

# 树莓组织培养技术的研究

曹 慧, 薛佳桢, 孙京波

(潍坊学院 生物工程学院, 山东 潍坊 261061)

**摘 要:**以树莓带芽茎段为外植体, 摸索树莓组织培养快速繁殖技术体系, 着重研究各阶段的最佳培养基配方及培养程序。结果表明: 树莓组培外植体最佳取材时间应在5月初, 半木质化的带芽茎段为其理想的外植体材料, 外植体灭菌用75%乙醇0.5 min、2%NaClO 15 min效果最好; 分化增殖最佳培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L+GA<sub>3</sub> 6 mg/L; 最佳生根培养基为1/2MS+NAA 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+活性炭0.5%; 组培苗移栽基质以有机肥: 土: 蛭石=1:1:1时成活率最高。

**关键词:** 树莓; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号:** Q 949.751.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)22-0125-03

树莓(*Rubus idaeus* L.)为蔷薇科悬钩子属多年生落叶小灌木, 俗称托盘、覆盆子。树莓适应性强, 喜光、耐旱、耐瘠薄, 对土壤要求中性或微酸性, 最适宜pH 5.5~7.0<sup>[1]</sup>。树莓不仅可作为鲜食的美味水果, 也可用于加工果酱、果汁、果冻等多种食品的添加剂, 除富含果糖、维生素、氨基酸, 风味香醇、酸甜可口外, 还具有几大药用保健功能: 人体可吸收的SOD含量居各种水果之首, 可清除氧自由基、提高免疫力, 具有美容和抗衰的功效; 天然抗致癌物质“鞣花酸”含量居各类可食物之首, 欧美人

美其名曰“癌症克星”; 富含天然阿司匹林, 可镇痛解热, 抗血凝, 也可减少心脑血管栓塞的发生率<sup>[2]</sup>。

欧洲、北美是树莓栽培史较早, 面积和产量较多的地区。据联合国粮农组织统计, 世界上有30多个国家栽培树莓, 形成规模的国家仅有10个, 大面积栽培的主要集中在波兰、南斯拉夫、美国和英国。国内树莓的优良品种多从欧美引进, 栽培面积小, 产量较低。到目前为止, 我国已从美国、俄罗斯、波兰等国引进50余个树莓品种, 在我国的东北、西北、华北、华东等地适合树莓栽培地区进行试种研究, 筛选出了一批适合各地栽培的品种。我国目前树莓栽培面积约有2 667 hm<sup>2</sup>, 发展空间约有5万hm<sup>2</sup>, 产品供不应求, 其经济效益是种植玉米、水稻等作物的10~15倍<sup>[2,3]</sup>。

生产上采用扦插、根蘖、压条等传统繁殖方法, 其繁殖系数低, 速度慢, 受季节限制, 苗木供应不足已成为目前发展树莓生产的主要限制因素, 采用组培快繁技术可

**第一作者简介:** 曹慧(1966), 女, 博士, 教授, 研究方向为果树逆境生理与分子生物学。E-mail: hui5232@163.com。

**基金项目:** 潍坊学院试验资助项目; 潍坊学院青年科研基金资助项目(2009Z19)。

**收稿日期:** 2010-08-30

## Study of Detection Method on Strawberry Vein Banding Virus

CHEN Xiao-jun, WANG Jing-dong, MA Hong-ai, CHEN Yu-chao, SONG Yu-xia

(Key Lab of Agricultural Biotechnology of Ningxia, Yinchuan, Ningxia 750002)

**Abstract:** The strawberry with strawberry vein banding virus was studied, employed a new bioinformatics arithmetic insignia to design a specific primer and current technology stands as a control to check its veracity and feasibility, RT-PCR amplification produced internal control sequence (295 bp), virus specific sequence (289 bp) and stand specific sequence (600 bp), accorded with the length of design. The results showed that bioinformatics arithmetic meted to detection stand of strawberry virus and enlarged a new approach of rapid detection.

**Key words:** SVBV; detection; insignia

以避免上述弊端<sup>4</sup>。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这一技术关键,还远远不能满足生产上的需求<sup>2-7</sup>。因此,通过对树莓组织培养技术的研究,建立一套优化的树莓组织培养快速繁殖体系,可为树莓产业化发展提供大量优质无毒苗木奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

试验所用的树莓材料均取自潍坊学院生物工程学院温室大棚,品种为红莓“中林13号”。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料的准备 材料的预处理:在晴天下午 14:00 左右采集材料,选取当年生枝条,去掉叶片,截段。表面消毒与接种:外植体表面灭菌处理有 3 组处理,肥皂水:将肥皂剪碎配成饱和肥皂水,将截断的枝条用肥皂水浸泡并用细毛刷刷洗 5 min。洗洁精:将洗洁精配成体积比 1% 的溶液,将截段枝条用洗洁精溶液浸泡并用毛刷刷洗 5 min。洗衣粉:将洗衣粉配成饱和溶液,将截断的枝条用洗衣粉水浸泡并用细毛刷刷洗 5 min。然后用流水冲洗 1 h,晾干。再在超净工作台上用 70% 乙醇浸泡 30 s → 无菌水中洗 3 遍 → 次氯酸钠(2%) 浸泡 15 min → 无菌水冲洗 4 遍 → 接种。

1.2.2 培养基配制 初代培养:以 MS 为基本培养基加入活性炭(AC) 5 g/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 6.5 g/L, pH 5.8 ~ 6.2。芽增殖培养:以 MS 培养基为基本培养基进行芽增殖培养。附加激素包括细胞分裂素(6-BA),生长素(NAA),赤霉素(GA<sub>3</sub>),激素配比见表 1。同时培养基中添加活性炭 5 g/L。生根培养:1/2MS 培养基,添加不同浓度的 IBA 和 NAA 以及 6-BA(表 2),活性炭 5.0 g/L。

表 1 芽增殖培养基激素 mg · L<sup>-1</sup>

编号	NAA	6-BA	GA <sub>3</sub>
1	0.02	0.5	0
2	0.02	1.0	0
3	0.06	0.5	0
4	0.06	1.0	0
5	0.02	0.5	6
6	0.02	1.0	6
7	0.06	0.5	6
8	0.06	1.0	6

表 2 生根培养基激素 mg · L<sup>-1</sup>

编号	IBA	NAA	6-BA
1	0.2	0.2	0.0
2	0.5	0.5	0.0
3	0.5	1.0	0.0
4	1.0	2.0	0.0
5	0	0	1.0

1.2.3 培养条件 将培养瓶放入培养箱中培养,光照时间 16 h/d,光照强度为 3 000 lx,光照时温度(25 ± 1) °C,黑暗时培养温度(18 ± 1) °C,相对湿度 40% ~ 80%。

1.2.4 驯化与移栽 选健壮植株(根长 2 ~ 3 cm)进行移栽。移栽前将培养瓶的封口膜打开,进行练苗试验,1 周后将组培苗自培养瓶中取出,洗净苗根部的琼脂,分别移栽入装有经过灭菌的(有机肥:土=1:1;土:有机肥;有机肥:土:珍珠岩=1:1:1;有机肥:土:蛭石=1:1:1;蛭石)培养介质中放入温室中观察其发育情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 初代培养

2.1.1 不同灭菌方法对污染率的影响 树莓茎段灭菌按前面所述的 3 种方法进行试验。6 d 后统计污染率不同处理污染率。由表 3 综合考虑污染率、发芽率和褐化率等因素,则肥皂饱和溶液灭菌效果最好。

表 3 不同处理外植体的污染、发芽及褐化情况

处理	污染率/%	发芽率/%	褐化率/%
①	18.18	63.64	18.18
②	9.09	81.82	0.00
③	9.09	54.55	36.36

2.1.2 不同取材时间对污染率的影响 试验对树莓茎段取材时间分布在 3 个季节:春季 5 月初,夏季 8 月中旬和秋季 10 月底。外植体均直接取自室外,未经室内进行水培。6 d 后统计污染率,不同季节取材的污染率见表 4。由表 4 可看出,在相同杀菌条件下春季接种的污染率明显低于夏秋两季,可见春季是最佳的取材时间。

表 4 不同季节取材污染率

时间/月日	污染率/%
5-3	18.75
8-10	58.75
10-15	81.25

### 2.2 芽增殖培养

根据芽增殖的质量和数量来评价激素配比的状态,从而选出最佳激素配比的培养基。由表 5 可看出,6 号培养基最适合芽的增殖培养。

表 5 不同激素对比对芽增殖的影响

激素组合类型	诱导率/%	平均生芽数/%	生长状况
1	90	2.33	粗壮
2	70	3.85	细小
3	80	1.50	高壮
4	90	2.11	绿小
5	80	2.13	绿壮
6	70	3.57	绿壮
7	80	2.75	绿壮
8	60	1.67	绿壮

### 2.3 不同生根培养基对树莓生根的影响

试验树莓生根培养基是以 1/2MS 为基本培养基共有 5 种激素配比类型(表 2)。由表 6 可看出,生根培养基 4 最适合植株生根培养,植株生长健壮,生根速度快,生根率高。

表 6 不同类型的生根培养基中的生根状况

培养及类型	生根率 %	生根特点及植株生长状况
1	0.00	未生根, 植株生长较弱
2	16.67	生根耗时较长, 生根株数少
3	33.33	生根耗时长
4	83.33	植株生根较快, 植株生长健壮, 生根率高
5	0.00	未见生根

#### 2.4 练苗与移栽

在恒定 25 °C 条件下, 移栽于以下 6 种基质中进行练苗(有机肥 : 土 = 1 : 1; 土; 有机肥; 有机肥 : 土 : 珍珠岩 = 1 : 1 : 1; 有机肥 : 土 : 蛭石 = 1 : 1 : 1; 蛭石)。培养 10 d 后, 统计成活率, 其中处理 5 的基质成活率最高, 达到 80%。

表 7 不同基质对试管苗移栽成活率的影响

移栽基质	成活率/%
1	60
2	30
3	50
4	70
5	80
6	20

### 3 结论与讨论

试验表明, 5 月初是最佳的采集外植体的时期, 在此阶段对外植体进行培养时, 灭菌效果最好, 污染率最低。在 8 种 6-BA、NAA 和 GA<sub>3</sub> 的不同浓度组合的芽增殖培养基中, 6 号培养基(NAA 0.02 mg/L、6-BA 1.0 mg/L、GA<sub>3</sub> 6 mg/L)芽诱导效果最好。以 1/2MS 为基本培养基, 添加 IBA 1.0 mg/L、NAA 2.0 mg/L 达到了最高的生根率、根数及根长。

在组织培养中, 褐变是普遍存在的, 尤其在木本材料中, 这种现象与菌类污染和玻璃化并称为植物组织培养的三大难题。一般认为, 褐化是由于酚类物质被多酚氧化酶(PPO)氧化成醌类物质, 抑制了相关酶的活性, 从而阻碍培养材料的正常生长, 甚至导致培养物死亡。减少褐化的措施有遮光、加入抗氧化剂、加入吸附剂等<sup>[8]</sup>。该试验中减少褐化的措施是在培养基中加入了活性炭, 通过与不加活性炭的对比, 可看出加入 5 g/L 活性炭可明显降低褐化率。

在组培苗移栽时, 首先要打开瓶口进行 1 周的练苗, 经过练苗期后转入土 : 有机肥 : 蛭石按 1 : 1 : 1 的介质中, 成活率最高。

#### 参考文献

- [1] 于有国, 勒士义, 曹相国. 树莓的生物学特性及栽培技术[J]. 现代农业科技, 2009, 19: 118-119.
- [2] 陈琦, 陈瑜, 黄庆文, 等. 树莓茎尖组织培养体系的优化研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1892-1898.
- [3] 徐娥, 李岩. 树莓的组织培养及快速繁殖[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(1): 64-65.
- [4] 解瑞彬, 李秋菊, 曹媛媛, 等. 树莓的组织培养快繁研究[J]. 天津农业科学, 2009, 15(3): 23-25.
- [5] 郭修武, 姜汉平. 树莓组织培养研究[J]. 中国果树, 2008(6): 21-23.
- [6] 刘文萍. 引进国外树莓品种的组织培养生根试验[J]. 北方园艺, 2005(4): 79-80.
- [7] 王丽玲, 郭军战. 树莓黑莓引种驯化及组培快繁技术的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [8] 陈菲, 李黎. 植物组织培养的防褐化探讨[J]. 北方园艺, 2005(2): 69.

## Study on the Tissue Culture Technique in Raspberry

CAO Hui, XUE Jia-zhen, SUN Jing-bo

(Bio-Engineering College, Weifang University, Weifang, Shandong 261061)

**Abstract:** The objective of this research was to study the tissue culture system of raspberry through explants of raspberry stem segment with buds, especially on optimum formula of culture medium and culture procedure at each phase. The results showed that the optional time of cutting explant was in early May, that the best explant was semi-lignified stem segment with buds, disinfected by 75% alcohol for 0.5 min and 2% NaClO for 15 min, that the optimal differentiation and rooting medium were MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L+GA<sub>3</sub> 6 mg/L and 1/2MS+NAA 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+activated carbon 0.05% respectively, that the cultured plantlets at the highest survival rate was transplanted in organic fertilizer, earth and vermiculite(1 : 1 : 1).

**Key words:** *Rubus idaeus* L.; tissue culture; rapid propagation