

doi:10.11937/bfyy.20180924

蓝莓组培苗在新型生物反应器中的 高效增殖技术

宗树斌¹, 王永平¹, 顾立新¹, 陈少卿¹, 杨 丽², 陈晓波²

(1. 江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400; 2. 溧阳市溧城镇农服中心, 江苏 溧阳 213300)

摘 要:以蓝莓第3代组培苗为试材,采用对培养液体积、摇摆角度、接种密度3因素3水平 $L_9(3^4)$ 正交实验和对摇摆频率、浸没时间二因素完全随机试验方法,研究了蓝莓组培苗在新型摆动式间歇浸没生物反应器(S-TIBs)中的高效增殖技术,以期建立蓝莓组培苗在新型生物反应器中增殖培养的技术体系。结果表明:培养液体积每瓶250 mL,摇摆角度 45° ,接种密度每瓶60株为最佳的培养参数,摇摆频率因素最佳为单次6 h,浸没时间设定为60 s。

关键词:蓝莓;间歇浸没;组培苗

中图分类号:S 663.203.6 文献标识码:B 文章编号:1001-0009(2018)24-0059-06

蓝莓(*Vaccinium corymbosum*)属杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium*)多年生落叶或常绿灌木,果肉细腻,风味独特^[1]。其果实营养丰富且有保健功能,如抗氧化^[2]、改善记忆和视力^[3-4]、抗癌^[5]、抗衰老^[6]、抑菌^[7]等,因此被联合国粮农组织列为人类五大健康食品之一^[8]。我国从20世纪80年代中期开始引种蓝莓,随着经济社会发展,人民生活水平的提高,蓝莓作为高档健康水果,越来越受到人们的青睐,种植面积也日益扩大,种苗生产亦供不应求。常规的扦插繁殖已不能满足市场对种苗的需求,目前优质蓝莓种苗的繁育主要通过组织培养技术进行工厂化生产。蓝莓组织培养多采用固体培养的方式,此技术在培养操作过程中需要大量的手工劳动,增殖率较低,是一种劳动密集型技术^[9],且技术操作复杂,自动

化半自动化程度低,消耗营养物质多,生产成本也较高。间歇浸没式液体培养技术(即间歇浸没式生物反应器培养系统,简称TIBs)是一种最新型的组织培养技术,在无菌环境下,将材料在培养液中进行周期性的浸泡培养,达到快速繁殖的目的,减少培养环节,降低人工耗费和生产成本^[10],克服了原有局限^[11]。国外在20世纪80年代就开始了该项技术的研究,目前技术已大规模用于农林和食品等产业中^[12-14]。国内相关研究起步较晚,近些年利用该技术扩繁的植物种类逐渐增多^[15-21],推动了国内一些经济作物优质种苗的大规模生产。

江苏农林职业技术学院从2010年开始对TIBs进行了引进吸收研究,经过不断改进,研发出新型摇摆式间歇浸没生物反应器(S-TIBs,专利号CN201220094482.8)。该研究以S-TIBs专利技术为培养系统,对蓝莓组培苗的增殖技术开展系统研究,建立蓝莓组培苗的S-TIBs增殖技术体系,为蓝莓种苗的高效工厂化育苗提供试验数据,以期促进新型组培育苗系统的推广及应用。

第一作者简介:宗树斌(1982-),男,硕士,副教授,现主要从事植物工厂化繁育技术等研究工作。E-mail: zongsb_1982@163.com.

基金项目:江苏省林业三新工程资助项目(LYSX[2016]46);常州市农业三项更新工程资助项目。

收稿日期:2018-06-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试优良蓝莓品种“伯克利”(Vaccinium corymbosum cv. Berkeley),由江苏农林职业技术学院通过固体组织培养繁育第三代健壮无根组培苗,组培苗高6~8 cm,叶片12~15片。

培养装置是具有自主知识产权的新型摇摆式间歇浸没生物反应器(S-TIBs)。该反应器通过摆动架的倾斜摆动,实现了培养架上成排的容器轴向倾斜摇动,容器内的培养液周期性地翻动间歇浸没植物组织,在装置上装有定时器和倾角调节装置,可以根据植物的不同和培养基含量的多少分别调节浸没频率及培养容器倾斜角度,反应器采用25.0 cm×12.0 cm×13.5 cm的大瓶培养器,具有结构简单、容量大、繁殖效率高、自动化程度高等特点,可连续高效地进行植物组培的生产(图1)。



图1 摇摆式间歇浸没生物反应器
Fig.1 Swinging type temporary immersion bioreactors system

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养参数的确立

对培养液体积、摇摆倾斜角度及接种密度3个基本培养参数进行研究,采用3因素3水平 $L_9(3^4)$ 正交实验设计(表1)。每处理15瓶,重复3次。

接种方法:在组培苗中部剪断,每个外植体3~4 cm,4~5节间,培养液采用1/2WPM+蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的增殖培养液,pH(5.2±0.1),培养温度(25±1)℃,光照强度 $36\sim54\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期12 h光照/12 h黑暗。

设定摇摆参数为60 s/6 h(即每6 h摇摆一次,浸没时间60 s)。接种60 d后观察记录增殖苗的生长情况,统计增殖的芽苗数,计算增殖系数及平均单株鲜质量。增殖系数=株高1 cm以上的增殖苗数/原接种苗数,平均单株鲜质量=每瓶增殖苗鲜质量/增殖苗数。

表1 正交实验设计
Table 1 Orthogonal experiment design

水平 Level	因素 Factor		
	A 培养液体积 /(mL·瓶 ⁻¹)	B 摇摆角度 /(°)	C 接种密度 /(株·瓶 ⁻¹)
1	200	30	50
2	250	45	60
3	300	60	70

1.2.2 摇摆频率和浸没时间的筛选

在1.2.1试验的基础上,对摇摆频率设定单次3、6、9、12 h 4个水平,对浸没时间设定30、60、90、120 s 4个水平,采用完全随机试验,每处理15瓶,重复3次。60 d后观察记录增殖苗生长情况,统计增殖系数与平均单株鲜质量,进行方差分析与多重比较以筛选最佳摇摆频率和浸没时间。

1.3 数据分析

采用SPSS 20.0软件进行极差和LSD检验方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养参数条件下蓝莓组培苗在S-TIBs中的增殖效果

由表2可知,处理4增殖系数和平均单株鲜质量均为最高,增殖系数为6.93,平均单株鲜质量最高为73.47 mg,结合蓝莓幼苗的生长状况较优的处理是2、4、5。根据正交实验结果,分别对各处理的增殖系数和平均单株鲜质量进行极差分析(表3)。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果
Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

处理 Treatment	A	B	C	增殖苗数 Number of multiplication seedlings	增殖系数 Multiplication coefficient	平均单株鲜质量 Average single fresh weight/mg	生长状况 Growth states
1	1	1	1	290.53±21.04	5.81±0.42	63.95±1.67	+
2	1	2	2	403.81±31.83	6.73±0.53	69.76±1.09	+++
3	1	3	3	290.53±46.91	4.15±0.67	60.45±0.97	++
4	2	1	2	415.82±22.82	6.93±0.38	73.47±1.34	+++
5	2	2	3	477.41±20.35	6.82±0.29	71.53±1.68	+++
6	2	3	1	218.54±22.53	4.37±0.45	59.63±1.45	++
7	3	1	3	440.35±35.71	6.29±0.51	68.72±0.98	++
8	3	2	1	317.07±23.34	6.34±0.46	67.47±1.78	++
9	3	3	2	267.94±22.23	4.45±0.37	61.59±1.69	+

注:+++ , 生长良好; ++ , 生长一般; + , 生长较差。
Note:+++ , Well growth; ++ , General growth; + , Poor growth.

极差(R)反映了各因子对蓝莓组培苗增殖培养影响的情况, R 值越大说明影响的效果越明显。由表 3 可知,各培养参数对蓝莓组培苗增殖情况的影响大小不同,但影响的规律相同。各培养参数因子对增殖系数和平均单株鲜质量的影响大小顺序均为摇摆角度因子>接种密度因子>培养液体积因子;增殖系数与平均单株鲜质量二者呈正相关,说明各培养参数的设定对组培苗增殖系数

和平均鲜质量 2 个指标的影响是一致的。
由表 4 可知,摇摆角度因子对增殖系数的影响达到了极显著水平,对平均单株鲜质量的影响达到了显著水平;而培养液体积和接种密度因子对增殖系数及平均单株鲜质量的影响均不显著。因此需要对摇摆角度因子各水平作进一步的多重比较分析。

表 3 极差分析结果
Table 3 Results of range analysis

测算因子 Calculate factor		A	B	C
增殖系数 Multiplication coefficient	K11	5.56	6.34	5.51
	K12	6.04	6.63	6.04
	K13	5.69	4.32	5.75
	R	0.48	2.31	0.53
平均单株鲜质量 Average single fresh weight	K21	64.72	68.71	63.68
	K22	68.21	69.59	68.27
	K23	65.93	60.56	66.90
	R	3.49	9.03	4.59

表 4 正交实验方差分析
Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment

变异来源 Source of variation	增殖系数 Multiplication coefficient				平均单株鲜质量 Average single fresh weight			
	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F
A 培养液体积 Culture solution volume	0.36	2	0.18	15	18.85	2	9.43	5.55
B 摇摆角度 Swing angle	9.48	2	4.74	395**	148.84	2	74.42	43.78*
C 接种密度 Inoculation density	0.42	2	0.21	17.5	33.30	2	16.65	9.79
误差 Error	0.024	2	0.012		3.39	2	1.70	
总变异 Total variation	10.29	8			204.38	8		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$ 。

由表5可知,摇摆角度45°处理的平均增殖系数最高达到6.63,与摇摆角度30°处理的差异达显著水平,与摇摆角度60°处理的差异达到极显著水平,摇摆角度30°和摇摆角度60°处理的差异也达到极显著水平,60°处理的增殖系数最低,为4.32;45°处理的平均单株鲜质量最大,为69.59 mg,45°处理与30°处理差异不显著,二者均与60°处理差异显著。综合增殖系数和平均单株鲜质量2个增殖情况指标分析,摇摆角度培养参数的最佳设定为45°。综合正交实验和方差分析结果得知,基本培养参数的最佳设定为培养液体积每瓶250 mL,摇摆角度45°,接种密度为每瓶60株。

表5 LSD检验多重比较
Table 5 LSD multiple comparisons

摇摆角度 Swing angle/(°)	平均增殖系数 Average multiplication coefficient	平均单株鲜质量 Average single fresh weight/mg
30	6.34Ab	68.71Aa
45	6.63Aa	69.59Aa
60	4.32Bc	60.56Ab

注:平均增殖系数 $LSD_{0.05}=0.084, LSD_{0.01}=1.09$;平均单株鲜质量 $LSD_{0.05}=5.61, LSD_{0.01}=12.94$ 。
Note: Average multiplication coefficient $LSD_{0.05}=0.084, LSD_{0.01}=1.09$; average single fresh weight $LSD_{0.05}=5.61, LSD_{0.01}=12.94$.

2.2 不同的摇摆频率和浸没时间条件下蓝莓组培苗在S-TIBs中的增殖效果

对摇摆频率和浸没时间2个因素进行完全随机试验,各处理的增殖系数和平均单株鲜质量结果如表6、7所示,并对2个因素随机试验结果进行方差分析(表8)。可知,摇摆频率因素和浸没时间因素对增殖系数的影响均为极显著影响;摇摆频率因素对平均单株鲜质量的影响为极显著影响,浸没时间因素对平均单株鲜质量的影响为显

著影响。因此,对2个因素随机试验结果作进一步的多种比较LSD检验(表9)。

由表9可知,摇摆频率单次6 h处理下平均增殖系数最高,为6.57,单次12 h处理最低,为4.35,各水平间差异均达到了极显著水平;单次6 h处理下平均单株鲜质量最高,为69.52 mg,极显著高于其它各水平处理,单次3 h与单次9 h处理间差异不显著,单次12 h处理平均单株鲜质量极显著低于其它处理。

表6 随机试验不同处理组的增殖系数
Table 6 Multiplication coeficien of different treatment in complete randomized experiment

摇摆频率 Swing frequency/(h·次 ⁻¹)	浸没时间 Immersion time/s				均值 Average
	30	60	90	120	
3	5.72	5.91	6.21	6.27	6.03
6	5.94	6.73	6.78	6.81	6.57
9	4.93	5.67	5.71	5.64	5.49
12	4.12	4.31	4.43	4.55	4.35
均值	5.18	5.66	5.78	5.82	

表7 随机试验不同处理组的平均单株鲜质量
Table 7 Average single fresh weight of different treatment in complete randomized experiment mg

摇摆频率 Swing frequency/(h·次 ⁻¹)	浸没时间 Immersion time/s				均值 Average
	30	60	90	120	
3	63.32	68.95	66.23	66.29	66.20
6	65.93	70.13	71.71	70.31	69.52
9	64.83	65.77	65.71	65.64	65.49
12	60.12	64.11	61.43	60.55	61.55
均值	63.55	67.24	66.27	65.70	

表 8 随机试验方差分析

Table 8 Variance analysis of complete randomized experiment

变异来源 Source of variation	增殖系数 Multiplication coefficient				平均单株鲜质量 Average single fresh weight			
	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F
摇摆频率 Swing frequency	10.73	3	3.58	165.25**	128.35	3	42.78	24.89**
浸没时间 Immersion time	1.05	3	0.35	16.13**	29.27	3	9.76	5.68*
误差 Error	0.20	9	0.02		15.47	9	1.32	
总变异 Total variation	11.97	15			173.09	15		

注： $F_{0.05}(3,9)=3.86$ ， $F_{0.01}(3,9)=6.99$ 。

表 9 随机试验的 LSD 检验多重比较

Table 9 LSD multiple comparisons of complete randomized experiment

因素处理 Factor treatment	平均增殖系数 Average multiplication coefficient		平均单株鲜质量 Average single fresh weight/mg	
摇摆频率 Swing frequency/(h·次 ⁻¹)	3	6.03Bb	66.20Bb	
	6	6.57Aa	69.52Aa	
	9	5.49Cc	65.49Bb	
	12	4.35Dd	61.55Cc	
	30	5.18Bb	63.55Ab	
浸没时间 Immersion time/s	60	5.66Aa	67.24Aa	
	90	5.78Aa	66.27Aa	
	120	5.82Aa	65.70Aa	

注：平均增殖系数 $LSD_{0.05}=0.302$ ， $LSD_{0.01}=0.375$ ；平均单株鲜质量 $LSD_{0.05}=2.121$ ， $LSD_{0.01}=3.048$ 。

Note: Average multiplication coefficient $LSD_{0.05}=0.302$ ， $LSD_{0.01}=0.375$ ；average single fresh weight $LSD_{0.05}=2.121$ ， $LSD_{0.01}=3.048$ 。

浸没时间 30 s 处理下平均增殖系数和平均单株鲜质量最低，分别为 5.18、63.55 mg；与其它处理相比，增殖系数差异达到极显著水平，平均单株鲜质量差异达到显著水平；其它处理下二者差异均不显著。通过试验发现，90 s 处理和 120 s 处理均不同程度出现了部分玻璃化苗，30 s 处理和 60 s 处理未出现玻璃化现象。综合增殖效果和玻璃化现象，浸没时间最佳设定为 60 s。

3 结论

蓝莓组培苗在 S-TIBs 增殖培养中，培养液体积、摇摆角度、接种密度 3 个因素对增殖效果影响的顺序是摇摆角度因子>接种密度因子>培养液体积因子，其中摇摆角度因子影响达到了极显著水平，这一试验结果主要是由 S-TIBs 的结构和工作原理确定的，因此，这一结果同样适用于其它植物在 S-TIBs 的增殖培养。同样，蓝莓组培苗 S-TIBs 增殖培养的最佳参数设定即培养液体积每瓶 250 mL，摇摆角度 45°，接种密度每瓶 60 株，对其它植物的 S-TIBs 增殖培养具有参考价值。

综合增殖系数和平均单株鲜质量 2 个增殖效

果因子，蓝莓组培苗 S-TIBs 增殖培养摇摆频率最佳处理是单次 6 h；浸没时间在 60~120 s 的增殖效果差异不显著，但综合玻璃化现象因子，浸没时间最佳设定为 60 s，这一试验结果同样对其它植物的 S-TIBs 增殖培养具有参考价值。

新型摇摆式间歇浸没生物反应器 (S-TIBs) 是最新研发的组培液体培养装置，对其应用的技术研究还很有限，各种培养参数的设定还应做进一步的细化研究。另外，还应对更多植物的 S-TIBs 繁育技术进行研究，特别是对不同植物生长的差异性研究，对加快 S-TIBs 组培育苗技术的推广应用具有重要意义。

参考文献

[1] 贺强, 吴立仁. 蓝莓果实中营养成分的生物学功能[J]. 北方园艺, 2010(24): 222-224.
[2] BORNSEK S M, ZIBERNA L, POLAK T, et al. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells[J]. Food Chem, 2012, 134(4): 1878-1884.
[3] 赵秀玲. 蓝莓的成分与保健功能的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(6): 19-23.
[4] 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): 17-20.

- [5] WU X, RAHAL O, KANG J, et al. In utero and lactational exposure to blueberry via maternal diet promotes mammary epithelial differentiation in prepubescent female rats[J]. *Nutr Res*, 2009, 29(11): 802-811.
- [6] DELBO C, MARTINI D, VENDRAME S, et al. Improvement of lymphocyte resistance against H₂O₂-induced DNA damage in sprague-dawley rats after eight weeks of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) enriched diet[J]. *Mutat Res-Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2010, 703(2): 158-162.
- [7] LACOMBE A, WUVCH, WHITE J, et al. The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *Food Microbiol*, 2012, 30(1): 124-131.
- [8] KADER F, ROVEL B, GIRARDIN M, et al. Fractionation and identification of the phenolic compounds of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) [J]. *Food Chem*, 1996, 55(1): 35-40.
- [9] 高美萍, 林志城, 张驰, 等. 荸荠组培苗在间歇浸没式生物反应器(TIBs)中的高效增殖技术[J]. *南方农业学报*, 2016, 47(10): 1653-1657.
- [10] ZHAO W F, WANG L H. Study on temporary immersion bioreactor in tissue culture [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(2): 317-320, 323.
- [11] 赵望锋, 王力华. 间歇浸没式生物反应器在大规模组织培养中的应用研究[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(2): 317-320, 323.
- [12] PEÑA-RAMÍREZ Y J, JUÁREZ-GÓMEZ J, GÓMEZ-LÓPEZ L, et al. Multiple adventitious shoot formation in Spanish red cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues; An improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species [J]. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 2010, 46: 149-160.
- [13] SNYMAN S J, MEYER G M, KOCH A C, et al. Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement [J]. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 2011a, 47: 234-249.
- [14] YANG L, QIN G, SU J, et al. Micro-propagation of banana (*Musa AAA Cavendish* var. Williams B6) in temporary immersion bioreactor system (TIBS) [J]. *Journal of Fruit Science*, 2010b, 27(6): 1010-1013.
- [15] 杨柳, 秦钢, 栗靖, 等. 利用间歇浸没式生物反应器进行香蕉 (*Musa AAA Cavendish* var. Williams B6) 组培快繁研究[J]. *果树学报*, 2010, 27(6): 1010-1013.
- [16] 杨柳, 秦钢, 杨丽涛, 等. 利用间歇浸没式生物反应器进行果蔗组培快繁[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(4): 614-620.
- [17] 杨柳, 秦钢, 杨丽涛, 等. 利用间歇浸没式生物反应器进行甘蔗组培快繁的研究[J]. *华南农业大学学报*, 2011, 32(1): 37-41.
- [18] 许亚良, 张家明. 一种高效大规模组培方法: 间歇浸没培养法[J]. *植物生理学报*, 2013, 49(4): 392-399.
- [19] 张转转, 石琨, 于镇榕, 等. 基于植物微扩繁器的草莓快繁技术的研究[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(16): 216-220.
- [20] 石琨, 郑彩霞. 美国红栌液体快繁体系的建立[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(4): 553-558.
- [21] 高美萍, 林志城, 张驰, 等. 荸荠组培苗在间歇浸没式生物反应器(TIBs)中的高效增殖技术[J]. *南方农业学报*, 2016, 47(10): 1653-1657.

Efficient Multiplication Technology of *Vaccinium corymbosum* Plantlets in New Type Bioreactors System

ZONG Shubin¹, WANG Yongping¹, GU Lixin¹, CHEN Shaoqing¹, YANG Li², CHEN Xiaobo²

(1. Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong, Jiangsu 212400; 2. Licheng Agriculture Service Center of Liyang, Liyang, Jiangsu 213300)

Abstract: The third generation of blueberry plantlet was used as test material. The efficient multiplication technology of blueberry plantlets in S-TIBs was systematically studied through L₉ (3⁴) orthogonal experiment with three factors and three levels (culture solution volume, swing angle and inoculation density) and completely randomized experiment with two factors (swing frequency and immersion time). The results showed that the optimal culture parameters were set as follows, the culture medium volume of 250 mL each bottle, the swing angle at 45°, and the inoculation density of 60 plantlets each bottle. The optimal swing frequency was 6 hours each time, and the immersion time was set as 60 seconds.

Keywords: *Vaccinium corymbosum*; temporary immerion; plantlet