

蓝莓组织培养工厂化育苗技术

杨艳敏¹, 陶承光², 魏永祥¹, 王兴东¹, 刘成¹, 魏鑫¹

(1. 辽宁省果树科学研究所, 辽宁 熊岳 115009; 2. 辽宁省农业科学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以“斯巴坦”、“北陆”、“伯克利”3个蓝莓品种为试材,研究了外植体最佳灭菌时间、增殖培养基及生根培养基,并研究了瓶外最佳海藻素生根浓度。结果表明:“斯巴坦”外植体处理最佳灭菌时间为 HgCl_2 7 min,灭菌效果好、伤芽少;蓝莓组培快繁以 WPM 为基本培养基,附加 ZT 0.5 mg/L、IBA 0.1 mg/L、 GA_3 0.5 mg/L 为最佳增殖培养基;1/2WPM+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L 培养基生根效果最好;瓶外生根最佳海藻素浓度为 667 mg/L。

关键词:蓝莓;组织培养;瓶外生根

中图分类号:S 663.203.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)07-0129-03

蓝莓果实中富含花青苷、鞣化酸等抗氧化物质,具有解除眼睛疲劳、改善视力、抗癌、延缓脑神经衰老、增强记忆力、防止心血管疾病、提高人体免疫力等功效^[1]。颇受全球消费者青睐,被列为人类五大健康水果之一,堪称 21 世纪“世界水果之王”。因此,为了满足日益增长的市场需求,加快蓝莓产业的发展,常规的繁殖方式难以满足市场对苗木的需求,进而促进了对对其进行组织培养快繁技术的研究,并获得了理想的结果。

第一作者简介:杨艳敏(1975-),女,本科,助理研究员,现从事小浆果遗传改良及生物技术工作。E-mail:yymzcb@163.com。

责任作者:陶承光(1955-),男,研究员,博士生导师,现从事农业科研管理及花卉与蔬菜和小浆果研究工作。

基金项目:辽宁省科技攻关资助项目(2011204001);农业部公益性行业专项资助项目(201103037);科技部成果转化资金资助项目(2011GB2B000013)。

收稿日期:2012-01-14

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蓝莓品种为“斯巴坦”、“北陆”、“伯克利”,在生长季节晴天上午采集当年生健壮枝条,去除叶片,剪成 1.5 cm 左右含单芽的茎段^[2],用流水冲洗 2~3 h,置超净工作台上用 75% 的酒精消毒 30 s 后,再用 0.1% 升汞(HgCl_2)消毒,设置消毒时间为 3、5、7 和 10 min 4 个处理,无菌水荡洗 3 次,每处理 10 个茎段,3 次重复,2 周后观察处理效果。

1.2 试验方法

1.2.1 增殖培养 诱导培养基为 WPM+ZT(玉米素) 1.0 mg/L+ GA_3 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L;增殖培养供试品种为“斯巴坦”、“北陆”、“伯克利”,培养基筛选,只加玉米素设 5 个处理, WPM+ZT (0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mg/L);ZT 与 IBA 配合使用以“伯克利”为试材,设 5 个

Induction of Embryonic Calluses by *in vitro* Culture of Immature Zygotic Embryo of *Pinus tabulaeformis*

MA Li-yuan¹, ZHANG Ying¹, SHANG Fu-qiang^{1,2}, YAO Rong-sheng², CUI Jian-guo¹

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Liaoning Institute of Forest Management, Dandong, Liaoning 118002)

Abstract: Effects of different developmental stages of immature zygotic embryo of *Pinus tabulaeformis* and different combination of plant growth regulators on induction of embryogenic calluses were studied. The results showed that the optimal time of sampling the immature zygotic embryo for induction of embryogenic calluses in Shenyang region of China was around 10th of July; and when DCR was adopted as the basal medium, combination of low concentration of KT and high concentration of 2,4-D was favorable the induction of embryogenic calluses. The highest initiation rate was up to 88.3% on DCR medium when 2 mg/L of 2,4-D and 0.5 mg/L of KT were added.

Key words: *Pinus tabulaeformis*; embryogenic calluses; immature zygotic embryo; somatic embryogenesis

处理,即 WPM+ZT 0.5 mg/L+IBA(0.05、0.10、0.15、0.20、0.25)mg/L。每处理接种 10 瓶,每瓶 10 个单芽茎段,3 次重复,培养 8 周后调查增殖效果。

1.2.2 生根培养 供试品种为北陆试管苗,生根培养基筛选共 12 个处理,加 IBA 培养基 7 个处理,即 1/2WPM+IBA(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6)mg/L,IBA+NAA 培养 5 个处理,即 1/2WPM+IBA 0.5 mg/L+NAA(0.05、0.10、0.15、0.20、0.25)mg/L。选取长势健壮的分化苗剪成 1.5~2.0 cm 的茎段接种,每处理接种 10 瓶,每瓶 10 个单株,3 次重复,在培养室内培养 6 周观察生根效果。

1.2.3 瓶外生根研究 供试品种为“伯克利”、“斯巴坦”、“北陆”组织培养苗,3 个品种枝段在不同浓度海藻素(购自上海永通化工有限公司)(500、667、1 000、2 000 mg/L)浸泡 3~5 min 后直接插入装有水苔的育苗盘中生根。每处理 300 株,3 次重复。调查始生根天数,30 d 后调查成活率、成活植株生根率和每株根数。

1.2.4 生根诱导物对试管苗瓶内、瓶外生根效果比较 供试品种为“伯克利”、“斯巴坦”、“北陆”组织培养苗,生根培养基选用上述试验效果最佳的配方,瓶外生根选用培养室增殖培养 6 周生长健壮的分化苗剪成 3~4 cm 枝段做扦插试材分别快速浸蘸 IBA(1 500 mg/L)、NAA(1 000 mg/L)、IBA+NAA(1 000 mg/L+1 000 mg/L)^[3]、在海藻素(667 mg/L)中浸泡 3~5 min,以水苔为培育基质,每处理 300 株,3 次重复。调查始生根天数、30 d 后调查成活率、成活幼苗生根率和每株根数。

1.2.5 培养条件 组培苗室内培养温度为 23~25℃,空气相对湿度 60%~70%,光照强度 1 500~3 000 lx,每日光照 12~14 h。

1.2.6 练苗与移栽 练苗、移栽时先将洗净的生根苗用 667 mg/L 的海藻素快速浸蘸后,栽入育苗盘(基质水苔)中,株高 10~20 cm 时,移入小营养钵,长至 35~50 cm 时,2~3 个丛状枝时即可出圃、定植。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对蓝莓外植体灭菌效果的影响

外植体处理 3 min 污染率高达 86.7%,5 min 污染率为 50.0%,10 min 最低 6.7%,但腋芽受损程度达 76.7%,7 min 污染率为 23.3%,腋芽受伤害率极低,处理效果最佳,灭菌效果好、伤芽少(表 1)。

表 1 HgCl₂ 处理时间对外植体的灭菌效果

灭菌时间 /min	处理芽数 /个	污染芽数 /个	污染率 /%	受伤芽数 /个	受伤芽率 /%
3	30	26	86.7a	0	0
5	30	15	50.0b	0	0
7	30	7	23.3c	0	0
10	30	2	6.7d	23	76.7

2.2 激素对蓝莓试管苗增殖的影响

2.2.1 玉米素(ZT)对试管苗增殖效果的影响 蓝莓各品种对 ZT 浓度的反应不同。在试验所用浓度范围内,随着 ZT 浓度不断增大,试管苗的增殖数量不断提高,但激素浓度增大到一定量时,试管苗质量有下降趋势。“斯巴坦”在 ZT 0.7 mg/L 时,增殖效果和试管苗质量都好;“伯克利”则在 ZT 0.5 mg/L 时表现最佳;而“北陆”的增殖效果在 ZT 0.5 mg/L 时最高,但试管苗较细不够粗壮(表 2)。

表 2 ZT 对蓝莓试管苗增殖的影响

处理 /mg·L ⁻¹	“斯巴坦”				“伯克利”				“北陆”			
	增殖数 /个	叶色	茎质量		增殖数 /个	叶色	茎质量		增殖数 /个	叶色	茎质量	
0.1	175.33d	浓绿	粗壮		172.00d	浓绿	粗壮		198.33d	浓绿	粗壮	
0.3	350.00b	浓绿	粗壮		355.67b	浓绿	粗壮		425.67b	浓绿	壮	
0.5	443.67a	绿	粗壮		500.33a	绿	较粗壮		549.33a	淡绿	较细	
0.7	493.67a	淡绿	壮		447.00a	淡红	细		426.33a	淡红	细弱	
1.0	308.33c	淡绿	细		286.67c	淡红	细弱		282.00c	红色	细弱	

2.2.2 ZT 与 IBA 配合使用对试管苗增殖效果的影响

由表 3 可知,在 ZT 浓度为 0.5 mg/L,IBA 为 0.05 mg/L 时,增殖芽数为 508.67 个,叶色浓绿、展开,茎粗壮;当 IBA 浓度为 0.15 mg/L 时的增殖芽数为 641.67 个,叶色淡绿、叶片展开,茎较壮;当 IBA 浓度为 0.20 mg/L 时的增殖芽数为 488.67 个,叶色淡绿,未全展开,茎细、弱;当 IBA 浓度为 0.25 mg/L 时的增殖芽数为 438.67 个,叶色淡绿、叶片未展开且小。IBA 浓度为 0.10 mg/L 时增殖效果最好,增殖芽数为 652.33 个,增殖倍数为 6.52 倍,并且试管苗粗壮,叶色浓绿。

表 3 ZT 与 IBA 配合使用对蓝莓试管苗增殖的影响

ZT+IBA/mg·L ⁻¹	增殖数/个	叶表现	茎表现
0.5+0.05	508.67	浓绿、展开	粗壮
0.5+0.10	652.33	浓绿、展开	粗壮
0.5+0.15	641.67	淡绿、展开	较壮
0.5+0.20	488.67	淡绿、未全展开	细弱
0.5+0.25	438.67	淡绿小、未展开	细弱、脆

2.3 生长素对蓝莓试管苗生根的影响

2.3.1 IBA 对试管苗生根的影响 当培养基 IBA 浓度为 0 和 0.1 mg/L 时,“北陆”试管苗生根率极低,当 IBA 浓度为 0.2~0.3 mg/L 时,生根率提高 18.6%~27.0%,每株根数达到 1.67~2.33 条,根长 0.12~0.27 cm,所生根均细弱。当 IBA 浓度达到 0.5 mg/L 时,生根率达到了 61.33%,每株生根数达到 4.66 条,根长为 0.25~0.41 cm 且生根匀称,IBA 浓度为 0.6 mg/L 时,根系出现愈伤组织,生根率降低。适合蓝莓的生根培养基 IBA 浓度为 0.5 mg/L(表 4)。

2.3.2 IBA 与 NAA 配合使用对试管苗生根的影响

当生根培养基中加入 IBA 0.5 mg/L 时,NAA 的浓度 0.10~0.15 mg/L 的处理效果较好,生根率达 67.33%~

72.67%,生根速度较快,当 NAA 的浓度加大到 0.30 mg/L 时,根上有较大愈伤组织会影响移栽成活(表 5)。

表 4 IBA 对蓝莓试管苗生根的影响

IBA 浓度/mg · L ⁻¹	生根率/%	每株根数/条	根长/cm	根质量
0	1.00f	0.7	0.02	纤细
0.1	6.33ef	1.0	0.02~0.06	纤细
0.2	18.67de	1.7	0.06~0.18	纤细
0.3	27.00d	2.3	0.12~0.27	纤细
0.4	52.67b	3.3	0.18~0.35	匀称
0.5	61.33a	4.7	0.25~0.41	匀称
0.6	37.67c	2.6	0.15~0.31	匀称、有愈伤

表 5 IBA 与 NAA 配合使用对试管苗生根的影响

IBA+NAA /mg · L ⁻¹	生根率 /%	每株根数 /条	根长 /cm	根表现
0.5+0.05	60.33bc	4.33	0.28~0.43	较匀称
0.5+0.10	67.33ab	4.67	0.27~0.45	匀称
0.5+0.15	72.67a	5.33	0.30~0.46	匀称
0.5+0.20	57.67c	3.67	0.22~0.27	有小愈伤组织
0.5+0.30	36.33d	2.67	0.06~0.12	有大愈伤组织

2.3.3 海藻素对蓝莓生根效果的影响 在一定范围内,随着海藻素浓度的升高,3 个蓝莓品种的生根率和每株根数均呈现出先升高后下降的趋势,当海藻素浓度为 667 mg/L 时“斯巴坦”、“伯克利”和“北陆”成活率分别为 98.5%、98.6%和 98.6%,生根率分别为 98.7%、97.6%和 96.7%,每株根数分别为 32.5、30.9 和 35.7 条,3 个品种的生根率和每株根数均达到高峰,显著高于其它 3 个浓度和对照(表 6)。

表 6 海藻素对蓝莓生根效果的影响

品种	处理/mg · L ⁻¹	始生根天数/d	成活率/%	生根率/%	每株根数/条
“斯巴坦”	500	15	95.2b	81.3c	26.2b
	667	17	98.5a	98.7a	32.5a
	1 000	18	92.5b	90.3b	21.6c
	2 000	21	91.5b	89.7b	15.4d
	0	32	35.6c	1.3d	3.5e
“伯克利”	500	16	94.5b	82.7c	27.3b
	667	17	98.6a	97.6a	30.9a
	1 000	19	93.7b	91.3b	25.5c
	2 000	20	90.2b	84.2c	18.6d
	0	31	33.6c	2.0d	1.7e
“北陆”	500	15	89.5b	85.3b	31.5b
	667	17	98.6a	96.7a	35.7a
	1 000	19	90.3b	86.0b	21.5c
	2 000	22	88.6b	84.7b	15.3d
	0	34	31.7c	1.3c	2.3e

2.3.4 不同生根诱导物质瓶内、瓶外生根效果 由表 7 可知,3 个品种的瓶外处理均表现出生根时间短,生根率和每株根数均高于试管内的。其中 3 个品种海藻素处理的生根天数最短均为 17 d,较试管外其它处理短 10 d 左右,较试管内短 15 d 左右。生根率 92.6%~98.8%,显著高于其它处理。每株根数最多,达 30.9~35.7 条。由图 1 可知,1 L 海藻素(667 mg/L)成本仅为 0.12 元,仅为

NAA(1 000 mg/L)的 2.4%,为 IBA(1 500 mg/L)的 1.3%,为 NAA+IBA(1 000 mg/L+1 000 mg/L)的 1.1%,采用海藻素可以大量降低生产成本。

表 7 不同生根诱导物瓶内、瓶外生根效果

品种	处理/mg · L ⁻¹	始生根 天数/d	成活率 /%	生根率 /%	每株根 数/条
“北陆”	试管内 IBA 0.5	35	—	61.3c	4.7c
	IBA+NAA 0.5+0.15	32	—	72.7b	5.3c
	试管外 海藻素 667	17	98.6a	96.7a	35.7a
	IBA 1 500	27	66.3c	70.4b	22.7b
	NAA 1 000	29	63.4c	73.1b	24.6b
	IBA+NAA 1 000+1 000	27	75.9b	76.4b	28.8b
	水 0	39	34.6d	1.7d	4.4c
“斯巴坦”	试管内 IBA 0.5	34	—	62.1c	4.2c
	IBA+NAA 0.5+0.2	33	—	69.2b	4.9c
	试管外 海藻素 667	17	98.5a	98.8a	32.5a
	IBA 1 500	28	66.3c	73.5b	20.4b
	NAA 1 000	30	61.3c	70.7b	21.6b
	IBA+NAA 1 000+1 000	27	75.7b	75.2b	25.6b
	水 0	44	27.6d	4.0d	3.9c
“伯克利”	试管内 IBA 0.5	34	—	65.0b	4.0d
	IBA+NAA 0.5+0.2	33	—	68.8b	3.7d
	试管外 海藻素 667	17	98.6a	92.6a	30.9a
	IBA 1 500	28	62.6c	61.0c	18.7c
	NAA 1 000	25	60.0c	62.7b	20.3b
	IBA+NAA 1 000+1 000	24	66.0b	65.0b	23.8b
	水 0	45	35.0d	3.7d	3.2d

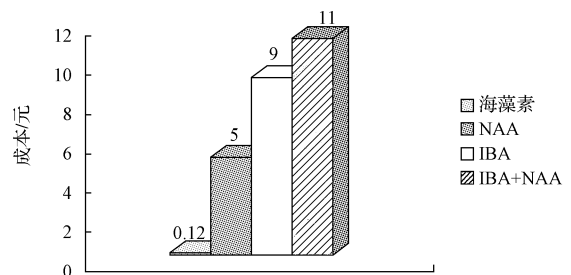


图 1 海藻素与生长素成本比较

3 结论

用 0.1% HgCl₂ 处理外植体适宜灭菌时间 7 min。蓝莓增殖适宜培养基为 WPM+蔗糖 30 g/L+琼脂 4.6 g/L+ZT 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L,增殖 6.5 倍。海藻素最佳瓶外生根浓度 667 mg/L,生根率 92.6%~98.8%,成本 0.12 元,仅为 NAA+IBA(1 000 mg/L+1 000 mg/L)的 1.1%。

参考文献

- [1] 孙阳,魏海蓉,程淑云,等. 蓝莓组培苗玻璃化及恢复研究[J]. 山东农业科学,2008(3):61-63.
- [2] 孙小环,许延玲,蒲远发. 蓝莓的组织培养技术[J]. 农业科技通讯,2010(6):222-223.
- [3] 程淑云. 蓝莓组培苗瓶外生根技术的研究[J]. 农业科技通讯,2009(4):48-50.

(该文作者还有杨玉春、王莉、张舵,工作单位同第一作者。)