

高丛越橘组培快繁技术研究

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 [目的] 探讨不定芽的直接再生方式, 建立高丛越橘组培快繁体系。[方法] 以高丛越橘‘比洛克西’带腋芽茎段为外植体, 在培养基中添加不同配比的 ZT、6-BA、NAA 和 IBA, 进行腋芽诱导、不定芽增殖和试管苗生根研究。[结果] 消毒处理以 0.1% HgCl₂ 4 min 为宜, 诱导率为 68.3%; 适宜不定芽继代增殖的培养基为 WPM + ZT 2.0 mg/L, 不定芽的增殖系数达到 11.3; 将试管苗转移至生根培养基 WPM + IBA 0.2 mg/L 中, 生根率为 63.3%, 平均每个苗形成 4.8 条根, 根长 9.4 mm。当试管苗长至 5 cm 时出瓶移栽, 成活率可达 80% 以上。[结论] 建立了高丛越橘组培快繁体系, 为试管苗规模化生产奠定基础。

关键词 高丛越橘; 茎段; 离体繁殖; 生根

中图分类号 S604+.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)36-247-03

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Vaccinium corymbosum*

LI Sen¹, GAO Li-xia², LIU Nian³, ZHANG Shi-jun^{3*} (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 [Objective] To explore the direct regeneration way of adventitious bud, and establish tissue culture and rapid propagation of *Vaccinium corymbosum*. [Method] Using stems with auxiliary of *Vaccinium corymbosum* ‘Biloxi’ as explants, adventitious bud induction, proliferation, rooting of test-tube plantlets were observed on media supplied with various plant growth regulators and their combinations of ZT, 6-BA, NAA and IBA. [Result] The results showed that fourminutes disinfection using 0.1% mercuric chloride was the most proper for stem sterilization and induction rate of explants reached 68.3%. The optimum medium for bud multiplication was WPM + ZT 2.0 mg/L and the proliferation coefficient achieved to 11.3. The rooting rate reached 63.3%, and 4.8 roots per plantlet and 9.4 mm in root length were obtained when the plantlets *in vitro* were inoculated to rooting medium WPM + IBA 0.2 mg/L. The plantlets over 5 cm in length were transplanted and survival rate exceeded 80%. [Conclusion] The study establish tissue culture and rapid propagation of *Vaccinium corymbosum*, and lay the foundation for large-scale production of test-tube seedling.

Key words *Vaccinium corymbosum*; Stem; *In vitro* propagation; Rooting

越橘 (*Vaccinium* spp.) 是杜鹃花科 (Ericaceae) 越橘属 (*Vaccinium*) 多年生浆果类灌木, 果实蓝色或红色, 其中蓝色越橘俗称蓝莓。越橘果实皮薄, 风味酸甜可口, 含有丰富的花色苷、黄酮等生理活性成分, 具有增强心脏功能、预防癌症的功效, 能防止脑神经衰老、增强脑力; 可以强化视力, 减轻眼球疲劳^[1-2]。近年来, 越橘在市场上受到追崇, 目前生产栽培的主要类型包括兔眼越橘 (*Vaccinium ashei*)、矮丛越橘 (*Vaccinium angustifolium*)、高丛越橘 (*Vaccinium corymbosum*) 等^[3]。

越橘的常规繁殖方法有播种、嫁接和扦插法, 但播种繁殖发芽率低, 嫁接繁殖成活率低, 扦插繁殖的繁殖系数小, 周期长, 均难以满足市场对种苗的需求。利用组织培养来快速高效地获得大量无性系组培苗, 是获取越橘优质种苗的有效途径。许多学者进行了兔眼越橘、高丛越橘、矮丛越橘等不同栽培类型的组织培养技术研究^[4-8]。在越橘的组织培养中, 常用的外植体包括叶片、茎尖和茎段。以叶片为外植体的再生体系需要经过叶片脱分化形成愈伤组织, 愈伤组织再

分化成苗的芽间接再生途径^[8-9], 这种芽再生方式常用于建立越橘的遗传转化体系。而通过茎尖或茎段的腋芽萌发形成不定芽的增殖体系属于芽直接再生途径, 是越橘试管苗规模化快速繁殖的主要方法^[10-11]。笔者以适合华南地区种植的高丛越橘‘比洛克西’的茎段为试验材料, 探讨不定芽的直接再生方式, 建立越橘的组培快繁体系, 为试管苗规模化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料高丛越橘‘比洛克西’种植在仲恺农业工程学院农场, 剪取当年生嫩枝为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 不同消毒条件对茎段诱导的影响。 从农场采回试验材料, 剪去叶片, 切成约 3 cm 的茎段, 用自来水加洗衣粉冲洗 10 min, 再用自来水冲洗 10 min, 在超净工作台上用 75% 乙醇浸泡 30 s, 再用无菌水冲洗 1 次, 然后分别用 0.1% 的 HgCl₂ (W/V) 和 5% 的 NaClO (W/V) 为消毒剂浸泡处理, HgCl₂ 的消毒时间分别设为 3、4 和 5 min, NaClO 的消毒时间分别设为 5、10 和 15 min; 消毒完成后用无菌水冲洗 6 次, 用无菌滤纸吸干茎段上的水分, 将茎段接入 WPM + ZT 0.5 mg/L 的初代培养基中, 每瓶接种 4 个外植体, 每个处理 5 瓶, 3 次重复。接种 30 d 后, 统计污染率和诱导率。污染率 = 污染外植体数/接种外植体数 × 100%; 诱导率 = 无菌外植体数/接种外植体数 × 100%。

1.2.2 不定芽的继代增殖。 将诱导获得的茎段分切成约

基金项目 广东省科技计划项目 (2013B020304006); 广东省科技厅产学研合作项目 (2013B090200065); 广东省落叶果树工程技术研究中心项目 (2015B090903082)。

作者简介 李森 (1982 -), 男, 黑龙江哈尔滨人, 助理研究员, 硕士, 从事园艺植物育种和栽培研究。* 通讯作者, 副研究员, 博士, 从事园艺植物育种与栽培研究及教学工作。

收稿日期 2015-11-30

2 cm, 转接到分别附加不同组合和浓度 6-BA、ZT、NAA 的 WPM 和 MS 培养基上, 每处理 5 瓶, 每瓶接种 4 段外植体, 3 次重复。30 d 后统计分枝数、不定芽数和增殖系数。增殖系数 = 不定芽数/接种芽数 × 100%。

1.2.3 试管苗的生根培养。将无菌苗分切成约 2 cm, 转接到 WPM 附加不同浓度 IBA 的培养基上进行壮苗和生根培养, 每处理 5 瓶, 每瓶接种 4 段外植体, 60 d 后统计生根率、生根数和根长, 3 次重复。

1.2.4 试管苗的移栽。用镊子将高达 5 cm 以上的试管苗从培养瓶中取出, 洗掉根部培养基, 栽入泥炭土基质中, 浇透水, 环境温度 (22 ~ 25) °C, 湿度 80%, 60 d 后统计移栽成活率。

1.2.5 培养条件。以上培养基中均添加 30 g/L 蔗糖, 6 g/L

琼脂, pH 5.2, 培养温度 (25 ± 2) °C, 光照强度 1 500 ~ 2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

1.3 数据分析 试验数据采用 SPSS22 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒条件对茎段诱导的影响 由表 1 可知, 5% NaClO 的消毒效果不理想, 茎段在 5% NaClO 中处理 15 min 后, 污染率仍高达 33.3%, 与 0.1% HgCl₂ 处理 3 min 的污染率相当。用 0.1% HgCl₂ 只需处理 4 ~ 5 min, 即可得到较理想的灭菌效果, 污染率降至 20.0% 以下。茎段经 0.1% HgCl₂ 处理 4 min 的效果最好, 诱导率达 68.3%, 茎段接种在诱导培养基上 (图 1-1), 10 d 后可见腋芽萌发, 叶片逐渐展开, 茎干伸长 (图 1-2)。

表 1 不同消毒条件对茎段诱导的影响

消毒条件	污染数	污染率//%	萌芽数	诱导率//%
0.1% HgCl ₂ 3 min	6.3 ± 0.6 c	31.7 ± 2.9 c	12.3 ± 1.5 b	63.3 ± 7.7 ab
0.1% HgCl ₂ 4 min	4.0 ± 1.0 d	20.0 ± 5.0 d	13.7 ± 1.2 a	68.3 ± 5.8 a
0.1% HgCl ₂ 5 min	2.7 ± 0.6 d	13.3 ± 2.9 d	12.0 ± 1.0 b	60.0 ± 5.0 b
5% NaClO 5 min	11.3 ± 0.6 a	56.7 ± 2.9 a	8.3 ± 0.6 c	41.7 ± 2.9 c
5% NaClO 10 min	8.7 ± 1.2 b	43.3 ± 5.8 b	11.3 ± 1.2 b	56.7 ± 5.8 b
5% NaClO 15 min	6.7 ± 0.6 c	33.3 ± 2.9 c	11.7 ± 0.6 b	58.3 ± 2.9 b

注: 接种数为 20, 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 不定芽的增殖培养 由表 2 可知, 6-BA 的浓度从 2.0 mg/L 增至 5.0 mg/L, 苗的分枝数、不定芽数和增殖系数有所增加; 在培养基中再添加 NAA, 各项指标无显著变化, 说明 NAA 的增殖效果不佳。ZT 对越橘增殖培养的效果比 6-BA 显著, 在培养基中添加适当浓度的 ZT, 茎段均有明显生长, 萌发分枝和新芽, ZT 的浓度从 2.0 mg/L 增至 3.0 mg/L, 各项指标无显著变化, 说明 ZT 2.0 mg/L 是不定芽增殖的合适浓度 (图 1-3)。在 ZT 的基础上再添加 NAA, 苗的基部出现了少量愈伤组织, 而分枝数、不定芽数和增殖系数均显著下降, 说明 NAA 对不定芽增殖没有促进作用。WPM 比 MS 培养基更适于越橘的离体培养, 各项指标均明显高于 MS 培养基。

表 2 不同培养基对增殖培养的影响

培养基//mg/L	分枝数	不定芽数	增殖系数
WPM + 6-BA _{2.0}	1.0 ± 0 e	3.7 ± 0.6 e	1.8 ± 0.3 e
WPM + 6-BA _{5.0}	2.2 ± 0.6 d	6.0 ± 1.0 d	3.0 ± 0.5 d
WPM + 6-BA _{5.0} + NAA _{0.1}	2.1 ± 0.1 d	5.0 ± 1.0 de	2.5 ± 0.5 de
WPM + ZT _{1.0}	4.4 ± 0.2 ab	12.7 ± 0.6 b	6.3 ± 0.3 b
WPM + ZT _{2.0}	4.5 ± 0.2 a	15.3 ± 0.6 a	7.7 ± 0.3 a
WPM + ZT _{3.0}	4.6 ± 0.2 a	16.0 ± 1.0 a	8.0 ± 0.5 a
WPM + ZT _{2.0} + NAA _{0.1}	4.1 ± 0.2 b	13.3 ± 1.2 b	6.7 ± 0.6 b
MS + ZT _{2.0}	3.3 ± 0.3 c	10.3 ± 0.6 c	5.2 ± 0.3 c

注: 接种数为 20; 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 试管苗的生根与移栽 由表 3 可知, 将高度约 2.0 cm 的苗转接至生根培养基上, 不同浓度 IBA 诱导的发根率无显著差异, 0.2 mg/L 和 0.5 mg/L IBA 诱导出的根数和根长无显著差异, 植株在 IBA 0.2 mg/L 的培养基上发根整齐, 苗生长健壮 (图 1-4)。

试管苗移栽前 3 ~ 5 d 先将瓶盖打开, 在培养室内炼苗,

移栽时用镊子将试管苗夹出, 用清水冲洗, 然后移入泥炭土基质中, 加遮阴网, 温度控制在 25 °C 左右, 保持 80% ~ 90% 的相对湿度, 移栽成活率达到 80% (图 1-5)。

表 3 不同 IBA 浓度对试管苗生根的影响

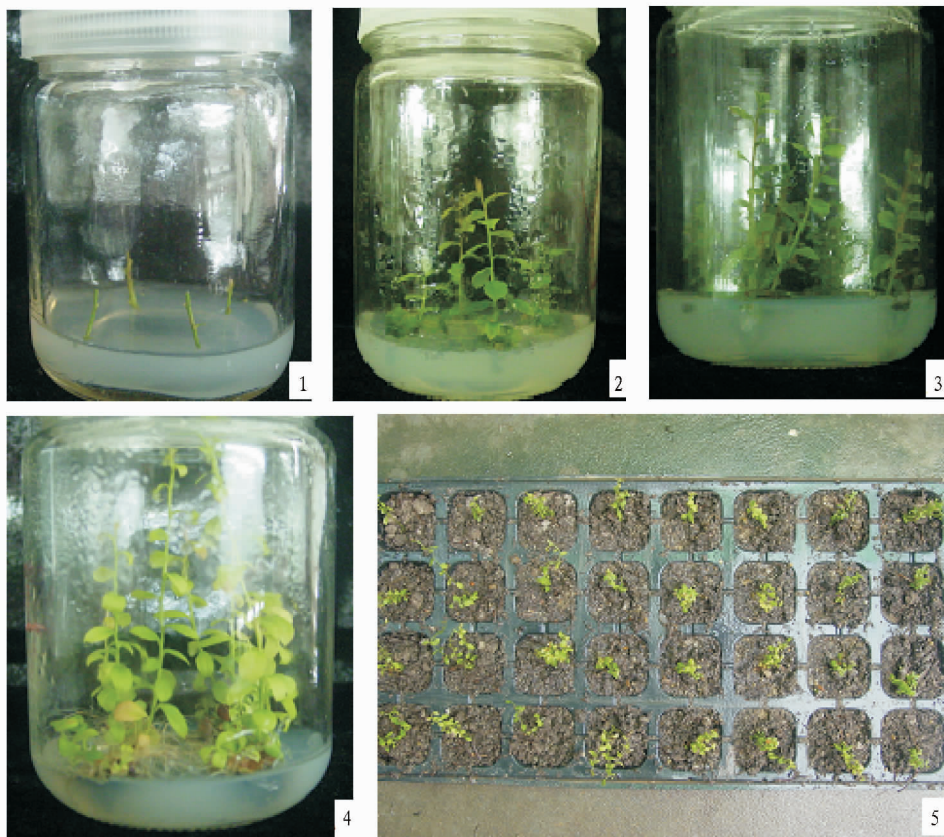
IBA 浓度//mg/L	根数	根长//mm	生根率//%
0.1	2.3 ± 0.7 b	5.2 ± 0.5 b	60.0 ± 5.0 a
0.2	4.8 ± 0.2 a	9.4 ± 1.0 a	63.3 ± 7.7 a
0.5	4.9 ± 0.1 a	9.8 ± 0.7 a	58.3 ± 7.7 a

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

0.1% HgCl₂ 和 5% NaClO 是植物材料常用的消毒剂^[12-13]。该试验结果表明, HgCl₂ 处理越橘茎段 3 ~ 5 min, 诱导成功率达 60% 以上, 而 NaClO 则需要 15 min 才能达到较好的消毒效果。在继代增殖培养中, ZT 比 6-BA 更有利于越橘增殖, ZT 2.0 mg/L 适宜越橘增殖培养, NAA 则诱导了愈伤组织的产生, 不利于茎段的增殖和生长, 这与人关于同属树种组培的研究相符^[8-11]。

不定根的发生与基因型和培养条件密切相关, 该试验选用越橘品种‘比洛克西’, 生根最适培养基为 WPM + IBA 0.2 mg/L, 生根率为 63.3%。不同品种试管苗的生根表现还有待进一步研究。试管苗移栽成活率的高低除与苗的健壮程度有关外, 还与移栽基质、环境温度及移栽后的栽培管理有关。该试验初步设置了泥炭土为栽培基质, 今后还将对栽培基质配方和移栽驯化条件进行更深入的研究, 以期提高试管苗的移栽成活率。



注:1. 外植体接种;2. 外植体在诱导培养基上生长 30 d;3. 不定芽的增殖;4. 试管苗的生根;5. 试管苗出瓶移栽。

图 1 越橘‘比洛克西’的组培快繁

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] 段祖安, 李建华, 赵艳燕, 等. 越橘离体快繁体系的优化[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2010, 34(3): 168-170.
- [4] 刘庆忠, 赵红军. 高丛蓝莓的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 253-253.
- [5] 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.
- [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, 39(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] 王新苗, 杨磊, 张海林. 矮丛蓝莓叶片愈伤组织培养的研究[J]. 绿色科技, 2010, 1(10): 185-188.
- [9] 邢瑞丹, 刘庆忠, 陈新, 等. 两个蓝莓品种离体叶片不定芽再生体系的建立[J]. 山东农业科学, 2009, 47(5): 8-11.
- [10] 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.
- [11] 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(Z1): 64-66.
- [12] 龚峥, 张卫华, 张方秋, 等. 绵毛银桦的组织培养与快速繁殖[J]. 广东农业科学, 2014, 50(2): 57-60.
- [13] 韩晓勇, 闫瑞霞, 殷剑美, 等. 铁棍山药组织培养快繁及试管珠芽离体再生体系研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(10): 2120-2125.

(上接第 138 页)

4 结论

该研究在分析 HACCP 体系基本原理的基础上, 对高钙奶整个生产工艺进行了危害分析, 确定了原料生鲜乳验收、超高温瞬时杀菌和无菌灌装是高钙奶生产过程中的 3 个关键控制点, 并针对控制点建立了限制、监控和纠偏措施。

HACCP 体系是一种控制危害的预防性体系, 不是反应性体系, 因此在实施 HACCP 体系时, 必须同时与操作规范(GMP)和卫生标准操作程序(SSOP)结合运行。该研究结果使整个高钙奶加工过程得到有效控制, 将提高高钙奶产品的

安全性。

参考文献

- [1] WANG D, WU H N, HU X T, et al. Application of hazard analysis critical control points(HACCP)system to vacuum-packed sauced pork in Chinese food corporations[J]. Food control, 2010, 21: 584-591.
- [2] 董萍, 吴韬, 郑晓杰, 等. HACCP 体系在大豆组织蛋白生产中的应用[J]. 大豆科学, 2014, 33(6): 903-909.
- [3] 刘皓, 王立晖, 范兆军, 等. HACCP 体系在乳粉生产中的应用[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(18): 104-107.
- [4] 华景清, 何文俊. HACCP 在苏州卤汁豆腐干生产中的应用[J]. 现代食品科技, 2013, 29(2): 448-451.