

引进国外蓝莓品种的组织培养及快繁技术研究

茨韦特科夫·约旦¹, 赵燕丽², 王 春³, 董 宣⁴, 杨 帆¹

(1. 黑龙江省农业科学院 对俄中心, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨市职工医学院, 黑龙江 哈尔滨 150020; 3. 黑龙江省农业科学院 植物保护研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 4. 哈尔滨科瑞种苗生物技术研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:以从保加利亚引进的蓝莓品种 B91 和 B92 的未萌动枝条为试验材料, 进行了顶芽、茎尖和茎段的萌发与分化、茎段的继代丛生与快繁、试管苗生根与移栽等技术的研究。结果表明: 对未萌动枝条进行预处理能明显提高接种效率; WPM+ZEA 2.0 mg·L⁻¹ 是接种茎段的适宜培养基, WPM+ZEA 1.0 mg·L⁻¹ 是大量产生丛生芽的快繁培养基, 1/2 WPM+IBA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹ 是生根的理想培养基; 在温室中草炭、河砂和园土按 1:1:1 混合, 经过硫粉调酸后是试管苗移栽的较好基质; 移植到示范果园的试管苗长势旺盛。

关键词: 蓝莓; 组织培养; 快繁技术; 硫

中图分类号: S663

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)06-0006-03

蓝莓 (Blueberry) 学名越橘, 也称美国蓝莓, 属杜鹃花科越橘属 (*Vaccinium*) 浆果类灌木, 是具有较高经济价值和广阔开发前景的新兴树种。据最新研究, 蓝莓果实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, 国际粮农组织将其列为人类五大健康食品之一^[1]。正是由于蓝莓独特的风味及营养保健价值, 其果实及产品风靡世界, 供不应求, 在国际市场上售价昂贵^[2]。

哈尔滨地处高寒地区, 冬季寒冷而漫长, 一般果树在这里越冬困难, 而蓝莓的抗寒力很强, 一些品种可以抵抗 -40℃ 低温, 在高寒山区和酸性沼泽地上具有很大的发展潜力^[3]。现利用生物技术研究, 以探讨蓝莓苗木的工厂化繁殖体系, 扩大群体数量, 满足蓝莓在哈尔滨地区发展的需要。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为从保加利亚引进的 2 个蓝莓品种 B91 和 B92 各 8 个未萌动的一年生枝条。

1.2 方法

试验于 2009 年 3 月在黑龙江省农业科学院

和哈尔滨科瑞种苗生物技术研究所同时进行。

1.2.1 预培养 取 2 个蓝莓品种 B91 和 B92 未萌动枝条截成长 25 cm 的段, 将其下部 1/3 浸泡在含 20 滴·L⁻¹ 吐温-20 的 0.75% 次氯酸钠溶液中, 灭菌 15 min。取出用无菌水冲洗 2 min, 将每段枝条从基部切去 0.3 cm, 立即浸入到“强制生长液”(简称 FC) 中进行处理。FC 主要成分为 6-BA 30 mg·L⁻¹ + IBA 10 mg·L⁻¹ + GA₃ 10 mg·L⁻¹, 蔗糖 20 g·L⁻¹, 八羟基喹啉柠檬酸 200 mg·L⁻¹。以无菌水为对照 (CK)。光照 16 h·d⁻¹, 23℃ 恒温培养。每周换 2 次 FC 溶液。待枝条叶腋处长出嫩绿的新枝, 取新枝茎段、顶芽、茎尖为外植体接种。

1.2.2 接种 接种时把新枝剪下, 放在流水下冲洗 30 min。然后用 75% 乙醇溶液浸 3~4 s, 再浸入 0.1% 升汞溶液中灭菌 10 min, 无菌水冲洗。将新枝条剪成 0.5~1.0 cm 长的段; 将顶芽剥落鳞片; 借助解剖镜剥离 0.3~0.5 mm 大小的茎尖。将切剪好的外植体依次接入诱导培养基中^[4-5]。

诱导培养基采用 MS、WPM 和改良的 WPM 为基本培养基, 添加 6-BA (0.5 和 1.0 mg·L⁻¹)、ZEA (0.5 和 2.0 mg·L⁻¹) 和 1.0 mg·L⁻¹ KT。蔗糖 3%, 琼脂 0.7%, pH 5.8。培养温度 23~25℃, 光强 2 000 lx, 光照 14 h·d⁻¹。

1.2.3 快繁 以诱导再生植株的茎段为继代材料, 以改良 WPM 为基本培养基, 分别添加 0.5、1.0、2.0 和 3.0 mg·L⁻¹ 的 ZEA, 每个品种的每个处理接种 10 瓶, 每瓶 5 个茎段, 接种后 30 d 统计

收稿日期: 2011-05-04

基金项目: 哈尔滨市科技攻关计划资助项目 (2009 AA6BE048)

第一作者简介: 茨韦特科夫·约旦 (1967-), 男, 保加利亚特罗扬市人, 硕士, 研究员, 从事对东欧国家的农业技术合作研究。E-mail: yordan-bg2000@yahoo.com。

增殖的丛生芽数^[4]。

1.2.4 生根 取继代培养 20 d 后,高 2.5 cm 左右的丛生芽为生根材料。将丛生芽分成单株,插入生根培养基中。培养基设计 8 个处理,每个处理 7 瓶,每瓶接种 8 个小单株。接种 14 d 后,观察不同处理的生根数,计算平均生根率。

1.2.5 移栽 生根后移栽前进行炼苗。移栽的床土选择草炭、河砂和园土按 1:1:1 混配,用硫粉调节 pH 4.5~5.0。

移栽方法是将育苗钵或纸筒装满土,浇透水,把洗净的试管苗小心插入纸筒中。栽苗后用塑料布将苗床罩上,保温保湿,14~21 d 后,揭开塑料布,同时遮荫。育苗在封闭的温室内进行,控制温度 22~27℃,湿度 85% 以上。育苗过程中适时人工锄草浇水,30 d 后,调查成活率。

2 结果与分析

2.1 预培养对接种的影响

引进品种材料非常少,为确保接种成功,先进行预培养。结果表明,FC 对新枝萌发有促进作用,用 FC 处理的休眠枝条,第 3 天时芽苞开始萌动,第 7 天时展叶,第 15 天开始有新枝抽出,到第 30 天时新枝长到 3~4 cm,新枝嫩绿健壮,可作为外植体接种。而 CK 处理的枝条,第 30 天时个别枝条才刚刚展叶,第 40 天时有少量新枝萌发,新枝细弱发黄。B91 和 B92 品种间没有差别。

表 1 FC 对新枝萌发的影响

处理枝条数		第 15 天	第 20 天	第 40 天
		新枝萌发数	新枝萌发数	新枝萌发数
FC 处理	16	13	43	45
CK	16	0	0	15

由表 1 可知,用 FC 处理能够有效地促使枝条提前结束休眠,萌发新枝,使取材可在 1 月份或更早时间进行,延长试验的取材时间。新枝萌发集中在处理 20 d 左右时,有利于外植体接种时大量取材。而 CK 直到 40 d 时,才有少量枝条萌发新枝,其它大部分枝条未反应,并逐渐干枯死亡。

2.2 不同接种培养基对植株再生的影响

以品种 B91 为例,外植体不同,对诱导的反应不同,茎段接种到培养基上,很快就有积极的反应,表现为皮孔增大,切口处产生少量愈伤组织。一些茎段 20 d 左右就在叶腋处生出新芽。顶芽接种后,只有少量顶端萌发,但过一段时间或转移后,下部叶片发黄,逐渐干枯死亡。茎尖接种后,

诱导出愈伤组织,转移后,没有分化。

在初步筛选接种外植体的基础上,将新枝的茎段接种到不同的诱导培养基上,筛选以茎段为外植体的诱导培养基。

由表 2 可知,WPM 是蓝莓培养适宜的基本培养基,稍做改动不影响培养效果,MS 不适宜蓝莓的培养。在激素使用上,6-BA 和 KT 等不适合蓝莓的培养,ZEA 0.5~2.0 mg·L⁻¹ 都能使蓝莓较好的萌动和生长,以 WPM-A + ZEA 2.0 mg·L⁻¹ 最为适宜。

表 2 不同培养基对 B91 茎段初始培养的影响

基本培养基	激素种类及浓度/mg·L ⁻¹	接种外植体数/个	萌芽数/个	萌芽率/%
MS	6-BA 0.5	10	0	0
	6-BA 1.0	10	0	0
	ZEA 0.5	10	0	0
	ZEA 2.0	10	0	0
	KT 1.0	10	0	0
WPM	6-BA 0.5	15	0	0
	6-BA 1.0	15	0	0
	ZEA 0.5	15	3	20
	ZEA 2.0	15	8	53
	KT 1.0	15	0	0
WPM-A	6-BA 0.5	10	0	0
	6-BA 1.0	10	0	0
	ZEA 0.5	10	3	30
	ZEA 2.0	10	6	60
	KT 1.0	10	0	0

2.3 不同浓度 ZEA 对增殖丛生芽的影响

经过初始培养再生的蓝莓苗数量有限,必须通过继代培养扩大繁殖群体,才能达到快繁目的。由图 1 可知,以 WPM-A 为基本培养基,添加不同浓度 ZEA,增殖的丛生芽数不同,B91 和 B92 品

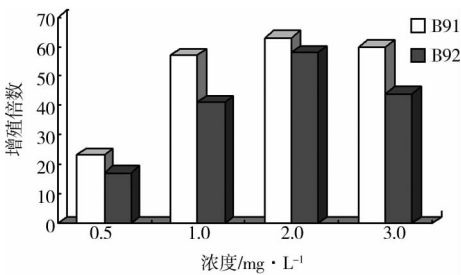


图 1 不同 ZEA 浓度对蓝莓增殖丛生芽的影响

种之间差别不大,在植株健壮程度上,B91 稍好于 B92。因 ZEA 成本较高,用 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 比较经济实惠。丛生芽数与每个丛生芽能剪切的茎段数之积等于增殖倍数,最高可达 60~70 倍。

2.4 不同培养基对生根的影响

以 $1/2\text{WPM}$ 为基本培养基,蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,活性炭 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 加或不加,不同浓度的 IBA 和 NAA 组成的不同培养基对生根的影响结果表明,对于蓝莓组培苗的生根,不同处理组合之间生根率有差异。在附加 IBA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和活性炭时,蓝莓组培苗的生根率最高为 45.23%(见表 3)。经显著性测验分析,处理 3 的生根率极显著高于其它处理组合的生根率(见表 4)。添加活性炭是影响蓝莓生根的高度显著因素,无论其培养基成分如何,其生根率都明显相对高于不加活性炭的组合,这说明根部的暗环境对于蓝莓生根非常重要。

表 3 不同培养基对生根的影响

处理	吲哚丁酸 IBA / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	萘乙酸 NAA / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	活性炭 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	生根率 /%
1	0	0	+	22.86
2	1.0	0.2	—	10.87
3	2.0	0.5	+	45.23
4	3.0	0	—	9.52
5	0	0.2	—	20.00
6	1.0	0	+	40.41
7	2.0	1.0	—	27.50
8	0	1.0	+	38.78

表 4 生根结果的显著性测验

处理组合	生根率均值	5%显著水平	1%极显著水平
3	0.4523	a	A
6	0.4041	b	B
8	0.3878	c	C
7	0.2750	d	D
1	0.2286	e	E
5	0.2000	f	F
2	0.1087	g	G
4	0.0952	h	H

2.5 移栽

结果表明,蓝莓喜酸性土壤条件,在温度、光照和湿度相同的情况下,调酸和不调酸的试管苗成活率差异明显,调酸后成活率为 87.7%,比不调酸的 48.5%提高了近 40%。

根据蓝莓的特点,采用硫粉和营养剂配合使用,将调酸、消毒和强化营养有机地结合为一体,为蓝莓初期生育创造良好的土壤环境。

2010 年秋季,将温室抚育的蓝莓苗移栽到示范果园中,试管苗长势旺盛。

3 结论与讨论

综合整个试验,保加利亚蓝莓品种 B91 和 B92 可通过组织培养进行快速繁殖,以预培养获得的茎段接种效果最好,WPM 附加 ZEA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是接种和繁殖的理想培养基,繁殖倍数最高可达 60~70 倍。 $1/2\text{WPM}+\text{IBA } 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是最佳生根培养基,生根率 45.23%,草炭、河砂和园土按 1:1:1 混合,经过硫粉调酸后是试管苗移栽的较好基质,移栽成活率达到 87.7%。

黑龙江省虽然早有采摘野生蓝莓进行加工的历史,但栽培蓝莓还是近几年才发展起来的,品种多从国内外引进,该试验引进保加利亚的 2 个品种 B91 和 B92 为半高丛蓝莓,组培过程中表现为植株较高,发生的丛生芽数明显比矮丛蓝莓少,2 个品种之间的组织培养特性无明显差异,要做进一步的栽培试验,才能明确引种效果。

WPM 为木本植物培养基,也有人在蓝莓培养时使用改良 WPM,试验中使用了 WPM-A 培养基,即用 KNO_3 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 代替 WPM 中的 K_2SO_4 和 CaCl_2 ,效果差别不明显。

参考文献:

- [1] Chen C M,Zhang N,Wang M. Ethnobotany of wu fan shu (*Vaccinium bracteatum* Thunb.)[J]. Journal of Plant Resources and Environment,1998,7(1):45-48.
- [2] Paul E. Blueberry Sciseu[M]. New Brunswick and London: Rutgers University Press,1988.
- [3] 李亚东. 越橘(蓝莓)栽培与加工利用[M]. 长春:吉林科学技术出版社,2001.
- [4] 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,2004(9):314-316.
- [5] 邢瑞丹,刘庆忠,陈新,等. 越橘组织培养及基因工程的研究进展[J]. 安徽农业科学,2009,37(20):9369-9371.

芫荽 RAPD 体系优化

李小梅^{1,2}, 栾 杰¹, 张景涛^{1,2}, 张丽苗², 张立微², 董守坤¹

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 哈尔滨市农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:以芫荽基因组 DNA 为模板, 对 RAPD 扩增反应条件进行优化, 以期建立适合芫荽的 RAPD 的最优反应体系, 结果表明: PCR 扩增体系(总体积 20 μL)为: 模板 DNA 1.0 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, dNTP 0.45 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 随机引物 1.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq 酶 0.6 U, Mg^{2+} 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 退火温度 39 $^{\circ}\text{C}$, 循环次数 40。

关键词:芫荽; DNA; RAPD; 反应体系

中图分类号: S636.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)06-0009-05

芫荽又名香菜、胡荽、香荽, 学名为 *Coriandrum sativum* L., 英文名为 Coriander, 属伞形科一年或二年生的草本绿叶蔬菜, 原产地中海沿岸, 汉代经“丝绸之路”传入我国。根据考古学文献和

种间多样性观察, 芫荽是一种栽培植物, 有时视为一种杂草。关于芫荽最早的考古学文献是公元前 6000 年在以色列^[1]。芫荽在各地的文献都有记载, 埃及 3200BC, 南欧 1500BC, 印度 300BC, 中国 400AD, 中欧 100AD, 北欧是 1 400 a 后, 美国是 1 670 a 后^[2-4]。它虽非主菜, 却是人们日常生活中不可缺少的调味香料^[5], 是人类历史上用于调味食品上最古老的芳香蔬菜之一^[6-7], 中医以全草入药, 可治麻疹诱发不快, 食物积滞, 感冒风寒等症^[7-8]。

收稿日期: 2011-03-25

基金项目: 东北农业大学博士启动基金资助项目

第一作者简介: 李小梅(1982-), 女, 黑龙江省绥化市人, 硕士, 农艺师, 从事蔬菜育种研究。E-mail: xmlynn@yahoo.cn。

通讯作者: 张景涛(1963-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士, 研究员, 从事蔬菜育种研究。E-mail: chiillii@126.com。

Study on the Techniques of Tissue Culture and Rapid Propagation of Introduced Foreign Blueberry Varieties

Tsvetkov Yordan¹, ZHAO Yan-li², WANG Chun³, DONG Xuan⁴, YANG Fan¹

(1. Heilongjiang Center for Agricultural Scientific and Technological Cooperation between China and Russia, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Harbin Staff and Workers Medical College, Harbin, Heilongjiang 150020; 3. Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 4. Harbin Kerui Seed and Seedlings Biotechnology Research Institute, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Dormant shoot of introduced blueberry varieties of B91 and B92 from Bulgaria were used as experimental materials to carry out a study on techniques of budding and dissimilating of apical bud, stem apex and stem segments, regeneration and fast propagation of stem segments, rooting and transplanting of seedlings in test tube. The results showed that the pre-treatment on dormant shoot has significantly increased efficiency of inoculation; WPM+ZEA 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was a suitable medium for stem segment inoculation; WPM+ZEA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was a fast propagation medium producing a large number of clusters; 1/2 WPM+IBA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was the ideal medium for rooting. In the greenhouse peat, river sand and garden soil mixed at 1:1:1 ratio, and treated with sulphur powder after acid was a comparatively good substrate for transplantation of seedlings produced in test tube; Transplanted seedlings performed vigorous growth in the demonstrate orchard.

Key words: blueberry; tissue culture; fast propagation techniques