

# 长白山笃斯越桔优良单株组培快繁技术的研究

宗长玲, 宗成文, 赵巍巍, 金炳奎, 曹后男

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘 要:**以长白山笃斯越桔优良单株的茎尖、茎段为外植体, 对其组培快繁技术进行了研究。结果表明: 笃斯越桔的幼芽分化适宜的启动培养基为 WPM+ZT 2.0 mg/L; 增殖培养基为改良 MS+ZT 0.5 mg/L+IBA 0.15 mg/L, 继代培养 30 d 后的增殖倍数可达 5.3 倍; 适宜的生根培养基为 1/4 改良 MS+IBA 0.5 mg/L, 培养 50 d 后的生根率可达 80%。将笃斯越桔组培苗在纯沙子中练苗 20 d, 将苗移栽至草炭土: 腐殖土为 1:2 的基质中, 组培苗移栽成活率达 78%。

**关键词:**笃斯越桔; 优良单株; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号:**S 666.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0113-04

笃斯越桔(*Vaccinium uliginosum* Linn.) 是杜鹃花科常绿小灌木, 主要分布在内蒙古、黑龙江、吉林、辽宁等地<sup>[1-4]</sup>, 是我国重要的野生浆果资源之一。笃斯越桔浆果酸甜适口, 可生食, 也是制果酒、果醋、果酱、速冻果及提取天然食用色素的良好原料。笃斯越桔还具有一定的药用价值, 其中的总酚和花青素是重要的抗氧化物质, 这种物质对视网膜有特异性功效<sup>[5-8]</sup>。由于乱摘乱挖, 笃斯越桔

野生资源遭到极大破坏, 并且有性繁殖发芽率低<sup>[9]</sup>, 无性繁殖扦插条件要求严格等<sup>[10-11]</sup>, 使其开发和利用受到极大的限制。现于 2007 年起对长白山笃斯越桔天然群落中的大果型、长势健壮的优良单株进行选择, 拟应用植物组织培养方法对这些宝贵优良野生资源进行快繁, 在保护野生资源的同时, 建立高效、遗传稳定的组培快繁体系, 为今后优良的笃斯越桔保存和大规模推广奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以采自吉林省长白山区笃斯越桔(*Vaccinium uliginosum* Linn.) 为优良单株的休眠枝, 实验室水培 2 周左右获得的茎段、茎尖为材料。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 笃斯越桔外植体消毒及初代培养

水培后, 待萌

**第一作者简介:**宗长玲(1983-), 女, 吉林榆树人, 在读硕士, 现主要从事果树生物技术研究工作。E-mail: zongchangling0925@163.com。

**责任作者:**宗成文(1974-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事果树遗传育种与生物技术研究。E-mail: zongchengwen@yahoo.com.cn。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30960231)。

**收稿日期:**2011-11-29

## 参考文献

[1] Paglia G P, Olivieri A M, Morgante M. Towards second-generation STS (sequence-tagged sites) linkage maps in conifers: a genetic map of Norway spruce (*Picea abies* K.) [J]. Mol. Gen. Genet, 1998, 258(5): 466-478.

[2] 何光源, 陈明杰, 杨广笑. 植物基因工程实验手册[M]. 北京: 清华大学出版社, 2007.

(该文作者还有李建红, 单位同第一作者。)

## Research of SSR Molecular Markers for *Phaseolus vulgaris* L. Variety Identification

TIAN Tian, FENG Guo-jun, SHENG Hui, LIU Da-jun, ZHAO Chun-mei, WANG Jie, LI Jian-hong  
(Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070)

**Abstract:** In order to determine the number of SSR primers that used in the identification of varieties of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars, taking two cultivars of 'Jiangjun' and 'Taikongjiangjun' as the materials by SSR markers were studied. In total of 65 SSR primers distributing on two cultivars were used, three of them showed specific. The results indicated that PM1040, PM1050, PM1065 would be sufficient for assessing cultivar variety identification.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris* L.; SSR; variety identification

发的腋芽长到 1 cm 左右时剪下放入广口瓶中,用少许洗涤灵清洗,之后用自来水流水冲洗 1~2 h,在超净工作台上用 75% 的酒精消毒 20~30 s,然后用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 浸泡并不断搅动(时间分别设为 3~8 min,间隔为 1 min,再用无菌水冲洗 3 次,最后将枝条切成长 0.5~1.0 cm 带腋芽的茎段,接种于初代培养基(WPM+ZT 2.0 mg/L+20 g/L 蔗糖+8.3 g/L 琼脂),pH 为 5.2,每个处理组合接种 30 个茎段,3 次重复。15 d 后调查试管苗污染情况、出芽率和成活率。培养条件:白天温度 25℃,晚上 20℃。通常光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 14 h/d,下同。

1.2.2 笃斯越桔继代增殖培养 (1)不同基本培养基对增殖生长的影响。以改良 MS(Fe 盐加倍,大量元素、微量元素、钙盐、维生素不变)、MS、WPM 为基本培养基,附加 ZT 0.5 mg/L、IBA 0.5 mg/L、蔗糖分别 30 g/L 和 20 g/L、琼脂 8.3 g/L。每个处理组合接种 30 个茎段,3 次重复。接种 30 d 后观察小苗生长状况,统计增殖倍数;(2)ZT 浓度对笃斯越桔继代增殖的影响。以改良 MS 为基本培养基,附加 ZT(3、2、1、0.5、0.1 mg/L)、IBA 0.5 mg/L,每个处理组合接种 30 个茎段,3 次重复。接种 30 d 后,观察苗的生长状况,统计增殖倍数;(3)IBA 浓度对笃斯越桔继代增殖的影响。以改良 MS 为基本培养基,附加 ZT 0.5 mg/L、IBA (0.50、0.40、0.30、0.20、0.15、0.10 mg/L),每个处理组合接种 30 个茎段,3 次重复。接种 30 d 后,观察苗的生长状况,统计增殖倍数。

1.2.3 笃斯越桔的生根及练苗移栽 将笃斯越桔继代增殖培养 30 d 后长势良好的试管苗接种于 5 种培养基(1/2MS+IBA 0.1 mg/L;1/4 改良 MS+IBA 0.5 mg/L;WPM+IBA 0.1 mg/L;1/2 WPM+NAA 0.05 mg/L;1/2 WPM+IBA 0.1 mg/L)中,每个处理组合接种 30 个茎段,3 次重复。50 d 后调查不同培养基对生根率及生长状态的影响。然后将带根壮苗移栽到河沙基质中练苗 20 d,再将其移栽到草炭土:腐殖土=1:2 的基质中,30 d 后统计移栽成活率。

1.2.4 统计方法 采用 SPSS for Windows 11.5 统计分析软件包对试验结果进行方差分析及显著性测验。

## 2 结果与分析

### 2.1 消毒时间对笃斯越桔外植体生长的影响

由表 1 可知,不同消毒时间对笃斯越桔外植体生长的影响显著,0.1% 升汞溶液消毒时间 3 min 真菌污染比较严重,消毒时间 6 min 时,外植体污染率显著地低于其它处理,出芽率和芽成活率都显著地高于其它处理,其次为 5 min,随着消毒时间的延长或减少,污染率也显著增高。

表 1 不同消毒时间对笃斯越桔外植体生长的影响

Table 1 Effect of different sterilization time on explant growth of *Vaccinium uliginosum*

| 消毒时间<br>Sterilization<br>time/min | 接种数<br>No. of inoculation<br>/个 | 污染率<br>Contamination<br>rate/% | 出芽率<br>Bud formation<br>rate/% | 芽成活率<br>Browning<br>rate/% |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| 3                                 | 30                              | 66.7a                          | 80.0c                          | 75.0e                      |
| 4                                 | 30                              | 53.3b                          | 71.0d                          | 80.0d                      |
| 5                                 | 30                              | 33.3d                          | 90.0b                          | 88.9b                      |
| 6                                 | 30                              | 6.7f                           | 92.9a                          | 92.3a                      |
| 7                                 | 30                              | 20.0e                          | 66.7e                          | 62.5f                      |
| 8                                 | 30                              | 46.7c                          | 37.5f                          | 83.3c                      |

注:小写字母表示  $P<0.05$  水平差异显著,下同。

Note: lowercase shows significantly different at  $P<0.05$ , the below is same.

### 2.2 笃斯越桔试管苗的增殖培养

2.2.1 基本培养基对笃斯越桔增殖生长的影响 初代培养获得的芽苗长势细弱。为获得大量茎条粗壮的无菌丛生芽,对笃斯越桔基本培养基进行了筛选。由表 2 可知,不同基本培养基间对笃斯越桔组培苗增殖生长的影响显著。改良 MS 基本培养基的培养效果显著地优于 WPM 和 MS,表现为诱导芽分化的速率较快、增殖倍数高,诱导的嫩茎粗,叶片浓绿,但茎段基部膨大,产生明显的愈伤组织。WPM 基本培养基的培养效果又显著地优于 MS,但在这 2 种基本培养基上诱导的芽苗茎细弱,叶色较淡,且随着培养时间的延长,WPM 培养基上诱导的试管苗出现不同程度的叶色变黄现象。

表 2 基本培养基对笃斯越桔继代培养影响

Table 2 Effect of basic media on subculture of *Vaccinium uliginosum*

| 基本培养基<br>Basic medium | 接种数 No. of<br>inoculation/个 | 增殖倍数<br>Multiplication coefficient | 生长状况<br>Growth situation |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| WPM                   | 30                          | 4.8b                               | 叶淡绿,嫩茎细弱                 |
| 改良 MS                 | 30                          | 5.1a                               | 叶浓绿,嫩茎较粗                 |
| MS                    | 30                          | 4.0c                               | 叶淡绿,嫩茎细弱                 |

注:ZT 2 mg/L+IBA 0.5 mg/L。

Note: ZT 2 mg/L+IBA 0.5 mg/L。

2.2.2 ZT 浓度对笃斯越桔继代增殖的影响 由表 3 可知,不同 ZT 浓度对笃斯越桔增殖培养的影响也显著。以改良 MS+ZT 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L 的培养基增殖效果最好,其增殖倍数虽低于 ZT 1.0 mg/L 的,但诱导出的芽苗长势好,叶色绿(图 1)。在试验中发现,随着

表 3 ZT 浓度对笃斯越桔增殖培养的影响

Table 3 Effects of ZT concentration on multiplication culture of the *Vaccinium uliginosum*

| ZT/mg · L <sup>-1</sup> | 增殖倍数<br>Multiplication coefficient | 生长情况<br>Growth conditions |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| 3.0                     | 3.0d                               | 叶淡绿,茎细弱                   |
| 2.0                     | 4.0c                               | 叶绿,茎细弱                    |
| 1.0                     | 5.3a                               | 叶绿,茎细弱                    |
| 0.5                     | 5.1b                               | 叶绿,茎粗壮                    |
| 0.1                     | 2.1e                               | 叶绿,茎细弱                    |

注:改良 MS+IBA 0.5 mg/L。

Note: Improved MS+IBA 0.5 mg/L。

ZT 浓度的提高,当达到 3 mg/L 时组培苗生长缓慢,试管苗的茎段虽然有所伸长,但没有新的节及腋芽产生,故认为其是对增殖没有意义的茎段伸长,而随着 ZT 浓度降低,试管苗增殖倍数显著下降,且茎段变细弱。



图 1 继代增殖 30 d 的笃斯越桔  
(ZT 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L)

Fig. 1 Subculture for 30 d growth on the acclimatizing culture mediu's *Vaccinium uliginosum*

2.2.3 IBA 浓度对笃斯越桔继代增殖的影响 由表 4 可知,不同 IBA 浓度也显著地影响笃斯越桔增殖培养的效果。以改良 MS+ZT 0.5 mg/L+IBA 0.20 mg/L 增殖培养效果最好,其增殖倍数虽低于 IBA 0.15 mg/L,但诱导出的芽苗长势好,叶色浓绿(图 2),与其它不同 IBA 浓度培养基对笃斯越桔增殖培养的影响显著。可见 IBA 浓度过高或过低对笃斯越桔生长不利,不加 IBA 浓度的培养基分化率低且长势不佳。

表 4 IBA 浓度对笃斯越桔增殖培养的影响

Table 4 The effects of IBA concentration on multiplication culture of the *Vaccinium uliginosum*

| IBA/mg · L <sup>-1</sup> | 增殖倍数                       | 生长情况              |
|--------------------------|----------------------------|-------------------|
|                          | Multiplication coefficient | Growth conditions |
| 0.50                     | 4.0c                       | 苗较粗,新芽生长缓慢        |
| 0.40                     | 4.2c                       | 苗较粗,新芽生长较慢        |
| 0.30                     | 4.5b                       | 苗较粗,新芽长势较快        |
| 0.20                     | 5.2a                       | 苗粗壮,新芽长势较快        |
| 0.15                     | 5.3a                       | 苗粗壮,新芽长势快         |
| 0.10                     | 3.1d                       | 苗粗壮,新芽长势缓慢        |
| 0                        | 3.0d                       | 苗较粗,新芽长势缓慢        |

注:改良 MS+ZT 0.5 mg/L。

Note:Improved MS+ZT 0.5 mg/L.



图 2 继代增殖 30 d 的笃斯越桔  
(ZT 0.5 mg/L+IBA 0.20 mg/L)

Fig. 2 Subculture for 30 d growth on the acclimatizing culture mediu's *Vaccinium uliginosum*

2.3 不同培养基对笃斯越桔试管苗生根的影响

外植体在生根培养基上培养 25~30 d 即可见到白色的根尖生成,由表 5 可知,不同生根培养基显著地影

响笃斯越桔试管苗生根,1/2 MS+IBA 0.1 mg/L 培养基不能诱导组培苗生根,其余生根培养基配方均可诱导组培苗生根,50 d 后组培苗均生长良好,但生根率有很大差异。不同种类的生长素差异显著。笃斯越桔较适合的生根培养基为 1/4 改良 MS+IBA 0.5 mg/L,生根率达 80%,根系也较粗壮(图 3)。

表 5 不同生根培养基对笃斯越桔试管苗生根的影响

Table 5 Effect of different medium on test-tube plantlets rooting of the *Vaccinium uliginosum*

| 培养基配方                  | 接种数                  | 生根率            | 生长状况              |
|------------------------|----------------------|----------------|-------------------|
| Rooting medium         | No. of inoculation/个 | Rooting rate/% | Growth conditions |
| 1/2MS+IBA 0.1 mg/L     | 30                   | 0e             | 叶绿色,不生根           |
| 1/4 改良 MS+IBA 0.5 mg/L | 30                   | 80a            | 叶绿色,根系发达          |
| WPM+IBA 0.1 mg/L       | 30                   | 30d            | 叶绿色,生根少           |
| 1/2WPM+NAA 0.05 mg/L   | 30                   | 70b            | 叶淡绿,生根较多          |
| 1/2WPM+IBA 0.1 mg/L    | 30                   | 60c            | 叶淡绿,生根较少          |

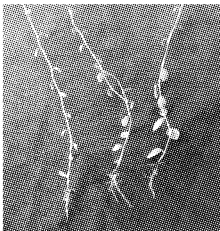


图 3 1/4 改良 MS+IBA 0.5 mg/L 培养 50 d 的生根情况

Fig. 3 Tansplants to the matrix 50 days later root's situation

2.4 练苗移栽

将生长势良好、植株健壮、根系发达的笃斯越桔组培苗移栽到纯沙子中练苗 20 d,期间注意保持湿度。20 d 后将小苗移栽到腐殖土和草炭土 1:2 的营养钵中,30 d 后苗的生长情况良好(图 4),移栽成活率达 78%。



图 4 笃斯越桔移栽 30 d 后生长情况

Fig. 4 Tansplants to the matrix 30 days later

3 结论与讨论

近年来,很多学者报道了越桔属植物组培快繁技术<sup>[12-22]</sup>,ZT 对越桔属植物芽的诱导和增殖作用至关重要,而 IBA 是否加入培养基,不同学者见解不一<sup>[12-15]</sup>。该研究结果表明,采用 WPM 基本培养基苗长势细弱,叶淡绿,而改良 MS 基本培养基苗长势粗壮,叶片浓绿;在改良 MS 附加 ZT 0.5 mg/L、IBA 0.15 mg/L 的培养基中能较好地诱导笃斯越桔茎段、茎尖增殖 30 d 时增殖系数为 5.3。在培养基中添加生长素是必要的,并且生



生长素和细胞分裂素浓度配比很重要,过高的生长素导致幼苗矮化且抑制主茎的伸长,幼苗基部表现为膨胀或产生愈伤组织。笃斯越桔生根状况与培养基类型、附加生长素种类和浓度有密切关系。在 1/2WPM 培养基中,诱导生根 IBA 比 NAA 快,但培养基的幼苗叶片由原来的鲜绿色转为黄绿色;而 WPM 基本培养基中,生根苗叶片还是鲜绿色,可能是营养成分过低导致的。用 1/4 改良 MS+IBA 0.5 mg/L 的生根培养基诱导生根的质量较好,根系发达,生根率为 80%。在进行继代培养时,不应只单独接 1 个芽苗,应将 3~5 株芽苗聚在一起接入培养基中,以提高笃斯越桔增殖率。

一些学者研究发现,不同种或品种对培养基的反应不同<sup>[16-18]</sup>,刘树英等<sup>[19]</sup>对兔眼越桔的研究表明,品种间没有差异,张长青等<sup>[14]</sup>对兔眼越桔增殖效果研究支持前一种说法,该研究筛选的笃斯越桔组培适宜配方与前人结果不一致<sup>[20-22]</sup>,其原因可能为样品采集地的生态环境不同而导致的对培养基的适应性有差异。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 57 卷. 北京: 科学出版社,1991.
- [2] 马毓泉. 内蒙古植物志[M]. 4 卷. 2 版. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社,1993.
- [3] 李书心. 辽宁植物志[M]. 下册. 沈阳: 辽宁科学技术出版社,1992.
- [4] 周以良. 黑龙江植物志[M]. 8 卷. 哈尔滨: 东北林业大学出版社,1998:30-31.
- [5] 周繇. 长白山区野生珍稀濒危药用植物资源评价体系的初步研究[J]. 西北植物学报,2006,26(3):599-605.
- [6] 李明瑾,林松毅,王二雷,等. 笃斯越桔笃斯越桔花青素的分离纯化研究[J]. 食品科学,2007(11):139-141.
- [7] 张兴茂,林松毅,刘静波,等. 长白山笃斯越桔果实原花青素浸提工艺的研究[J]. 食品科学,2007(11):186-188.
- [8] 尹澜,皮裕琰,张卯年,等. 笃斯越桔对兔眼光损伤前后视网膜电图及组织结构的影响[J]. 中华眼科杂志,2010,46(5):446-451.
- [9] 罗旭,朴善阳. 笃斯越桔人工培育技术研究[J]. 中国林副特产,2006,81(2):28-30.
- [10] 罗旭,张海峰,李华,等. 笃斯越桔嫩枝扦插繁殖技术[J]. 林业科技,2005,30(2):6-8.
- [11] 程广有,刁淑清. 笃斯越桔硬枝扦插技术研究[J]. 吉林林业学报,1999,15(3):163-165.
- [12] 聂飞,廖优江,何健,等. 美国兔眼蓝莓繁殖技术研究[J]. 亚热带植物科学,2004,33(4):39-41.
- [13] 顾地周,孙忠林,何晓燕,等. 牛皮杜鹃的组培快繁及种质试管保存技术[J]. 园艺学报,2008,35(4):603-606.
- [14] 张长青,李广平,朱士农,等. 兔眼越桔茎段快繁高效技术研究[J]. 果树学报,2007,24(6):837-840.
- [15] 唐晓杰,葛春华,杜凤国,等. 北土越桔组织培养快速繁殖技术研究[J]. 北华大学学报(自然科学版),2005(6):261-263.
- [16] 马怀宇,李亚东,刘庆忠,等. 高丛越橘离体叶片再生植株研究初报[J]. 东北农业大学学报,2004,35(2):129-134.
- [17] 黄文江,周守标,阚显照,等. 越橘属植物克隆的体外繁殖[J]. 中国野生植物资源,2005,24(2):62-64.
- [18] 马艳丽. 越橘组培快繁技术研究[J]. 吉林林业科技,2005(1):3-5.
- [19] 刘树英,安伟,孔令学,等. 兔眼越橘芽的诱导及再生[J]. 吉林农业大学学报,2004,26(6):632-635.
- [20] 刘永强,陈建军,吴俊遥,等. 笃斯越桔组培繁殖育苗技术研究初报[J]. 吉林农业科技,2008,37(4):40-44.
- [21] 顾地周,高捍东,顾美影,等. 笃斯越桔离体培养及植株再生体系的建立[J]. 林业科学研究,2009,22(2):226-229.
- [22] 顾地周,顾美影,曹逊,等. 高山笃斯越桔离体快繁体系建立及种质试管保存研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2009,40(2):200-204.

## *In vitro* Culture of Superior Individual of *Vaccinium uliginosum* from Changbai Mountain

ZONG Chang-ling, ZONG Cheng-wen, ZHAO Wei-wei, JIN Bing-kui, CAO Hou-nan  
(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

**Abstract:** Taking stem or shoot tip of *Vaccinium uliginosum* as the explants, *in vitro* culture of superior individual of *Vaccinium uliginosum* distributing in Changbai Mountain were studied. The results indicated that the media for inducing shoot clusters was WPM+ZT 2.0 mg/L; the medium for subculture multiplication culture was modified MS+ZT 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L, and the coefficient of multiplication was 5.3 after culture for 30 days; the medium for the rooting was 1/4 MS+IBA 0.5 mg/L with rooting rate of over 80% after culture for 50 days. Practices transplanting seedling was to tissue culture in sand 20 days, and then transplanting seedlings to the turfy soil: humus soil 1:2, and survival rate in nursery was up to 78%.

**Key words:** *Vaccinium uliginosum*; superior individual; *in vitro* culture; rapid propagation