

汤飞云,方亮,王小敏,等.培养基成分对黑莓 Kiowa 叶片和叶柄愈伤组织诱导的影响[J].江苏农业科学,2013,41(10):42-44.

培养基成分对黑莓 Kiowa 叶片和叶柄愈伤组织诱导的影响

汤飞云,方亮,王小敏,张春红,胡淑英,李维林,吴文龙

(江苏省中国科学院植物研究所,江苏南京 210014)

摘要:为获得适于悬浮培养的优质愈伤组织,以黑莓品种 Kiowa 无菌苗的叶片、叶柄为外植体,研究了不同种类培养基、不同种类糖、不同蔗糖浓度、不同水解酪蛋白浓度对叶片、叶柄愈伤组织诱导的影响。结果表明,不同培养条件下诱导 Kiowa 的叶片和叶柄都可以产生愈伤组织,并且诱导率都为 100%,但愈伤组织的状态和生长势各不相同。以 MS 作为基本培养基,25 g/L 蔗糖作为碳源,200 mg/L 的水解酪蛋白诱导效果最佳,愈伤组织为质地疏松颗粒状嫩黄色愈伤,生长势好。

关键词:黑莓;叶片;叶柄;愈伤组织;组织培养

中图分类号: S663.204⁺.3; Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0042-03

黑莓(*Rubus* spp.)是蔷薇科悬钩子属实心莓亚属的一种多年生浆果类果树^[1],原产于北美,其花朵颜色淡雅迷人,果实色彩艳丽、风味宜人、营养丰富,因此黑莓是一种不可多得的具有观赏和营养保健作用的新型果品^[2-5],也是近年来国内外兴起的第三代水果之一^[6],具有很高的经济价值。

愈伤组织是指形态上没有分化但能进行活跃分裂的一团细胞,离体培养条件下产生的愈伤细胞具有再分化的潜能^[7]。愈伤组织培养具有多种用途,一方面可用于研究植物生长发育及分化机制、遗传变异规律,另一方面可用于细胞培养筛选工业、农业、医药生产上有用的无性系,或用于原生质体培养中的原生质体来源等^[8]。此外,愈伤组织的诱导是植物组织培养中快速繁殖的一条主要途径,也是细胞育种或次生物质生产的重要基础^[9-10]。目前国内对黑莓愈伤组织诱导的研究较少,仅有 2 篇以黑莓叶片、叶柄为外植体进行愈伤组织诱导的研究论文^[11-12]。愈伤组织的外观形态和生理状态直接影响到后续建立细胞悬浮系的质量,愈伤组织越是疏松,细胞的分散程度也就越大。因此,挑选颗粒细小、疏松易碎、外观湿润鲜艳的淡黄色愈伤组织有利于诱导悬浮细胞系^[13]。

本试验以黑莓品种 Kiowa 的叶片、叶柄为外植体,对诱导 Kiowa 的叶片、叶柄产生适于悬浮培养的优质愈伤组织进行探讨。从培养基种类、糖种类、蔗糖浓度、水解酪蛋白(CH)浓度等方面进行试验比较,从而选出能够进行细胞悬浮培养的最佳愈伤组织。

1 材料与方法

1.1 材料

黑莓品种 Kiowa 无菌苗的叶片、叶柄,取自江苏省中国科学院植物研究所组织培养实验室。取苗龄 30~40 d 的黑莓组培苗从上往下数第 2~5 片叶,剪去叶片的叶尖及叶缘,把叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 左右的方块,把叶柄剪成 1 cm 左右的小段作为接种材料。接种时,使叶片背面接触培养基。

1.2 方法

1.2.1 培养基种类对 Kiowa 愈伤组织诱导的影响 将 Kiowa 的叶片、叶柄分别接种于不同种类的培养基(MS、B₅、N₆)上诱导愈伤组织。培养 20 d 后观察、统计结果,比较不同种类的培养基对 Kiowa 叶片、叶柄愈伤组织诱导的影响。

1.2.2 糖种类对 Kiowa 愈伤组织诱导的影响 将 Kiowa 的叶片、叶柄分别接种于附加 25 g/L 的蔗糖、麦芽糖、葡萄糖的 MS 培养基上诱导愈伤组织。培养 20 d 后观察、统计结果,比较不同种类的糖对 Kiowa 叶片、叶柄愈伤组织诱导的影响。

1.2.3 蔗糖浓度对 Kiowa 愈伤组织诱导的影响 将 Kiowa 的叶片、叶柄分别接种于附加不同浓度的蔗糖(10、25、30、40、50、60 g/L)的 MS 培养基上诱导愈伤组织。培养 20 d 后观察、统计结果,比较不同蔗糖浓度对 Kiowa 叶片、叶柄愈伤组织诱导的影响。

1.2.4 水解酪蛋白浓度对 Kiowa 愈伤组织诱导的影响 将 Kiowa 的叶片、叶柄分别接种于附加不同浓度水解酪蛋白(0、200、300、400、500、600 mg/L)的 MS 培养基上诱导愈伤组织。培养 20 d 后观察、统计结果,比较不同水解酪蛋白浓度对 Kiowa 叶片、叶柄愈伤组织诱导的影响。

除试验项目以外,以上所有处理中的基本培养条件是:MS 培养基中蔗糖浓度为 25 g/L,琼脂为 5.6 g/L, pH 值 5.8~6.0, 2,4-D 1.0 mg/L,培养温度为(25±2)℃,暗培养。每个处理接种叶片、叶柄 20 个,重复 3 次。

愈伤组织诱导率=形成愈伤组织的外植体个数/外植体总数×100%。

收稿日期:2013-03-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31000753);江苏省农业自主创新资金[编号:CX(10)109];江苏省科技基础设施建设计划(编号:BM2009041、BM2010458)。

作者简介:汤飞云(1988—),女,江苏常州人,硕士研究生,主要从事黑莓生物技术研究。Tel:(025)84347063;E-mail:tangfeiyun3@163.com。

通信作者:李维林,博士,研究员。E-mail:lwlcnbng@mail.cnbg.net。

2 结果与分析

2.1 培养基对 Kiowa 愈伤组织诱导的影响

培养基是植物组织培养的物质基础,也是愈伤组织能否成功诱导的重要因素之一。愈伤组织能否形成,一方面取决于培养基材料本身的性质,另一方面也取决于培养基的种类和成分,培养基的成分以及各成分的含量对愈伤组织的诱导有很大的影响。因此要根据不同的植物、不同的外植体以及不同的培养目的选择合适的培养基^[14]。由表 1 可以看出,不同种类培养基诱导 Kiowa 的叶片、叶柄都可以产生愈伤组织,并且诱导率都为 100%。其中 MS 作为基本培养基诱导效果最佳,愈伤组织为质地疏松颗粒状嫩黄色愈伤,生长势好,到后期出现褐化。B₅ 和 N₆ 作为基本培养基诱导的愈伤组织的状态和生长势都比较差。其中 B₅ 诱导的愈伤组织是质地疏松,呈颗粒状透明色愈伤,后期褐化严重完全变黑;N₆ 诱导的愈伤组织是质地紧密块状黄绿色愈伤,后期褐化严重。

表 1 不同培养基对 Kiowa 愈伤组织的诱导

培养基种类	叶片愈伤组织诱导率(%)	叶片愈伤组织生长势	叶柄愈伤组织诱导率(%)	叶柄愈伤组织生长势
MS	100	+++++	100	+++++
B ₅	100	++	100	++
N ₆	100	+	100	+

注:“+”表示愈伤组织生长很差;“++”表示愈伤组织生长较差;“+++”表示愈伤组织生长一般;“++++”表示愈伤组织生长较好;“+++++”表示愈伤组织生长最好。

2.2 糖对 Kiowa 愈伤组织诱导的影响

不同植物对不同种类糖的反应不完全相同,因此在进行植物愈伤组织诱导时,选用合适的糖不仅会提高胚性愈伤组织的诱导率,而且可以改善愈伤组织的质量^[14]。由表 2 可以看出,不同种类糖诱导 Kiowa 的叶片、叶柄都可以产生愈伤组织,并且诱导率都为 100%。其中蔗糖作为碳源诱导效果最佳,愈伤组织为质地疏松颗粒状嫩黄色愈伤,愈伤组织生长势也很好,后期出现褐化。葡萄糖作为碳源诱导效果次之,愈伤组织为质地疏松颗粒状嫩黄色愈伤,但后期褐化严重,而且愈伤组织生长势一般。麦芽糖作为碳源诱导效果最差,愈伤组织状态和生长势都很差,为质地疏松颗粒状透明色愈伤,后期褐化。

表 2 糖对 Kiowa 愈伤组织的诱导

糖	叶片愈伤组织诱导率(%)	叶片愈伤组织生长势	叶柄愈伤组织诱导率(%)	叶柄愈伤组织生长势
蔗糖	100	+++++	100	+++++
麦芽糖	100	++	100	++
葡萄糖	100	+++	100	+++

注:“++”表示愈伤组织生长较差;“+++”表示愈伤组织生长一般;“++++”表示愈伤组织生长较好;“+++++”表示愈伤组织生长最好。

2.3 蔗糖浓度对 Kiowa 愈伤组织诱导的影响

培养基中的糖浓度对细胞生长的影响主要表现在两个方面:一方面,糖是植物细胞生长和代谢的碳源,为细胞的生长和代谢提供能量。另一方面,糖是一种渗透压调节剂,对细胞的代谢有重要影响。在很多的植物细胞培养过程中,培养基

中糖浓度的不同对细胞生物量的积累也不同^[15]。由表 3 可以看出,不同浓度的蔗糖诱导 Kiowa 的叶片、叶柄都可以产生愈伤组织,诱导率都为 100%。蔗糖浓度小于 30 g/L 时诱导的愈伤组织后期出现褐化;蔗糖浓度为 30 g/L 时诱导的愈伤组织后期褐化严重;蔗糖浓度大于 30 g/L 时诱导的愈伤组织后期褐化严重,并且叶片愈伤组织还出现了白色愈伤。蔗糖浓度为 10 g/L 或者≥30 g/L 时诱导的愈伤组织生长势差,蔗糖浓度为 25 g/L 时诱导的愈伤组织生长势好。

表 3 蔗糖浓度对 Kiowa 愈伤组织的诱导

蔗糖浓度(g/L)	叶片愈伤组织诱导率(%)	叶片愈伤组织生长势	叶柄愈伤组织诱导率(%)	叶柄愈伤组织生长势
10	100	++	100	++
25	100	+++++	100	+++++
30	100	++	100	++
40	100	+	100	+
50	100	+	100	+
60	100	+	100	+

注同表 1。

2.4 水解酪蛋白浓度对 Kiowa 愈伤组织诱导的影响

表 4 结果显示,不同浓度的水解酪蛋白(CH)诱导 Kiowa 的叶片、叶柄都可以产生愈伤组织,并且诱导率都为 100%。除 CH 浓度为 600 mg/L 时诱导的愈伤组织为质地疏松颗粒状透明色愈伤,其余浓度诱导的愈伤组织都是质地疏松颗粒状嫩黄色愈伤。CH 浓度为 0、200、300 mg/L 时诱导的愈伤组织初期从外观来看效果相同都是最佳,后期褐化程度也相同。当浓度大于 300 mg/L 时 CH 对诱导愈伤有一定的抑制作用。鉴于文献^[16-21]指出一定浓度的水解酪蛋白对于愈伤组织诱导效果有一定的提升作用,结合经济效益可选用 200 mg/L 的水解酪蛋白用于 Kiowa 的叶片、叶柄愈伤组织的诱导。

表 4 水解酪蛋白浓度对 Kiowa 愈伤组织的诱导

水解酪蛋白浓度(mg/L)	叶片愈伤组织诱导率(%)	叶片愈伤组织生长势	叶柄愈伤组织诱导率(%)	叶柄愈伤组织生长势
0	100	+++++	100	+++++
200	100	+++++	100	+++++
300	100	+++++	100	+++++
400	100	+++	100	+++
500	100	++++	100	++++
600	100	++++	100	++++

注:“+++”表示愈伤组织生长一般;“++++”表示愈伤组织生长较好;“+++++”表示愈伤组织生长最好。

3 讨论与结论

选择最佳外植体和最佳培养条件,同时附加适宜的外源激素和有机物质来诱导愈伤组织是获得良好的胚性愈伤组织必不可少的条件。植物生长调节剂对植物愈伤组织诱导的影响十分重要,同时也十分复杂^[22-25],2,4-D 被广泛应用于植物愈伤组织诱导中^[26-29],因此本试验选用 2,4-D 作为外源激素。本试验诱导黑莓愈伤组织的最终目的是用于细胞悬浮培养,所以诱导出质地疏松颗粒状嫩黄色的愈伤组织^[13,30]是本试验的关键。

本试验结果表明,不同培养基种类、不同种类糖、不同蔗

糖浓度以及不同水解酪蛋白浓度诱导 Kiowa 的叶片、叶柄都可以产生愈伤组织,并且诱导率均为 100%,但愈伤组织的状态和生长势各不相同。以 MS 作为基本培养基,25 g/L 蔗糖作为碳源,水解酪蛋白 200 mg/L 时诱导效果最佳,愈伤组织为质地疏松颗粒状嫩黄色愈伤,生长势也最佳。诱导愈伤组织产生所需的植物激素种类和浓度取决于外植体的来源,外植体的选择对愈伤组织诱导的成功与否也很重要。高利臣等^[31]研究了不同外植体对美洲商陆组培产生愈伤组织的影响,发现叶、下胚轴、根尖均有利于诱导脱分化产生愈伤组织。试验结果表明,叶片最易诱导脱分化,下胚轴次之,根尖最难。陈莉等研究发现建立玉米愈伤组织的受体系统,关键是选择合适的外植体,只有合适的外植体才能诱导出胚性愈伤组织^[32]。本试验发现叶片、叶柄作为 2 种不同的外植体都可以诱导产生出愈伤,但是叶片诱导的愈伤组织量比叶柄多,因此以后的试验应选择叶片作为外植体。陈春伶等研究结果表明水解酪蛋白和谷氨酰胺作为有机氮源对栓皮栎胚性组织的增殖有很大的影响作用^[20];张建瑛等研究发现 700 mg/L 水解酪蛋白有利于胡桃楸胚性愈伤组织的诱导^[33]。但是本试验发现,水解酪蛋白浓度对黑莓愈伤组织诱导率和生长势的影响并不是特别明显,水解酪蛋白浓度大于 300 mg/L 时对于诱导愈伤反而有一定的抑制作用。

参考文献:

- [1] 李维林,李海燕,王小敏,等. 黑莓和树莓组织培养研究进展[J]. 林业科技开发,2009,23(3):9-14.
- [2] 吴文龙,李维林,闫连飞,等. 不同品种黑莓鲜果营养成分的比较[J]. 植物资源与环境学报,2007,16(1):58-61.
- [3] 王小敏,吴文龙,赵慧芳,等. 黑莓原果汁中色素的光热稳定性与保护技术研究[J]. 江苏农业科学,2008(5):223-227.
- [4] 李维林,贺善安,顾 姻. 中国悬钩子属植物的利用价值概述[J]. 武汉植物学研究,2000,18(3):237-243,246.
- [5] 赵慧芳,王小敏,闫连飞,等. 黑莓果实中花色苷的提取和测定方法研究[J]. 食品工业科技,2008(5):176-179.
- [6] 姜 河,修英涛,蔡 骞. 我国树莓发展现状及产业化前景分析[J]. 辽宁农业科学,2006(2):45-48.
- [7] 崔德才,徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社,2003:51-56.
- [8] 何志华,熊建立,杨 军,等. 地被月季愈伤组织的诱导初探[J]. 现代园艺,2010(8):3-4.
- [9] 大泽胜次. 用花药培育脱毒苗的研究[J]. 农业与园艺,1974(4):537-540.
- [10] 马洪民,高公泓,李宗芬. 草莓花药培养中胚性愈伤组织形成及植株再生的基因型差异[J]. 西北植物学报,1988,8(3):175-183,211.
- [11] 王鲁北,张春红,王小敏,等. Arapaho 黑莓叶片与叶柄愈伤组织的诱导[J]. 中国南方果树,2011,40(2):19-23.
- [12] 李从玉,廖伍金. 黑莓叶片组织培养及植株再生的初步研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(4):998-999,1001.
- [13] 孙敬三,朱至清. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006:21.
- [14] 王慧英. 影响植物愈伤组织形成的因素研究[J]. 聊城大学学报:自然科学版,2010,23(2):51-53.
- [15] 李学栋,龚真才,马 勇,等. 不同培养条件对益母草悬浮培养细胞生长的影响[J]. 西华师范大学学报:自然科学版,2008,29(2):136-140.
- [16] 李卫东,葛会波,周春江,等. 草莓花药愈伤组织类型与状态调控研究[J]. 河北农业大学学报,2004,27(2):59-63.
- [17] 兰 妍,张 博,李培英. 水解酪蛋白对诱导苜蓿愈伤组织的影响[J]. 新疆农业大学学报,2006,29(1):87-89.
- [18] 李忠光,龚 明. 水解酪蛋白对烟草愈伤组织和悬浮培养细胞生长的促进作用[J]. 云南师范大学学报:自然科学版,2006,26(4):60-61.
- [19] 修景润,廉美兰,朴成日,等. 培养基成分对山参愈伤组织增殖生长的影响[J]. 延边大学农学学报,2011,33(2):99-102.
- [20] 陈春伶,张存旭,高小俊. 有机附加物对栓皮栎胚性组织增殖的影响[J]. 北方园艺,2010(13):171-173.
- [21] 盛长忠,王淑芳,王宁宁,等. 南方红豆杉愈伤组织培养的研究[J]. 中草药,2000,31(2):52-54.
- [22] 王冬梅,黄学林,黄上志. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学通讯,1996,32(5):373-377.
- [23] 张振超,戴忠良,毛忠良,等. 青花菜雄性不育系组培快繁技术研究[J]. 江苏农业学报,2011,27(3):680-681.
- [24] 谷瑞升,蒋湘宁,郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. 植物学通报,1999,16(3):47-53.
- [25] 姜灵敏,徐有明,张冬梅,等. 红刺玫愈伤组织诱导再生体系的建立[J]. 江苏农业学报,2012,28(4):914-916.
- [26] Hsia C, Korban S S. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996, 44(1):1-6.
- [27] 崔瑞峰,杜 娟,轩 阁. 陆地棉愈伤组织诱导影响因素初探[J]. 江苏农业科学,2012,40(8):70-71.
- [28] 高莉萍,包满珠. 愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 园艺学报,2005,32(3):534-536.
- [29] 周金梅. 欧李芽离体诱导培养技术研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(6):97,110.
- [30] 张春爱. 丰花月季愈伤组织诱导与原生质体培养的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008.
- [31] 高利臣,余燕秋,肖 璐,等. 美洲商陆不同外植体组培的初步研究[J]. 湖南科技大学学报:自然科学版,2010,25(3):106-111.
- [32] 陈 莉,程朝霞,原红娟. 玉米不同外植体愈伤组织的诱导研究进展[J]. 山东农业科学,2009,4(4):13-15.
- [33] 张建瑛,姜思佳,邢亚娟,等. 胡桃楸胚性愈伤组织诱导与体细胞胚胎发生[J]. 植物研究,2010,30(1):22-26.