形成的成熟胚状体的形态(30×); E~I. 依次为培养 5、10、15、20、25 d 的叶片切片整体图(50×); J. 多细胞原胚(箭头所示;200×); K. 梨形胚(箭头所示;100×); L. 球形胚(箭头所示;100×); M. 心形胚(箭头所示;100×); N. 子叶胚(100×); O. 次生胚(黑色箭头所示;)和胚内部“Y”形的微管组织雏形(红色箭头所示;100×); P. 叶片表皮胚性细胞(黑色箭头所示)和叶肉组织内部的胚性细胞团和一些散在的胚性细胞(红色箭头所示;200×); Q. 表皮细胞和叶肉细胞共同形成的早期多细胞原胚(200×)。

Explanation of plate II: A. Crowd shoots formed on the surface of leaf segments cultured in vitro for 25 days; B. Crowd shoots formed on the surface of leaf segments cultured in vitro for 45 days; C. Crowd shoots subcultured and growth; D. Mature embryo or shoot bud formed on the surface of leaf segments under dissecting microscope(30×); E~I. Complete section photos of leaf segments inoculated for 5, 10, 15, 20 and 25 days (50×); J. Multicellular proembryo (arrow, 200×); K. Pear-shaped embryo (arrow, 100×); L. Globular embryo (arrow, 100×); M. Heart-shaped embryo (arrow, 100×); N. Cotyledon-shaped embryo (arrow, 100×); O. Secondary embryo (black arrow) and “Y” shaped microtubule tissue (red arrow, 100×); P. Embryogenic cells or tissue of leaf upper epidermal layers (black arrow) and mesophyll (red arrow, 100×); Q. Multicellular proembryo formed by leaf upper epidermal layer cells (black arrow) and mesophyll cells (red arrow, 100×).

色箭头所示)。图版 II-H和 N(箭头所示)组织结构表明,叶片离体培养 20 d 时,子叶胚已经形成,叶片表面形成更多的不定芽状突起。叶片培养至 25 d 时,叶片表面突出芽体更加密集(图版 II-I),尤其在叶尖和叶柄基部的伤口部位(图版 II-D)。此外,在一些较大的胚体发育过程中,发育后期胚体的表面还可形成次生胚(图版 II-O 箭头所示)。总体来看,蓝莓叶片在此离体培养条件下,历经多细胞原胚、球形胚、梨形胚、心形胚、子叶胚等发育过程,最终形成肉眼可见的芽体(图版 II-D),并能直接成苗(图版 II-B)。这与一般植物胚状体发育过程相似^[15],但其发生上更倾向于多细胞起源。在所有切片中,胚状体只在叶片的上表面形成,在叶片的下表面未发现胚状体形成,这与作者报道的蝴蝶兰叶片离体培养胚状体发生发育过程相似^[21]。从本试验动态的组织切片过程中,还可以推测出蓝莓离体培养叶片体细胞胚胎各发育阶段的大致时间:胚性细胞 1~5 d;胚性细胞团和多细胞原胚 6~10 d;球形胚、梨形

胚、心形胚 11~15 d;子叶胚 16~20 d。

3 结论与讨论

3.1 结论

不同浓度外源激素 TDZ 和 ZT 对蓝莓叶片的离体培养胚状体直接发生和不定芽的发生影响很大,适合高灌蓝莓叶片离体叶片胚状体及丛芽高效发生的最佳培养基为 WPM + 0.04 mg/L + ZT 0.25~2.0 mg/L + 蔗糖 20~40 g/L, pH 5.4。丛生芽继代培养于 WPM + ZT 0.5~1.0 mg/L + 蔗糖 20 g/L 培养基中,有利于苗的长高。蔗糖浓度对胚状体的发生及丛芽的生长有较大影响,而添加椰汁、水解酪蛋白则影响不明显。蓝莓叶片体细胞胚胎发生发育过程与一般植物相同,主要起源于叶上表皮细胞及紧挨上表皮的部分叶肉细胞,可能为多细胞起源,历经多细胞原胚、球形胚、梨形胚、心形胚、子叶胚等发育阶段,最终形成不定芽和幼苗。

3.2 讨论

据不完全统计,能通过体细胞胚胎发生途径从植物组织培养物诱导胚状体发生的植物种类在150种以上,分布于40多个科,其中包括被子植物几乎所有重要的科和一些裸子植物,这表明胚状体发生在高等植物中是一个普遍的现象^[15,22]。蓝莓叶片离体培养的相关研究结果认为再生植株是通过器官发生途径进行的^[5-6,8-10,13],本试验结果表明,高灌蓝莓叶片的离体再生植株也可通过体细胞胚胎直接发生途径来完成,动态组织切片观察结果清楚地显示了胚状体发生发育典型的基本特征。相关研究关于蓝莓叶片离体再生植株通过器官发生途径的结果可能是因培养体系、品种等差异的缘故。本研究虽仅对蓝莓的一个品种进行了研究,相信其结果对其它蓝莓的品种的相关研究也具有重要的参考价值。高效的体细胞胚胎发生及植株再生体系的建立,为进行转基因研究、实现外源基因的稳定表达、利用化学诱变剂进行新种质诱变等奠定基础^[17-18],同时研究体细胞胚胎发生发育机理对揭示细胞与合子胚的分化、发育和形态发生等理论问题具有重要意义^[15-17,20]。

影响植物离体器官体细胞胚胎发生发育的因素很多,其中外源激素发挥着重要的调节作用^[18,20-22],甚至是关键作用^[23]。大量的研究证明,细胞分裂素与生长素的结合使用有利于体细胞的发生,甚至单独使用细胞分裂素时有的植物也产生胚状体^[20],这在我们的试验中也得到了验证,这可能因植物的种类不同而不同。TDZ对离体植物组织培养的生理效应较其它的细胞分裂素要强的许多,常常用于洋兰叶片的胚状体诱导^[18,24],本试验结果也表明,较低浓度的TDZ诱导蓝莓叶片胚状体的效率远高于ZT。蔗糖不仅是外植体的碳源和能源,也是影响培养基中渗透压的重要因素,不同种类植物的不同外植体对糖浓度的要求存在一定的差异。Cao^[6]等的研究结果表明,不仅糖浓度影响蓝莓芽的增殖,不同糖的种类也影响蓝莓芽的增殖。蔗糖浓度对蝴蝶兰叶片离体培养诱导胚状体发生也产生重要影响^[21]。其它蓝莓品种胚状体发生发育及影响蓝莓叶片胚状体发生发育的因素、胚状体发生的生理机制等问题尚有待于进一步研究。

致谢

感谢南京农业大学园艺学院陈发棣教授研究室在组织切片观察、拍摄中给予的方便!

References

- [1] BILLINGS S G, CHIN C K, JELENKOVIC G. Regeneration of Blueberry Plantlets from Leaf Segments[J]. HortScience, 1988, 23:63-766.
- [2] 王侠礼, 钟士传, 郑亚琴, 等. 美国高灌蓝莓的引进及微体快繁技术研究[J]. 中国种业, 2003, 12:40-41.
WANG Xia-li, ZHONG Shi-chuan, ZHENG Ya-qing, et al. Introduction of America Highbush Blueberry and Study on the Technique of Micropropagation[J]. Chinese Seeds, 2003, 12: 40-41.
- [3] 聂飞, 韦吉梅, 文光琴. 蓝莓的经济价值及其在我国产业化的前景探讨[J]. 贵州农业科学, 2007, 35(1):117-119.
NIE Fei, WEI Jie-mei, WEN Guang-qin. Discussion on Economical Values of *Vaccinium* ssp. and Its Industrial Development Prospect in China[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2007, 35 (1):117-119.
- [4] WOLFE D E, ECK P, CHEE-KOK C. Evaluation of Seven Media for Micropropagation of Highbush Blueberry[J]. Hortscience, 1983, 18:703-705.
- [5] GUO-QING SONG, K C SINK. Agrobacterium Tumefaciens-mediated Transformation of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) [J]. Plant Cell Rep, 2004, 23:475-484.
- [6] CAO X, FORDHAM I, DOUGLASS L, et al. Sucrose Level Influences Micropropagation and Gene Delivery into Leaves from *in vitro* Propagated Highbush Blueberry Shoots[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2003, 75:255-259.
- [7] CALLOW P, HAGHIGHI K, GIROUX M, et al. *In vitro* Shoot Regeneration on Leaf Tissue from Micropropagated Highbush Blueberry[J]. HortScience, 1989, 24:372-375.
- [8] CAO X, HAMMERSCHLAG F A. Improved Shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbush Blueberry[J]. HortScience, 2000, 35:945-947.
- [9] 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.
- [10] ROWLAND L J, OGDEN E L. Use of a Cytokinin Conjugate for Efficient Shoot Regeneration from Leaf Sections of Highbush Blueberry[J]. HortScience, 1992, 27:1127-1129.
- [11] 黄文江, 刘庆忠, 阚显照. 高灌蓝莓离体繁殖的研究[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版), 2004, 27(3)314-317.
HUANG Wen-jiang, LIU Qing-zhong, KAN Xian-zhao. In vitro Micropropagation of High Blueberry[J]. Journal of Anhui Normal University (Natural Science), 2004, 27(3)314-317.
- [12] 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, 35(2)129-134.
MA Huai-yu, LI Ya-dong, LIU Qing-zhong, et al. Regeneration of Highbush Blueberry Plantlets from Leaf Section [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2004, 35 (2): 129-134.
- [13] 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):0610-0614
TAO Jian-min, GENG Qi-fang, ZHUANG Zhi-min, et al.

- Construction of the High-efficiency Regeneration System of Blueberry with Its Leaves[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2006, 26(3):0610-0614.
- [14] 刘庆忠, 赵红军. 高灌蓝莓的组织培养及快速繁殖[J]. *植物生理通讯*, 2002, 38(3):253.
- LIU Qing-zhong, ZHAO Hong-jun. Tissue Culture and Rapid Propagation of *Vaccinium corymbosum* [J]. *Plant Physiology Communication*, 2002, 38(3):253.
- [15] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学(第1版)[M]. 北京: 科学出版社, 2000, 12:8-11
- CUI Kai-rong, DAI Ruo-lan. *Plant Somatic Embryogenesis Molecular Biology* (1st ed)[M]. Beijing: Science Press, 2000, 12:8-11.
- [16] AHLÖWALIA B S. Somatic Embryos in Monocots: Their Genesis and Genetic Stability[J]. *Rev Cytol Biol Veget-Bot*, 1991, 14: 223-235.
- [17] QIAN ZHANG, JIANJUN CHEN, RICHAD J HENNY. Regeneration of *Syngonium podophyllum* 'Variegatum' through Direct Somatic Embryogenesis[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2006, 84: 181-188.
- [18] J T CHEN, C CHANG, W C CHANG. Direct Somatic Embryogenesis on Leaf Explants of *Oncidium Gower Ramsey* and Subsequent Plant Regeneration[J]. *Plant Cell Rep*, 1999, 19: 143-149.
- [19] LLOYD E, MCCOWN B. Commercially Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia Latifolia*, by Use of Shoot Tip Culture[J]. *Proc Intl Plant Prop Soc*, 1980, 30:421-427.
- [20] 郑艳红, 熊庆娥. 植物体细胞胚胎发生的研究进展[J]. *四川农业大学学报*, 2003, 21(1):59-63.
- JIA Yan-hong, XIONG Qing-e. Advance in Research on Plant Somatic Embryogenesis[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2003, 21(1):59-63.
- [21] 崔广荣, 侯喜林, 张子学, 等. 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体发生及组织学观察[J]. *园艺学报*, 2007, 34(2):431-436.
- CUI Guang-rong, HOU Xi-lin, ZHANG Zi-xue, et al. Efficient Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of *Phalaenopsis* in vitro Culture and Histological Observations[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(2):431-436.
- [22] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003, 7:84-86.
- ZHU Zhi-qing. *Plant Cell Engineering* (1st ed)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003, 7: 84-86.
- [23] THOMAS C, JIMENES V M. Model of Action of Hormones and Plant Growth Regulators during Induction of Somatic Embryogenesis Molecular Aspects[M]. *Plant Cell Monogr*(2), Published online, 2005:157-175.
- [24] CHEN J T, CHANG W C. Direct Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Phalaenopsis amabilis* [J]. *Biologia Plantarum*, 2006, 6:169-173.