

“南高丛”蓝莓离体培养及增殖技术的研究

刘作梅¹, 王兰英¹, 宋祥兰¹, 邓晶², 王真¹

(1. 赣州市林业科学研究所, 江西 赣州 341000; 2. 湖南省农业科学院, 湖南 长沙 410000)

摘要:以1 a生“南高丛”蓝莓茎段为试材, 对其进行了外植体消毒、丛生芽诱导和增殖培养研究。结果表明: 茎段在75%乙醇湿润30 s, 0.1%升汞灭菌5~8 min的条件下较易获得无菌外植体; 丛生芽诱导最适宜培养基为改良WPM+ZT 1.0 mg/L, 萌动率达95%, 芽体饱满, 健壮; 丛生芽增殖培养最适宜培养基为改良WPM+KT 0.5 mg/L, 增殖系数为4.1。

关键词:“南高丛”蓝莓; 离体培养; 培养基; 激素

中图分类号:S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0103-03

蓝莓(Blueberry)属杜鹃花科越桔属(*Vaccinium*)多年生落叶或常绿灌木, 又名越橘。果实为蓝色浆果, 含特有的蓝莓花青素、黄酮等多种生理活性物质, 具有提高视力、抗衰老和防癌等功效^[1-2], 被誉为“21世纪功能性保健浆果”和“水果中的皇后”, 被国际粮农组织列为人类五大健康食品之一^[3], 是具有较高经济价值的新兴果树。目前, 国际市场上蓝莓果实售价昂贵, 处于供不应求的状态^[4]。

“南高丛”蓝莓完全是人工培育出的一个全新品系, 适于我国华中、华南和华东地区发展, 此品种群果实较大, 品质佳, 鲜食口感好^[5]。常规的种子繁殖和扦插繁

殖受生长季节的影响使得繁殖速度较慢, 难以满足市场对苗木生长的需要。现通过对“南高丛”蓝莓组培快繁进行初步试验和探索, 以期为我国长江以南地区快速发展蓝莓产业提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

外植体取材于赣州市林业科学研究所蓝莓种植基地, 品种为“南高丛”蓝莓“维尔康”, 在8~9月取材, 以田间生长的1 a生健壮、无病虫害、半木质化嫩枝为材料。

1.2 试验方法

无菌材料的获得: 将采自田间的健壮嫩枝, 放入低浓度的洗衣粉水中漂洗10~15 min, 然后用流水冲洗30 min。先用75%的乙醇湿润, 用无菌水冲洗1~3次, 0.1%氯化汞灭菌, 无菌水冲洗3~5次。用无菌滤纸吸干外植体表面的水分, 将嫩枝剪成1 cm左右的带腋芽(或具茎尖)茎段作为外植体。

第一作者简介:刘作梅(1981-), 女, 江西赣州人, 硕士, 工程师, 现主要从事植物组织培养与林木培育等研究工作。E-mail: liuzuomei703@126.com.

基金项目:江西省科技厅科技支撑计划资助项目(20112BBF60055)。

收稿日期:2013-01-24

Preliminary Establishment of Melon cv. ‘Huangzuixian’ Regeneration System

WANG Ai-ling, ZHANG Min, LIAO Xin-fu, ZHAO Rong-hua

(Xinjiang Development and Research Center of Grape and Melon, Shanshan, Xinjiang 838200)

Abstract: Taking the hypocotyl of melon cv. ‘Huangzuixian’ as explants, the effects of MS media with different concentrations of BA and IAA combination on the callus and adventitious bud induction, as well as adventitious buds elongation were investigated. Meanwhile, the effects of MS media with different concentrations of IBA on rooting of regenerative buds were also investigated. The results showed that the optimal medium for inducing melon ‘Huangzuixian’ callus was MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L and MS+BA 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L, the optimal medium of adventitious bud induction was MS+BA 2.0 mg/L, and the optimal media of adventitious bud elongation was MS+IAA 1.0 mg/L while the optimal rooting media was 1/2MS+IBA 1.0 mg/L.

Key words: melon; ‘Huangzuixian’; regeneration system; hypocotyls

以 MS 培养基、改良 WPM 培养基为基本培养基,添加蔗糖 2%,卡拉胶 0.6%,pH 为 5.2,121℃ 高压灭菌 20 min,添加不同浓度和配比的生长调节剂。培养温度为(25±1)℃,光照时间为 16 h/d,光照强度为 2 000 lx,日光灯光源。

1.2.1 不同灭菌时间对无菌材料的获得的影响 采用不同的灭菌时间设 3 个处理,分别为(1)75%的乙醇湿润 10 s,0.1%升汞灭菌 5 min;(2)75%的乙醇湿润 30 s,0.1%升汞灭菌 8~10 min;(3)75%的乙醇浸泡 1 min,0.1%升汞灭菌 10 min。每个处理接 30 瓶,每瓶 1 个外植体,3 次重复,培养 2 周后统计无菌外植体。

1.2.2 不同激素及配比对丛生芽诱导的影响 以改良 WPM 培养基为基本培养基,将茎段分别接种于腋芽诱导培养基上,同时添加不同浓度的 KT(0.5、1.0、2.0 mg/L)、ZT(0.5、1.0、2.0 mg/L)和 6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L)与 NAA 0.2 mg/L 组合。每个处理接 30 瓶,每瓶 1 个外植体,3 次重复。培养 2 周后统计萌芽率,观察腋芽诱导的效果和新芽的生长状况。

1.2.3 不同培养基及配比对芽增殖培养的影响 以 MS 和改良 WPM 2 种不同培养基,分别加入不同的浓度 ZT(0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L),将蓝莓诱导的不定芽进行增殖培养,培养 4 周后观察增殖状况。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对无菌材料的获得的影响

从表 1 可以看出,灭菌条件为 75%乙醇湿润 10 s,0.1% HgCl₂ 5 min 时,较难得到灭菌彻底的无菌材料,虽然易诱导出不定芽,但诱导 5~10 d 后不定芽出现菌丝。75%乙醇浸泡 1 min,0.1%升汞 10 min,灭菌时间过长,灭菌材料容易出现褐化现象而死亡,不易诱导出不定芽。75%乙醇湿润 30 s,0.1%升汞 8~10 min 为最佳试验条件,外植体灭菌较彻底,容易诱导出不定芽。不定芽一般在培养 4~5 d 后萌动,茎段基部膨大,叶腋处(或茎尖)萌发出侧芽(或顶芽),生长状态随培养基不同而不同(图 1)。

表 1 不同灭菌条件对丛生芽诱导的影响

Table 1 The effects of sterilizing condition on adventitious bud induction

灭菌条件	接种数/个	启动率/%	生长状况
75%乙醇湿润 10 s, 0.1% HgCl ₂ 5 min	30	85	芽生长良好,容易带菌
75%乙醇湿润 30 s, 0.1% HgCl ₂ 8~10 min	30	90	萌动快,生长旺盛
75%乙醇浸泡 1 min, 0.1% HgCl ₂ 10 min	30	20	萌动较少,易褐化死亡

2.2 不同激素及配比浓度对丛生芽诱导的影响

经过多次重复试验,“南高丛”蓝莓的丛生芽诱导启



图 1 无菌外植体

Fig. 1 Aseptic explants

动以一般常用激素 KT 和 6-BA 难于使其萌动,而价格昂贵的激素 ZT 对其诱导效果明显,诱导速度快。从表 2 可看出,不定芽的诱导最适宜 ZT 浓度为 1.0 mg/L,萌动率达 95%,接种 5~6 d 腋芽萌动且生长良好,芽体饱满,再经 10~15 d 培养,腋芽部位能长出 1~2 个新枝,新芽可生长 3~5 cm。ZT 浓度为 0.5 mg/L 时,萌动时间较长,芽体生长较弱。ZT 浓度达 2.0 mg/L 时,萌动时间最短,但丛生芽的叶型卷曲,生长不正常,极易玻璃化,再培养 7~15 d 后,丛生芽生长缓慢,部分外植体甚至褐化死亡,表明浓度过高(图 2)。

表 2 不同激素及配比浓度对丛生芽诱导的影响

Table 2 The effects of different hormone combinations on adventitious bud induction

编号	培养基配方	接种数	萌动率	萌动时	生长状况
		/个	/%	间/d	
1	改良 WPM+KT 0.5 mg/L	30	0	—	—
2	改良 WPM+KT 1.0 mg/L	30	0	—	—
3	改良 WPM+KT 2.0 mg/L	30	0	—	—
4	改良 WPM+ZT 0.5 mg/L	30	90	10	芽较小,颜色嫩绿
5	改良 WPM+ZT 1.0 mg/L	30	95	5~6	芽饱满,健壮,绿色
6	改良 WPM+ZT 2.0 mg/L	30	98	3~4	芽卷曲,玻璃化
7	改良 WPM+6-BA 0.5+NAA 0.2	30	0	—	—
8	改良 WPM+6-BA 1.0+NAA 0.2	30	0	—	—
9	改良 WPM+6-BA 2.0+NAA 0.2	30	0	—	—

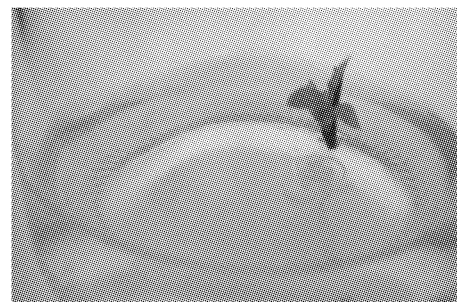


图 2 丛生芽诱导

Fig. 2 Tufted-bud induction

2.3 不同培养基及配比浓度对丛生芽增殖培养的影响

从表 3 可以看出,以 MS 和改良 WPM 2 种不同培养基进行蓝莓增殖培养比较,因 MS 培养基中含铵盐和

硝酸盐含量高,培养的蓝莓增殖系数低,扩增速度慢,叶片褶皱,生长到中后期常常出现玻璃化,接种时叶片易脱落,茎段脆弱,不利于增殖培养。改良 WPM 培养基中生长的蓝莓新枝生长健壮,叶片舒展,颜色浓绿,随着激素 ZT 浓度的增加,繁殖系数也随之增加,浓度在 1.0~2.0 mg/L 时增殖系数增长较为缓慢,新枝慢慢出现茎干弯曲,叶片卷曲,不正常状况,该范围浓度过大,不利于腋芽(或是顶芽)增殖培养。最适宜蓝莓腋芽(或是顶芽)增殖的培养基为改良 WPM+KT 0.5 mg/L,增殖系数较高,新枝生长健康,利于下一步培养(图 3)。

表 3 不同培养基及配比浓度对芽增殖培养的影响

Table 3 The effects of medium and hormone combinations on adventitious bud induction

编号	培养基配方	接种数/个	增殖数/个	增殖系数
1	MS+KT 0.2 mg/L	20	36	0.80
2	MS+KT 0.5 mg/L	20	40	1.00
3	MS+KT 1.0 mg/L	20	56	1.80
4	MS+KT 2.0 mg/L	20	65	2.25
5	改良 WPM+KT 0.2 mg/L	20	88	3.40
6	改良 WPM+KT 0.5 mg/L	20	102	4.10
7	改良 WPM+KT 1.0 mg/L	20	105	4.25
8	改良 WPM+KT 2.0 mg/L	20	110	4.50



图 3 丛生芽增殖

Fig. 3 Adventitious buds proliferation

3 结论与讨论

“南高丛”蓝莓无菌材料获得的最佳条件是:75%乙醇湿润 30 s,0.1% HgCl₂ 灭菌 8~10 min,芽体萌动快,生长正常,健壮。在灭菌时间上应把握乙醇和升汞消毒时间,不能过短或过长,易引起灭菌不彻底和褐化死亡,不利于芽诱导。不定芽诱导的最适 ZT 浓度为 1.0 mg/L,萌动率达 95%,芽体饱满,健壮,颜色浓绿,高浓度的 ZT 易造成玻璃苗,最适宜培养基浓度为改良 WPM+ZT 1.0 mg/L。蓝莓属于寡营养植物,与其它果树相比,体内氮、磷、钾、钙、镁含量很低,富含硝态氮的 MS 培养基不利于蓝莓生长,蓝莓新枝出现叶片褶皱,茎段弯曲,改良 WPM 培养基更适合蓝莓诱导和增殖,随着 ZT 浓度增加蓝莓增殖系数也随之增加,但浓度过高容易引起玻璃化,最适宜增殖的培养基为改良 WPM+KT 0.5 mg/L。“南高丛”蓝莓的离体和增殖培养极易出现玻璃化现象,应注意培养基基本成分改良和激素浓度不易过高。

参考文献

- [1] Sellappan S, Akoh C C, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia - grown blueberries and blackberries [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(8): 2432-2438.
- [2] 王姗姗,孙爱东,李淑燕. 蓝莓的保健功能及其开发应用[J]. 中国食物与营养, 2010(6): 17-19.
- [3] 刘庆忠,赵红军. 高丛蓝莓微体繁殖技术研究初报[J]. 落叶果树, 2001(5): 1-3.
- [4] 修英涛,常凤英,姜河,等. 我国蓝莓栽培研究现状及发展措施[J]. 辽宁农业科学, 2003(3): 21-23.
- [5] 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): 12-13.

Study on *in vitro* Culture and Proliferation of *Vaccinium corymbosum*

LIU Zuo-mei¹, WANG Lan-ying¹, SONG Xiang-lan¹, DENG Jing², WANG Zhen¹

(1. Ganzhou Forestry Science Institute, Ganzhou, Jiangxi 341000; 2. Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha, Hunan 410000)

Abstract: Taking 1-year-old stem segment of *Vaccinium corymbosum* as test materials, explants sterilizing, multiple shoot induction and multiplication culture were studied. The results showed that the optimum sterilizing condition was 70% alcohol for 30 s, 0.1% HgCl₂ for 30 min, by which more explants with higher proliferation rate were obtained. The adventitious bud induction medium were modified WPM+ZT 1.0 mg/L and the highest induction frequency reached 95%, with plumpness and heftiness of bud. The optimal culture medium of bud was modified WPM+ZT 0.5 mg/L, with the multiplication coefficient of 4.1.

Key words: *Vaccinium corymbosum*; culture *in vitro*; culture media; phytohormone