

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.05.008

越橘“Legacy”离体培养及秋水仙素诱变研究初报^①

李雪松, 赵康, 李凌

西南大学园艺园林学院, 重庆 400716

摘要: 以越橘栽培品种“Legacy”茎段为外植体建立离体快繁体系后, 研究了秋水仙素处理对“Legacy”组培苗的诱变影响。结果表明: 4℃低温冷藏茎段 24 h 后, 用 0.15% HgCl₂ 消毒 8 min, 可获得越橘“Legacy”无菌材料。0.10% 秋水仙素浸泡茎尖 24 h 诱变效果最佳, 变异率达到 10%, 变异株均为嵌合体。0.05% 秋水仙素处理茎尖 24 h 后, 继代后代增殖率与对照植株呈极显著差异, 继代后代之间无显著性差异, 其他越橘品种并没有表现出此现象。

关键词: 越橘; 离体培养; 秋水仙素; 多倍体

中图分类号: S663.9

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)05-0051-07

越橘又称蓝莓、蓝浆果, 为杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium* spp.)灌木。果实为蓝色浆果, 具有很高的营养价值和药用价值, 富含多种维生素、微量元素及花青素、黄酮等生理活性成分^[1]。越橘原产北美, 为世界最大栽培区。目前越橘属植物在全世界约 450 种以上, 我国约有 90 种、24 变种、2 亚种, 南北方均有野生资源分布, 主要在西南、华南及东北地区^[2]。越橘对土壤选择性很强, 适宜栽培在酸性土壤中。目前我国北方栽培的越橘品种和面积均较南方多, 适应我国南方气候特点的越橘品种大多果实较小, 但长势较旺。具有北高丛和南高丛遗传物质的越橘品种“Legacy”果实大、口感好, 适合鲜食; 果实易贮藏, 便于运输。“Legacy”已引进重庆并适应性栽培达 5 年, 表现出抗病性中等、长势中庸、果实较大且品质较好等特点。

多倍体具有巨大型、抗病性强、适应性广、生长旺盛等优点^[3]。离体培养与秋水仙素诱导多倍体相结合较常规杂交育种而言周期短, 能够较快地得到植物新品种。本试验研究越橘品种“Legacy”外植体预处理及消毒方法, 建立越橘品种“Legacy”组培快繁体系; 并研究秋水仙素处理离体茎尖的初步诱变效果, 为越橘“Legacy”倍性育种提供基础数据和材料储备。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本试验材料选用越橘品种“Legacy”(2n=2x=24)。离体茎段取自西南大学园艺园林学院园林植物与栽培育种实验室苗圃地。

初代培养基及增殖培养基均为改良 wpm 基本培养基+0.75 mg/L 的玉米素(Zeatin, ZT), 20 g/L 的

^① 收稿日期: 2014-06-25

基金项目: 重庆市科技成果转化项目(cstc2013jcsf-nycgzhA80001)。

作者简介: 李雪松(1989-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事花卉种植资源与遗传育种研究。

通信作者: 李凌, 教授, 硕士研究生导师。

蔗糖, 5.2 g/L 的琼脂, pH=5.0.

1.2 方法

1.2.1 无菌体系建立

选取生长旺盛, 腋芽饱满的一年生半木质化枝条作为外植体. 剪取枝条后在 4 °C 下冷藏预处理, 设置时间梯度为 0, 1, 2, 3 d, 保持枝条湿润. 处理完成后, 剪成 5 cm 左右茎段. 用洗衣粉清洗茎段表面 10 min, 再用流水冲洗茎段 1 h 以上^[4]. 将冲洗好的茎段置于超净工作台上用 75% 乙醇浸泡 20 s, 无菌水冲洗 4~5 次, 然后用 0.15% HgCl₂ 消毒 5, 8, 12 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 用无菌滤纸将茎段表面的水分吸干, 将其剪成约 1 cm 左右的茎段, 接种于配置好的培养基中. 当芽萌发后, 继代 2~3 次后进行诱变.

1.2.2 诱变方法

根据石佳、李宏平等人的相关研究^[5-6]可知, 浸渍法诱导植株的变异率及成活率均高于培养基添加法和离体诱导法. 因此本试验采用浸渍法诱导处理试验材料.

在超净工作台上将秋水仙素过滤灭菌, 配置成 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20% 等 4 种浓度. 选取生长健壮的无菌组培苗, 剪取茎尖约 0.5 cm, 分别浸泡在 4 种浓度的秋水仙素溶液中, 后置于摇床(100 r/min)震荡. 处理时间为 12, 24, 36, 48 h, 处理温度为(26±1) °C. 处理完成后, 用无菌水冲洗 3~5 次, 再用无菌滤纸将茎尖表面的水吸干, 转接到不含秋水仙素的培养基中^[7-8]. 每组处理为 50 株.

1.3 秋水仙素处理对越橘组培苗的诱变研究

1.3.1 多倍体诱变

1.3.1.1 形态鉴定

植物性状变化(叶、芽、茎、花、果实)是鉴定多倍体最直接、最直观、最简便的方法, 也是最粗略的方法^[9]. 通过观察处理后的植株茎叶变化: 茎增粗、节间变短、叶色变深、叶表皮毛增多等外部形态特征变化, 初步筛选出可能变异的植株进行细胞学鉴定.

1.3.1.2 叶片气孔特征

撕取植株叶片下表皮制片, 用 1% 碘-碘化钾染色 5 min 后在 Leica DM1000 光学显微镜下观察保卫细胞长度、宽度及气孔数目.

1.3.1.3 染色体计数

采用去壁低渗-火焰干燥法^[10]进行制片: 上午 9-11 点剪取茎尖或茎旁幼叶, 将材料放入 0.002% 的 8-羟基喹啉中遮光处理 5 h, 用去离子水冲洗两次, 转移到固定液(V(甲醇): V(冰醋酸)=3:1)中固定 24 h, 冲洗材料直到没有固定液气味, 将材料转移到酶溶液(6% 纤维素酶+1.2% 果胶酶, pH=5.5)中, 在 25~30 °C 下酶解 3.5 h, 用去离子水冲洗材料后浸泡在去离子水中 10 min, 再固定 1 h, 敲片, 用 Na₂HPO₄ 预染 45 min, 用 5% Giemsa 染液(pH=7)染色 5 min, 镜检.

1.3.2 诱变后植株生长情况观察

观察经秋水仙素诱变后植株的生长情况, 观察记录生长数据, 与二倍体对照进行比较.

2 结果与分析

2.1 冷藏预处理与消毒时间对外植体污染率及成活率的影响

接种 3~7 d 后, 未彻底消毒的带菌外植体腋芽处或培养基上会出现多种菌落. 75% 乙醇和 0.15% 升汞在灭菌的同时也会使茎段褐化死亡. 分别在 15 d 和 30 d 后统计污染率与存活率(表 1). 与对照组相比, 外植体冷藏预处理后污染率降低, 存活率增加. 从污染率和存活率两方面综合考虑, 本试验选取灭菌处理组合为预处理 1 d 后用 0.15% 的 HgCl₂ 消毒 8 min.

2.2 秋水仙素对越橘组培苗的诱变研究

2.2.1 秋水仙素对多倍体诱导及细胞学鉴定

经秋水仙素处理 35 d 后茎尖干枯呈黑褐色停止生长并死亡为统计死亡率的标准; 通过形态鉴定统计

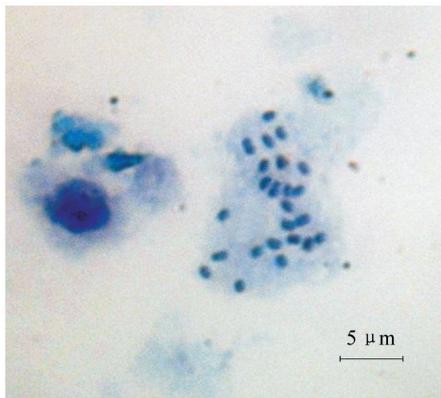
形态变异率; 以去壁低渗-火焰干燥法^[10]对形态变异植株进行染色体计数, 统计变异率。

表 1 冷藏预处理与消毒时间对外植体的影响

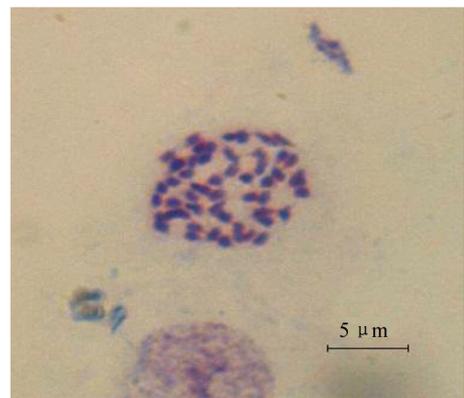
冷藏预处理时间/ d	消毒时间/ min	接种数/ 个	污染数/ 个	污染率/ %	存活数/ 个	存活率/ %
0	5	30	28	93.3	2	6.7
	8	30	13	43.3	12	40.0
	12	30	9	30.0	5	16.7
1	5	30	25	83.3	4	13.3
	8	30	8	26.7	20	66.7
	12	30	4	13.3	7	23.3
2	5	30	23	76.7	4	13.3
	8	30	8	26.7	16	53.3
	12	30	4	13.3	8	26.7
3	5	30	20	66.7	3	10
	8	30	8	26.7	12	40.0
	12	30	3	10.0	8	26.7

取二倍体和全部形态变化明显的越橘茎尖, 进行染色体数目计数, 结果显示, 越橘“Legacy”二倍体细胞染色体数目为 $2n=2x=24$; 经诱导的植株出现了加倍现象, 即染色体数为 $2n=4x=48$ (图 1); 同时诱导后植株均表现为嵌合体, 即二倍体细胞与四倍体细胞混合生长. 统计变异株中多倍体细胞的比例, 发现多倍体细胞最高为 49.06%。

随着秋水仙素的质量浓度增加, 其对植株的毒害作用增加, 死亡率升高. 在低质量浓度情况下, 随着处理时间增加, 形态变异率和变异率增高, 但时间大于 36 h 后植株形态变异率和变异率降低. 其中经 0.10% 秋水仙素处理, 越橘的变异率相对较高, 处理 24 h 后形态变异率为 16%, 变异率为 10%, 诱导效果最佳(表 2)。



(a) 二倍体



(b) 四倍体

图 1 二倍体与四倍体染色体数目比较

2.2.2 秋水仙素对越橘组培苗增殖影响

0.05% 秋水仙素处理 24 h, 越橘茎尖恢复生长后, 表现出分枝量明显增多的现象(图 2). 该现象继代 4 代后仍不消失. 分枝能力增强的现象并未随着继代次数的增多而减弱. 统计分析表明(表 3), 处理后萌芽数与增殖率均与对照植株在 1% 水平呈现极显著差异, 继代各代之间萌芽数与增殖率均无显著差异. 处理后的植株后代生长中均出现茎杆变红的现象。

在试验过程中发现此现象后, 取本实验室中已有的越橘组培苗品种 Sharpblue 和 M5, 采用本试验中各个质量浓度的秋水仙素浸泡 24 h, 对存活植株的后代继代培养, 同样出现茎杆变红的现象, 但并未发现诱

变处理后出现分枝量明显增多的植株(表 4)。石佳、李宏平等人的相关研究^[5-6]中也未见对此现象的报道。越橘“Legacy”茎尖在低浓度秋水仙素诱变处理后,表现出连续多代分枝能力、生长势增强的现象。引发此现象的具体原因有待进一步研究。

表 2 不同秋水仙素质量浓度和处理时间对越橘组培苗的影响

秋水仙素的质量 浓度/(mg·L ⁻¹)	处理 时间/h	处理茎 尖数/个	死亡 数/个	死亡 率/%	形态变 异数/个	形态变 异率/%	嵌合体 数/个	变异 率/%
0	0	50	0	0	0	0	0	0
0.05	12	50	0	0	0	0	0	0
	24	50	15	30	0	0	0	0
	36	50	23	46	1	2	0	0
	48	50	35	70	0	0	0	0
0.10	12	50	17	34	4	8	4	8
	24	50	24	48	8	16	5	10
	36	50	30	60	2	4	2	4
	48	50	38	76	0	0	0	0
0.15	12	50	20	40	3	6	2	4
	24	50	32	64	2	4	1	2
	36	50	38	76	0	0	0	0
	48	50	46	92	0	0	0	0
0.20	12	50	28	56	1	2	0	0
	24	50	35	70	0	0	0	0
	36	50	50	100	0	0	0	0
	48	50	50	100	0	0	0	0



(a) 诱变株



(b) 对照株

图 2 秋水仙素诱变株与对照株增殖情况对比

表 3 秋水仙素对越橘“Legacy”丛生芽增殖影响

继代数/ 次	接种数/ 个	萌芽数/ 个	增殖率/ 个	生长情况
Ck	8	25.10±2.079bB	3.14±0.260bB	茎秆绿, 生长正常, 愈伤正常约 0.4 cm
1	8	54.60±2.757aA	6.83±0.345aA	
2	8	53.30±4.547aA	6.66±0.568aA	茎秆变红但未增粗, 分蘖多, 叶绿,
3	8	53.40±5.358aA	6.68±0.670aA	愈伤增大约 0.7 cm
4	8	54.20±4.185aA	6.78±0.523aA	

注: a, b 表示 $p < 0.05$ 差异性分析, A, B 表示 $p < 0.01$ 差异性分析。

表 4 秋水仙素对越橘“Sharpblue”“M5”丛生芽增殖影响

品 种	接种数/ 个	萌芽数/ 个	增殖率/ 个	生 长 情 况
Sharpblue 对照	8	17.10±0.738a	2.14±0.092a	茎秆绿, 生长正常, 愈伤正常约为 0.4 cm
Sharpblue 处理	8	17.50±0.850a	2.19±0.106a	茎秆变红, 生长开始较慢逐渐恢复正常, 愈伤正常约为 0.4 cm
M5 对照	8	15.90±0.994b	1.99±0.124b	茎秆绿, 生长正常, 愈伤正常约为 0.4 cm
M5 处理	8	16.18±1.079b	2.02±0.041b	同 sharpblue 处理株

注: a, b 表示 $p < 0.05$ 差异性分析, A, B 表示 $p < 0.01$ 差异性分析。

2.3 二倍体与变异株特征比较

2.3.1 植株的形态观察

经过秋水仙素处理后的越橘植株均为嵌合体, 称为变异株. 与二倍体对照比较, 变异株外部形态呈现明显变化: 叶片颜色变深; 茎顶端、新叶表皮毛增多(图 3); 典型的器官巨大性(图 4); 生长缓慢. 茎直径、叶宽、叶厚及叶形指数等在 1% 水平差异极具有统计学意义, 叶长在 5% 水平差异具有统计学意义(表 5).



(a) 变异株



(b) 对照株

图 3 变异株与对照株叶表皮毛对比



(a) 变异株



(b) 对照株

图 4 变异株与对照株茎叶形态对比

表 5 对照株与变异株茎、叶显著性比较

组别	茎粗/mm	叶厚/mm	叶长/mm	叶宽/mm	叶形指数
对照株	0.53±0.025bB	0.10±0.009bB	6.12±0.450bA	3.65±0.275bB	1.68±0.081bB
变异株	0.75±0.020aA	0.17±0.014aA	6.47±0.224aA	4.35±0.179aA	1.49±0.049aA

注: a, b 表示 $p < 0.05$ 差异性分析, A, B 表示 $p < 0.01$ 差异性分析。

2.3.2 下表皮叶片气孔特征比较

由表 6 可知, 对照株与变异株保卫细胞长度、宽度和气孔数目差异均极具有统计学意义. 其中保卫细

胞平均长度增加 16.3%；平均宽度增加 19.3%。在 10×40 倍镜下视野里的平均气孔数目减少 24.1%。变异株的气孔密度降低、保卫细胞明显增大(图 5)。

表 6 对照株与变异株气孔差异显著性比较

组别	保卫细胞长度/ μm	保卫细胞宽度/ μm	气孔数目/个/ 10×40
对照株	$30.75\pm 1.687\text{bB}$	$20.25\pm 1.845\text{bB}$	$30.70\pm 0.949\text{bB}$
变异株	$35.75\pm 1.208\text{aA}$	$24.15\pm 0.658\text{aA}$	$23.30\pm 1.767\text{aA}$

注：a,b 表示 $p<0.05$ 差异性分析，A,B 表示 $p<0.01$ 差异性分析。

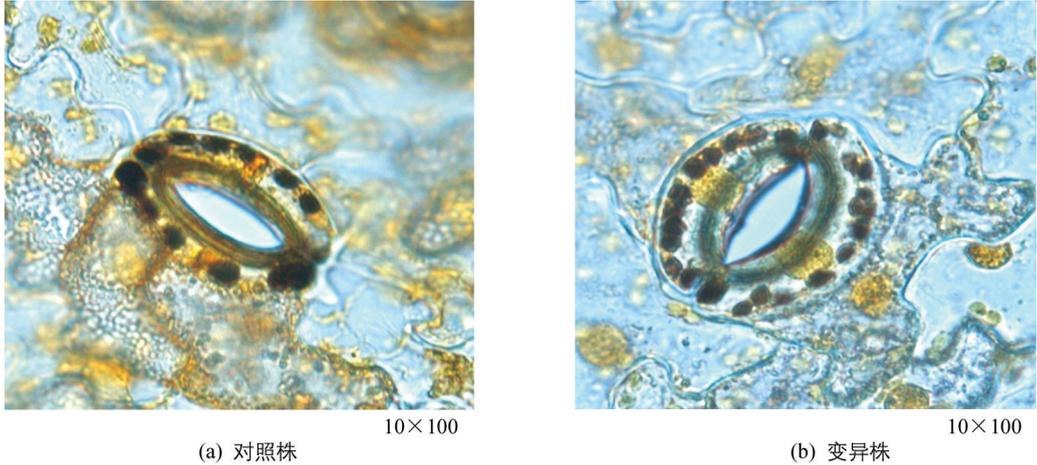


图 5 对照株与变异株气孔形态比较 (10×100)

2.3.3 变异株生理指标检测

所测的三项生理指标，对照株与变异株在 1% 水平差异极具有统计学意义(表 7)。变异株叶绿素含量高于对照株，说明变异株植株光合作用强于对照株，变异株叶片颜色加深与叶绿素含量增加有关。变异株可溶性糖含量增加、丙二醛含量降低，说明变异株较对照株抗逆性强。

表 7 对照株与变异株三项生理指标比较

组别	叶绿素含量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	可溶性糖/%	丙二醛/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$
对照株	$3.99\pm 0.085\text{bB}$	$4.29\pm 0.054\text{bB}$	$2.42\pm 0.054\text{aA}$
变异株	$4.56\pm 0.074\text{aA}$	$4.78\pm 0.116\text{aA}$	$1.79\pm 0.042\text{bB}$

注：a,b 表示 $p<0.05$ 差异性分析，A,B 表示 $p<0.01$ 差异性分析。

3 结论与讨论

低温处理可降低外植体的呼吸强度，减少物质消耗，从而延长外植体寿命^[11]。本试验中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存使越橘外植体污染率降低，推测有效的低温预处理有可能降低外植体污染率。

秋水仙素诱导在多倍体育种中应用广泛且效果明显^[12-13]。“Legacy”在 0.10% 秋水仙素处理 24 h 时植株死亡率为 48%，变异率为 10%，诱导效果最佳。

“Legacy”在 0.05% 秋水仙素处理植株 24 h 后，少数组培苗分枝能力、增殖系数显著增加，细胞学研究发现其变异率并未提高。此现象并未随着继代次数的增加而衰减。越橘的其他品种中尚未有此现象的报道，因此其产生原因需进一步探索研究。此组培苗生根移栽后分枝能力及生长势的田间表现有待进一步试验观察。

经秋水仙素处理后的植株在生长过程中，叶片颜色变深，叶表皮毛增多，出现畸形叶，植株生长缓慢，叶明显增大，茎增粗，各项生理指标与对照差异均极具有统计学意义。采用秋水仙素处理时嵌合率较高，需要将嵌合体分离以获得较为纯合的多倍体植株。下一步将获得的嵌合体植株分离纯化成四倍体植株后，炼苗移栽，进一步观察其田间性状表现，筛选出植株健壮、抗性强、生长势强的多倍体植株。

参考文献:

- [1] SELAPPAN S, AKOCH C C, KREWER G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(8): 2432—2438.
- [2] 方瑞征. 中国植物志(第57卷第3分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 75.
- [3] 孙敏红, 张蜀宁. 多倍体育种在园艺作物中的应用 [J]. *江苏农业科学*, 2004(1): 68—72.
- [4] 刘丽娟, 李红梅, 刘雪莲. 不同处理方法对外植体消毒效果比较研究 [J]. *北方园艺*, 2009(10): 86—87.
- [5] 石佳, 郑文娟, 任广炼, 等. 秋水仙素诱导越橘四倍体研究 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2012, 37(4): 102—107.
- [6] 李宏平, 江曼, 石佳, 等. 越橘“V3”品种四倍体诱导及鉴定研究 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2013, 38(2): 90—95.
- [7] 李政, 黄静洁, 李凌. 秋水仙碱诱变绿玉树多倍体研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2007, 29(2): 106—110.
- [8] 李晓艳, 张志东, 李亚东, 等. 秋水仙素诱导离体培养越橘多倍体研究 [J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(1): 38—42.
- [9] 常月梅. 果树多倍体鉴定进展 [J]. *山西林业科技*, 2000(1): 1—5.
- [10] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及研究技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [11] 胡含, 陈英. 植物体细胞遗传与作物改良 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1988.
- [12] 张凌媛, 郭启高, 李晓林, 等. 枇杷气孔保卫细胞叶绿体数目与倍性相关性研究 [J]. *果树学报*, 2005, 22(3): 229—233.
- [13] HISATO K, TOSHIKI N, KINYA M, et al. Somaclonal and Chromosomal Effects of Genotype, Ploidy and Culture Duration in *Asparagus officinalis* L [J]. *Euphytica*, 1998, 102(3): 309—316.

Tissue Culture of *Vaccinium* L. cv. “Legacy” and Mutagenic Effects of Colchicine

LI Xue-song, ZHAO Kang, LI Ling

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Plant regeneration system of cultivar “Legacy” of *Vaccinium* L. was established in an experiment, in which the stem segments of the cultivar were used as explants and then colchicine immersion was made of the cultured plants for polyploidy induction. Aseptic plants were obtained by keeping the explants in cold storage (4 °C) for 24 h and disinfecting them in 0.15% HgCl for 8 min. Soaking shoot tips for 24 h with 0.10% colchicine gave the best mutagenesis, with a variation rate of 10%. The variants were all chimeras. Soaking shoot tips for 24 h with 0.05% colchicine gave a multiplication rate of subculture significantly different from that of the control group. Such a phenomenon was not detected in other cultivars in this study.

Key words: *Vaccinium* L.; in vitro culture; colchicine; polyploid

责任编辑 潘春燕

