

红树莓工厂化繁育技术体系研究

尤淑丽, 王海新, 苏君伟, 安玉明, 赵 艳

(辽宁省风沙地改良利用研究所, 辽宁 阜新 123000)

摘 要:对红树莓的4个优良栽培品种“托拉米”、“维拉米”、“菲尔杜德”、“海尔特兹”组织培养过程中的几个主要环节进行了系统研究。结果表明:红树莓工厂化生产中,外植体采用4~6月取茎尖或9月取茎段比较适宜。茎尖分化培养采用培养基:1/2MS+BA 0.75 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L;茎段分化培养采用培养基:1/2MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L;通过正交试验得出:“维拉米”和“菲尔杜德”的最佳增殖培养基为:MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.3 mg/L;“托拉米”和“海尔特兹”的最佳增殖培养基为:MS+BA 0.35 mg/L+IAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.3 mg/L;增殖系数达到4~6;4个品种最佳生根培养基均为:1/2MS+IAA 0.3 mg/L+IBA 0.2 mg/L;平均生根率85.3%;依照试验确定蛭石是最佳移栽驯化基质,移栽成活率达到90.2%。

关键词:红树莓;工厂化繁育;培养基

中图分类号:S 663.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0161-04

红树莓(*Rubus idaeus* L.)为蔷薇科悬钩子属多年生落叶半灌木树种,鲜果为聚合果,富含人体必需的多种氨基酸、维生素和矿物质,特别是含有人体可吸收的植物SOD(超氧化物歧化酶)、天然抗癌物质(鞣化酸)、天然阿斯匹林(水杨酸)及大量天然减肥物质(覆盆子酮),VE的含量也居各类水果之首,是近来世界上发展最为迅速的,集营养与保健于一身的第三代新兴水果。

欧洲、北美洲栽培树莓历史较早,栽培面积大且产量也高。我国早在20世纪30年代由俄罗斯引进了少量树莓。近10a来,我国树莓发展很快,目前栽培面积约为2 667 hm²,据专家预测,发展空间约为5万hm²。生产上多采用扦插、根蘖、压条等传统繁殖方法,繁殖系数低,速度慢,受季节限制,影响优良品种的开发和推广。采用组培快繁技术可以避免上述弊端。有关树莓的组织培养国内已有一些报道,但尚未解决繁殖系数低、生根难等关键技术,还远远不能满足工厂化生产的需求,因此有必要研究和完善红树莓高频、稳定的组培快繁技术体系。

该研究对红树莓的4个优良栽培品种“托拉米”、“维拉米”、“菲尔杜德”、“海尔特兹”组织培养过程中的主要环节进行了系统研究,确立了一个较为完整的树莓茎尖(茎段)组织培养快速繁殖体系,可为树莓的快速繁殖和产业化发展提供理论依据。

第一作者简介:尤淑丽(1968-),女,本科,副研究员,现主要从事植物组织培养研究工作。E-mail:Youshuli2004@163.com。
收稿日期:2010-05-11

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料采自风沙研究所优质树莓园,2a生无病毒苗木。4个红树莓品种为夏果型“托拉米”、“维拉米”、“菲尔杜德”和秋果型“海尔特兹”,选取生长健壮的1a生枝条。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌培养体系的建立 取红树莓1a生幼嫩枝条,去叶后用洗衣粉浸泡10 min轻刷表面,剪成20 cm左右,自来水冲洗1 h后,在1% 84消毒液或0.3% H₂O₂中预灭菌20 min,再用自来水冲洗干净。在无菌条件下将材料剪成2~3 cm长带1个腋芽的茎段。先将材料放入70%酒精中浸润30 s,再用0.1% HgCl₂溶液消毒4 min,最后用无菌水冲洗4~6遍。接种在红树莓茎尖(茎段)分化培养基中。茎尖需在灭菌后剥取,茎尖大小为3~5 mm。35 d后调查分化情况。

1.2.2 培养条件 MS基本培养基或1/2MS,糖25 g/L(生根培养15 g/L),琼脂5 g/L,pH 5.6~5.8,培养温度(25±2)℃,光照强度2 000 lx左右,光照时间14 h/d。

1.2.3 茎尖(茎段)启动培养 剥取4个品种的茎尖分别接种在通过预备试验选定的4种配方培养基中,分别为:I. 1/2MS+BA 0.75 mg/L+IAA 0.3 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L;II. 1/2MS+BA 0.75 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L;III. 1/2MS+BA 0.5 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L;IV. 1/2MS+BA 0.25 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L。共16个处理,每个处理接种20个茎尖,每瓶1枚。1周后统计污染率,35 d后统计分化率。比较不同品种在4种培养基中的分化表现。取4个品种的带腋芽茎段分别接种在3种配方

培养基中。培养基分别为:Ⅰ. 1/2MS+BA 0.75 mg/L+IAA 0.3 mg/L+GA₃ 0.5mg/L;Ⅱ. 1/2MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L;Ⅲ. 1/2MS+BA 0.5 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L。试验共 12 个处理,每个品种每个处理接种 20 个茎段,每瓶接种 1 枚,1 周后统计污染率,20 d 左右腋芽开始分化,35 d 调查分化芽数。比较不同品种在 3 种培养基中的分化率。

1.2.4 增殖培养 当外植体分化长出芽丛后,将丛生芽 2~3 株切为 1 丛转接到 MS 附加不同激素的继代培养基上进行增殖培养。在预备试验的基础上采用正交试验设计(L₉3⁴)研究 BA、IAA、GA₃ 3 个因子不同浓度水平(表 1)对增殖的影响。每个处理 2 次重复,每个重复接种 10 瓶,培养 35 d 调查增殖情况。

表 1 因素水平表

水平	因素		
	BA/mg·L ⁻¹	IAA/mg·L ⁻¹	GA ₃ /mg·L ⁻¹
1	0.2	0.1	0.1
2	0.35	0.2	0.3
3	0.50	0.3	0.5

1.2.5 生根培养 当芽苗继代培养到一定数量后,取叶片展开、生长健壮芽丛分割成具 2~3 节、高 2~4 cm、带 2~3 叶的单个小苗,接种于生根诱导培养基中。依据预备试验的结果,生根培养试验采用单因素试验设计,以 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度的 IBA、IAA、NAA。每个处理接种 20 瓶,每瓶 5 株。30 d 后统计生根率。以下为 5 种生根培养基:Ⅰ. 1/2MS+IAA 0.3 mg/L+IBA 0.2 mg/L;Ⅱ. 1/2MS+IAA 0.5 mg/L;Ⅲ. 1/2MS+IBA 0.3 mg/L;Ⅳ. 1/2MS+NAA 0.3 mg/L;Ⅴ. 1/2MS+IAA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

1.2.6 驯化移栽基质的筛选 红树莓试管苗生根培养 30 d 后移入温室。移栽前,首先不打开封口膜,在温室 10 000~20 000 lx 自然光条件下练苗 5 d,再从瓶中取出小苗洗净根上的培养基,最后用 0.1%KMnO₄ 溶液浸洗苗木后栽植。基质用五氯硝基苯消毒,注意苗木移栽后 1 周内的管理,特别是注意塑料薄膜保湿和遮荫覆盖,相对湿度 80%~90%,保持温度在 18~21℃,控制好水分和温度。基质试验采用草炭、河沙、蛭石按比例混合 4 种基质。30 d 后调查幼苗成活情况。

2 结果与分析

2.1 不同外植体取材时期及取材部位初代培养情况

试验初代培养采用品种“托拉米”休眠芽水培、4~6 月份取茎尖、4~6 月份取茎段、8 月份取的茎段、9 月份取的茎段 5 种外植体,接种在 1/2MS+BA 0.75 mg/L+IAA 0.3 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L 培养基中。每种外植体接种 50 瓶,每瓶接种 1 枚,35 d 开始调查外植体分化情况。计算方法:污染率(%)=污染芽数/接种数×100%;褐化率(%)=褐化芽数/正常接种数×100%;分化率

(%)=分化芽数/正常接种数×100%。

表 2 结果表明,取树莓休眠芽水培做为外植体培养,污染率低,外植体褐变率也低,但部分芽体未萌动,萌芽率仅为 58%。可能是部分腋芽未打破休眠的原因。采用生长旺季 8 月份取的茎段做为外植体,污染率高达 28%,外植体易褐变,褐化率 20%,所以分化率较低。而用 9 月份取的茎段作外植体时,腋芽分化率最高达 75%,且腋芽饱满度较好,褐化率也较低。采用茎尖作外植体时,由于腋芽表面被鳞片,在较长时间消毒后,内部芽体损伤较小,既保证了消毒效果,又避免了消毒对培养材料的损害。污染率最低为 7%,分化率 65%。综合考虑采用 4~6 月取茎尖及 9 月取茎段做为外植体比较适宜。

表 2 “托拉米”不同取材时期及取材部位

初代培养情况

	休眠芽 水培	4~6 月 取尖	4~6 月 取茎段	8 月 取茎段	9 月 取茎段
污染率/%	6	7	12	28	10
褐化率/%	9	16	10	20	12
分化率/%	58	65	73	47	75

2.2 茎尖、茎段启动培养试验

2.2.1 不同品种茎尖在 4 种培养基中的分化率 从表 3 可知,4 个红树莓品种茎尖的分化率由高到低排列依次为:“菲尔杜德”>“维拉米”>“托拉米”>“海尔特兹”。说明不同基因型的分化能力是有差别的。从 4 种培养基的诱导分化看,培养基Ⅱ诱导分化能力最强为 68.2%;培养基Ⅲ分化能力为 67.2%次之;培养基Ⅳ第 3,诱导分化能力为 64.8%;培养基Ⅰ最次为 58.8%。经方差分析 4 种培养基之间存在显著差异($P<0.05$)。所以,可采用培养基Ⅱ. 1/2MS+BA 0.75 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L 做为红树莓的茎尖分化最佳培养基。

表 3 不同品种茎尖在 4 种培养基中的分化率 %

品种	培养基			
	I	II	III	IV
托拉米	51	67	65	63
维拉米	61	70	68	69
海尔特兹	55	59	60	52
菲尔杜德	68	77	76	75
平均数	58.8 d	68.2 a	67.2 b	64.8 c

注:小写字母有相同者为差异($P<0.05$)不显著,下同。

2.2.2 不同品种茎段在 3 种培养基中的分化率 由表 4 可知,4 个红树莓品种茎段分化率由高到低排列依次为:“菲尔杜德”>“维拉米”>“托拉米”>“海尔特兹”。说明不同基因型的分化能力是有差别的。培养基Ⅱ诱导分化能力最强为 70.8%;培养基Ⅰ为 69.3%第 2;培养基Ⅲ诱导分化能力最差为 58.5%。经方差分析,Ⅰ和Ⅱ、Ⅲ之间存在显著差异,Ⅰ与Ⅱ之间差异不显著,但从 2 个配方中激素比较,配方Ⅱ中的 BA 和 IAA 浓度都比配方Ⅰ低,而

相对较低的激素配比对植物保持遗传特性更有利。所以,采用培养基Ⅱ. 1/2MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L 做为红树莓的茎段最佳分化培养基。

表 4 不同品种茎段在 3 种培养基中的分化率 %

品种	培养基配方/mg·L ⁻¹		
	I	Ⅱ	Ⅲ
托拉米	73	69	65
维拉米	71	78	58
海尔特兹	55	59	50
菲尔杜德	78	77	61
平均数	69.3 a	70.8 a	58.5 b

2.2.3 不同红树莓品种增殖培养试验 由表 5 可知,在正交试验的 9 组处理中,“托拉米”和“海尔特兹”以处理 4 增殖系数最大,“维拉米”和“菲尔杜德”以处理 8 增殖系数最大。4 个红树莓品种增殖系数比较,“维拉米”增殖系数最大;“菲尔杜德”增殖系数最小;“托拉米”、“海尔特兹”居中。增殖培养的正交试验中依照 R 值的大小极差分析(表 6),三因子对各品种增殖系数影响由大到小的顺序为:“托拉米”、“维拉米”和“海尔特兹”为 BA>IAA>GA₃;“菲尔杜德”是 BA>IAA=GA₃。3 种生长调节剂中,BA 对增殖系数影响最大,BA 是影响试管苗

表 6 不同处理组合增殖系数极差分析

品种		因素/mg·L ⁻¹						
		K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃	R
托拉米	BA	15.12	15.79	15.47	5.04	5.26	5.16	0.22
	IAA	15.63	15.34	15.37	5.21	5.11	5.12	0.10
	GA ₃	15.45	15.47	15.42	5.15	5.16	5.14	0.02
维拉米	BA	14.08	17.42	17.83	4.69	5.81	5.94	0.25
	IAA	16.4	16.81	16.12	5.47	5.60	5.37	0.23
	GA ₃	16.34	16.81	16.18	5.45	5.6	5.39	0.21
海尔特兹	BA	14.73	15.30	14.89	4.91	5.10	4.96	0.19
	IAA	15.09	14.83	15.00	5.03	4.94	5.0	0.09
	GA ₃	14.81	15.10	15.01	4.94	5.03	5.0	0.09
菲尔杜德	BA	13.66	14.40	14.65	4.55	4.80	4.88	0.33
	IAA	14.08	14.42	14.41	4.69	4.81	4.80	0.12
	GA ₃	14.33	14.37	14.21	4.78	4.79	4.74	0.05

2.2.4 红树莓生根培养试验 由表 7 可知,采用不同培养基配方的平均生根率排序为:I>Ⅲ>Ⅱ>Ⅳ>V。经显著性测验存在显著差异,即配方I的生根率显著高于其它配方。所以,最佳生根培养基为I:1/2MS+IAA 0.3 mg/L+IBA 0.2 mg/L。4 个品种在培养基I中的生根率经方差分析,“菲尔杜德”与“海尔特兹”差异不显著;“托拉米”与“维拉米”生根率差异不显著。它们两两之间差异达到显著(P<0.05)。说明红树莓不同基因型之间生根率存在显著差异。而且采用 NAA 生根同时易产生大量愈伤组织,影响以后移栽成活率,所以生根培养中应减少 NAA 用量。

增殖培养的主要因素。对于分化增殖培养而言,在保证试管苗增殖率的前提下,应选择苗木生长旺盛的处理。根据表 6 中 K 值大小可得出各品种最佳处理组合,“维拉米”和“菲尔杜德”的最佳增殖培养基为:MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.3 mg/L;“托拉米”和“海尔特兹”的最佳增殖培养基为:MS+BA 0.35 mg/L+IAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.3 mg/L。在试验设计的 9 个组合中,只有“托拉米”和“海尔特兹”的最佳增殖培养基出现。这也是正交试验的科学性体现,即通过部分试验了解全面试验情况,并找出最优的组合。

表 5 不同处理组合对各品种苗木增殖的影响

处理号	因素/mg·L ⁻¹			增殖系数			
	BA	IAA	GA ₃	托拉米	维拉米	海尔特兹	菲尔杜德
1	0.2	0.1	0.1	5.11	4.76	4.86	4.46
2	0.2	0.2	0.3	5.02	4.89	4.97	4.65
3	0.2	0.3	0.5	4.95	4.43	4.90	4.55
4	0.35	0.1	0.3	5.28	5.79	5.15	4.74
5	0.35	0.2	0.5	5.24	5.90	5.03	4.78
6	0.35	0.3	0.1	5.26	5.73	5.12	4.88
7	0.5	0.1	0.5	5.23	5.85	5.08	4.88
8	0.5	0.2	0.1	5.08	6.02	4.83	4.99
9	0.5	0.3	0.3	5.16	5.96	4.98	4.98

表 7 不同红树莓品种的生根率 %

品种	培养基配方/mg·L ⁻¹				
	I	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	V
菲尔杜德	95 a	94	92	88	80
海尔特兹	90 a	81	85	78	76
托拉米	80 b	65	67	56	48
维拉米	76 b	60	65	60	45
平均数	85.3 a	75 b	77.3 b	70.5 c	62.3 d

2.2.5 红树莓品种在不同基质中的移栽成活率 由表 8 看出,不同红树莓品种在 4 种基质中的移栽成活率以蛭石最高为 90.2%;河沙、草炭(1:1)72.6%第 2;第 3 为蛭石、草炭(1:1)68.8%;草炭最低为 49.4%。而且,基质之间差异达到极显著。所以,依照试验确定蛭石是最佳移栽基质。

表 8 红树莓品种在不同基质中的移栽成活率 %

基质	移栽数	成活率				平均
		托拉米	维拉米	海尔特兹	菲尔杜德	
河沙、草炭(1:1)	100	72.3	65.8	75.7	76.6	72.6 b
蛭石、草炭(1:1)	100	68.0	67.1	75.3	64.6	68.8 c
草炭	100	24.3	43.2	35.6	45.2	49.4 d
蛭石	100	90.2	89.6	93.4	88.7	90.5 a

3 结论与讨论

3.1 各培养阶段最佳培养基及培养条件

红树莓初代培养中,采用休眠芽水培做外植体时,试验中未采用激素处理打破休眠,部分芽体未萌动,萌芽率仅为 58%。因调查时间为 35 d,随着培养时间延长萌芽率逐渐提高。与郭修武等研究结果不甚相同。增殖培养的正交试验中,BA、IAA、GA₃ 三因子中,BA 对增殖系数影响最大,是影响试管苗增殖培养的主要因素。试验设计中 BA 浓度范围为 0.2~0.5 mg/L,根据 K 值大小可得出各品种最佳处理组合,“维拉米”和“菲尔杜德”的最佳增殖培养基为:MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.3 mg/L;“托拉米”和“海尔特兹”的最佳增殖培养基为:MS+BA 0.35 mg/L+IAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.3 mg/L。对于分化增殖培养而言,在保证试管苗增殖率的前提下,应选择苗木生长旺盛的处理。BA 浓度太高小苗增殖系数变大,但苗细弱生长势差,而且依试验得出当 BA 浓度大于 1.0 mg/L 时,对后期组培苗生根会带来不良影响。

3.2 工厂化生产中应注意的问题

在树莓种苗工厂化繁育中,如果种苗组织培养时间较长、温度过高或转接不及时、种苗过密等,均易产生玻璃化现象。这时需采取酌情更新种苗、适当降低培养温度、应用透气性封口膜等办法。如果玻璃化较严重,则需马上降低大量盐浓度和激素浓度来解决,否则会造成大量死苗。在大量生产中,某一种生长素应用时间较长,也容易产生愈伤组织。需根据种苗生长状态及时更换生长素。

总之,在种苗工厂化繁育中应灵活调整培养基配方,使其达到最佳生长状态,为培育组培壮苗打下坚实基础。

参考文献

- [1] 陈琦,陈瑜,黄庆文,等. 树莓茎尖组织培养体系的优化研究. 西北植物学报,2007,27(9):1892-1898.
- [2] 郭修武,姜汉平. 树莓组织培养研究[J]. 中国果树,2008(6):21-23.
- [3] 田新华,李海霞,张妍妍,等. 菲尔杜德树莓的组织培养研究[J]. 黑龙江生态工程职业学院学报,2008,21(6):20-23.
- [4] 肖娅萍,王喆之,张志勤,等. 红树莓植株再生系统的建立[J]. 中草药,2001,32(8):738-741.
- [5] 朴日子,曹后男,陈艳秋,等. 无刺红树莓组织培养快速繁殖技术研究[J]. 吉林农业大学学报,2006,28(4):411-414.
- [6] 董玉之,王晓炜,蒋萍,等. 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.
- [7] 王宏,于辉,洪建源,等. 树莓茎尖组织培养试验简报[J]. 沈阳农业大学学报 2002,33(4):319-320.
- [8] 李岩,徐娥. 树莓组培快繁生产技术[J]. 农业科技通讯,2004(9):18.

Study on Technological System of Industrial Production of Red Raspberry Idaeus

YOU Shu-li, WANG Hai-xin, SU Jun-wei, AN Yu-ming, ZHAO Yan

(Liaoning Institute of Aeolian Land Improvement and Utilazation, Fuxin, Liaoning 123000)

Abstract: Systematic Study on major stage of tissue culture of excellent 4 red raspberry varieties; Tullameen, Wilamette, Fertodi and Heritage. The results indicated that in industrial production, the stem tip of April to June and stem segment of September were selected as the optimum explants, and the appropriate media for respective culture stages were: for regeneration of stem tips: 1/2MS+BA 0.75 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L; for regeneration of stem segments: 1/2MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L; By orthogonal design concluded, for differentiation and multiplication of Tullameen and Heritage: MS+BA 0.35 mg/L+IAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.3 mg/L, of Wilamette and Fertodi: MS+BA 0.35 mg/L+IAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.3 mg/L; the multiple for multiplication was up to 4~6; for rooting: 1/2MS+IAA 0.3 mg/L+IBA 0.2 mg/L; the mean rate of rooting was 85.3%; with the experiment, vermiculite was the excellent matrix, Transplanting surviving rate could reach 90.2%.

Key words: red raspberry; industrial production; medium