

蓝浆果的组织培养及离体微繁殖技术研究

刘捷¹, 吴小锋¹, 刘学平², 杨丽娜¹, 章镇¹, 陶建敏¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; 2. 南京市茶桑果技术指导站, 江苏南京 210036)

摘要: 蓝浆果具有很高的保健功能, 是目前世界上最重要的小果类果树之一。以 5 个北高丛蓝浆果品种和 1 个兔眼蓝浆果品种为试材, 取成熟的蓝浆果单芽切段及幼嫩叶片为外植体, 在添加各种激素的改良 1/2MS 培养基上培养, 筛选蓝浆果离体增殖和生根培养基。试验结果表明, 兔眼蓝浆果品种粉蓝在添加 3 mg/L ZT 的改良 1/2MS 培养基上初代培养后诱导出大量新生枝, 北高丛蓝浆果蓝丰和伯克利在分别添加了 5、10 mg/L Z-IP 的改良 1/2MS 培养基上继代培养 5 周后, 增殖率均可达 40~50 倍; 在改良 1/2MS + 0.1 mg/L IBA 的生根培养基上生根培养 3 个月后, 蓝浆果的生根率可达 100%。

关键词: 蓝浆果; 组织培养; 离体快繁

中图分类号: S663.904+.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2007)05-0101-03

蓝浆果 (Blueberry), 又名越橘、蓝莓, 为杜鹃花科越橘属 (*Vaccinium* L.) 植物, 多年生落叶或常绿灌木或小灌木, 广泛分布于北半球, 具有较高经济价值和广阔的开发前景^[1]。蓝浆果低糖、低脂肪、抗氧化能力列所有果品、蔬菜之首, 具有防止脑神经衰老、增强心脏功能、明目及抗癌等独特功效, 因此被国际粮农组织列为人类五大健康食品之一^[2]。尽管中国也有越橘属植物分布, 但对其研究很少。随着人们生活水平的提高, 蓝莓、树莓、沙棘、酸枣等因具有独特风味及营养保健作用而日益受到人们的关注, 被列入世界第三代水果的行列^[1]。蓝浆果将成为 21 世纪最有发展前景的果树树种之一^[3]。商业栽培的主要种是北高丛蓝浆果 (*Vaccinium corymbosum* L.) 和南高丛蓝浆果。前者需要较长的低温需求量, 故主要分布于美国的温带地区和加拿大的哥伦比亚省; 南高丛蓝浆果要求较短的低温需求量, 主要分布于美国东南部的亚热带气候区。兔眼蓝浆果 (*Vaccinium ashei* Reade) 在美国东南部栽培很普遍^[4]。我国蓝浆果的引种工作始于 20 世纪 80 年代中后期。自 1985 年起, 吉林农业大学首次引进了矮

丛蓝浆果、半高丛蓝浆果和高丛蓝浆果的一些品种, 并在长白山和大小兴安岭地区推广生产。中国科学院南京植物研究所于 1987 年开始引种, 先后从美国引进兔眼蓝浆果和高丛蓝浆果, 目前生长状况良好^[5]; 贵州省麻江县于 2000 年引种美国兔眼蓝浆果 8 个品种栽培已获成功^[6]。我国蓝浆果的引种工作还在日益扩大, 因此, 迫切需要对蓝浆果品种进行繁殖试验的研究。各类蓝浆果品种的传统繁殖方法有所不同, 高丛蓝浆果主要采用硬枝扦插, 兔眼蓝浆果以绿枝扦插为主, 矮丛蓝浆果则以地下根茎繁殖。与传统繁殖方法不同的是蓝浆果组织培养能够在短时间内繁育出大量组培苗。关于蓝浆果的组织培养繁殖, 国内外已经有一些成功的报道^[2,6-13]。本文以粉蓝、迪克西、赫伯特、大达柔、伯克利和蓝丰 6 个品种为试材, 研究适宜它们的离体微繁殖体系与关键技术。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料选用北高丛蓝浆果品种迪克西 (Dixi)、赫伯特 (Herberd)、大达柔 (Big Darrow)、伯克利 (Berkely)、蓝丰 (Bluecrop) 和兔眼蓝浆果品种粉蓝 (Powderblue) 两种类型。外植体材料为田间生长的蓝浆果的半木质化绿枝和田间嫩梢叶片。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得 以田间生长的半木质化绿枝和嫩梢叶片为初始外植体, 枝条切成 1~2 cm 的单芽茎段。外植体用自来水冲洗 5~6 h, 在超净工

收稿日期: 2007-03-22

基金项目: 国家“863”项目 (编号: P200310); 国家农业综合开发科技示范项目 (编号: 财发 2001-14)。

作者简介: 刘捷 (1979—), 女, 山东菏泽人, 硕士生, 从事果树生物技术研究。E-mail: 2004104096@njau.edu.cn。

通讯作者: 陶建敏。E-mail: tjm266@sina.com。

作台上用 70% 的酒精灭菌 40 ~ 50 s, 0.1% 的升汞溶液浸泡 5 ~ 8 min, 无菌水冲洗 4 ~ 6 次, 以备接种。

1.2.2 培养条件 外植体接种选用的基本培养基有 MS、1/2MS、改良 1/2MS(1/2MS 大量, 2 倍 MS 铁盐) 3 种培养基。从附加不同浓度 Z - ip (5、10、15、20 mg/L) 和 ZT (3、5、10 mg/L) 的培养基中筛选出最适宜的丛生芽诱导和增殖培养基。培养基中添加蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L, pH 值 5.3 左右。培养基在 121 °C、131 kPa 的条件下灭菌 20 min, 接种后在温度为 (25 ± 2) °C、光照强度为 1 200 lx 左右、光暗周期 16 h/8 h 的条件下培养。

1.2.3 生根培养 剪取 1 ~ 2 cm 的无菌苗新梢, 接种到添加 IBA 0.1 mg/L 的改良 1/2MS 培养基上进行生根培养, 先暗培养 1 周, 然后转移到光暗周期为 16 h/8 h 条件下培养, 3 个月后统计生根率。

2 结果与分析

2.1 蓝浆果无菌苗的获得

6 个供试蓝浆果品种迪克西、赫伯特、大达柔、伯克利、蓝丰和粉蓝的外植体初代培养后均获得了一些成活植株, 长势最好的是兔眼蓝浆果品种粉蓝。在继代培养过程中, 伯克利、蓝丰和粉蓝的丛生芽增

殖效果都很好, 而迪克西、赫伯特和大达柔的丛生芽增殖没有最终取得成功。

2.2 适合蓝浆果品种离体微繁的基本培养基筛选

MS、1/2MS、改良 1/2MS 3 种基本培养基中均添加 10 mg/L 的 Z - ip, 从不同蓝浆果品种在 3 种不同培养基上的反应中可以看出 (表 1), 在改良 1/2MS 培养基上, 蓝浆果品种的丛生芽分化和增殖生长最好, 而在 MS 及 1/2MS 培养基上所生长的外植体表现为淡黄色, 芽分化和增殖生长较差。所有供试蓝浆果品种在改良 1/2MS 培养基上的成活率均达到 90.0% 以上。

2.3 适合不同蓝浆果品种离体微繁的培养基筛选

蓝浆果品种不同适宜它们生长的培养基也不同。从表 2 中可以看出, 粉蓝品种在添加了不同浓度 ZT (3、5、10 mg/L) 的改良 1/2MS 培养基上诱导丛生芽, 结果差异显著, 在添加 ZT 3 mg/L 的改良 1/2MS 培养基上可以长出新生枝, 长势最好, 丛生芽的诱导和增殖最多, 成活率可达到 100%。而当 ZT 为 5、10 mg/L 时接种的外植体全部死亡, 并不能诱导出丛生芽。蓝丰和伯克利分别在添加 Z - ip 5 mg/L 和 10 mg/L 的培养基上丛生芽诱导和增殖效果最好。

表 1 不同基本培养基对蓝浆果不同品种初代培养成活率的影响

培养基	接种外植体数	迪克西		赫伯特		大达柔		伯克利		蓝 丰	
		成活数	成活率 (%)	成活数	成活率 (%)	成活数	成活率 (%)	成活数	成活率 (%)	成活数	成活率 (%)
MS	30	4	13.3	5	16.7	6	20.0	4	13.3	5	16.7
1/2MS	30	4	13.3	7	23.3	4	13.3	6	20.0	4	13.3
改良 1/2MS	30	27	90.0	28	93.3	28	93.3	29	96.7	29	96.7

表 2 不同激素对蓝浆果不同品种丛生芽诱导增殖成活率的影响

激素	浓度 (mg/L)	接种外植体数	伯克利		蓝 丰		粉 蓝	
			成活数	成活率 (%)	成活数	成活率 (%)	成活数	成活率 (%)
Z - ip	5	30	11	36.7	26	86.7		
	10	30	27	90.0	9	30.0		
	15	30	14	46.7	11	36.7		
	20	30	13	43.3	12	40.0		
ZT	3	30					30	100
	5	30					0	0
	10	30					0	0

2.4 不同蓝浆果品种的继代培养

以兔眼蓝浆果品种粉蓝的茎尖和含单芽茎段为外植体, 接种在改良 1/2MS + ZT 3 mg/L 诱导培养基上, 1 周后开始萌发, 4 周后芽长成 6 ~ 8 cm 的新梢, 侧芽同时也萌发出 4 ~ 6 个丛生芽。剪取 1 ~ 2

cm 茎段新梢接种在含有 ZT 3 mg/L 的继代培养基中, 培养 5 周后, 可分化出 15 ~ 30 个丛生芽, 增殖倍数可达 15 ~ 30 倍。另外, 2 个北高丛蓝浆果品种蓝丰和伯克利分别在添加 Z - ip 5、10 mg/L 的培养基上培养 5 周后, 增殖倍数均可达 40 ~ 50 倍。

2.5 蓝浆果无菌苗的生根及炼苗

剪取 1~2 cm 的无菌苗新梢,接种到生根培养基上。先暗培养 1 周,然后转移到光暗周期为 16 h/8 h 条件下培养,3 个月后统计生根率。结果发现,蓝浆果供试品种的生根率可达 100%。因蓝浆果组培苗小而弱,根纤细,移栽较其他植物组培苗困难。移栽成活的关键是小环境保湿和基质通气性好,以保证小植株不失水和根的再生长。试验证明,使用通透性好的基质并且保持小环境的空气湿度,是保证蓝浆果组培苗移栽成活的关键。本试验采用 1:1 的泥炭与珍珠岩做基质,移栽已生根的组培苗小植株,移栽后用小拱棚封闭保湿 40 d 以上,以后逐渐通风,降低棚内空气湿度,小植株成活率可达 60% 以上。

3 讨论

本研究中选用了 3 种基本培养基,其中改良 1/2MS 培养基最适宜。选择改良 1/2MS 培养基,即 MS 大量减半,铁盐加倍,是依据越橘属局限于酸性土壤中分布的特性。分析其中的主要原因可能是,在 pH 值高的土壤中越橘属植物不能充分利用土壤中的 Fe 而发生 Fe 的失调,其他如 Mn、Zn、Cu 等也可能不足,因为这些元素的可溶性随着 pH 值的上升而下降,在 pH 值 6.5 条件下 Mn 和 Fe 不足是其生长受抑制的主要原因。蓝浆果能够积累,或者说能够忍耐土壤中较高的 Mn 和 Al 含量,但如果吸收了过多的 Ca 和 Na 盐,则会引起 N 过高,而使生长势削弱。Creech 等发现,当灌溉水中的 Na^+ 浓度达到 50 mg/L 时,就会对兔眼蓝浆果有害^[14]。与 MS、1/2MS 培养基相比,供试蓝浆果品种在改良 1/2MS 培养上的成活率均在 90.0% 以上。Cohenn 和 Elliot 以高丛蓝浆果新芽上取的单节茎为外植体,培养在含 1/4MS 矿物质浓度、0.02 mg/L NAA 和 LS 培养基的维生素浓度的培养基上获得成功。后来又发现 1/2MS 矿物质浓度优于 1/4MS,而且,在不含苯乙酸的培养基上生长更好。Chandler 和 Draper 用 ZT 代替 Z-ip 使不定芽诱导率提高 2~4 倍^[14]。本试验结果显示,在添加不同浓度 Z-ip 和 ZT 的改良 1/2MS 培养基可以成功地诱导一些蓝浆果品种的生长。据报道,蓝浆果在试管内生根较慢,且生根率低,在 1/2WPM 添加 IBA 的培养基中,培养 20 d 生根率还不到 10%,培养 40 d 后生根率也仅 30%~70%。黑暗条件下预培养 1~2 周,可以提高生根

率^[2],本试验结果证实了这一点。蓝浆果生根非常缓慢,而且生出的根很细。不过,在添加 IBA 0.1 mg/L 的改良 1/2MS 培养基上生根 3 个月后,蓝浆果的生根率可以达到 100%。

国内外蓝浆果离体微繁殖研究中所用的细胞分裂素多为 Z-ip、玉米素核苷和 TDZ,蓝浆果的组织培养基本培养基均以改良的 WPM 最好^[15],而本研究以改良 1/2MS 为基本培养基,供试品种在添加了不同浓度 Z-ip 和 ZT 的适宜它们生长的培养基上,均能大量增殖。研究蓝浆果组织培养离体微繁殖技术可以为蓝浆果的工厂化育苗和商品化建设奠定技术基础。

参考文献:

- [1] 修英涛,常凤英,姜河,等. 我国蓝莓(越橘)栽培研究现状及发展措施[J]. 辽宁农业科学,2003(3):21-23.
- [2] 刘庆忠,赵红军,郑亚芹,等. 高灌蓝莓微体繁殖技术研究初报[J]. 落叶果树,2001(5):1-3.
- [3] 孙贵宝. 浅谈欧美及日本等国蓝莓栽培的立地条件[J]. 北方园艺,2006(4):103-105.
- [4] 苑兆和. 世界蓝莓生产历史与发展趋势[J]. 落叶果树,2003(1):49-52.
- [5] Yu H, Wang C Y, Yin G U, et al. The present status of blueberry growing in China[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2005,14(2):42-48.
- [6] 朱忠荣,聂飞. 兔眼蓝浆果组织培养研究初报[J]. 贵州林业科技,2003,31(4):20-22.
- [7] Rowland L J, Ogden E L. Use of a cytokine in conjugate for efficient shoot regeneration from leaf section of high blueberry[J]. Hortscience, 1992,27(10):1127-1129.
- [8] Dweikat M, Lyrene P M. Adventitious shoots production from leaves of blueberry cultured *in vitro*[J]. Hort Science, 1998,23:629.
- [9] Cao X, Hammerschlag F A, Douglas L I. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of high-bush blueberry cv. Bluecrop[J]. Hortscience, 2002,37(5):819-821.
- [10] Lyrene P M. Micropropagation of rabbiteye blueberries[J]. Hortscience, 1980,15(1):80-81.
- [11] 刘树英,张志东,吴林,等. 兔眼越橘芽增生诱导培养基及激素的筛选[J]. 吉林农业大学学报,2002,24(1):55-57.
- [12] 王侠礼,钟士传,琴亚琴,等. 美国高灌蓝浆果的引进及微体快繁技术的研究[J]. 中国种业,2003(12):40-41.
- [13] 刘庆忠,赵红军. 高灌蓝浆果的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2002,38(3):253.
- [14] 顾姻,贺善安. 蓝浆果与蔓越橘[M]. 北京:中国农业出版社,2001:252.
- [15] 陈慧都,郝瑞,关爱军,等. 越橘工厂化育苗研究[J]. 中国农业科学,1990,23(3):44-50.