

文章编号: 1000-5862(2017)03-0234-04

‘南大’蓝莓试管苗快速繁殖体系的建立

胡燕梅¹, 方中明^{2*}

(1. 江汉大学期刊社, 湖北 武汉 430056; 2. 武汉生物工程学院应用生物技术研究中心, 湖北 武汉 430415)

摘要: 以蓝莓南高丛品种‘南大’为外植体, 对外植体消毒方法、腋芽诱导、腋芽增殖、试管苗生根等方面确定了其快速繁殖的最佳条件. 结果表明: 蓝莓‘南大’茎段的最佳消毒方式为 75% 酒精消毒 120 s + 0.1% HgCl_2 消毒 10 min. 茎段腋芽诱导最佳培养基为 WPM + ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 腋芽增殖的最佳培养基为 WPM + ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养 60 d 后增殖倍数可达 6.0. 生根的最佳培养基为 WPM + IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 活性炭 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养 30 d 后生根率达到 73%.

关键词: 蓝莓; 组织培养; 外植体; 生根培养

中图分类号: S 663.9 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2017.03.04

0 引言

蓝莓属杜鹃花科越桔属灌木, 果实为浆果, 风味独特, 营养丰富, 并具有独特的营养保健价值, 被誉为“浆果之王”. 国际粮农组织将其列为人类 5 大健康食品之一^[1]. 据美国蓝莓专家预测, 蓝莓将成为 21 世纪世界范围内最具有发展潜力的果树树种^[2].

蓝莓原产于北美, 我国对蓝莓的研究和引种试种从 20 世纪 80 年代初开始^[3], 我国北方种植范围较广, 而南方发展较慢. 蓝莓传统繁殖方法以扦插为主, 但繁殖速度较慢, 品种容易退化. 要使之形成国内支柱产业参与国际市场竞争, 应重点建立蓝莓良种选育和快速繁殖基地, 以适应蓝莓产业化发展需要^[4]. 组织培养技术由于繁殖速度较快, 且能保持品种特性, 又可利用茎尖培养达到脱毒效果, 是当前蓝莓种苗大量生产最主要的技术之一. 蓝莓各地品种众多, 本研究选取了适合长江以南地区种植的南高丛品种‘南大’, 从外植体消毒方法、腋芽诱导、腋芽增殖、试管苗生根等方面建立快繁体系, 以期为我国长江以南地区快速发展蓝莓产业提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料

蓝莓南高丛品种‘南大’由武汉生物工程学院

细胞工程实验室实验基地提供.

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 剪取盆栽‘南大’蓝莓的嫩枝条, 剪成 3 cm 带芽茎段, 流水下冲洗 30 min. 在超净工作台上先用 75% 酒精消毒 120 s, 再用无菌水漂洗 3 遍, 然后用 0.1% HgCl_2 、84 消毒液和 2% NaClO 分别消毒 5、10 和 15 min, 最后用无菌水漂洗 3 遍, 待用. 外植体消毒后接入 MS + ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 启动培养基中, 9 种消毒方式各接种 30 个外植体, 重复 3 次. 培养 30 d 后统计各处理的污染率、死亡率及成活率.

1.2.2 腋芽诱导与增殖试验 蓝莓腋芽诱导的基本培养基为 MS、White、WPM、B5 培养基, 每种基本培养基中均加入 ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 确定好基本培养基对腋芽诱导的影响后, 选取最佳基本培养基, 设置腋芽诱导激素的种类及浓度. 分别实验 ZT 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 每种处理接种 30 个外植体, 重复 3 次. 培养 60 d 后统计各处理腋芽诱导情况. 培养 60 d 后统计各处理腋芽诱导率与腋芽增殖倍数.

1.2.3 试管苗生根 在 WPM + IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的基础上, 设置活性炭 0, 0.1, 0.5, 1.0 和 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. 每种处理接种 30 个外植体, 重复 3 次. 培养 30 d 后, 统计生根率、平均根数和平均根长.

1.2.4 培养条件 培养基的其它成分为蔗糖 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂粉 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 5.8. 灭菌时间 121 $^{\circ}\text{C}$ 20 min. 培养条件为温度 $(25 \pm 2) ^{\circ}\text{C}$ 、光强 1 600 lx、

收稿日期: 2017-01-05

基金项目: 国家自然科学基金(31301250)和湖北省教育厅科学技术研究(B2015392、B2015394)资助项目.

通信作者: 方中明(1984-), 男, 安徽黄山人, 副教授, 博士, 主要从事植物生物技术研究. E-mail: zmfang@mail.hzau.edu.cn

光照 16 h · d⁻¹.

1.2.5 数据分析 污染率为外植体污染的个数除以外植体的总个数,死亡率为外植体的死亡个数除以外植体的总个数,成活率为外植体无污染且无死亡而成活下来个数,再除以外植体的总个数.腋芽诱导率为能够诱导出腋芽的外植体个数除以成活下来的外植体个数,腋芽增殖倍数为诱导出的丛芽个数除以能够诱导出腋芽的外植体个数.

生根率为诱导出根的外植体个数除以接种的外植体个数;生根数为诱导出的总根数除以生根的外植体个数;平均根长以直尺测量为准.数据分析采用 SPSS 软件进行变量分析(ANOVA),以 Duncan's 在 0.05 水平上进行显著性差异分析.

表 1 不同消毒方式对外植体消毒的影响 %

| 消毒方式 | 污染率 | 死亡率 | 成活率 |
|-------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| 0.1% HgCl ₂ 5 min | 61.11 ± 3.5d | 11.11 ± 1.17d | 27.78 ± 3.05c |
| 0.1% HgCl ₂ 10 min | 18.89 ± 2.5f | 10.00 ± 1.85d | 71.11 ± 2.534a |
| 0.1% HgCl ₂ 15 min | 8.89 ± 1.12g | 51.11 ± 3.46a | 40.00 ± 4.15b |
| 84 消毒液 5 min | 81.11 ± 4.39b | 12.22 ± 2.12d | 6.67 ± 0.59g |
| 84 消毒液 10 min | 41.11 ± 3.18e | 40.00 ± 3.75b | 18.89 ± 2.53d |
| 84 消毒液 15 min | 40.00 ± 2.74e | 51.11 ± 4.57a | 8.89 ± 1.16f |
| 2% NaClO 5 min | 88.89 ± 5.12a | 0.00e | 11.11 ± 1.18e |
| 2% NaClO 10 min | 72.22 ± 4.78c | 0.00e | 27.78 ± 2.47c |
| 2% NaClO 15 min | 60.00 ± 4.33d | 28.89 ± 3.78c | 11.11 ± 1.10e |

注: ± 表示标准差 a、b、c、d、e、f、g 表示差异达到显著区别,下同.

2.2 不同基本培养基对蓝莓腋芽诱导和增殖的影响
由表 2 看出,不同基本培养基对蓝莓腋芽诱导和增殖的影响有显著差异,其中 WPM 培养基对蓝莓品种‘南大’腋芽诱导效果最好,腋芽诱导率为 64.4%,腋芽增殖倍数为 5.0,其次为 B₅ 培养基,而 White 培养基诱导茎段腋芽的效果最差.

表 2 不同基本培养基对蓝莓腋芽诱导和增殖的影响

| 基本培养基 | 腋芽诱导率/% | 腋芽增殖倍数 |
|----------------|-------------|-------------|
| WPM | 64.4 ± 2.5a | 5.0 ± 0.43a |
| MS | 42.2 ± 3.8b | 3.1 ± 0.28c |
| White | 13.3 ± 4.7c | 1.0 ± 0.0d |
| B ₅ | 46.7 ± 3.2b | 4.3 ± 0.26b |

2.3 不同细胞分裂素对蓝莓腋芽诱导和增殖的影响
选用 WPM 培养基,加入 ZT 或 6-BA 各 0.5, 1.0 2.0 3.0 和 5.0 mg · L⁻¹,光照培养 60 d 后观察不同激素对腋芽诱导的影响见表 3,腋芽生长情况见图 1.由表 3 和图 1 可以看出,细胞分裂素 ZT 对于蓝莓腋芽诱导与增殖效果显著性优于 6-BA.添加 ZT 1.0 mg · L⁻¹对蓝莓腋芽诱导效果较好,外植体腋芽诱导率平均能达到 60.2%.而当 ZT 浓度为 2.0 mg · L⁻¹时,外植体的腋芽增加数量最多,增殖倍数也最大,达到 6 倍.高浓度 ZT 不适合腋芽的诱

2 实验结果

2.1 不同消毒方式对外植体消毒的影响

由表 1 看出,75% 酒精消毒 120 s + 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min 对蓝莓‘南大’的消毒效果最好,成活率平均值为 71.11%,随着 0.1% HgCl₂ 处理时间的延长,污染率降低,消毒效果好,但由于消毒时间过长,对外植体造成了伤害,植株褐化,致使死亡率升高.75% 酒精消毒 120 s + 84 消毒液的消毒效果一般,外植体成活率低,不同时间处理下外植体的存活率成活率均低于 20%.而用 75% 酒精消毒 120 s + 2% NaClO 消毒处理,污染率高,同时成活率低.

导和增殖,当培养基中 ZT 浓度大于 2.0 mg · L⁻¹时,腋芽诱导数或腋芽增殖倍数均降低.当培养基不添加 ZT 时,腋芽不能够被诱导.而不同浓度的 6-BA 对蓝莓腋芽的诱导和增殖有较大差别,当添加 6-BA 3.0 mg · L⁻¹时,平均仅有 9.6 个外植体腋芽能够诱导,增殖倍数也较低.

表 3 不同激素与浓度对蓝莓腋芽诱导和增殖的影响

| 激素 | 浓度 / (mg · L ⁻¹) | 腋芽诱导率/% | 腋芽增殖倍数 |
|------|------------------------------|--------------|--------------|
| ZT | 0 | 0g | 0e |
| ZT | 0.5 | 36.3 ± 3.38d | 2.17 ± 0.19d |
| ZT | 1.0 | 60.2 ± 4.25a | 3.10 ± 0.25b |
| ZT | 2.0 | 54.0 ± 3.19b | 6.00 ± 0.17a |
| ZT | 3.0 | 43.8 ± 2.78c | 3.14 ± 0.14b |
| 6-BA | 0.5 | 0g | 0e |
| 6-BA | 1.0 | 0g | 0e |
| 6-BA | 2.0 | 0g | 0e |
| 6-BA | 3.0 | 9.6 ± 2.52e | 2.00 ± 0.18d |
| 6-BA | 5.0 | 3.3 ± 1.23f | 2.67 ± 0.24c |

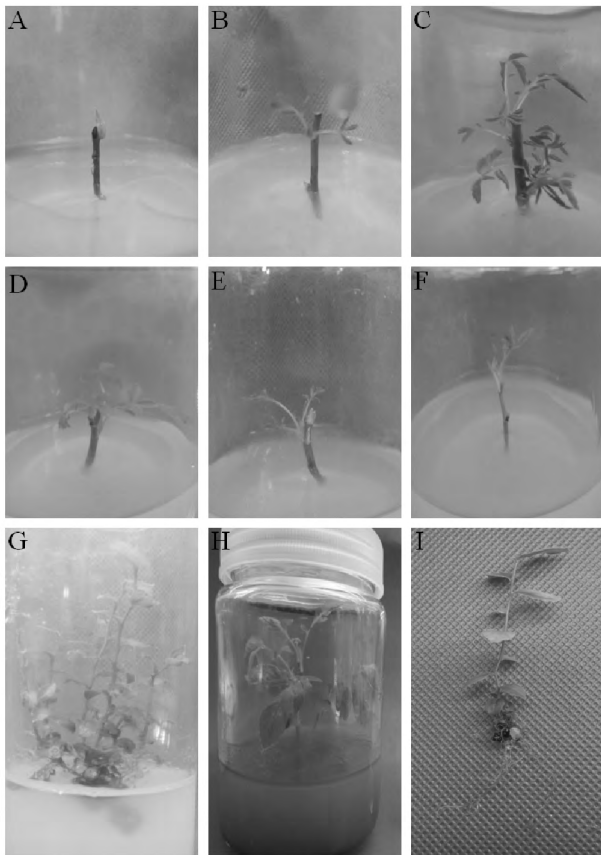
2.4 不同活性炭浓度对蓝莓试管苗生根的影响

由表 4 可看出,使用活性炭可以提高生根率,并可以提高生根数量,但对根长影响较小.生根培养基中添加 0.5 g · L⁻¹活性炭对生根效果最好,生根率

可以达到 73.33% ,且植株生长较好 ,未出现褐化现象. 当培养基中活性炭质量浓度增加 1% 时 ,生根率反而降低.

表 4 活性炭对蓝莓试管苗生根的影响

| 活性炭浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 生根率/% | 平均生根数/ (条 \cdot 株 $^{-1}$) | 平均根长/ cm |
|---|-------------------|----------------------------------|-----------------|
| 0 | 41.11 \pm 3.59c | 3.0 \pm 0.22c | 2.3 \pm 0.12b |
| 0.1 | 48.89 \pm 4.12b | 4.0 \pm 0.27b | 2.5 \pm 0.23a |
| 0.5 | 73.33 \pm 4.78a | 5.5 \pm 0.33a | 2.7 \pm 0.15a |
| 1.0 | 51.11 \pm 3.23b | 4.5 \pm 0.24b | 2.2 \pm 0.10b |
| 2.0 | 47.78 \pm 4.15b | 4.2 \pm 0.18b | 2.1 \pm 0.24b |



注: A 为茎段在 ZT 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上诱导腋芽; B 为茎段在 ZT 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上诱导腋芽; C 为茎段在 ZT 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上诱导腋芽; D 为茎段在 ZT 3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上诱导腋芽; E 为茎段在 6-BA 3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上诱导腋芽; F 为茎段在 6-BA 5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上诱导腋芽; G 为腋芽在 ZT 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上增殖; H 为试管苗在 0.5% 活性炭培养基上生根; I 为试管苗在 0.5% 活性炭培养基上生根后效果.

图 1 蓝莓品种‘南大’快速繁殖体系过程

3 讨论

木本植物组织培养中成功建立初始无菌系的第

一步就是进行外植体消毒 ,而外植体消毒在考虑杀死植物材料表面微生物的同时又要尽可能减轻对母本植物材料造成伤害. 所以在消毒过程中选择合适的消毒剂就显得非常重要. 本研究发现 75% 酒精消毒 120 s 后再用 0.1% HgCl_2 消毒 10 min 既达到了消毒效果 ,又可以减少对组织的损伤 ,而 0.1% HgCl_2 消毒 15 min 效果虽强 ,但同时对外植体产生了较大伤害. 而 2% 次氯酸钠与 84 消毒效果较差 ,污染率高. 李丽容等^[5] 研究结果表明蓝莓外植体茎段用 0.1% HgCl_2 消毒时间为 6 ~ 8 min 时最好 ,李杰等^[6] 研究结果表明当 0.1% HgCl_2 消毒时间为 9 min 时消毒效果较好 ,成活率最高 ,本研究中在蓝莓品种‘南大’中的消毒结果与其基本一致.

不同基本培养基对蓝莓不同品种腋芽的诱导效果也不同. 陶俊锋等^[7] 研究表明高温多湿条件下生长的兔眼蓝莓品种‘灿烂’腋芽诱导与增殖的最适合培养基为 1/2MS^[7]. 本研究结果表明 ,WPM 基本培养基有利于南高丛品种‘南大’茎段腋芽的诱导和增殖 ,可能是由于 WPM 含有较高的无机盐浓度 ,对于保证木本植物组织生长所需的矿物营养和加速愈伤组织的生长十分有利. 同样 WPM 培养基也适于美国高丛蓝莓品种‘夏普蓝’^[8-9]、北高丛蓝莓品种‘杜克’^[10]、矮丛蓝莓品种‘美登’^[11] 等茎段诱导或增殖.

在蓝莓组织培养中 ,细胞分裂素对芽的诱导和增殖起到至关重要的作用 ,其中 ZT 是蓝莓丛生芽诱导和增殖中使用最为广泛的一种 ,且在蓝莓南高丛的不同品种中其用量也有差别^[12] ,所以值得进一步探究适合蓝莓南高丛‘南大’茎段腋芽诱导和增殖的 ZT 浓度. 本研究表明 ,‘南大’茎段腋芽诱导最适宜的质量浓度为 ZT 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,腋芽增殖的最适质量浓度为 ZT 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 其他南高丛蓝莓如‘奥尼尔’最适诱导质量浓度为 ZT 1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[13] ,北高丛蓝莓品种‘杜克’最佳增殖培养基为 ZT 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[14]. 实验中发现 6-BA 不适合蓝莓的培养 ,ZT 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以作为腋芽诱导或增殖的长期培养 ,避免玻璃化以及褐变的出现.

蓝莓属木本植物 ,组培快繁中生根较为困难 ,且生根率低、发根周期长 ,成为制约蓝莓扩大栽培形成产业化的关键因素. 本实验中发现 ,在不加活性炭而单独加 IBA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ,蓝莓‘南大’的生根率仅为 41.11% ,而在 IBA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 基础上添加活性炭 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对蓝莓‘南大’的生根率显著提高. 活性炭的作用可能是吸附了木本植物生根中的

抑制化合物.当活性炭用量较多时生根率反而下降,这可能是活性炭吸附了植物细胞营养成分或 IBA,这与李树丽^[15]的研究结果一致. WPM + IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 活性炭 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 有利于蓝莓 ‘南大’ 的生根,生根率达到 70% 以上,平均根长 2.7 cm,生根数 5.5,瓶苗出瓶后栽种生长良好.

4 参考文献

- [1] Chen Chengming, Zhang Ning, Wang Ming. Ethnobotany of wu fan shu(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 1998, 7(1): 45-48.
- [2] Paul E. Blueberry Sciseu [M]. New Brunswick and London: Rutgers University Press, 1988.
- [3] 聂飞, 韦吉梅, 文光琴. 蓝莓的经济价值及共在我国产业化发展的前景探讨 [J]. 贵州农业科学, 2007, 35(1): 117-119.
- [4] 刘茂泉. 浙江蓝莓繁殖及栽培技术研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [5] 李丽容, 金开正, 赖联森. 不同灭菌条件对蓝莓组培影响试验 [J]. 中国园艺文摘, 2012, 28(2): 10-11.
- [6] 李杰, 黄学文, 王明莹, 等. 蓝莓组培外植体消毒条件初探 [J]. 中国园艺文摘, 2013, 29(1): 16-17.
- [7] 陶俊锋, 李叶芳, 宋杰. ‘灿烂’ 蓝莓组培与快繁技术 [J]. 亚热带植物科学, 2014, 43(2): 159-163.
- [8] 饶宝蓉, 陈泳和, 江文清, 等. 蓝莓夏普蓝组培苗繁殖技术研究 [J]. 江西农业学报, 2014, 26(10): 46-49.
- [9] 陆卫明, 王林, 章庆华. 蓝莓组培苗快繁技术研究 [J]. 中国园艺文摘, 2015, 31(2): 23-24.
- [10] 沙玉芬, 王建萍, 李公存, 等. 蓝莓茎段组培快繁技术研究 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(10): 27-28.
- [11] 王明莹, 李杰, 黄学文, 等. 蓝莓 ‘美登’ 组培苗繁殖技术研究 [J]. 中国园艺文摘, 2013, 29(2): 4-5.
- [12] 郑琪, 孙叶芳, 赵虎, 等. 几种 “南高丛” 蓝莓新品种的组培快繁技术研究 [J]. 上海农业科技, 2011(1): 21-24.
- [13] 岳健, 杨东, 董正兵, 等. 奥尼尔蓝莓组培快繁体系的建立 [J]. 浙江农业科学, 2015, 56(9): 1419-1421.
- [14] 张凯, 刘明群, 赵建华. 蓝莓品种都克组培苗瓶内生根培养研究 [J]. 中国果树, 2015(1): 49-51.
- [15] 李树丽. Vc 液和活性炭对中华红叶杨外植体褐变的影响 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(26): 11232-11233.

The Establishment of Tissue Culture and Rapid Propagation System of Blueberry Variety ‘Nanda’

HU Yanmei¹, FANG Zhongming^{2*}

(1. Journal Department, Jiangnan University, Wuhan Hubei 430056, China;

2. Center of Applied Biotechnology, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan Hubei 430415, China)

Abstract: Taking blueberries south high bush variety ‘Nanda’ as explants materials, the effects of rapid propagation conditions on disinfection method, axillary bud induction, bud proliferation and plantlet rooting were studied and compared. The result showed that 75% alcohol disinfection 120 s + 0.1% HgCl_2 disinfection 10 min was favorable to blueberry stem section. The best basic medium for ‘Nanda’ axillary bud induction was WPM. The optimal plant growth regulator concentration was ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for axillary bud induction, but ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for bud proliferation, with proliferation rate reached to 6.0. WPM + IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + activated carbon $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ is the optimal rooting medium and the rooting rate reached to 73%.

Key words: blueberry; tissue culture; explant; rooting culture

(责任编辑: 刘显亮)