

# 红树莓组织培养研究进展

尹相博,于咏梅,于立芝

(中国农业大学 烟台研究院,山东 烟台 264670)

**摘要:** 从外植体的选择、培养基的选择、褐化预防、继代培养、生根培养及炼苗移栽等方面综述了红树莓组织培养技术的研究进展,并分析了红树莓组织培养中存在的问题,为其组织培养技术的研究提供了借鉴。

**关键词:** 红树莓;组织培养;外植体;培养基;褐化

**中图分类号:** S663.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-2767(2013)02-0140-04

红树莓(*Fructus Rubi*)又名托盘、红马林,结浆果的新兴果树。浆果圆球形,深红色,甜香味浓,品质好。花托上小浆果排列疏松,很容易与花托分离。植株丛生,萌蘖力强,产量较高,单株丛可结果 3 kg,单产 11 250~22 500 kg·hm<sup>-2</sup>。果实具有独特香味和天然色素,糖含量与苹果、梨、柑桔三大水果相似,氨基酸含量高于苹果、葡萄,富含维生素 E 和硒,其抗衰老物质超氧化物歧化酶(SOD)及抗癌物质鞣化酸含量高于现有的任何栽培及野生水果,其根、茎、叶也都有药用功效,在食品、医药、化妆、保健等方面有着广泛用途。由于营养成分和出汁率优于所有的水果,得到了国内外果树界的高度重视,被列为第三代水果和西部大开发的先锋树,开发前景十分广阔。

红树莓鲜果甘爽多汁,风味爽口,既可鲜食也可深加工。红树莓的生命力和适应性极强,在黑龙江省最冷(-40℃)的高寒山区露地栽培可安全越冬,只要能生长植物的土壤,它都能正常生长。每亩栽苗 1 000 棵,两年自然串根扩满园,达 5 000 棵以上。栽培当年少量挂果,二年旺果,采收期为每年的 4~7 月份(因地区温度而异),保护地栽培可提前上市。为此世界上许多国家已先后引种,投入大量的人力物力对红树莓进行栽培研究和利用。一些专家学者开展了对其组织培养体系的研究,以期产业化快速培育红树莓种苗。现对近几年红树莓组织培养方面的研究进行了综

述,旨在为红树莓组织培养技术的进一步研究与开发提供借鉴。

## 1 无菌再生体系的建立

### 1.1 外植体的选择

红树莓组织培养常用的外植体有茎尖、芽、茎段、叶片、种子。一般应选择幼嫩、生长旺盛的外植体,这与不同部位、不同生长时期细胞的理化性质及其功能有关。毕海林<sup>[1]</sup>、孟静静<sup>[2]</sup>等用腋芽为外植体,对红树莓进行了组织培养和快速繁殖并取得成功。张健<sup>[3]</sup>选择长势旺盛的幼嫩枝条,除去所有叶片,切取除顶芽外的第 3~10 节茎段作为外植体,将外植体一叶一节接种在丛生芽诱导培养基进行培养取得成功。肖娅萍等<sup>[4]</sup>采用在早春腋芽刚萌动或长出 1.0~1.5 cm 嫩茎时剥取的茎尖。关丽霞等<sup>[5]</sup>以 3 种双季树莓的当年生茎段为外植体,成功地对 3 种双季树莓进行了组织培养和快速繁殖。朴日子等<sup>[6]</sup>无刺红树莓带芽茎段和茎尖为外植体,试验证明外植体以茎段为佳。任爱<sup>[7]</sup>曾用红树莓的叶作为外植体进行培养。

不同季节和不同外植体的选择对组织培养的效果有较大影响。王岳英<sup>[8]</sup>以树莓一年中不同时期的材料及同一植株不同部位的器官作外植体进行试验,结果表明,一年中不同时期所采集的同一类外植体,其成活后的生长分化表现没有差别,只要培养基适宜,均可进行分化生长活动,只是外植体的接种存活率、污染率等有差别,4 月份采集的外植体污染率最低,成活率最高,是树莓组织培养最佳取材时期;在初代培养中,茎段的诱导率最高,为 79.3%,带芽茎段是树莓组织培养最佳外植体材料。

### 1.2 培养基的选择

红树莓组织培养选择的培养基包括 MS、1/2

收稿日期:2012-11-19

第一作者简介:尹相博(1990-),男,山东省日照市人,在读学士,从事设施农业科学与工程研究。E-mail: yxb19900820@126.com。

通讯作者:于立芝(1963-),女,山东省烟台市人,学士,教授,从事植物营养、土壤肥料与生物技术研究。E-mail: yulizhi8656@sina.com。

MS、WPM 和 Anderson,植物生长调节剂主要为 IBA、6-BA 和  $GA_3$ 。但对最适培养基和激素浓度的选择不同。肖娅萍等用 1/2MS 为培养基;王岳英试验所用的基本培养基为 MS 培养基;刘计权<sup>[9]</sup>初代培养以 MS+IBA 0.03 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>为最适,接种 5 d 后,腋芽开始萌发;曹慧<sup>[10]</sup>以树莓带芽茎段为外植体,分化增殖最佳培养基 MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.02 mg·L<sup>-1</sup>+ $GA_3$  6 mg·L<sup>-1</sup>;关丽霞以 3 种双季树莓的当年生茎段为外植体,试验结果表明最佳诱导培养为 MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+ $GA_3$  0.5 mg·L<sup>-1</sup>;董丽芬<sup>[11]</sup>等以树莓芽作为外植体,在 MS、1/2MS、WPM 和 Anderson 4 种基本培养基中培养 40 d 后,筛选出最佳基本培养基为 MS,芽分化率达 90.48%;贺立恒<sup>[12]</sup>以树莓的茎段作为外植体,研究发现树莓最佳初代培养基为 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA,适宜外植体腋芽分化的蔗糖浓度为 25 g·L<sup>-1</sup>。朴日子等以无刺红树莓带芽茎段和茎尖为外植体,筛选各组织培养阶段高频、稳定的适宜培养基,结果表明,分化培养基以 1/2 MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+活性炭 0.1% 最好,分化率可达 100%。

由于 pH 直接影响培养材料对营养的吸收,因此配制培养基时调节 pH 是必要的。不同的植物材料对培养基 pH 的要求是不同的。毕海林等以未萌发的腋芽为外植体,对树莓栽培品种红宝玉进行了组织培养和快速繁殖技术研究,培养基 pH 为 5.8;郭玉霞<sup>[13]</sup>等以带腋芽茎段为外植体,培养基的 pH 5.6~5.8;朴日子以无刺红树莓芽茎段和茎尖为外植体,pH 5.8;解瑞彬<sup>[14]</sup>将预培养 10 d 后的健壮侧芽为外植体,培养基的 pH 为 5.8。

### 1.3 褐化的预防

切割材料时,组织中的酚类化合物被氧化产生棕褐色的醌类物质,进而使整个外植体组织受到伤害的现象称为褐变。一般幼龄材料褐变较轻,减小伤口面积并缩短切口暴露在空气中的时间有助于减轻褐变,酒精消毒虽然效果较好,但易对材料造成伤害,导致褐化。在培养基中加入抗氧化剂和活性炭等都会有效控制褐化的发生。

崔雪艳<sup>[15]</sup>以带芽茎段和茎尖为外植体,进行红树莓海尔特兹初代培养中防止外植体褐化的研

究,结果表明随着培养时间加长,茎尖明显比茎段褐化现象严重,培养 30 d 后茎尖最终褐死,可见带芽茎段为其理想的外植体材料;褐化率随着升高灭菌时间的增加而升高,污染率随着升高灭菌时间的增加而降低;防褐化的同时又使外植体生长良好的初代培养基为 MS+6-BA 0.50~0.75 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+ $GA_3$  0.2 mg·L<sup>-1</sup>;暗处理可以明显抑制褐化。朴日子进行不同培养基对外植体萌发的影响,表明 1/2MS+6-BA 1.00 mg·L<sup>-1</sup> 效果最好,褐变死亡数最少。曹慧等通过与不加活性炭的对比,看出加入 5 g·L<sup>-1</sup> 活性炭可明显降低褐化率。在配制培养基时,适当地降低 pH 可以降低多酚氧化酶的活性和底物的利用率,故可以抑制褐变,升高 pH 则明显加重褐变。

消除或减少外植体的褐化方法有以下 5 种:一是选择适宜的外植体,一般以红树莓的带芽茎段为理想外植体;二是加入抗氧化剂或吸附剂,培养基中加入了 1.0 g·L<sup>-1</sup> 的 VC,能有效减少褐化,添加活性炭效果更好;三是连续转移外植体,对于新接种的外植体,将其很快转移到新鲜培养基上 2~3 次,在某些情况下可以减轻褐化,这段时间外植体的切口愈合,外渗停止<sup>[16]</sup>;四是对外植体的消毒预处理;五是适宜的暗处理。

## 2 继代增殖培养与生根培养

### 2.1 继代增殖培养

在初代培养基基础上,获得的芽、苗的数量有限,不能充分发挥组织培养快速繁殖的优势,需经继代繁殖以获取大量增殖材料。在植物组织培养中,激素的种类和浓度是除了遗传因素之外非常重要的因素,虽然用量较少,但却起着非常重要和明显的调节作用。不同的激素相互作用,具有重叠和互补的效应<sup>[17-20]</sup>。

肖娅萍等用 MS 培养基作为基本培养基,附加 BA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1.0~1.5 mg·L<sup>-1</sup> 适用于愈伤组织的诱导;附加 6-BA 1 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1~0.2 mg·L<sup>-1</sup>+ $GA_3$  6~8 mg·L<sup>-1</sup>+CH 300 mg·L<sup>-1</sup> 适于芽的诱导;附加 BA 1 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+ $GA_3$  2 mg·L<sup>-1</sup> 适于芽的繁殖。毕海林以未萌发的腋芽为外植体,对树莓栽培品种红宝玉进行了组织培养和快速繁殖技术研究。结果表明,MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 为较佳的增殖培养基。朴日子继代增殖培养基以 MS+6-BA

1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>最理想,增殖倍数可达7倍。吴春花等<sup>[21]</sup>对红树莓茎尖进行了快速繁殖研究,最适继代培养基为MS+BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0.5 mg·L<sup>-1</sup>。诱导丛芽分化的培养基中细胞分裂素浓度相同时,加生长素的培养基分化出的幼芽要比无生长素的培养基分化出的幼芽多;而生长素用量相同,细胞分裂素偏高时分化出的丛芽较多<sup>[22-23]</sup>。

目前,很多茎尖组织增殖培养工作的重点集中在各种生长调节剂的配比上,但都没有同时研究6-BA、GA<sub>3</sub>、IAA以及琼脂4因子在增殖培养中的配比<sup>[24]</sup>。

## 2.2 生根培养

王岳英进行组织培养生根试验,用2MS、MS、1/2MS和IBA、NAA水平正交设计9个处理,表明1/2MS培养基是生根的最佳培养基。NAA为2.00 mg·L<sup>-1</sup>时生根率最高,为88.40%。郭玉霞用的生根培养基为1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+活性炭0.2%+白砂糖20.0 g·L<sup>-1</sup>+琼脂粉4.0 g·L<sup>-1</sup>。毕海林在生根培养阶段,试管苗在1/2MS+IBA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+细沙+珍珠岩的培养基上生根情况较好。朴日子的生根培养基以1/2 MS+IBA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>最佳,生根率可达93.33%。

加活性炭于培养基中主要是利用其吸附能力,减少一些有害物质的影响,对某些植物诱导生根有利。但是活性炭对物质的吸附基本无选择性,既对有害物质吸附,也对有利物质吸附,因此活性炭不易过多,一般以不超过0.1%为宜<sup>[25-26]</sup>。综合以上研究结果,适于红树莓生根的最佳培养基组合为:1/2MS+NAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+0.1%活性炭。

## 3 炼苗移栽

由于试管苗是在无菌、恒温、高湿、弱光的培养条件下生长发育的,不能立即适应栽培环境,因此必须有一个逐步驯化(也称炼苗)和适应的过程。在低温高湿、土壤肥沃、含微生物多的环境中,组培苗移栽很容易从根颈部长霉而导致腐烂坏死。因此,炼苗时需注意土壤温湿度等外部条件的控制。

移栽前要进行通风炼苗,先将生根后的培养瓶口打开,使嫩苗逐渐与外界接触,提高适应能

力,但要保持较高的空气湿度。移栽时用镊子轻轻取出试管苗,用流水将根部培养基冲洗干净,然后栽入细砂中,待长出新的根尖后,移栽到已消毒的基质中。因试管苗根系吸收营养能力差,移栽后3 d内要经常给幼苗叶喷施营养液。10 d内要注意遮荫,并及时喷水,30 d后记录其成活率<sup>[27]</sup>。

不同基质对试管苗移栽成活率具有重要影响<sup>[28]</sup>。毕海林等在当组培苗的根系生长到3~5 cm时,移栽到大棚,湿度为100%、移栽基质为新蛭石+草炭土(2:1)时,生长效果最好,成活率最高。刘计权<sup>[29]</sup>在当生根苗长出发达根系,株高达3~4 cm时,移入温室打开瓶口,保持3 d,洗净根系上的培养基,移入美式72穴育苗盘,基质配比为草炭土+珍珠岩+蛭石(1:1:1),成活率达95%以上。王岳英等在试验的几种基质中,纯砂+珍珠岩(1:1)混合炼苗成活率最高达52.0%,纯砂次之,珍珠岩+蛭石(1:1)混合的效果最差。郭玉霞等温室炼苗7 d,移栽基质为纯砂+草炭土(1:1),移栽成活率高达92.78%。陈琦<sup>[30]</sup>等研究河沙保水性比珍珠岩好,透气性也较好,因此树莓组培苗移栽成活率最高,所以在生产实践中最好选择河沙作为移栽基质。基质松而不散,透气性较好,且苗较易插入,才能使苗生根较多且生根率较高<sup>[31]</sup>。

## 4 结语

植物组织培养目前已成为现代生物技术中应用较广泛的技术,在植物育种、建立无病毒株系、快速繁殖无性系、次生代谢产物生产及细胞和发育生物学的研究应用中发挥着重要作用。在目前的生产技术条件下红树莓组织培养还存在一些问题需要解决。

首先,培养过程中的污染率仍较高,不能进行批量生产。造成污染的来源较多,主要是外植体、培养容器、接种工具、培养基、接种室和培养室环境、接种人员的操作等。应根据实际情况采取相应的措施进行预防和控制。分化率、生根率和移栽成活率需要进一步提高,同时组织培养的工作场所也需要进一步改进,加强消毒和灭菌水平。

其次,研究者获得众多不同品种的快繁体系,缺少同一品性红树莓在组织培养技术中共性的归纳和理论支持。

最后,缺乏新品种的选育研究。我国红树莓

资源较少,且品质不好,大多为引进品种,因此有必要利用组织培养技术对红树莓进行新品种的选育,为红树莓资源的遗传转化、微型种质资源库的建立创造条件。

未来的研究应该注重建立适合地域栽培品种的离体再生体系和转化体系,为开展基因技术优化品种品质提供技术支撑,为地区科研和生产提供理论依据。对红树莓的组织培养的相关研究仍然不足,红树莓的开发与利用依然不如蓝莓等其它蔷薇科浆果,因此,对红树莓组培过程的植物生理变化过程和进行工厂化高效再生体系研究以及红树莓的产品开发方面还有极大的研究前景。

#### 参考文献:

- [1] 毕海林,徐中志,和加卫,等.红宝玉树莓组织培养和快速繁殖技术研究[J].现代农业科技,2007(4):5-6.
- [2] 孟静静,李慧,宋旭丽,等.红莓组织培养及快速繁殖技术[J].西南农业学报,2010,23(6):2155-2157.
- [3] 张健.红树莓的组织培养快繁技术[J].吉林蔬菜,2012(3):10.
- [4] 肖娅萍,王哲之,张志勤,等.红树莓植株再生系统的建立[J].中草药,2001,32(8):738-741.
- [5] 关丽霞,王兴东,王振龙,等.双季树莓组织培养技术初报[J].广东农业科学,2011(1):62-63.
- [6] 朴日子,曹后男,陈艳秋,等.无刺红树莓组织培养快速繁殖技术研究[J].吉林农业大学学报,2006,28(4):411-414.
- [7] 任爱.树莓组织培养技术体系研究[J].山西农业科技,2008(1):12-14.
- [8] 王岳英.树莓组织培养生根炼苗技术[J].东北林业大学学报,2010,38(6):121-122.
- [9] 刘计权.树莓的组培快繁研究[J].北方园艺,2003(2):47.
- [10] 曹慧,薛佳桢,孙京波,等.树莓组织培养技术的研究[J].北方园艺 2010(22):125-127.
- [11] 董丽芬,张晓英,张宗勤,等.树莓的组织培养技术[J].西北林学院学报,2003,18(2):42-43.
- [12] 贺立恒.美国红树莓和黑莓脱毒快繁及工厂化育苗研究[D].北京:中国农业大学,2005:21-27.
- [13] 郭玉霞,董彦琪,刘喜存,等.红树莓组培快繁技术研究[J].河南农业科学,2011,40(4):127-128,133.
- [14] 解瑞彬,李秋菊,曹媛媛,等.树莓的组织培养快繁研究[J].天津农业科学,2009,15(3):23-25.
- [15] 崔雪艳,董敬超.红树莓海尔特兹初代培养中防止外植体褐化的研究[J].现代农业科技,2011(22):123-124.
- [16] 袁巧平,董茂山,黄钦才,等.核桃的组织培养[J].植物生理学通讯,1990,26(2):43-44.
- [17] 王小敏,李维林,赵志强,等.薄荷属植物的组织培养研究进展[J].江苏农业科技,2007(4):117-121.
- [18] 王志成,刘明稀,易自力.杀菌剂防治植物组织培养污染的初步研究[J].长沙电力学院学报:自然科学版,2004,19(1):82-84.
- [19] 袁意,李纯.树莓组织培养及植株再生[J].激光生物学报,2006,16(3):334-337.
- [20] 陈凯,刘颖.如何控制植物组织培养中褐变的产生[J].邯郸农业高等专科学校,2004,21(3):5.
- [21] 吴春花,李莲花.红树莓的茎尖培养与快速繁殖[J].延边大学农学学报,2003,25(4):273-275,278.
- [22] 张林水,李志民,李波,等.树莓组培快繁技术体系研究[J].山西农业科学,2006,34(1):32-34.
- [23] 王宏,于辉,洪建源,等.树莓茎尖组织培养试验简报[J].2002,33(4):319-320.
- [24] 王岳英.树莓组织培养最佳外植体材料试验[J].山西林业科技,2009,38(2):12-13,30.
- [25] 祁永琼,许邦丽,李开云,等.植物组织培养中污染的原因分析及控制[J].云南农业科技,2010(4):40-44.
- [26] 赵蓬晖,张江涛,马红卫,等.植物组织培养中的几个常见问题与对策[J].河南林业科技,2001,21(2):27-28.
- [27] 王清连.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2002:176.
- [28] 刘庆昌,吴国良.植物细胞组织培养[M].北京:中国农业大学出版社,2002:156.
- [29] 刘计权.应用组织培养对覆盆子快速繁殖的研究[J].中草药,2006,4(6):426-428.
- [30] 陈琦,陈瑜,黄庆文,等.树莓茎尖组织培养体系的优化研究[J].西北植物学报,2007,27(9):1892-1898.
- [31] 卢军,张相波,王路勇,等.树莓栽培技术[J].现代农业科技,2009(3):42.

## Review of Progress in Tissue Culture of Red Raspberry

YIN Xiang-bo, YU Yong-mei, YU Li-zhi

(Yantai Research Institute of China Agricultural University, Yantai, Shandong 264670)

**Abstract:** The research progress of tissue culture of red raspberry, including the effects of explants sources, culture medium, the inhibition on browning of explants and methods of rooting and seedling before transplanting, were reviewed. The problems raised in the tissue culture were analyzed. It provided reference for the tissue culture technology research.

**Key words:** red raspberry; tissue culture; explant; browning; medium