维普资讯 http://www.cqvip.com

果 树 学 报 2007,24(6):837~840
Journal of Fruit Science

兔眼越橘茎段快繁高效技术研究

张长青[1,2],李广平[3],朱士农[1],张 波[1],王 进[2]

([1]金陵科技学院园艺学院,南京 210038;[2]南京大学医药生物技术国家重点实验室,南京 210093;
[3]南京林业大学环境学院,南京 210037)

摘 要:为获取兔眼越橘微体快繁高效技术体系,以越橘幼嫩茎段为试材,通过改变初代培养基、增殖培养基、生根培养基和炼苗基质的组分对24种介质进行了筛选。结果表明,初代培养基WPM+10 mg/L ZT能显著提高外植体的萌芽率和>1 cm的枝条数;增殖培养基WPM+5 mg/L ZT能使新梢增殖率提高12倍;散射光处理下,生根培养基1/2 WPM+0.1 mg/L IBA能使试管苗生根率达到97%;草炭:石英砂=2~3:1的炼苗基质可以使幼苗的成活率达到99%。

关键词:兔眼越橘;茎段快繁;培养基筛选
中图分类号:S666.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-9980(2007)06-837-04

Studies on shoot regeneration and micro-propagation of Rabbiteye blueberry

ZHANG Chang-qing[1,2], LI Guang-ping[3], ZHU Shi-nong[1], ZHANG Bo[1], WANG Jin[2]

([1]Department of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing, Jiangsu 210038 China; [2]State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093 China; [3]College of Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037 China)

Abstract: In order to obtain a set of rapid micro-propagation technology of Rabbiteye blueberry, the young shoots were used as explants, and 24 different mediums including those used in primary culture, proliferating culture, rooting culture, and refining culture were selected. The result showed that WPM+10 mg/L ZT could effectively improve the rate of bud sprouting and the number of shoot (>1 cm) formed; WPM+5 mg/L ZT could make the multiplication coefficient reach 12 times, together with diffused light treatment, 1/2 WPM+0.1 mg/L IBA could make the rooting rate reach up to 97%, and the surviving rate could reach to 99% if the young plant were planted in the medium with the proportion of peat moss and silica within 2:1 to 3:1.

Key words: Rabbiteye blueberry; Shoot micro-propagation; Selection of culture medium

越橘(*Vaccinum ashei*)是杜鹃花科(*Ericaceae*)越橘属(*Vaccinum* L.)植物,具有重要的保健功能,目前已被联合国粮农组织确定为世界5大健康食品之一[1]。在美国、智利、日本、德国、加拿大等国,它的生产也已进入了产业化栽培阶段[2-3]。而在我国,由于苗木供应不足,目前栽培面积还相当有限。高效育苗技术的研究将有助于我国越橘的产业化发展。

传统的扦插技术由于存在繁殖系数低、生根难、受当前母株取材限制的缺点,一时还无法成为越橘繁育的主要手段。组织培养技术虽然存在少量变异,但它具有用材少、繁殖系数高的优点,所以是快速解决当前苗木瓶颈的首选方法。同时,组织培养技术也是开展原生质体融合和遗传转化体系研究的基础[3]。开发微体快繁技术研究不仅可以促进我国越橘业的迅速发展,而且能为基因工程和细胞工程研究提供技术平台。

国内越橘微体快繁技术研究目前主要集中在高丛越橘和矮丛越橘上[4-7],而兔眼越橘(*Vaccinum ashei* Reade)的研究还仅局限于初步阶段[8-9]。我们以兔眼越橘的幼嫩茎段为试材,系统地对微体快繁技术中的初代培养基、增殖培养基、生根培养基和炼苗基质进行了筛选和研究,获得了一套高效的快繁技术体系。

1 材料和方法

1.1 材料

本文所用材料为2 a生兔眼越橘。品种为粉蓝(购自贵州省麻江县)。

收稿日期:2007-07-12 接受日期:2007-09-13
基金项目:南京市科技局项目(200501016);江苏省教育厅项目(05KJD210077)
作者简介:张长青,男,讲师,在读博士生,主要从事园艺植物分子生物学研究。Tel:025-83065272,E-mail:zhang_chq2002@sohu.com

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 方法

于春梢长到10~15 cm时采集枝条,清水冲洗2 h后,酒精消毒30 s,无菌水冲洗3次。用0.1%升汞消毒10 min,无菌水冲洗3次。剪去叶片大小的2/3后,将含1~2个芽的茎段接种在初代培养基上培养。30 d后将发出的新梢转接在WPM + 2 mg/L ZT上开始增殖。培养3~4代后接种到不同的增殖培养基和生根培养基上进行高效培养基筛选。其中1/2 WPM +0.1 mg/L IBA的生根培养基采用了全光照和散射光处理,其余培养基均采用14 h光照和8 h黑暗的光周期处理,其它条件相同。数据统计在接种后30~40 d内进行。

炼苗时,提前3 d打开瓶盖进行过渡。移栽后在组培室条件下保持湿度100%的塑料棚中培养15 d,然后在湿度80%、透光度70%的室外条件下过渡7 d再逐步通风换气。15 d后,完全揭去棚膜。2周后统计成活率。

每套培养基1次接种量不低于500 mL,pH值为5.2。炼苗时,每套基质的栽植量不少于50株。各试验的重复次数不少于3次。

各培养基和炼苗基质情况如表1:

表1 蓝莓茎段繁育培养基和炼苗基质情况

Table 1 Total media used for shoot micro-propagation of rabbit blueberry

序号 No.	快繁阶段 Stages	培养基或炼苗基质 Mediums	序号 No.	快繁阶段 Stages	培养基或炼苗基质 Mediums
1	初代培养	WPM + 5 mg/L 2iP	13	增殖培养	WPM + 10 mg/L ZT
2	Primary culture	WPM + 10 mg/L 2iP	14	Proliferating culture	WPM + 0.5 mg/L 6BA
3		WPM + 15 mg/L 2iP	15		WPM + 1 mg/L 6BA
4		WPM + 1.5 mg/L ZR	16		WPM + 0.5 mg/L 6BA + 1 mg/L ZT
5		WPM + 2 mg/L ZR	17		WPM + 0.5 mg/L 6BA + 5 mg/L ZT
6		WPM + 5 mg/L ZT	18	生根培养	WPM + 0.1 mg/L IBA
7		WPM + 10 mg/L ZT	19	Rooting culture	1/2 WPM + 0.1 mg/L IBA
8		WPM + 15 mg/L ZT	20		1/2 WPM + 0.1 mg/L IBA + 0.3% C
9	增殖培养	WPM + 5 mg/L 2iP	21	炼苗	草炭:河沙 Peat moss:sand=1:1
10	Proliferating culture	WPM + 1 mg/L ZT	22	Refining culture	草炭:田土 Peat moss:soil=1:1
11		WPM + 2 mg/L ZT	23		草炭:石英砂 Peat moss:silica=2~3:1
12		WPM + 5 mg/L ZT	24		草炭:珍珠岩 Peat moss:perlite=1~2:1

注:WPM:木本植物培养基;2iP:异戊烯基腺嘌呤;ZR:反式玉米素;ZT:玉米素;IBA:吲哚乙酸;6BA:6苄基腺嘌呤。

Note: WPM: Woody plant medium; 2iP: 6-Dimethylallylamino purine; ZR: Zeatin riboside; ZT: Zeatin; IBA: Indole butyric acid; 6BA: 6-Benzylamino purine.

2 结果与分析

2.1 初代培养基筛选

将消毒后的外植体茎段接种在8种不同的初代培养基上,每天观察生长现象。结果表明,WPM与ZT组合的效果明显好于与2iP或ZR组合的效果,其中,以WPM+10 mg/L ZT的表现最好(图1)。

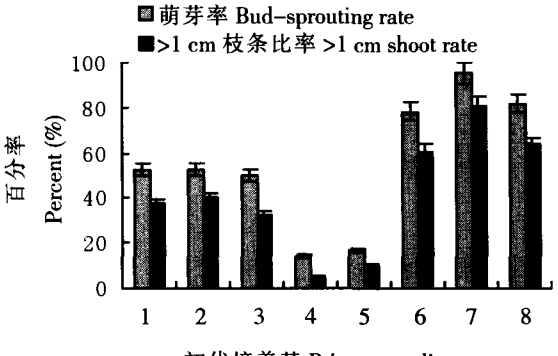

图1 初代培养基对蓝莓茎段萌芽率和成枝率的影响

图中编号所对应的培养基见表1。下同。

Fig. 1 The effects of primary culture media on the bud-sprouting rate and on the shoot-becoming rate of blueberry shoot

Mediums of the code same as Table 1. The same below.

在WPM + 10 mg/L ZT组合中,3 d就可以看到芽萌动,7 d即有70%的芽萌发。20 d后,新梢长度可达1.2 cm,叶片数量6~8枚,大小近乎田间正常叶的1/3 (图版-a)。同时,在茎段和叶片上会出现明显的白色粉状物,叶色黄绿,鲜嫩,茎段底部膨大,产生明显的愈伤组织。但当ZT质量浓度增大到15 mg/L时,则会出现茎尖不明显、叶片特大、节间很短的典型特征。而当ZT质量浓度降低到5 mg/L时,芽萌发起始时间明显滞后,生长势头也相对缓慢。在添加2iP的培养基上,7 d时才出现茎段底部膨大。20 d后,基部产生愈伤,膨大后的直径为原来的4倍左右,同时,枝条上的芽也变成了水渍样的团状物,萌发势头很差。添加ZR的效果最差,仅发现茎段基部轻微膨大,萌芽率低于20%,大于1 cm枝条比率低于15%。

2.2 增殖培养基筛选

将获取的无菌苗转接在9种增殖培养基上进行比较。结果表明,WPM+ZT的增殖效果明显优于WPM与6BA、2iP、6BA+ZT组合的效果,其中以WPM+5 mg/mL ZT最好(图2)。

在WPM+ZT中,各植株均能正常生长。但它们

维普资讯 http://www.cqvip.com

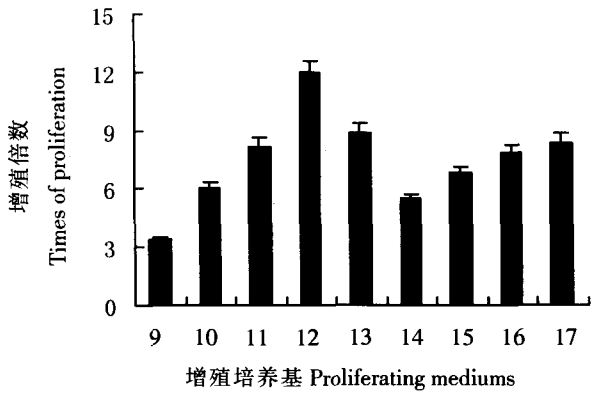

图 2　不同培养基上蓝莓茎段的增殖率

Fig. 2 The increased rate of blueberry micro-shoot in different culture media

启动植株生长和分化的时间，以及提高增殖率上却存在明显差异。当 ZT 质量浓度为 1 mg/L 时，10~15 d 无菌苗便开始恢复生长。同时在愈伤上出现丛生芽，生长势头强劲。20 d 后生长和分化效果最好。增殖率超过 6 倍，而且丛生芽呈直立、粗壮、鲜嫩状。部分枝条上还具有二次枝现象。但当 ZT 质量浓度升高到 2 mg/L 时，再生苗除增殖率有所增加外，开始生长和分化的时间与 1 mg/L 时相差不大。当 ZT 为 5 mg/L 时，4 d 即可看到再生苗开始生长和分化现象。而且分化出来的新梢也要比低质量浓度下的明显粗壮，多数枝上会出现 2 次枝，增殖率可超过 12 倍(图版-b)。当 ZT 质量浓度达到 10 mg/L 时，则出现明显玻璃化现象。其增殖率为 8.9 倍。

WPM 与其它激素组合效果均差于 WPM+ZT 组合。当使用 5 mg/L 2iP 时，20 d 后个别愈伤团中才出现丛生芽，而且枝条具有明显的加长现象，无新芽萌发。增殖倍数也仅为 3.4。使用 6BA 时，0.5 mg/L 和 1 mg/L 2 种质量浓度差异不大，它们均会在 2 周后出现生长和萌芽态势，少量有愈伤组织，增殖率为 5~7 倍。而对于 6BA+ZT 组合来讲，10 d 后出现少量愈伤，苗虽然有生长，但长势差。20 d 后新梢基部形成红色愈伤，茎上也长出红色新梢。叶片小，茎间短。

2.3　生根培养基筛选

将增殖后的兔眼越橘枝条剪下扦插在 3 种生根培养基上，1 个月后发现，WPM+0.1 mg/L IBA 和 1/2 WPM+0.1 mg/L IBA 在生根率上没有太大差别，均超过 80%(图 3，图版-c)。但在 1/2 WPM+0.1 mg/L IBA 培养基上，生根数量在 3 条以上的可达 85%，而 WPM+0.1 mg/L IBA 的则为 75%。

活性碳对生根的影响研究表明，添加活性碳的培养基生根率仅为 60%，显著低于不加活性碳的(图 3)。但进行炼苗时却发现，加活性碳的生根苗生长相当健壮，非常容易成活。

另外，我们也在 1/2 WPM+0.1 mg/L IBA 培养基上研究了散射光和全光对生根的影响。结果表明，弱光效果好于全光效果，其生根率超过 97.3%，而全光条件下为 87% (图 3)。

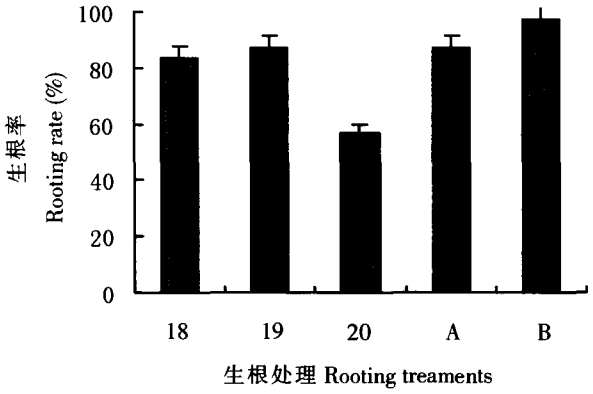

图 3　不同培养基和处理条件对蓝莓生根率的影响

Fig. 3 The effect of different culture media/treatments on the rooting rate of blueberry micro-shoot

A. 1/2 WPM+0.1 mg/L IBA+light; B. 1/2 WPM+0.1 mg/L IBA+diffused light

2.4　炼苗

对生根苗移栽在 4 种不同基质上，1.5 个月后统计成活率(图 4)。结果表明：2~3:1 的草炭与石英砂组合效果最好，成活率为 99%，苗木的生长量达 1.2 cm 以上，新增叶片 2~4 枚(图版-d)。而 1:1 的草炭与河沙基质成活率仅为 52%，但成活苗的质量却很高，表现为生长墩实、植株健壮、生长量与“草炭+石英砂”相当。另外 2 种基质的表现则居于 2 者之间。

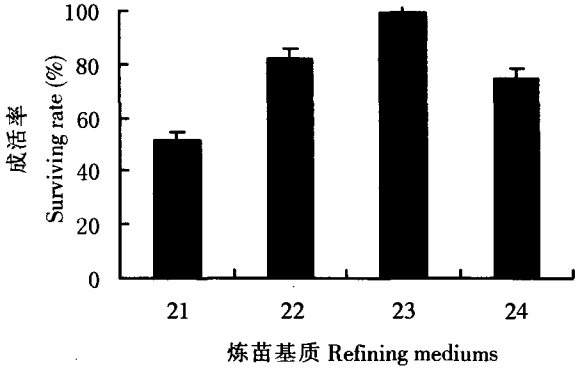

图 4　不同炼苗基质对蓝莓成活率的影响

Fig. 4 The effect of different cultivated media on surviving rate of young blueberry

3　讨　论

维普资讯 http://www.cqvip.com

已有研究表明,Anderson、WPM 和 MS 培养基均适合越橘快繁,但 WPM 的效果最好[10]。同时也发现,芽的诱导和增殖中细胞分裂素的作用至关重要,而生长素几乎没有影响[11]。因此,本研究主要采用了 WPM 培养基,并重点探讨了细胞分裂素的效应。

研究表明,10 mg/L 的 ZT 用于初代培养时,能使萌芽率达到 95%,这远高于刘树英等[12]报道的 25%~70%兔眼越橘茎段萌芽率。利用 5 mg/L 的 ZT 进行增殖培养,可使增殖倍数达到 12 倍,这也是前人在兔眼越橘的增殖研究中所不及的[12-13]。所以,本研究提供了一套用于兔眼越橘初代培养和增殖培养的高效配方。生根培养方面,本研究在 1/2 WPM+0.1 mg/L IBA 配方[14]的基础上采用了散射光处理。结果表明,散射光对生根有利。它能使生根率提高到 97.3%。

炼苗方面,国内也已报道了多种配方[5-6,9,14]。考虑到如何为越橘生长提供适宜的 pH 值环境,它们均以草炭或其类似物作为基本介质。然而除草炭外,筛选合适的支撑材料和水、肥、气、热等因素的协调材料也十分关键。为此,我们尝试了由草炭组成的多种基质效果。这些结果中,草炭与珍珠岩(1:1)的炼苗效果与前人报道类似,均达到了 85%左右的成活率[5-6]。但该基质中的成活苗明显不抗倒伏。进一步将珍珠岩替换为细砂[14]和田土的研究表明,偏细的颗粒影响了基质的通透性,因此幼苗的成活率不高。而草炭与石英砂组合中,由于石英砂弥补了珍珠岩和细纱/田土 2 种材料的不足,从而表现出了良好的炼苗效果。这不失为有效提高越橘炼苗效率的一个新配方。

另外,基因型的依赖性是组织培养中的一种常见现象。高丛越橘和矮丛越橘上的多数研究也发现,越橘的不同种或品种对培养基的反应不同[4-7]。但刘树英等[9]对兔眼越橘的研究认为,品种间没有差异。我们的工作中,目前仅涉及到粉蓝品种,其它尚未深入研究。但其中报道的增殖效果与高丛越橘上报道的增殖效果[5,15]相比,似乎支持了前一种说法。品种间的比较还有待进一步开展。(本文图版见封2)

参考文献 References:

[1] YU H, HE S A, GU Y. The challenge of blueberry development in China and in the world [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2001, 10(2): 52-55. (in Chinese)
於虹,贺善安,顾姻. 我国和世界蓝浆果的发展前景[J]. 植物资源与环境学,2001,10(2): 52-55.

[2] SHIBLI R A, SMITH M A L, KUSHAD M. Headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in vaccinium pahalae cell culture[J]. Plant Growth Regulation, 1997, 23: 201-205.

[3] CAO X, LIU Q, ROWLAND L J, Hammerschlag F A, GUS expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing Agrobacterium-mediated gene transfer efficiency[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 266-270.

[4] MA H Y, LI Y D, LIU Q Z, ZHAO H J, SUN Q R. Regeneration of highbush blurberry plantlets from leaf section[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2004, 35(2): 129-134. (in Chinese)
马怀宇,李亚东,刘庆忠,赵红军,孙清荣. 高丛越橘离体叶片再生植株研究初报[J]. 东北农业大学学报,2004,35(2):129-134.

[5] HUANG W J, ZHOU S B, KAN X Z, PAN C. *In Vitro* micropropagation of vaccinium[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2005, 24 (2): 62-64. (in Chinese)
黄文江,周守标,阚显照,潘超. 越橘属植物克隆的体外繁殖[J]. 中国野生植物资源,2005,24(2): 62-64.

[6] MA Y L. Quick-propagation techniques by tissue culture to vaccinium vitis-idaea[J]. Jilin Forestry Science and Technology, 2005, 34: 3-5. (in Chinese)
马艳丽. 越橘组培快繁技术研究[J]. 吉林林业科技,2005,34:3-5.

[7] HUANG W J, LIU Q Z, KAN X Z. *In vitro* micropropagation of high blueberry [J]. Journal of Anhui Normal University: Naturel science Edition, 2004, 27 (3): 314-317. (in Chinese)
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.

[8] NIE F, LIAO Y J, HE J, SHI J H, ZHU Z R. Propagation technique of vaccinium ashei[J]. Subtropical Plant Science, 2004, 33 (4): 39-41. (in Chinese)
聂飞,廖优江,何健,石江红,朱忠荣. 美国兔眼蓝莓繁殖技术研究[J]. 亚热带植物科学,2004,33(4): 39-41.

[9] LIU S Y, AN W, KONG L X, LI Y D, ZHANG Z D, LIN D H. Screening of culture media and hormones for inducing the propagation of Rabbiteye Blueberry Shoots[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2004, 26 (6): 632-635. (in Chinese)
刘树英,安伟,孔令学,李亚东,张志东,林东慧. 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.

[10] WOLFE D E, ECK P, CHIN C. Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry[J]. HortScience, 1983, 18(6): 703-705.

[11] SHARON G B, CHEE K, CHIN C. Regeneration of blueberry plantlets from leaf segment[J]. Hortscience, 1988, 23(4): 763-766.

[12] LIU S Y, ZHANG Z D, WU L, AN W, LI Y D. Screening of culture media and hormones for inducing the propagation of Rabbiteye Blueberry Shoots [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2002, 24 (1): 55-57. (in Chinese)
刘树英,张志东,吴林,安伟,李亚东. 兔眼越桔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.

[13] ZHU Z R, NIE F. Primary study on mico-propagation of blueberry [J]. Guizhou Forestry Science and Technology, 2003, 31(4): 20-21. (in Chinese)
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): 20-21.

[14] LIU Q Z, ZHAO H J. High-effective cultivation, processing and utilization on blueberry[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2003: 59-60. (in Chinese)
刘庆忠,赵红军. 越桔高效栽培与加工利用[M]. 北京:中国农业出版社,2003: 59-60.

[15] LIU Q Z, ZHAO H J, ZHENG Y Q, WANG X L, SHI L Y. Primary study on mico-propagation of high brush blueberry[J]. Deciduous Fruits, 2001, 5: 1-3. (in Chinese)
刘庆忠,赵红军,郑亚芹,王侠礼,石立岩. 高灌蓝莓微体繁殖技术研究初报[J]. 落叶果树,2001, 5: 1-3.