DOI:10.11937/bfyy.201501028

蓝莓茎段离体快繁研究

赵兴宇[1],李丽丽[2,3],杨洪一[1]

(1.东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040;2.黑龙江省林业科学研究所,黑龙江 哈尔滨 150081;
3.黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘　要:以大兴安岭地区野生蓝莓苗木为试材,取当年生幼嫩茎段为外植体,探索建立蓝莓组培苗的快繁体系。结果表明:外植体消毒处理组合为75%乙醇处理10～15 s,0.1%升汞处理10 min。培养基为WPM培养基,愈伤组织诱导及不定芽增殖时期应用的激素组合ZT 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。利用IBA蘸根法诱导不定根,激素浓度为200 μg/mL,芽诱导率超过80%,生根率超过70%。

关键词:蓝莓;外植体;组织培养;不定根

中图分类号:S 663.203.6　**文献标识码**:A　**文章编号**:1001－0009(2015)01－0103－03

蓝莓属杜鹃花科越橘属(*Vaccinium*),原产北美,在我国主要集中分布于东北及西南地区。蓝莓苗木的繁殖方式有扦插、实生、分株等。目前,我国的蓝莓苗木在生产上通常以扦插繁殖方法为主,其它方法如种子育苗,根状茎扦插、分株等也有应用。近年来,植物组织培养方法以其不受生长季节限制、培养周期短、可短时间大量繁殖等优点逐渐被应用到蓝莓繁殖的领域。与草莓、马铃薯等作物相比,蓝莓组织培养尚处于起步阶段,主要问题在于组培过程中,蓝莓的增殖过程较慢,且生根较困难,根质量较差,因而移栽至田间后成活率较低。该研究以野生蓝莓当年生幼嫩茎段为外植体,探索建立蓝莓

第一作者简介:赵兴宇(1989-),男,吉林人,硕士研究生,研究方向为微生物学。

责任作者:杨洪一(1978-),男,吉林九台人,博士,副教授,现主要从事微生物学等研究工作。E-mail:yhyi1@sohu.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31200517;31300573);中国博士后科学基金资助项目(2011M500706;2012T50382)。

收稿日期:2014－10－11

[9] 王建辉,刘建军,陈克玲,等.三种葡萄病毒的RT-PCR检测和系统进化分析[J].果树学报,2013,30(2):197-201.

[10] 廖富荣,叶志红,陈青,等.应用RT-PCR和IC-RT-PCR方法检测南瓜花叶病毒[J].植物检疫,2013,27(2):60-64.

[11] 杨翠云,曹洁,于翠,等.烟草环斑病毒的RT-PCR和IC-RT-PCR检测方法研究[J].上海农业学报,2007,23(1):83-87.

[12] 李勇.葡萄病毒A多克隆抗体的制备及检测效果分析[D].武汉:华中农业大学,2009.

[13] Gambino G,Gribaudo I.Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control[J].Phytopathology,2006,96:1223-1229.

Study on Detection of *Grapevine virus A* by Immunocapture Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR)

WEI Mei-sheng,MA Jie,LI Gui-fen

(Institute of Plant Quarantine,China Academy of Inspection and Quarantine,Beijing 100029)

Abstract: *Grapevine virus A* (GVA) is one of pathogens causing grapevine rugose wood complex,which can be caused by many kinds of viruses simultaneously. In order to more effectively detecting this virus,an immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) was developed for detecting *Grapevine virus A* in this study. The results showed that 2 strains of GVA were detected using this method. There was no cross reaction with *Grapevine fanleaf virus*,*Arabis mosaic virus* and *Tobacco ringspot virus*. The sensitivity of the assay was 10 ng/mL for detecting purified GVA. Extract from GVA infected *Nicotiana benthamiana* leaves was detected to a dilution of 10^{-6}.

Keywords:*Grapevine virus A*;IC-RT-PCR

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

组培苗的快繁技术体系。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试材料为蓝莓多年生苗,于2012年10月份采自大兴安岭,移栽入花盆后保存于实验室。

1.2　试验方法

1.2.1　培养基及激素的选择　培养基为WPM培养基,115℃高温灭菌30 min。添加激素ZT 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/mL。

1.2.2　外植体处理　春季蓝莓新枝生长旺盛时期,选取当年生嫩茎,剪去两端茎节,取中间光滑部分作为外植体。将新鲜的外植体用清水浸泡30 min,水中加入1～2滴吐温-80,之后用自来水冲洗30 min。将外植体移入超净工作台中,75%乙醇消毒10～15 s,无菌水冲洗3～5次,每次1 min;无菌滤纸吸干表面水分,再用0.1%升汞消毒10 min,无菌水冲洗5次,每次1 min,无菌滤纸吸干表面水分。

1.2.3　愈伤组织的诱导　将消毒后的茎段用镊子平放在培养基上,之后进行组织培养。培养温度25℃,光照强度2 000 lx,光照时间16 h/d。

1.2.4　不定芽的增殖　待外植体脱分化形成一定大小的愈伤组织后,将愈伤组织切成小块重新接入新的培养基中进行培养,培养条件同上。培养30 d后统计不定芽数量。

1.2.5　幼苗生根培养　将3～4 cm高的由不定芽长成的蓝莓植株从基部剪下,采取高浓度生长素浸蘸法,将幼苗基部放入200 μg/mL的IBA溶液中,浸蘸10～15 s后将植株基部垂直插入WPM培养基中进行培养。

1.2.6　练苗　将高度为5 cm以上且已经诱导生根的蓝莓幼苗的培养瓶封瓶膜打开,在组培室中放置7 d,使幼苗初步适应外界的环境。再将其移栽入盛有移栽基质(V泥炭土∶V蛭石=1∶1)的花盆中进行培养,每隔14 d浇适量的0.5%的$FeSO_4$溶液。

2　结果与分析

2.1　外植体的选择及消毒处理

蓝莓组培快繁的外植体选择有很大的多样性,休眠枝条[1]、茎尖茎段[2]、叶片[3]均可以作为外植体,该试验选择去掉茎节的光滑茎段作为外植体,选择在其生长旺盛各项生理指标处于上升阶段的春夏交接之际采摘,在充分保证其生理活性的同时又使其对外消毒处理具有一定程度的耐受性。经消除处理后的茎段并未出现黄化及坏死等不良反应,同时也未出现微生物污染的情况,说明该消毒处理措施效果较好。

2.2　愈伤组织的形成

培养15 d后,蓝莓茎段从两端处逐渐膨大并形成愈伤组织。培养30 d后,超过80%的茎段形成了愈伤组织,愈伤组织直径0.5～1.5 cm不等。

2.3　不定芽的增殖

重新转接后的愈伤组织培养15～25 d后逐渐形成不定芽,结果表明,采用WPM培养基和ZT 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L的激素组合,在愈伤组织诱导不定芽上取得了良好的效果,芽诱导率(出芽的外植体数/接种的外植体总数)超过80%。

2.4　根的诱导

采取蘸根法处理后,幼苗生根状况良好,一般培养7 d左右,幼苗基部膨大形成根原基,继续培养7 d后从根原基处长出不定根(图1、图2),采用该处理方法幼苗的生根率在70%以上。

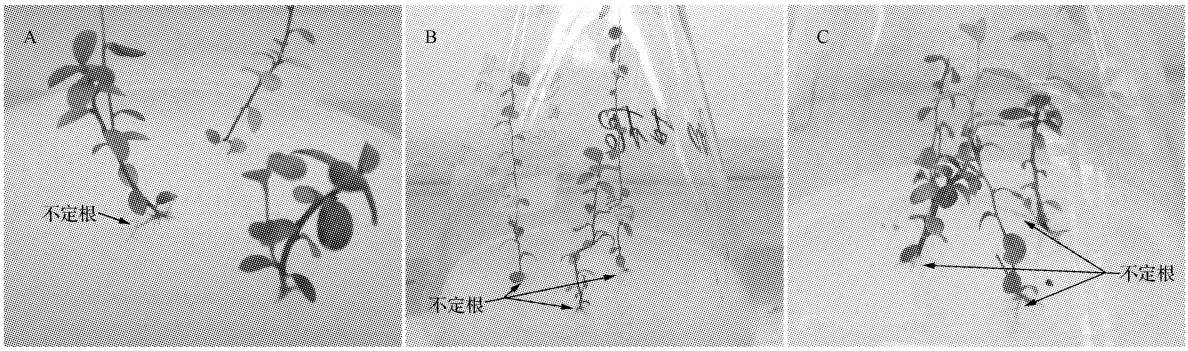

图1　蓝莓组培苗蘸根法处理15 d后不定根的诱导情况

Fig.1　The growh of adventitious roots of blueberry somaclone after treating it by dipping root for 15 days

3　讨论

3.1　外植体的消毒处理

外植体消毒试剂组合和时间是决定消毒成败的关键因素,若外消毒试剂浓度过低或时间过短,外植体上粘附的微生物有可能未完全杀死,易造成外植体污染。若外消毒试剂浓度过高或时间过长则会对外植体本身造成伤害,同样不利于蓝莓组培苗的获得。该试验所用的消毒体系是75%乙醇10～15 s,之后再用0.1%升汞处理10～15 min,消毒效果较好且对外植体损伤较小。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

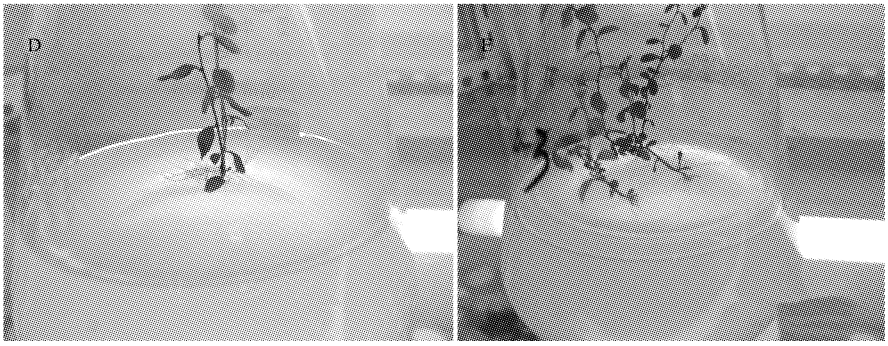

图 2 蓝莓组培苗蘸根法处理 30 d 后不定根的诱导情况

Fig. 2 The growh of adventitious roots of blueberry somaclone after treating it by dipping root for 30 days

3.2 出芽及成苗培养

培养基会为外植体脱分化提供必要的营养成分,以往的培养过程多用 MS 培养基,但是蓝莓是木本植物,使用 WPM 培养基的研究较多,特别是在初代培养过程中,以 WPM 为基本培养基效果较好,MS 培养基效果较差[4-5]。

3.3 激素的选择

有研究表明,ZT 对蓝莓侧生芽的诱导起着主导作用[2-3],同时 ZT 的成苗效果也远好于 BA[3],ZT 诱导蓝莓外植体出芽及成苗的浓度为 1.0～2.0 mg/L,一般不宜超过 2.0 mg/L[6-7],但也有报道显示 ZT 浓度高于 0.8 mg/L时便会使蓝莓外植体分化形成的不定芽中有效芽的数量大幅减少,并且愈伤组织玻璃化严重[8-10],该研究中应用了偏高浓度的 ZT(2.0 mg/L),有效芽数量较多,且并未出现玻璃化现象。

参考文献

[1] 刘庆忠,赵红军.高灌蓝莓的组织培养及快速繁殖[J].植物生理学通讯,2002,38(4):39-41.

[2] 黄文江,刘庆忠,阚显照.高灌蓝莓离体繁殖的研究[J].安徽师范大学学报(自然科学版),2004,27(3):314-317.

[3] 郝明明,杜小春,周文婷,等.蓝莓的快速繁殖[J].安徽农业科学,2010,38(22):11795-11761.

[4] 郭卫东.高丛蓝莓组培体系及种子萌发率的建模研究[D].金华:浙江师范大学,2010.

[5] 韩婷婷,孙周平,吴媛媛.矮丛蓝莓茎段再生植株研究[J].中国农学通报,2010,26(5):164-168.

[6] 郑琪,孙叶芳,赵虎,等.几种"南高丛"蓝莓新品种的组培快繁技术研究[J].上海农业科技,2011(2):21-24.

[7] 张彩玲,朱延明,曹天旭.蓝莓"美登"组培快繁及瓶外生根技术的研究[J].特产研究,2012(1):40-43.

[8] 王连润,马钧,胡忠荣,等.蓝莓离体快速繁殖研究[J].红河学院学报,2009(5):16-18.

[9] 刘树英,张志东,吴林,等.兔眼越桔芽增生诱导培养基及激素的筛选[J].吉林农业大学学报,2002(1):55-57.

[10] 田新华,邢亚娟,张妍妍.蓝莓组织培养及外部因子对其生长的影响[J].黑龙江生态工程职业学院学报,2009(1):19-21.

Study on Rapid Proliferation of Stem Segments *in vitro* of Blueberry

ZHAO Xing-yu[1], LI Li-li[2,3], YANG Hong-yi[1]

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Institute of Forestry Science of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150081; 3. Institute of Crop Tillage and Cultivation, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Taking the wild blueberry seedlings in Greater hinggan mountains area as test materials, using the young stem segments as explants, the blueberry somaclone of rapid propagation system was explored. The results showed the explants disinfection treatment combination was 75% ethanol for 10－15 seconds and 0.1% mercuric chloride for 10 min. The medium was WPM, and the hormones were ZT 2.0 mg/L＋NAA 0.2 mg/mL in the steps of inducement of callus and proliferation of adventitious buds. Adventitious roots were induced with dipping method by 200 μg/mL IBA. The results showed that callus and adventitious buds could be formed from stem of blueberry by the medium and hormones, and the induced ratio of adventitious buds was higher than 80%. In addition, the rooting rate was more than 70%.

Keywords: blueberry; explants; tissue culture; adventitious root

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn