

矮丛蓝莓‘北极星’启动培养研究

孙晓梅, 王新苗, 杨宏光, 张丽杰, 崔文山

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以矮丛蓝莓栽培品种‘北极星’的带腋芽茎段和幼嫩叶片为外植体,对启动培养的几
个影响因素进行了研究。结果表明:矮丛蓝莓组织培养的最佳取材季节是4月份,该时期外植体
的污染率最低;带腋芽茎段最佳灭菌方式为75%酒精30 s+0.1% HgCl₂ 8 min;带腋芽茎段以
WPM+6-BA 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L诱导效果最佳,诱导率为72.5%;幼嫩叶片以WPM+6-
BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2,4-D 2 mg/L诱导效果最佳,出愈率为42.5%。

关键词:矮丛蓝莓;启动培养;影响因素

中图分类号:S 663.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)01-0023-04

蓝莓(Blueberry),又名越橘、蓝浆果,属杜鹃花科越
橘属(*Vaccinium* L.)植物,为多年生落叶或常绿灌木或小
灌木,主要分布在北美和欧洲,具有较高的经济价值和
广阔的开发前景^[1]。蓝莓果实深蓝色,富含花青苷,低
糖、低脂肪,抗氧化能力列所有果品、蔬菜之首,具有防
止人体细胞衰老、增强心脏功能、明目及抗癌等独特功
效,被国际粮农组织列为人类五大健康食品之一^[2]。

由于蓝莓的常规繁殖速度慢,繁殖规模受插条数量
的限制,在短期内不能满足生产需要,所繁育的苗木在
生长势、果实品质等诸多方面较组培苗有不足之处^[3,4],
此外有些品种生根十分困难,即使应用植物生长物质也
不生根^[7]或生根率极低^[8]。利用组织培养技术来获取
蓝莓无性系后代,可在较小空间和较短时间内快速高
效地获得大量无性系组培苗,对加速蓝莓良种繁育和推
广种植有一定的实用意义。该试验在前人研究的基
础上,对矮丛蓝莓启动培养的几个影响因素进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试矮丛蓝莓品种‘北极星’(Polaris),取自辽宁省
抚顺市清原县。选择生长健壮、无病虫害的植株进行组
培试验。

1.2 试验方法

1.2.1 取材 2008年4月初、7月初和11月初进行取
材,以带腋芽茎段和幼嫩叶片为试材,将其接种到MS培
养基上进行培养。每个处理40个外植体,重复3次。

第一作者简介:孙晓梅(1970-),女,博士,副教授,现主要从事园林
植物遗传育种的教学与科研工作。E-mail: xiaomei7280@126.
com。

基金项目:辽宁省教育厅资助项目(2009B157)。

收稿日期:2009-08-20

30 d后调查各处理的污染率。

1.2.2 外植体表面消毒 在4月初进行灭菌方案的筛
选。以带腋芽茎段为试材,用流水冲洗20~30 min。在
超净工作台上,先用75%酒精30 s,再用无菌水冲洗1
遍,接着以0.1% HgCl₂、2% NaClO为灭菌剂,对应不同
的消毒时间进行进一步消毒,具体处理见表1,最后用无
菌水冲洗5遍,待用。以上操作采用WPM+BA 2.0
mg/L+NAA 0.2 mg/L作为培养基,每个处理接种40
个外植体,重复3次。30 d后调查各处理的死亡率、污
染率及成活率,筛选出外植体消毒的最佳方案。死亡率
(%)=死亡的外植体数/接种外植体数×100%;污染率
(%)=污染的外植体数/接种外植体数×100%;成活率
(%)=成活的外植体数/接种外植体数×100%。

表1 不同灭菌方式

处理编号 NO.	灭菌剂 Disinfectant	灭菌时间 Disinfected time/min
A1	0.1% HgCl ₂	5
A2	0.1% HgCl ₂	8
A3	0.1% HgCl ₂	11
A4	2% NaClO	9
A5	2% NaClO	12
A6	2% NaClO	15

1.2.3 不同激素组合对外植体的影响 选取带腋芽茎
段、幼嫩叶片为试材。分别接种到WPM培养基上,并附
加不同浓度的6-BA、NAA、2,4-D,蔗糖3.0%,琼脂
0.7%,pH 5.8,培养温度为(25±2)℃,光照强度1 400~
1 500 lx。每天观察茎段和叶片的生长及出愈情况,30 d
后进行数据统计。诱导率(%)=萌发出叶片的外植体
个数/接种外植体数×100%;出愈率(%)=诱导出愈伤
组织的外植体个数/接种外植体数×100%。

2 结果与分析

2.1 不同取材时期对污染率的影响

由图 1 可以看出,4~11 月份,外植体污染率逐渐上升。具体表现为,4 月份接种,污染率最低,2 种外植体分别为 5.6%、5.4%;7 月份污染率急剧上升,分别为 22%、20%;11 月份污染率继续上升,分别为 25%、22%。试验中观察到 4~7 月份,外植体的污染以细菌性污染为主,11 月份以后,枝条逐渐进入休眠,细菌污染率逐渐降低,霉菌污染率逐渐升高。综合分析取材时期对外植体污染率的影响发现,4 月份是取材的最佳时期。

2.2 不同消毒处理对外植体表面消毒效果的影响

外植体的消毒处理是植物组织培养中的重要环节,具体的消毒方案因植物材料和取材时期而异。按表 1 的试验方案,对 4 月份‘北极星’带腋芽茎段进行消毒处

理,30 d 后统计死亡率、污染率和成活率(见表 2)。通过表 2 比较后发现,不同处理对外植体死亡率、污染率和成活率的影响不同。0.1% HgCl₂ 灭菌时,A2 处理成活率最高 90%,与其它处理差异显著,A3 处理虽然污染率也为 0%,但由于消毒时间过长,对外植体造成了伤害,致使死亡率升高,达到 55%;2% NaClO 灭菌时,A5 处理成活率最高 75%,显著高于 A4、A6 处理。就灭菌试剂的种类而言,0.1% HgCl₂ 灭菌效果明显好于 2% NaClO 的效果。

综合分析死亡率、污染率和成活率的测定结果,确定 A2 处理即 75%酒精 30 s+0.1% HgCl₂ 8 min 为最佳消毒处理方案。

表 2 不同灭菌方式的灭菌效果

Table 2 Effect of different sterilization methods

处理 编号 NO.	灭菌剂 Disinfectant	灭菌时间 Disinfected time/ min	接种数 NO. of Stems/ 个	死亡率 Death rate/ %	污染率 Contamination Rate/ %	成活率 Survival rate/ %
A1	0.1% HgCl ₂	5	40	0e	45a	55d
A2	0.1% HgCl ₂	8	40	10d	0e	90a
A3	0.1% HgCl ₂	11	40	55a	0e	45f
A4	2% NaClO	9	40	0e	35b	65c
A5	2% NaClO	12	40	15c	10c	75b
A6	2% NaClO	15	40	45b	5d	50e

注:同列内相同字母表示邓肯新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平上差异不显著。下同。
Note: Different letters within a column indicated significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. The same below.

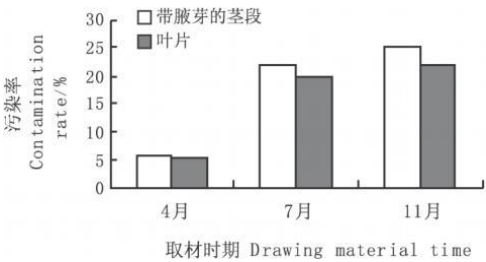


图 1 取材时期对污染率的影响

Fig.1 Effect of different drawing material time on contamination rate

2.3 不同激素组合对诱导情况的影响

2.3.1 带腋芽茎段的诱导结果 生长素和细胞分裂素的平衡对于诱导芽的萌发非常重要,在启动培养时期选择一个合适的浓度及配比,是诱导芽萌发的关键。为了筛选合适的启动培养基,试验设置了 9 个附加不同生长调节剂的处理(见表 3)。通过表 3 比较后发现,B8 处理诱导率最高,为 72.5%,显著高于其它处理。随着 6-BA 浓度的提高,诱导率在上升,当 6-BA 浓度为 3 mg/L 时,诱导率分别达到 70.27%、72.5%、68.57%,高于其它组

合。在同样 6-BA 浓度下,NAA 浓度为 0.1~0.2 mg/L 时,诱导率差异不显著,苗芽生长健壮,颜色为绿色或深绿色;当 NAA 浓度为 0.3 mg/L 时,虽然诱导率差异不显著,但是愈伤组织略有增加。综合分析 WPM+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基适宜‘北极星’带腋芽茎段的诱导(图 2)。

2.3.2 幼嫩叶片的诱导结果 接种后,将叶片放置黑暗处进行培养,暗培养 10 d 后取出。取出后观察到部分叶片有开始卷曲的迹象。继续将叶片放在培养架上培养,部分叶片卷曲明显,叶片也有长大的趋势,有的叶缘开始出现白色颗粒,标志出愈的开始。30 d 后统计结果。从表 4 极差分析可以看出,不同激素对比对叶片愈伤组织诱导的效果是不同的。在 4 个因素中,对叶片出愈率的影响由大到小的顺序为 2,4-D>NAA>6-BA。其中 2,4-D 对出愈率的影响最大,随着 2,4-D 浓度的升高,出愈率也呈上升趋势。通过 K 值比较,可以看出最适合幼嫩叶片愈伤组织诱导的处理为 C5,出愈叶片 17 个,出愈率为 42.5%,显著高于其它处理。所以 WPM+6-BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2,4-D 2 mg/L 的培养基适宜幼嫩叶片愈伤组织诱导(图 3)。

表 3 不同激素浓度组合对带腋芽茎段的启动培养效果

Table 3 Effect of different hormone combinations on primary culture of stem with axillary bud

处理编号	6 BA	NAA	接种数	萌发数	诱导率
NO.	/mg ° L ⁻¹	/mg ° L ⁻¹	NO. of stems/ 个	NO. of germination/ 个	Induction rate/ %
B1	1	0.1	35	19	54.28e
B2	1	0.2	32	18	56.25de
B3	1	0.3	40	22	55.00e
B4	2	0.1	37	22	59.46c
B5	2	0.2	35	21	60.00c
B6	2	0.3	34	20	58.82cd
B7	3	0.1	37	26	70.27ab
B8	3	0.2	40	29	72.50a
B9	3	0.3	35	24	68.57b

表 4 不同激素组合对幼嫩叶片愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of different hormone combination on callus induction of tender leaves

处理编号	6-BA	NAA	2 4-D	接种数	出愈数	出愈率
NO.	/mg ° L ⁻¹	/mg ° L ⁻¹	/mg ° L ⁻¹	NO. of stems/ 个	NO. of callus/ 个	Callus formation rate/ %
C1	0.5	0.05	0.5	40	2	5.00f
C2	0.5	0.1	1	38	10	26.31c
C3	0.5	0.5	2	36	12	33.33b
C4	1	0.05	1	40	4	10.00e
C5	1	0.1	2	40	17	42.50a
C6	1	0.5	0.5	34	4	11.76e
C7	2	0.05	2	38	12	31.58b
C8	2	0.1	0.5	42	2	4.76f
C9	2	0.50	1	44	8	18.18d
K1	21.55	15.53	7.17			
K2	21.42	24.52	18.16			
K3	18.17	21.09	35.80			
R	3.37	9.00	28.63			



图 2 腋芽萌发

Fig.2 Cultivated for bourgeoning of axillary bud

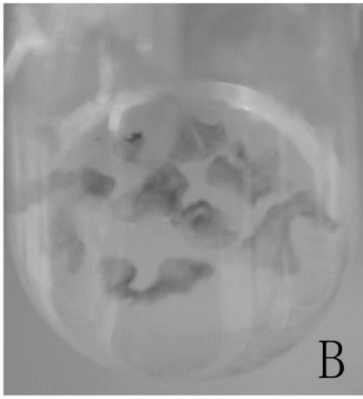


图 3 幼嫩叶片愈伤组织诱导

Fig.3 The callus induction of tender leaves

3 讨论

在矮丛蓝莓启动培养中发现, 接种材料的取材时期对腋芽的启动率有显著影响。4 月份, 蓝莓处于萌动时期, 体内养分充足, 因而诱导效果较好。11 月份蓝莓进入休眠期, 体内养分也较充足, 无菌培养条件可打破其休眠, 但该时期的蓝莓材料木质化程度较高, 霉菌污染

较严重且难于控制, 不利于无菌操作。综合分析, 诱导率、污染率和无菌操作的难易程度, 该试验确定 4 月份为蓝莓初代接种的最佳时期。

木本植物组织培养的困难之一是建立无菌体系。消毒的一个基本原则是, 既要杀死植物材料表面的微生物, 同时尽可能不杀死植物材料。所以, 消毒时采用的

消毒剂种类、浓度和处理时间等, 必须根据植物材料的生长环境及对消毒剂的敏感性来确定^[4]。该研究发现, 对于矮丛蓝莓带腋芽茎段 75%酒精 30 s+0.1% HgCl₂ 浸泡 8 min 组合的效果是比较理想的。

该试验与 Lyrene^[9]、金炜等^[5]所用的主要激素不同, 因只有选用适宜细胞分裂素及适宜浓度, 才能达到快繁的目的。试验选用激素的是 6-BA 和 NAA, 在 WPM+6-BA 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基上对矮丛蓝莓带腋芽茎段进行启动培养, 萌芽早, 诱导率高, 苗芽生长正常。这表明, 适当的 6-BA 和 NAA 组合既可保证较高的诱导率和较早萌芽(1 周左右), 又可保证苗芽的质量; 以幼嫩叶片为外植体诱导愈伤组织, 在 WPM+6-BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2,4-D 2 mg/L 的培养基中诱导效果最好。关于进一步的增殖培养和生根培养正在研究中。

参考文献

[1] 修英涛, 常凤英, 姜河, 等. 我国蓝莓(越橘)栽培研究现状及发展措

施[J]. 辽宁农业科学, 2003(3): 21-23.

[2] 苑兆和. 世界蓝莓生产历史与发展趋势[J]. 落叶果树, 2003(1): 49-52.

[3] 容祖, 郝瑞. 浆果学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 59-89.

[4] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 24-74.

[5] 金炜, 陈品良, 顾姻. 植物激素对越橘组织培养中侧芽增殖的影响[J]. 植物学通报, 1991, 8(2): 53-54.

[6] Chandler C K, Draper A D. Effect on zeatin and 2ip on shoot proliferation of three highbush blueberry clones *in vitro*[J]. Hortscience, 1986, 21: 1065-1066.

[7] Hall I V. Callus formation in stem internode section of low bush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) cultured on a medium containing plant growth regulation[J]. Hort. Rev. 1976 16: 29-35.

[8] El-shiekh A. Long-term effects of propagation by tissue culture or soft-wood single-node cuttings on growth habit, yield and berry weight of "Northblue" blueberry[J]. Amer. Soc. Hort. Sci. 1996, 12(2): 339-342.

[9] Lyrene P M. Micropropagation of rabbiteye blueberries[J]. Hort-science, 1980 15: 80-81.

Studies on Primary Culture of *V. angustifolium* 'Polaris'

SUN Xiao-mei, WANG Xin-miao, YANG Hong-guang, ZHANG Li-jie, CUI Wen-shan

(Forestry College of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: Stem with axillary bud and tender leaf of *V. angustifolium* of one cultivated varieties Polaris were used as explants for the experiment to research several influence factors of primary culture. The results indicated that the optimal time of drawing material for *V. angustifolium* tissue culture was April. During this period, the contamination rate of explant was the lowest; The optimal sterilizing treatment for the stem with axillary bud was 75% Alcohol 30 s+0.1% HgCl₂ 8 min; it was also found that the optimal primary medium for stem with axillary bud was WPM+6-BA 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L, the induction rate was 72.5%; The optimal primary medium for tender leaf was WPM+6-BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2,4-D 2 mg/L, the induction rate was 42.5%.

Key words: *V. angustifolium*; primary culture; influential factors

小知识

塑膜闷土除蔬菜草害

菜苗生长时杂草也在生长, 与菜苗争地争肥, 影响菜苗生长。如果用人工拔草, 既费工费时, 又容易错将菜苗拔掉。若采用塑料薄膜闷土, 消灭杂草后播种育苗效果很好。具体方法是: 在选定做苗床的地方, 先深翻晒土, 然后耙碎整平, 再浇水湿土, 或放水浸湿片

刻将水排干, 再用塑料薄膜将苗床密封盖紧。苗床里的杂草及残根断茎即很快萌发, 长出的小草及嫩芽遇到塑料薄膜下的高温、水分, 很快就会被闷死。一般密封 3~4 d 后揭开塑料薄膜, 然后播蔬菜种子, 这样杂草很少, 有利于菜苗生长。