

# 兔眼蓝莓‘顶峰’的离体快繁技术研究

李 森<sup>1</sup>, 高丽霞<sup>2</sup>, 刘 念<sup>3</sup>, 张施君<sup>3</sup>

(1. 仲恺农业工程学院 科技处, 广东 广州 510225; 2. 仲恺农业工程学院 健康农业研究所, 广东 广州 510225;

3. 仲恺农业工程学院 园艺园林学院, 广东 广州 510225)

**摘 要:**以兔眼蓝莓‘顶峰’的带芽茎段为外植体,研究了腋芽诱导、增殖、生根和出瓶移栽的最佳培养条件,建立了‘顶峰’的离体快繁技术体系。结果表明:适宜芽诱导的培养基为 WPM+ZT 0.5 mg/L;适宜苗增殖的培养基为 WPM+ZT 1 mg/L;适宜组培苗生根的培养基为 WPM+ZT 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L。在生根培养基中用河沙代替琼脂粉固定植株,易于清洗出瓶苗根系上粘附的培养液,避免损伤不定根系,60 d 后组培苗的移栽成活率达 80%。

**关键词:**兔眼蓝莓;离体繁殖;生根

**中图分类号:**S 663.203.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)24-0101-03

蓝莓(*Vaccinium* spp.)属杜鹃花科越橘属的小浆果灌木。蓝莓叶片卵圆形,互生,叶片大小不等,3.0~8.0 cm,视品种而定。总状花序,侧生或顶生,花单生或双生在叶腋间。果实呈蓝色,被一层白粉,营养成分丰富,不仅是一种果品,还是一种流行的保健和功能食品<sup>[1-2]</sup>。兔眼蓝莓(*Vaccinium ashei*)是从野生兔眼越橘品种中选育出来的栽培品种,果实成熟前其颜色红如兔眼,因此得名。‘顶峰’(Climax)是兔眼蓝莓中的优良品种之一,寿命长,果实质量在 1 g 以上,多汁并有香味,风味佳。其繁殖技术通常采用播种或扦插方法,繁殖速度

慢,生产规模难以扩大。通过组织培养技术能够在短期内获得大量种苗,且操作不受季节限制。目前蓝莓‘顶峰’的组织培养和快速繁殖研究尚鲜见报道,该试验旨在提供蓝莓‘顶峰’的组织培养快速繁殖技术,为该品种的大规模繁殖和开发利用奠定试验和技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

蓝莓‘顶峰’外植体取自仲恺农业工程学院的钟村农场,于晴天剪取健壮优株萌发的新枝条作为外植体备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 去除枝条上的叶片,保留腋芽,将枝条剪切成长约 2 cm 的茎段,用自来水冲洗干净,在超净工作台上用浓度为 75% (v/v) 的酒精浸泡 30 s,再用 0.1% (w/v) HgCl<sub>2</sub> 浸泡 2~3 min,无菌水冲洗 5~6 次,无菌滤纸吸干水分。

1.2.2 腋芽的诱导 将消毒处理过的茎段分别接种于不同的诱导培养基,观察腋芽的诱导和生长情况,30 d 后统计污染率和萌芽率。污染率(%) = 污染外植体总数 / 总外植体数 × 100,萌芽率(%) = 萌芽外植体总数 / 总

**第一作者简介:**李森(1982-),男,硕士,助理研究员,现主要从事园艺植物良种繁育与商品化生产研究及科研管理等工作。E-mail: 88045361@qq.com.

**责任作者:**张施君(1974-),女,博士,副研究员,现主要从事园艺植物育种与栽培等教学与科研工作。E-mail: guanyehuaazu@163.com.

**基金项目:**广东省科技计划资助项目(2013B020304006);广东省科技厅产学研合作资助项目(2013B090200065)。

**收稿日期:**2015-07-27

**Abstract:** Using the anther of *Platycodon grandiflorum* as explants, different density of anther were inoculated and different concentrations of sucrose were added respectively in the culture medium, and their effect on induction rate of anther was studied. The results showed that MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA as induction medium, with the increase of density callus induction rate was decreased; MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L BA+2,4-D as induction medium, callus induction rate first increase and then decrease with the increase of density, when the density reach to 15, the induction rate was the highest; and the induction rate of the latter were significantly higher than that of the former induction rate. MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA as induction medium, attaching different concentrations of sucrose, with the increase of sucrose concentration, callus induction rate showed a trend of rise after the fall of the first, while the concentration of sucrose reached to 60 g/L, the induction rate was the highest.

**Keywords:** *Platycodon grandiflorum*; anther; concentrations of sucrose; inoculated density

外植体数 $\times 100$ 。

1.2.3 无菌苗的继代培养 将以上培养获得的无菌植株切成约 2 cm 的茎段,分别接种于不同的继代培养基中。每 30 d 继代 1 次。观察植株的生长情况,统计株高、分枝数和增殖率。外植体接种后节间开始伸长,植株长高,30 d 后测量株高;统计植株上萌发的新枝条数,增殖系数=生长 30 d 后株高/接种时株高。

1.2.4 生根培养 继代培养中获得的高约 3~5 cm 的无菌苗转移到生根培养基中进行 2 个月生根培养,诱导出不定根系,试管苗生长健壮,叶色浓绿。

1.2.5 试管苗的移栽 生根培养 2 个月后,将瓶盖打开,练苗 3 d 后取出试管苗,用清水冲洗根部培养基,栽入泥炭土中,浇透水,环境温度 22~25℃,湿度 80%~90%,60 d 后统计移栽成活率。

1.2.6 培养条件 以 WPM 培养基为基本培养基,附加不同激素,培养基中均添加 30 g/L 蔗糖,pH 5.2,初代和继代培养基中添加 6 g/L 琼脂,生根培养基中用河沙代替琼脂,以利于洗净出瓶试管苗上沾染的营养液;培养温度为(25 $\pm$ 2)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间为 12 h/d。

## 2 结果与分析

### 2.1 腋芽的诱导

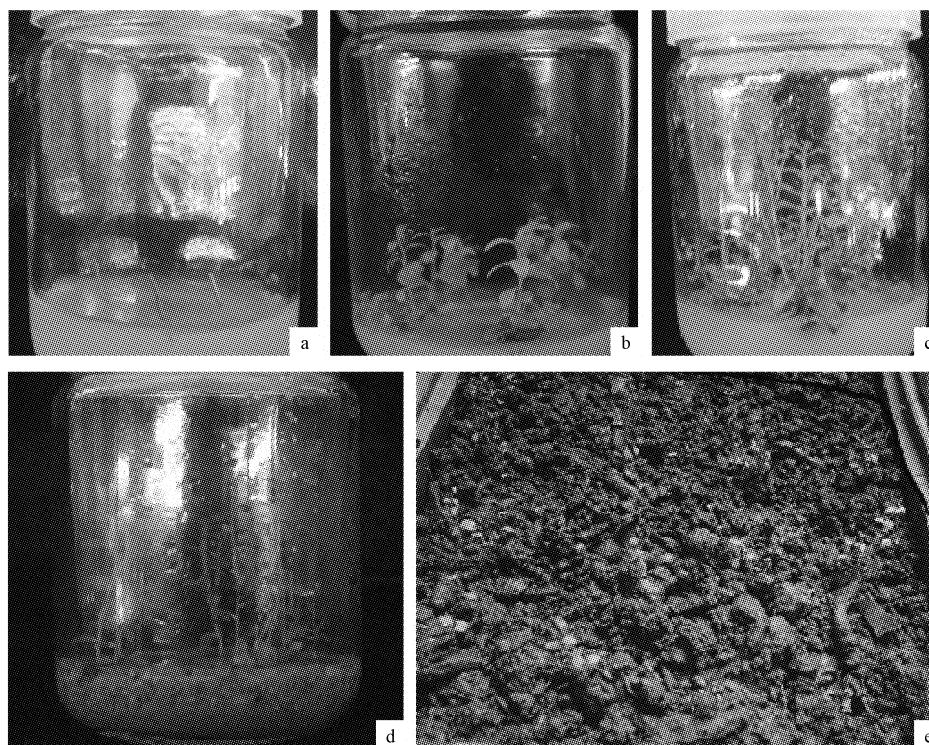
切取 2 cm 的茎段,消毒后接种到腋芽诱导培养基

中(图 1a)。外植体接种后约 1 周恢复生长,腋芽展开,节间伸长,不断长出新叶片。接种 2~3 周,有新的分枝发出(图 1b)。从表 1 可以看出,不同激素处理皆能诱导茎段的生长,但是诱导率有差异。在 6-BA 作用下,60% 的外植体能够产生 1~2 个腋芽,生长 1 个月株高约 3.2 cm。用 ZT 代替 6-BA 能够明显加强芽的诱导率和植株的生长,低浓度的 ZT (0.5 mg/L)即可诱导 75% 的外植体产生腋芽,株高约 5 cm,说明 ZT 对蓝莓芽的生长有显著作用。ZT 的浓度升高至 1 mg/L 的诱导效果最好,培养基中若添加 NAA 会导致愈伤组织的产生。因此,培养基中只添加 ZT 即可有效诱导外植体的生长。

表 1 不同激素配比对腋芽诱导的影响

Table 1 Effect of different hormone combinations on axillary bud induction

激素及浓度 Hormone concentration /(mg $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	接种外植体数 Explant number /个	污染数 Contamination number /个	污染率 Contamination rate /%	萌芽数 Budding number /个	诱导率 Induction rate /%
6-BA 2	20	5	25.0	12	60.0
ZT 0.5	20	3	15.0	15	75.0
ZT 0.5+NAA 0.1	20	4	20.0	15	75.0
ZT 1	20	3	15.0	16	80.0
ZT 2	20	3	15.0	14	70.0



注:a.初代培养的茎段;b.茎段腋芽的诱导;c.丛生芽的增殖;d.试管苗的生根培养;e.试管苗的出瓶移栽。

Note:a,early generation induced culture of stems;b,induction of axillary buds;c,multiplication of shoots;d,rooting culture of test-tube plantlets;e,ex vitro transplantation of test-tube plantlets.

图 1 兔眼蓝莓的组织培养

Fig. 1 Tissue culture of *Vaccinium ashei*



## 2.2 无菌苗的继代增殖

将生长 1 个月的无菌植株分切成约 2 cm 的茎段转接到添加不同激素的增殖培养基中,无菌苗的生长和新枝条的分化与 ZT 的浓度密切相关。从表 2 可以看出,当 ZT 浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0 mg/L 时,增殖系数分别为 11.2、13.5、13.9 和 9.1,其中以 ZT 1.0 mg/L 和 ZT 2.0 mg/L 增殖效果最好,无菌苗的分枝数和增殖系数高,ZT 1.0 mg/L 对株高的促进效果最好,平均株高达到 6.6 cm (图 1c)。ZT 的浓度从 2.0 mg/L 增加到 5.0 mg/L,增殖系数、分枝数和株高均明显降低,说明高浓度的 ZT 抑制了无菌苗的生长。

表 2 不同激素浓度对无菌苗继代增殖的影响

Table 2 Effect of different hormone concentrations on subculture proliferation of *in vitro* plantlets

ZT 浓度 ZT concentration /(mg · L <sup>-1</sup> )	接种株数 Explant number /株	平均分枝数 Average branch number/条	增殖系数 Proliferation coefficient	平均株高 Average height/cm
0.5	20	2.5	11.2	5.4
1	20	5.4	13.5	6.6
2	20	5.2	13.9	6.2
5	20	2.4	9.1	4.5

## 2.3 试管苗的生根与移栽

将无菌苗转移到生根培养基中进行 2 个月的生根培养(图 1d),从表 3 可以看出,培养基只添加 IBA 时,可

表 3 不同激素浓度对无菌苗生根的影响

Table 3 Effect of different hormone concentrations on root of *in vitro* plantlets

激素及浓度 Hormone concentration /(mg · L <sup>-1</sup> )	接种株数 Vaccination number/株	平均根数 Average root number/条	平均根长 Average root length/mm	平均株高 Average height/cm
IBA 0.05	20	5.2	3.2	3.6
ZT 0.5+IBA 0.05	20	6.4	4.5	5.6
ZT 0.5+IBA 0.1	20	6.2	5.4	5.8
ZT 1.0+IBA 0.1	20	6.4	5.8	6.2
ZT 1.0+IBA 0.2	20	6.3	5.6	6.0

以诱导出不定根,但根长和株高均增长缓慢,说明培养基中还需要添加生长素以促进枝、叶和根的伸长。当 ZT 浓度由 0.5 mg/L 升到 1 mg/L 时,根数、根长和株高均有明显增加。当试管苗长到 4~7 cm 时即可出瓶移栽(图 1e),60 d 后统计成活率可达 80% 以上。

## 3 结论与讨论

在越橘属植物的离体培养研究中,ZT 是诱导腋芽萌发,无菌苗增殖和生长常用激素<sup>[3-4]</sup>,如黄文江等<sup>[5]</sup>发现随着 ZT 浓度的上升,高灌蓝莓的增殖率增大,当 ZT 浓度达到 1 mg/L 时,蓝莓的增殖效果最好,张长青等<sup>[6]</sup>使用 ZT 建立了兔眼越橘的茎段快繁体系,过高的 ZT 浓度会导致玻璃化,宁志怨等<sup>[7]</sup>使用 ZT 和 NAA 诱导蓝莓丛生芽的增殖,发现 ZT 浓度达到 1 mg/L 会增加愈伤组织和玻璃化现象。试验研究了兔眼蓝莓‘顶峰’的组织培养技术使用 ZT 和 NAA 诱导腋芽发生和增殖,结果显示 NAA 会导致愈伤组织的产生,说明培养基中只添加 ZT 即可有效诱导外植体生长。在生根阶段则需要 ZT 和 IBA 的组合,以保证枝叶和根系的有效生长。

### 参考文献

- [1] 苑兆和. 世界蓝莓生产历史与发展趋势[J]. 落叶果树, 2003, 35(1): 49-52.
- [2] 李森, 高丽霞, 青木宜明. 南部高丛类型蓝莓适宜盆栽品种的选择研究[J]. 广东农业科学, 2011, 38(15): 31-32.
- [3] 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(3): 253.
- [4] 张力思, 魏海蓉, 艾呈祥, 等. 培养基组分对蓝莓组培增殖效率的影响[J]. 落叶果树, 2006(4): 13-14.
- [5] 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.
- [6] 张长青, 李广平, 朱士农, 等. 兔眼越橘茎段快繁高效技术研究[J]. 果树学报, 2007, 24(6): 837-840.
- [7] 宁志怨, 江芹, 陈静娴, 等. 蓝莓丛生芽的诱导及植株再生[J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 64-66.

## Study on the Technique of *in vitro* Rapid Propagation of *Vaccinium ashei* ‘Climax’

LI Sen<sup>1</sup>, GAO Lixia<sup>2</sup>, LIU Nian<sup>3</sup>, ZHANG Shijun<sup>3</sup>

(1. Science and Technology Department, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225; 2. Institute of Health and Agriculture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225; 3. College of Horticulture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225)

**Abstract:** Taking the stems with axillary buds from *Vaccinium ashei* ‘Climax’ as materials, the induction, propagation, rooting and transplanting of the plantlets were studied to set up technique of *in vitro* rapid propagation in ‘Climax’. The results showed that the suitable medium for adventitious bud induction was WPM+ZT 0.5 mg/L, the suitable medium for bud proliferation was WPM+ZT 1 mg/L, the optimal medium for bud rooting was WPM+ZT 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L. During the rooting culture period, sand was used to fix plantlets instead of agar so that the medium which stuck to the root system could be washed easily and the roots could be protected from damage when transplanting. The survival rate reached 80% after 60 days’ transplanting.

**Keywords:** *Vaccinium ashei* ‘Climax’; *in vitro* propagation; rooting