

黑莓叶片组织培养及植株再生的初步研究

李从玉, 廖伍金 (长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 430025)

摘要 以美国黑树莓叶片作为外植体, 以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA、NAA 或 IAA 进行愈伤组织诱导及植株再生试验。结果表明: 树莓叶片外植体在培养基 MS + 6-BA 2.0~4.0 mg/L + NAA(IAA) 0.01~0.5 mg/L 都能不同程度地形成愈伤组织, 但以 MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 和 MS + 6-BA 4.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 愈伤组织的诱导率最高, 诱导率可达 100%; 所试验的各种不定芽分化培养基, 都能不同程度地诱导愈伤组织分化出不定芽, 在添加 6-BA 2.0 mg/L 和 NAA 0.01 mg/L 的 MS 培养基上, 愈伤组织分化不定芽的比例最高, 达 49.7%; 所产生的不定芽在 1/2 MS + NAA 0.1 mg/L 的培养基上的生根率可达 89.3%。

关键词 黑树莓; 组织培养; 叶片; 植株再生

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)04-0098-02

Tissue Culture and Plant Regeneration of Blackberry

LI Cong-yu et al (Horticulture & Garden College, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 430025)

Abstract The leaves of the blackberry as the explant, and MS contained different concentration of 6-BA, NAA or IAA as the media, the callus induction and the plant regeneration of the blackberry were studied. The results showed that the calluses were induced from the leaf explants on the media of MS + 6-BA 2.0~4.0 mg/L + NAA 0.01~0.5 mg/L and MS + 6-BA 2.0~4.0 mg/L + IAA 0.01~0.5 mg/L. The induction rate was up to 100% on the media of MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L and MS + 6-BA 4.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L. Adventitious buds were induced from the calluses at the frequency of 49.7% on MS medium supplemented with 6-BA 2.0 mg/L and NAA 0.01 mg/L. 89.3% adventitious buds were rooted and induced regenerated plants on 1/2 MS medium supplemented with NAA 0.1 mg/L.

Key words Blackberry; Tissue culture; Leaves; Plant regeneration

黑树莓的营养性、病用性极佳^[1-3], 多年来, 对黑莓组培快繁技术的研究国内外时有报道^[4-15]。笔者试验以树莓叶片为试材, 拟对影响树莓叶片愈伤组织诱导和再生植株的几种植物生长调节剂进行研究, 筛选出合适的生长调节剂组合, 探讨树莓叶片愈伤组织诱导及植株再生技术体系, 为大规模工厂化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 品种为美国黑树莓赫尔(Hull), 以其无菌苗叶片为外植体。

1.2 外植体处理 取生长较健壮的树莓无菌苗, 挑选无损伤的幼嫩叶片作为外植体, 于已消毒的培养皿中切成 0.5 cm² 左右的小块, 叶背朝下平放接种到培养基上。

1.3 培养基 ①愈伤组织诱导培养基为 MS + 6-BA + NAA、MS + 6-BA + IAA, 6-BA 的浓度分别为 2.0、4.0 mg/L, NAA 为 0.01、0.05、0.1 mg/L, IAA 为 0.5 mg/L, 16 个浓度组合。试验不同浓度的 6-BA、NAA 及 6-BA、IAA 组合对愈伤组织诱导的影响。②芽诱导培养基为 MS + 6-BA + NAA, 6-BA 的浓度为 1.0、2.0 mg/L, NAA 的浓度设定与上述相同, 每处理接种材料 25~30 个。③根诱导培养基为 1/2 MS + NAA, NAA 的浓度为 0.01、0.05、0.1、0.5 mg/L, 探讨不同浓度的 NAA 对根诱导的影响, 筛选适宜的生根培养基。以上 MS 培养基中均加琼脂 0.7%, 蔗糖 3%, pH 值均为 5.8~6.0。

1.4 培养条件 温度为 (25 ± 2) °C, 培养室内空气相对湿度为 70% 左右, 光照强度为 1 500~2 000 lx, 每日光照 14 h。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织的诱导 接种约 15 d 后, 叶片开始卷曲, 边缘开始膨大, 同时在伤口边缘形成肉眼可见的愈伤组织, 有部分带有叶柄的外植体则直接从叶柄处长出幼嫩的不定芽, 另有一部分叶片褐化, 没有产生愈伤组织, 接种约 30 d 后, 叶片边

缘切口处和基部叶脉切伤处愈伤组织稍微增多, 且愈伤组织多为黄绿色, 呈半透明状, 较疏松。继续培养 1 周后, 大部分愈伤组织开始变绿, 质地变得更加致密。再继续培养之后发现部分生长较快的愈伤组织开始出现分化, 长出了少量的不定芽。从表 1 可知, 6-BA 4.0 mg/L 诱导率比 6-BA 2.0 mg/L 诱导率明显要好, 而 NAA 和 IAA 2 个试验组之间的差别并不是很明显, 这表明, NAA 和 IAA 在对愈伤组织的诱导效果上没有明显的差异。6-BA 4.0 mg/L 附加 NAA 或 IAA 0.5 mg/L 的处理组诱导效果最好, 基本达到了 100%, 而且愈伤组织的生长速度较快, 生长状态良好, 大部分都呈现出健康的黄绿色, 质地较其他组紧密。另外, 6-BA 4.0 mg/L 附加 NAA 或 IAA 0.05 mg/L 的处理组诱导率也相对较高, 分别达到了 84.5%、92.3%, 但是其愈伤组织的生长状态很不均匀, 大小差异很大。

表 1 不同浓度 6-BA 与 NAA(IAA) 对比对愈伤组织分化的影响

编号	激素组合	外植体		诱导率 %	生长状态
		数/个	愈伤组织 数/个		
A1	BA 2.0 + NAA 0.01	30	12	40.0	黄绿, 较缓慢
A2	BA 4.0 + NAA 0.01	39	30	76.9	黄绿, 较缓慢
B1	BA 2.0 + NAA 0.05	35	17	48.6	黄绿色, 较缓慢
B2	BA 4.0 + NAA 0.05	33	28	84.5	黄绿色, 较快
C1	BA 2.0 + NAA 0.1	30	21	70.0	色黑, 缓慢
C2	BA 4.0 + NAA 0.1	30	24	80.0	色黑, 缓慢
D1	BA 2.0 + NAA 0.5	38	38	100	黄绿色, 快
D2	BA 4.0 + NAA 0.5	40	40	100	黄绿色, 较快
E1	BA 2.0 + IAA 0.01	40	22	55.0	黄绿色, 较缓慢
E2	BA 4.0 + IAA 0.01	38	32	84.2	褐色, 缓慢
F1	BA 2.0 + IAA 0.05	34	8	23.6	白色, 缓慢
F2	BA 4.0 + IAA 0.05	39	36	92.3	绿色, 中等
G1	BA 2.0 + IAA 0.1	35	21	60.0	黄绿至青色, 较小
G2	BA 4.0 + IAA 0.1	39	27	69.0	青色, 小
H1	BA 2.0 + IAA 0.5	31	29	93.5	黄绿色, 较好
H2	BA 4.0 + IAA 0.5	34	34	100	黄绿色, 较好

2.2 不定芽的诱导 在无菌条件下用镊子将愈伤组织分割成若干小块, 剔除附着在愈伤组织上的原有培养基, 然后在

作者简介 李从玉(1961-), 男, 湖北安陆人, 讲师, 从事园艺教学与研究。

收稿日期 2006-09-22

无菌条件下将修理好的愈伤组织小块转移到新鲜的培养基中,在经过大约 40 d 培养后,愈伤组织开始分化出黄绿色的不定芽。大部分的处理组产生不定芽可呈绿色或黄绿色,只有少量的试验组产生深绿色的不定芽。从表 2 可知,MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L 的处理组诱导效果最好,达到了 49.7%,而且诱导的丛芽数目较多,长势也较旺盛。其次是 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L,该组诱导的不定芽数目也较多,长势良好。在添加 NAA 浓度为 0.5 mg/L 的试验组中,愈伤组织绝大部分都没有分化出不定芽,有少量分化出不定芽的,苗势也非常弱小。而且愈伤组织本身也大部分都发生褐变的现象。此外,叶片愈伤组织在附加不同浓度激素的培养基中都不同程度的生根,以 NAA 0.5 mg/L 的处理组生根率最高。

表 2 6-BA 及 NAA 不同浓度组合对不定芽诱导的影响

编号	激素组合	愈伤组织芽数量 诱导率			形态
		数//个	个	%	
A1	BA 1.0 + NAA 0.01	20	39	15.3	长势一般
A2	BA 2.0 + NAA 0.01	26	92	49.7	丛芽较多,生长旺盛
B1	BA 1.0 + NAA 0.05	22	21	20.4	长势一般
B2	BA 2.0 + NAA 0.05	21	76	40.8	长势较好
C1	BA 1.0 + NAA 0.1	19	11	31.9	细弱
C2	BA 2.0 + NAA 0.1	20	3	11.3	细弱
D1	BA 1.0 + NAA 0.5	27	5	12.6	细弱
D2	BA 2.0 + NAA 0.5	29	7	14.6	长势一般

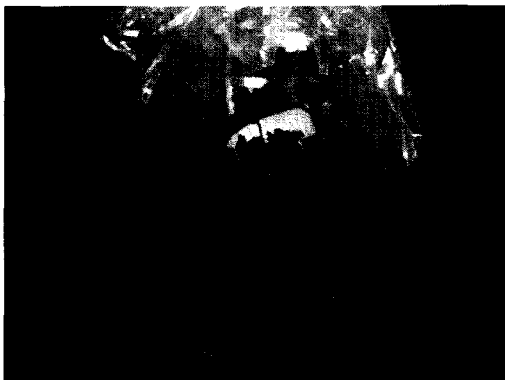


图 1 黑莓组培养的植株

2.3 不定根的诱导 选取高 3 cm 以上生长健壮的小苗转入生根培养基中诱导生根,试验选用 1/2 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 NAA,筛选适宜的生根培养基。NAA 的浓度分别为 0.01、0.05、0.1、0.5 mg/L,共 4 种浓度处理,5 次重复,每个培养皿中接种 5 个幼苗。培养 7 d 后大部分接种苗的基

部长出数量不同的白色不定根。继续培养 20 d 后不定根不断伸长。从诱导效果来看,NAA 0.1 mg/L 试验组最好,诱导率达到了 89.3%,且根系生长健壮,质量好,若再提高 NAA 的浓度则会抑制不定根的形成,故不定根诱导的最适培养基为 1/2 MS + NAA 0.1 mg/L(表 3)。

表 3 不同培养基对根诱导的影响

编号	培养基	接种数		诱导率 %	单根平均长度//cm
		个	条		
1	1/2 MS + NAA 0.01	25	2.2	66.7	1.3
2	1/2 MS + NAA 0.05	25	2.8	74.5	1.9
3	1/2 MS + NAA 0.1	25	4.7	89.3	2.7
4	1/2 MS + NAA 0.5	25	5.2	71.2	1.8

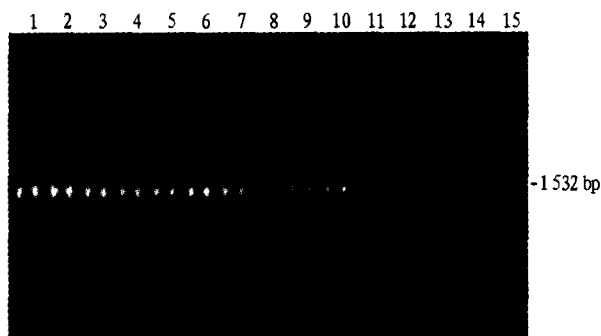
3 结论

利用黑莓的叶片作为外植体,用组织培养的方法能再生出完整植株(图 1-a、b),但是诱导频率相对偏低。试验筛选出最佳诱导愈伤组织培养基 MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA (IAA)0.5 mg/L;最佳诱导不定芽培养基 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L;最佳诱导不定根培养基 1/2 MS + NAA 0.1 mg/L。试验过程中发现,用树莓叶片诱导愈伤组织所需要的时间比较长,大约经过 3 周之后才开始从切口处长出少量的愈伤组织。不定芽的诱导率也偏低,最高 49.7%,最低 11.3%,这可能是受到树莓基因型的影响,树莓叶片再生比较困难^[15]。同时,培养基中的外植体和诱导出的不定芽都不同程度地出现了褐化现象,这对树莓的诱导率影响很大。在进一步的试验时要筛选优化诱导条件和防止外植体褐化。从诱导的愈伤组织的生长状态来看,附加 NAA(IAA)0.5 mg/L 的组合愈伤组织生长较均匀外,其他处理组所诱导的愈伤组织大小都有不同程度的差异,有的培养基中出现了愈伤组织生长状态良好而其他则生长极其缓慢甚至完全没有产生愈伤组织的现象,此现象的原因还有待进一步研究。

通过生根试验,筛选出美国黑莓的最佳生根培养基为 1/2 MS + NAA 0.1 mg/L,NAA 在 0.05 ~ 0.1 mg/L 范围内对芽的诱导效果随浓度的增加而增加,继续增加浓度则会抑制不定根的发生。在相关的研究中也有见不同品种所需激素配比不同的报道,这可能与品种各异,内源激素的含量和自身对激素的要求有关^[16]。

参考文献

- [1] 刘建华,张志军,李淑芳. 树莓中功效成分的开发浅论[J]. 食品科学, 2004(10): 370 - 373.
- [2] 刘春菊,宣景宏,孟宪军. 树莓的营养价值及发展前景[J]. 北方果树, 2004(12): 57 - 58.
- [3] 王文芝. 树莓果实营养成分初报[J]. 西北园艺, 2001(2): 13 - 14.
- [4] 肖亚萍,张志勤,刘全宏. 红树莓植株再生系统的建立[J]. 中草药, 2001, 32(8): 738 - 742.
- [5] 董玉芝,王晓玮,蒋萍. 树莓组织培养及植株再生[J]. 新疆农业大学学报, 2003, 26(1): 28 - 30.
- [6] 吴春花,李莲花. 红树莓茎尖培养与快速繁殖[J]. 延边大学学报, 2003, 25(4): 273 - 277.
- [7] 赵晓光. 树莓的离体培养技术研究[J]. 山东林业科技, 2004(4): 45 - 47.
- [8] 王丽玲,郭军战,陈铁山,等. 树莓和黑莓茎段组织培养研究初报[J]. 经济林研究, 2002, 20(3): 24 - 25.
- [9] 李春艳,汪卫星,向素琼,等. 树莓离体培养与快速繁殖研究[J]. 中国南方果树, 2005, 34(3): 71 - 72.
- [10] 刘文萍. 引进国外树莓品种的组织培养生根试验[J]. 北方园艺, 2005 (4): 79 - 80.



注:1~10为转基因植株;11~12为未转化植株;13为 ddH₂O;14为 pCambia1301-BADH;15为 DL2000 DNA Marker。

图1 PCR检测结果



图2 NaCl浓度为100 mmol/L时未转化植株和转基因植株的生长情况

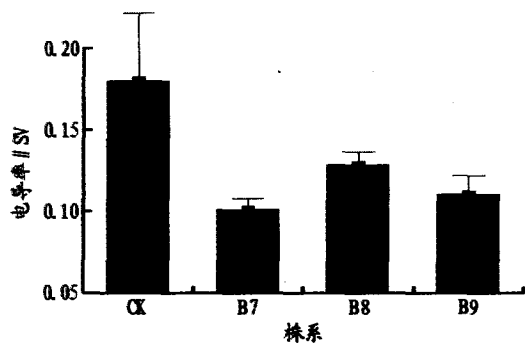


图3 NaCl浓度为50 mmol/L时叶片的相对电导率

株在 NaCl 浓度为 100 mmol/L 时存活率达到 70%^[6]。该试验耐盐筛选测定表明,转基因植株在盐胁迫条件下的生长情况都要好于未转化植株,其在 NaCl 浓度为 100 mmol/L 时仍可生根生长,与上述报道结果一致。

在高等植物体内,甜菜碱以胆碱为底物,经 2 步催化反

为 150 mmol/L 以上时,所有植株都表现出严重的盐害症状。

2.4 转基因植株叶片相对电导率测定 在盐胁迫条件下,植物细胞膜会受到损伤,影响植物生长。在该试验中,取在 50 mmol/L 生根培养基上培养 30 d 的转基因植株及未转化植株叶片,测定其相对电导率。方差分析结果显示,转基因植株的相对电导率都显著低于未转化植株,说明在盐胁迫条件下,转基因植株细胞膜的完整性要好于未转化植株,转基因植株较未转化植株能更好地抵御盐害的影响(图 3)。

3 讨论

邹维华等将反义磷脂酶基因转入美洲黑杨中,转基因植株在 NaCl 浓度为 136 mmol/L 的培养基上仍可生根^[5]。樊军锋等将 mtd/gutD 双价耐盐基因转入 84K 杨树中,转基因植

应生成。该试验将 BADH 基因导入速生杨 107 号中,提高了转基因植株的耐盐性。另外,该实验室曾将 CMO 基因导入速生杨 107 号中,也使转基因植株耐盐性得到提高。如果将这 2 个基因一起转入杨树中,是否会使转基因植株的耐盐水平有更大提高,有待于进一步研究。

参考文献

[1] LI Q L, LIU D W, GAO X R, et al. Cloning of cDNA encoding choline monoxygenase from Suaeda Liaotungensis and salt tolerance of transgenic tobacco[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(2): 242-247.
 [2] 梁铮, 马德钦, 汤岚, 等. 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因在烟草中的表达[J]. 生物工程学报, 1997, 13(3): 236-240.
 [3] 郭北海, 张艳敏, 李洪杰, 等. 甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因转化小麦及其表达[J]. 植物学报, 2000, 42(3): 279-283.
 [4] 杨晓玲, 东方阳, 孙耀中, 等. 转 BADH 基因水稻幼苗抗盐性研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(8): 1627-1632.
 [5] 邹维华, 赵强, 崔德才, 等. 反义磷脂酶 Dy 基因与几丁质酶基因转化美洲黑杨 G2[J]. 林业科学, 2006, 42(1): 37-42.
 [6] 樊军锋, 韩一凡, 李玲, 等. 84K 杨树耐盐基因转化研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(4): 33-37.

(上接第 999 页)

[11] 孙廷, 胡如善, 杨玉珍, 等. 无刺树莓的离体培养和快速繁殖技术研究[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(3): 384-385.
 [12] 朴日子, 曹后男, 朱波, 等. 树莓品种离体培养及植株再生频率的研究[J]. 延边大学学报, 2005, 27(2): 126-132.
 [13] 徐桂娟. 黑树莓的组织培养与快速繁殖[J]. 北京林业大学学报, 2002

(1): 99-100.
 [14] 代汉萍, 谭章华, 黄庆文. 树莓茎尖培养技术及其应用[J]. 中国果树, 2000(4): 18-19.
 [15] 李红星, 杜敬斌, 郭慧苗. 树莓叶片再生研究初报[J]. 中国农学通报, 2005, 11(11): 286-287.
 [16] 王蒂. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.

本刊提示 参考文献只列主要的、公开发表的文献, 序号按文中出现先后编排。著录格式(含标点)如下: (1) 期刊——作者(不超过 3 人者全部写出, 超过者只写前 3 位, 后加“等”)。文章题名[J]. 期刊名, 年份, 卷(期): 起止页码。(2) 图书——编著者. 书名[M]. 版次(第一版不写). 出版地: 出版者, 出版年: 起止页码。(3) 论文集——析出文献作者. 题名[C]//主编. 论文集名. 出版地: 出版者, 出版年: 起止页码。