

高丛越橘“奥尼尔”的组织培养

李 森¹, 高丽霞², 刘 念³, 张施君³

(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:以高丛越橘“奥尼尔”的带芽茎段为外植体,采用组织培养技术,研究了不同配比的 ZT、6-BA、NAA 和 IBA 植物激素对高丛越橘“奥尼尔”外植体诱导的影响。结果表明:最佳的外植体消毒条件为 0.1% HgCl₂ 4 min, 萌芽率可达 71.4%。腋芽诱导的初代培养宜用 WPM+1.0 mg/L ZT 培养基,侧枝能够萌发,苗高 4.7 cm;适宜的增殖培养基为 WPM+2.0 mg/L ZT, 增殖系数达到 13.0;试管苗的生根培养基为 1/2WPM+0.1 mg/L IBA。当试管苗长至 5 cm 出瓶移栽,成活率可达 80%以上。

关键词:高丛越橘“奥尼尔”;组织培养;增殖

中图分类号:S 666.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)09-0102-04

越橘(*Vaccinium* spp.)属杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium*)多年生浆果类灌木,果实蓝色或红色,其中蓝果越橘俗称蓝莓。越橘果肉细腻,风味独特,营养丰富,富含花青苷,抗氧化能力强,具有重要的保健功能,目前已被联合国粮农组织定为世界五大健康食品之一^[1-2]。

越橘的栽培类型主要有高丛越橘(*V. corymbosum*)、兔眼越橘(*V. ashei*)、矮丛越橘(*V. angustifolium*)等^[2]。其中高丛越橘树体高大,可达 1~2 m,“奥尼尔”(*V. corymbosum* ‘O’Neal’)是高丛中的优良品种之一,喜湿润、温暖气候条件,适于我国黄河以南地区如华中、华南地区种植。花期约为 3 月,果熟期为 5 月中旬至 6 月。果实较大,品质佳,鲜食口感好,适合供应鲜果市场销售,也可以加工食用。传统的越橘播种和扦插技术存在繁殖速度慢,受母株取材限制的缺点,生产规模难以扩大^[3]。组织培养技术是越橘大量快速繁殖的有效途径,该试验旨在研究“奥尼尔”的组培快繁技术,以期为试管

苗规模化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

越橘“奥尼尔”露地栽培在仲恺农业工程学院农场,于晴天剪取当年生枝条作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 去除枝条上的叶片,剪成 2~3 cm 长的茎段,用自来水冲洗 5 min。在超净工作台上用 75%酒精浸泡 30 s,再用无菌水冲洗 1 遍,用镊子将茎段夹出置入 0.1% HgCl₂ 消毒,用无菌水冲洗 6 遍。

1.2.2 外植体的初代培养 将已消毒的茎段接种到附加不同浓度 ZT 的 WPM 培养基上,每处理 7 瓶,每瓶接种 3 株,3 次重复。7 d 后腋芽开始萌动,叶片逐渐伸长。培养 30 d 后,统计外植体污染率、萌芽率、分枝数和株高。

1.2.3 丛生芽的继代增殖 将诱导获得的丛生芽转接到分别附加不同浓度 ZT、6-BA 和 NAA 的培养基上,每处理 7 瓶,每瓶接种 3 株,3 次重复。30 d 后统计丛生芽的增殖系数和植株高度。

1.2.4 生根培养 将无菌苗分切成高约 2 cm 的茎段转接到附加不同浓度 ZT 和 IBA 的培养基上进行壮苗和生根培养,每处理 7 瓶,每瓶接种 3 株,3 次重复。60 d 后统计生根率、生根数和根长。

1.2.5 试管苗的移栽 用镊子将高 5 cm 以上的试管苗从培养瓶中取出,洗净根部培养基,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 以上培养基中均添加 30 g/L 的蔗

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研究及教学等工作。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);广东省科技计划资助项目(广东省落叶果树工程技术研究中心)(2015B090903082)。

收稿日期:2015-12-23

糖,6 g/L 琼脂,pH 5.2,培养温度为(25±2)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间为 12 h/d。

1.3 项目测定

萌芽率(%)=成活的外植体数/接种的外植体数×100;增殖系数=增殖芽长/接种芽长;生根率(%)=生根苗数/接种苗数×100。

1.4 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外植体的初代培养

由表 1 可知,0.1%HgCl₂ 消毒 3 min 的外植体污染率最高,为 30.2%。消毒时间延长 1 min,外植体的污染率降低至 17.5%,当消毒时间延长至 5 min 时,污染率降低至 9.5%,但芽的死亡增多,导致萌芽率显著下降。由此可见,最佳的消毒时间应为 4 min。将茎段接种到不同的诱导培养基中(图 1.1),约 7 d 后腋芽开始萌动,恢复生长,叶片逐渐伸长展开,茎段也伸长(图 1.2)。从表 2 可以看出,3 种培养基均能诱导腋芽的萌发,其中,1.0、

2.0 mg/L ZT 培养基的诱导效果差异不显著,无菌苗生长健壮,说明 1.0 mg/L ZT 即可有效诱导腋芽生长。

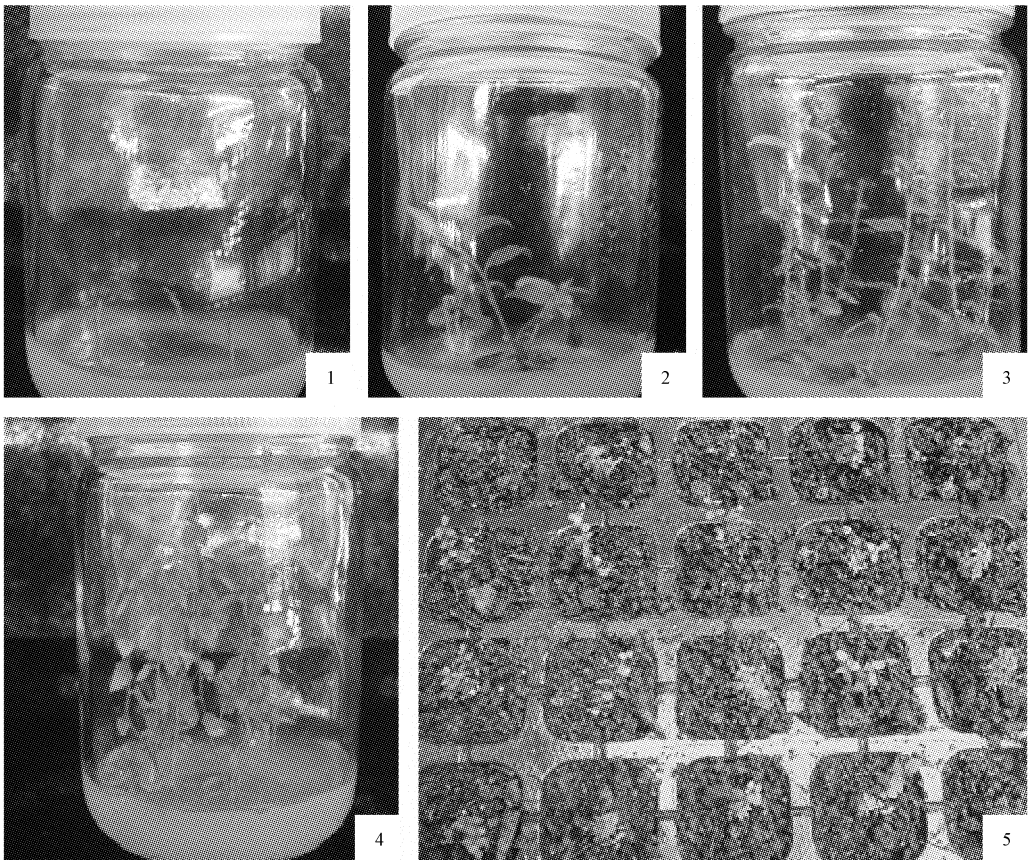
表 1 不同消毒时间对外植体诱导的影响

Table 1 Effect of different sterilizing time on explant induction					
消毒时间	外植体数	污染数	污染率	萌芽数	萌芽率
Sterilizing time/min	Explant number/个	Contamination number/个	Contamination rate/%	Germination number/个	Germination rate/%
3	21	6.3±0.6a	30.2±2.7a	13.3±0.9b	63.5±5.6b
4	21	3.7±1.2b	17.5±5.5b	15.0±0.7a	71.4±4.8a
5	21	2.0±0.0c	9.5±0.0c	13.7±0.6b	65.1±2.8b

注:同列数据后不同字母表示差异显著(P<0.05)。下同。
Note: Different letters in the same column indicate significant difference (P<0.05). The same below.

表 2 不同激素浓度对外植体诱导的影响

Table 2 Effect of hormone concentration on explant induction			
ZT 浓度	外植体数	分枝数	株高
Concentration/(mg·L ⁻¹)	Explant number/个	Branch number/个	Height/cm
0.5	21	1.2±0.1b	3.9±0.4b
1.0	21	1.6±0.1a	4.7±0.5a
2.0	21	1.7±0.1a	4.8±0.6a



注:1. 茎段的初代培养;2. 腋芽的萌发与生长;3. 丛生芽的增殖培养;4. 试管苗的生根培养;5. 试管苗的出瓶移栽。

Note: 1. Primary culture of stems; 2. Axillary bud germination and growth; 3. Proliferation culture of adventitious buds; 4. Plantlet rooting culture; 5. Plantlet transplanting.

图 1 越橘“奥尼尔”的组织培养
Fig. 1 Tissue culture of V. 'O'Neal'

2.2 丛生芽的继代增殖

在继代增殖试验中,比较了3种外源激素6-BA,ZT和NAA对丛生芽增殖的效果。从表3可以看出,6-BA对丛生芽的诱导效果不明显,而ZT的诱导效果显著(图1.3),当ZT浓度为2.0 mg/L时,增殖系数达到13.0,ZT浓度继续增加,分枝数、株高和增殖系数都不再显著

增加,说明2.0 mg/L ZT是最适合丛生芽增殖的浓度。在基本培养基中同时加入ZT和NAA,丛生芽的长势没有明显加强,培养2周后,芽基部出现了愈伤组织,分枝数和株高没有显著变化,说明在增殖培养基中不需要添加NAA,而只需ZT即可有效保证丛生芽的生长和增殖。

表3 不同激素组合对丛生芽增殖的影响

Table 3 Effect of hormone combination on bud multiplication

激素及浓度 Hormone and concentration/(mg·L ⁻¹)	外植体数 Explant number/个	分枝数 Branch number/个	株高 Height/cm	增殖系数 Multiplication coefficient
6-BA 1.0	21	2.2±0.1c	3.3±0.3c	3.8±0.2c
6-BA 2.0	21	2.3±0.1c	3.6±0.3c	4.2±0.3c
ZT 1.0	21	3.0±0.1b	5.5±0.3b	8.6±0.5b
ZT 2.0	21	3.7±0.2a	6.4±0.2a	13.0±0.4a
ZT 2.0+NAA 0.1	21	3.5±0.3a	6.0±0.2ab	12.3±0.2a
ZT 3.0	21	3.6±0.3a	6.4±0.3a	13.2±0.5a

2.3 试管苗的生根与移栽

把试管苗分切成约2 cm的长度,从继代培养转入添加不同浓度IBA生根培养基中(表4)。培养3~4周后可见幼苗的基部长出不定根,说明IBA对试管苗生

根有明显促进作用,其中0.10、0.20 mg/L IBA诱导的根数和根长差异不显著。当IBA浓度相同时,1/2WPM与全量WPM的效果差异不显著,因此该试验以1/2WPM+0.10 mg/L IBA为最适生根培养基。

表4 不同培养基对试管苗生根的影响

Table 4 Effect of different media on plantlet rooting

培养基 Medium/(mg·L ⁻¹)	接种苗数 Inoculation number/个	生根苗数 Rooting plantlet number/个	生根率 Rooting rate/%	根数 Root number/个	根长 Root length/mm
WPM+IBA 0.05	21	21	55.5±2.7a	3.9±0.2b	6.8±0.6b
WPM+IBA 0.10	21	21	60.3±5.5a	6.6±0.4a	7.8±0.4a
WPM+IBA 0.20	21	21	58.7±7.3a	6.8±0.4a	10.1±0.3a
1/2WPM+IBA 0.10	21	21	57.1±4.8a	6.5±0.4a	9.6±0.5a

组培养生根后,当苗长至5~6 cm时,将苗从培养瓶中取出,用自来水洗掉根部培养基,栽入泥炭土质中(图1.4),浇透水,保持环境温度22~25℃,湿度80%~90%,成活率达到80%以上。

3 结论与讨论

WPM基本培养基是一种低无机盐浓度的培养基,适于多种木本植物的离体培养^[4],刘树英等^[4]比较了WPM培养基与MS、Anderson和Knop培养基对兔眼越橘的离体培养,发现越橘丛生芽在WPM培养基中的长势最好。黄文江等^[5]、朱宏芬等^[6]、李丽容等^[7]、张力思等^[8]均以WPM为基本培养基建立了蓝莓的离体培养体系。ZT是越橘组织培养中常用的植物激素^[9-10],该试验比较了ZT与6-BA、NAA对外植体诱导与增殖的影响,发现ZT对越橘的芽诱导和增殖效果显著,而6-BA促进不定芽生长的效果不明显,NAA会导致茎段基部产生褐色愈伤组织,说明增殖培养基中不宜加入NAA,而只需添加ZT即可有效诱导丛生芽的萌发和生长。

综上所述,越橘“奥尼尔”的最佳消毒时间为4 min,腋芽萌发的最佳培养基为WPM+1.0 mg/L ZT,试管苗

增殖的最佳培养基为WPM+2.0 mg/L ZT,生根的适宜培养基为1/2WPM+0.1 mg/L IBA。

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, 20(1): 49-52.
- [2] 刘庆忠, 赵红军. 越橘高效栽培与加工利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 64-71.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [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] 朱宏芬, 沈岚, 黄坚, 等. 兔眼蓝莓“灿烂”组织培养与植株再生研究[J]. 北方园艺, 2012(19): 105-107.
- [7] 李丽容, 金开正. 兔眼蓝莓组培快繁试验[J]. 中国南方果树, 2010, 39(1): 71-72.
- [8] 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, 38(4): 13-14.
- [9] 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.
- [10] 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(21): 64-66.

宁夏枸杞花药培养胚状体的诱导

张 波, 罗 青, 张 曦 燕, 曹 有 龙

(国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

摘 要:以宁夏枸杞新优品系为试材,利用花药培养技术,研究了不同基因型、激素配比、低温预处理、热激处理、添加活性炭对其胚状体诱导率的影响。结果表明:宁夏枸杞新优品系‘06-16’在基因型筛选中,诱导率最高为 0.95%,通过对试验体系进行优化,2.0 mg/L KT 与 0.2 mg/L 2,4-D 的组合诱导率达到 2.07%。4℃低温预处理 3 d 或 5 d、33℃热激处理 5 d、活性炭浓度为 0.8%,均能提高新优品系‘09-106’的胚状体诱导率。

关键词:宁夏枸杞;花药培养;胚状体

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)09-0105-04

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)是我国重要的特色药用植物资源之一^[1],其根、茎、叶、果均可入药^[2],具有生态、经济及社会效益^[3]。采用群体选优、杂交的方法选育新品种耗时耗力、效率低^[4]。而利用花药培养直接成苗技术,可快速获得纯系和突变体^[5],同时可为分子

理论研究提供基础材料。

我国枸杞花药培养起源于 20 世纪 80 年代,顾淑荣^[6]首次获得宁夏枸杞花粉植株,樊映汉等^[7]通过胚状体途径获得 2 种枸杞植物花药单倍体。曹有龙等^[8]通过枸杞花药愈伤组织细胞悬浮培养获得了单倍体再生植株。段丽君等^[9]通过激素、活性炭、蔗糖、低温预处理等因素对枸杞花药愈伤组织诱导率进行研究,建立了“宁杞 1 号”花药离体培养技术体系。钱春艳^[10]在前者研究基础上,采用 $L_{32}(2 \times 4^5)$ 正交设计对影响枸杞花药培养的几个因素进行了系统的研究,认为影响花药愈伤与胚状体诱导的主次因素顺序不同。罗青等^[11]认为低温预处理有利于“宁杞 1 号”胚状体的诱导。现以宁夏枸杞新优品系为试材,利用花药培养技术,研究了不同基因型、激素配比、低温预处理、热激处理、添加活性炭

第一作者简介:张波(1984-),女,宁夏中宁人,硕士,研究实习员,现主要从事枸杞遗传育种等研究工作。E-mail:zhang_bo_0309@126.com.

责任作者:曹有龙(1963-),男,博士,研究员,现主要从事枸杞遗传育种及分子生物学等研究工作。E-mail:youlongchk@163.com.

基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ13126);国家科技厅枸杞育种专项资助项目(2013NYYZ0105);宁夏农林科学院自主研发资助项目(NKYJ-14-08)。

收稿日期:2015-12-22

Tissue Culture of *Vaccinium corymbosum* ‘O’Neal’

LI Sen¹, GAO Lixia², LIU Nian³, ZHANG Shijun³

(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 stems with buds of *Vaccinium corymbosum* ‘O’Neal’ as explants, the effect of different combination of ZT, 6-BA, NAA and IBA added into the media were tested. The results showed that the optimal disinfection treatment was soaking into 0.1% $HgCl_2$ for 4 min with induction rate of 71.4%. The optimal medium for bud induction was WPM+1.0 mg/L ZT on which some branches germinated and plantlet length reached to be 4.7 cm. The suitable proliferation medium was WPM+2.0 mg/L ZT and the proliferation coefficient achieved to be 13.0. The optimum medium for root induction was 1/2WPM+0.1 mg/L IBA. The plantlets reached to be 5 cm in length and could be transplanted outside and the survival rate exceeded 80%.

Keywords: *Vaccinium corymbosum* ‘O’Neal’; tissue culture; proliferation