

王振武,代志国,彭醒醒,等. 笃斯越橘愈伤组织诱导分化及试管苗生根研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):59-61.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.017

笃斯越橘愈伤组织诱导分化及试管苗生根研究

王振武,代志国,彭醒醒,王雪娇,闫超

(东北农业大学,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:以笃斯越橘(*Vaccinium uliginosum* L.) 优系 SL-1 试管苗为试验材料,研究不同浓度 NAA、6-BA 对笃斯越橘优系 SL-1 叶片、茎段的出愈率、出愈量、再生率、平均出芽苗数的影响以及培养基中添加 IBA、浸蘸 IBA 溶液 2 种方法对笃斯越橘优系 SL-1 生根的影响。结果表明:当 NAA 为 0.8 mg/L、6-BA 为 4 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 叶片出愈率最高,达 100%,出愈量最多;当 NAA 为 0.2 mg/L、6-BA 为 4 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 叶片愈伤再生分化效果最好,分化率达 66.7%,平均再生分化苗数可达 5.765 株。当 IBA 浓度为 300 mg/L 浸蘸时,笃斯越橘试管苗生根率最高,平均生根条数最多,生根效果最佳。

关键词:笃斯越橘;愈伤组织;诱导分化;生根

中图分类号: S663.904+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0059-03

笃斯越橘(*Vaccinium uliginosum* L.) 属杜鹃科越橘属灌木果树,别称都柿、蓝莓(blueberry)、蓝浆果,果实呈蓝紫色,柔软多汁、风味醇美、营养价值高,具有独特的香味,除含有人体所需的多种维生素、矿物质外,还含有较多的花色素苷、黄酮等生理活性成分,能防治高血压、疏通毛细血管、缓解视力疲劳,被誉为“浆果之王”,被联合国粮农组织列为人类五大健康食品之一。多数学者认为,越橘组培离体快繁试管苗生根困难、生根率低、发根周期长,关于笃斯越橘愈伤组织研究较少^[1-5]。愈伤组织再生不定芽不仅可以扩大不定芽繁殖系数,还可为导入外源基因、保存种质资源奠定基础^[6-9]。本试验以经过多年选育的笃斯越橘优系为试验材料,探讨笃斯越橘愈伤组织诱导及愈伤组织再生的最佳激素,旨在为开发利用笃斯越橘资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2014 年 4 月至 2015 年 3 月在东北农业大学园艺学院进行。试验材料取自黑龙江省农业科学院浆果研究所,为该所经多年选育的笃斯越橘优系 SL-1。选用笃斯越橘优系 SL-1 的叶片与茎段进行愈伤组织的诱导分化,选用株高 3 cm 左右、健壮无根的笃斯越橘优系 SL-1 试管苗进行生根培养。

1.2 方法

1.2.1 不同浓度 NAA 对笃斯越橘优系 SL-1 愈伤诱导及再生的影响 选择生长良好的植株,将叶片切成约 0.5 cm² 的小块,用解剖刀尖在叶片上扎 10 个孔。将茎段切成长 1 cm 的

小段,用解剖刀在茎段上割 3 条伤口。在 WPM + 30 g/L 蔗糖 + 7.5 g/L 琼脂 + 4 mg/L 6-BA 培养基上进行培养,pH 值 5.3,在人工自然培养箱中 24 h 黑暗处理 1 周,培养温度为 25 ℃,湿度为 60%,然后移入温度 25 ℃,光照度 2 000 lx,光照周期 12 h/d 的培养室内进行培养。NAA 浓度设 0、0.2、0.4、0.8 mg/L 4 个处理,每处理 5 瓶,每瓶 6 个外植体,重复 3 次。接种 30 d 后调查笃斯越橘优系 SL-1 出愈率、出愈量及愈伤的颜色、生长状态;50 d 后调查笃斯越橘优系 SL-1 再生率、平均出芽苗数及再生苗的生长状态。

1.2.2 不同浓度 IBA 激素对笃斯越橘优系 SL-1 生根的影响 以单芽为外植体,先后经过营养生长、培养基增殖培养后,接种到壮苗培养基上培养 30 d,然后再接到生根培养基上。均采用 1/2 大量 WPM 培养基,附加蔗糖 20 g/L,琼脂 8 g/L,pH 值 5.3,在温度(25 ± 2) ℃,光照度 2 500 lx,光照周期 12 h/d 的培养室内进行培养。研究不同浓度 IBA 对笃斯越橘优系 SL-1 生根培养的影响时,培养基中 IBA 设 4 种浓度,分别为 0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L。浸蘸液中 IBA 分别设 50、150、300、500、700 mg/L 5 个浓度,将笃斯越橘优系 SL-1 试管苗基部 1 cm 浸蘸在不同浓度 IBA 溶液中,10 s 后接种在培养基上,每处理重复 3 次,每个重复 10 瓶,每瓶 5 个外植体,接种 30 d 后调查生根情况,统计不同 IBA 浓度浸蘸下笃斯越橘优系 SL-1 生根率、平均生根条数。出愈率、再生率、平均出芽苗数、生根率、平均生根条数计算公式如下:

出愈率 = 形成愈伤组织的外植体数/接种外植体数 × 100%; (1)

再生率 = 再生不定芽的愈伤组织数/接种的愈伤组织数 × 100%; (2)

平均出芽苗数 = 再生不定芽总数/再生不定芽的愈伤组织数; (3)

生根率 = 生根的植株数/接种的植株数 × 100%; (4)

平均生根条数 = 生根总数/生根植株数。 (5)

1.2.3 数据处理 采用 Excel、SPSS 软件处理数据。

收稿日期:2014-12-09

基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项(编号:201103037)。

作者简介:王振武(1986—),男,硕士,研究方向为小浆果种质资源利用。E-mail:960619600@qq.com。

通信作者:代志国,副教授,硕士生导师,研究方向为小浆果种质资源利用。E-mail:daizhiguoneau@126.com。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 NAA 对笃斯越橘优系 SL-1 愈伤诱导及再生的影响

2.1.1 不同浓度 NAA 对笃斯越橘优系 SL-1 愈伤诱导的影响 叶片在愈伤诱导培养基中经过培养,10 d 后叶片所有伤口处开始形成黄白色颗粒状的愈伤,叶片变得褶皱,叶片长大。由表 1 可知,30 d 后,4 mg/L 6-BA 与 0.8 mg/L NAA 激素配比时,出愈率达 100%,出愈量最多,但伴随有褐化现象,愈伤呈绿色、紧实。由表 2 可知,当 NAA 浓度为 0.8 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 愈伤再生分化能力不高;当不加入 NAA 时,不能诱导出愈伤,接种的外植体叶片死亡。叶片在愈伤诱导培养基中培养 10 d 后,茎段所有伤口处形成愈伤很少,茎段变得粗壮、呈绿色透明状。由表 1 可以看出,30 d 后,4 mg/L 6-BA 与 0.8 mg/L NAA 激素配比时,出愈率最高,达 (86.7±3.3)%,出愈量也最多,但伴有褐化现象,愈伤呈绿色、紧实;当不加入 NAA 时,不能诱导出愈伤,接种的外植体茎段死亡。综上所述,当 NAA 浓度为 0.8 mg/L、6-BA 为 4 mg/L 时笃斯越橘优系 SL-1 叶片、茎段愈伤诱导效果均达到最好,且叶片诱导效果优于茎段。

表 1 不同浓度 NAA 对笃斯越橘优系 SL-1 愈伤诱导影响				
外植体	NAA 浓度 (mg/L)	出愈率 (%)	出愈量	愈伤颜色及状态
叶片	0.0	0d	无	叶片干枯死亡
	0.2	90.0±3.0c	+	黄绿色,质地紧实
	0.4	95.5±3.8b	+++	部分褐化,黄绿色,质地紧实
	0.8	100.0±0.0a	+++	部分褐化,绿色,质地硬
茎段	0.0	0c	无	茎段干枯死亡
	0.2	43.3±7.7b	+	部分褐化,绿色,质地紧实
	0.4	54.2±4.7b	+	部分褐化,黄绿色,质地紧实
	0.8	86.7±3.3a	++	部分褐化,绿色,质地硬

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。“+”表示愈伤组织发生量在 0.4 g 左右;“+”越多,表示愈伤组织发生量越多。下表同。

2.1.2 不同浓度 NAA 对笃斯越橘优系 SL-1 愈伤再生的影响 笃斯越橘优系 SL-1 外植体培养 30 d 后,在叶片的愈伤表面有嫩绿色小不定芽形成。由表 2 可以看出,4 mg/L

6-BA 与 0.2 mg/L NAA 激素配比时,笃斯越橘叶片分化率为 (66.7±1.6)%,平均出芽苗数为 (5.765±0.45) 株,再生苗生长速度快、健壮;当 NAA 浓度为 0 mg/L 时,外植体死亡;当 NAA 浓度为 0.8 mg/L 时,再生率低,平均出芽苗数少。笃斯越橘优系 SL-1 外植体培养 40 d 后,在茎段的愈伤表面有少量嫩绿色小不定芽形成。由表 2 可以看出,4 mg/L 6-BA 与 0.2 mg/L NAA 激素配比时,笃斯越橘叶片再生率、平均分化苗数与其他处理均差异显著,再生苗呈嫩绿色,生长速度快。当 NAA 浓度为 0 mg/L 时,外植体干枯死亡;当 NAA 浓度为 0.8 mg/L 时,再生率低,平均出芽苗数少。综上所述,当 NAA 浓度为 0.2 mg/L、6-BA 为 4 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 叶片、茎段愈伤再生分化效果均达到最好,且叶片再生分化效果优于茎段。

表 2 不同浓度 NAA 对笃斯越橘优系 SL-1 愈伤再生的影响				
外植体	NAA 浓度 (mg/L)	再生率 (%)	平均出芽苗数 (株)	生长状态
叶片	0.0	0d	0d	叶片外植体死亡
	0.2	66.7±1.6a	5.765±0.45a	苗粗壮,嫩绿色,生长快
	0.4	33.3±1.7b	3.250±0.75b	苗粗壮,绿色,生长快
	0.8	12.5±1.4c	1.111±0.11c	苗弱,浓绿,生长慢
茎段	0.0	0d	0d	茎段外植体干枯死亡
	0.2	54.2±1.8a	3.231±0.02a	苗弱,绿叶片色,生长快
	0.4	25.0±3.0b	1.125±0.13b	苗弱,叶片发黄,生长快
	0.8	16.7±1.7c	1.000±0.0c	苗弱,叶片发黄,生长慢

2.2 培养基中不同浓度 IBA 对笃斯越橘优系 SL-1 茎段生根的影响

由表 3 可知,当 IBA 浓度为 2.0 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 茎段生根率为 (68.0±2.0)%,平均生根条数为 (3.471±0.029) 条,试管苗壮,有少量愈伤,生根快、分枝多,生根效果最好,与其他处理差异显著。当 IBA 浓度为 0.5 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 茎段生根率为 (12.5±0.5)%,平均生根条数为 (1.177±0.66) 条,生根效果差,生根率低,生根慢、短、细,无分枝。当 IBA 浓度为 1.0、3.0 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 茎段生根效果相似,苗健壮,有愈伤生成,生根快、长、壮,分枝少。综上所述,IBA 浓度为 2.0 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 茎段生根效果最好。

表 3 不同浓度 IBA 对笃斯越橘优系 SL-1 生根的影响				
IBA 浓度 (mg/L)	生根率 (%)	平均生根条数 (条)	苗生长状态	
0.5	12.5±0.5d	1.177±0.66c	苗健壮,生根慢、短、弱,无分枝	
1.0	38.0±2.0c	2.111±0.089b	苗健壮,有愈伤生成,生根快、长、粗壮,分枝少	
2.0	68.0±2.0a	3.471±0.029a	苗健壮,有愈伤生成,生根快、长、粗壮,分枝多	
3.0	44.1±1.1b	2.211±0.081b	苗健壮,有较多愈伤生成,生根快、长、弱,有分枝	

2.3 不同浓度 IBA 浸蘸对笃斯越橘优系 SL-1 生根的影响

以 WPM 为培养基,将笃斯越橘试管苗基部在不同浓度 IBA 溶液中浸蘸,接种在培养基中,观察不同浓度 IBA 对笃斯越橘生根的影响(表 4)。茎段在 IBA 中浸蘸,可以促进笃斯越橘生根,在浓度为 150、300、500 mg/L IBA 溶液中浸蘸的试管苗,1 周左右即可观察到根生成,首先发根的部位是叶腋

处,根迅速向下生长,进入培养基中,30 d 后生根最多,根系生长迅速,产生许多分枝。由表 4 可知,随着 IBA 浓度的增加,笃斯越橘试管苗生根率、平均生根条数逐渐增加。当 IBA 浓度为 300 mg/L 时,生根率最高,生根率达 100%,平均生根条数多,生根效果最好。当 IBA 浓度为 500 mg/L 时,叶片变黄烧苗。当 IBA 浓度为 700 mg/L 时,叶片变黄烧苗现象更严

重,且生根率及平均生根条数下降。综上所述:当 IBA 浓度为 300 mg/L 时,笃斯越橘试管苗生根率最高,平均生根条数最多,生根效果最佳。采用浸蘸方法,笃斯越橘试管苗的生根

率、平均生根条数以及苗和根的生长状态优于直接在培养基中添加 IBA。

表 4 不同浓度 IBA 浸蘸对笃斯越橘优系 SL-1 生根的影响

IBA 浓度 (mg/L)	生根率 (%)	平均生根条数 (条)	苗生长状态
50	43.0 ± 5.0d	3.167 ± 1.067d	苗绿色,生根慢、短、弱,分枝少
150	68.0 ± 6.0c	5.333 ± 1.120cd	苗绿色,生根快、长、壮,有分枝
300	100.0 ± 0a	12.667 ± 3.036a	苗绿色,生根快、长、壮,有分枝
500	96.0 ± 4.0a	8.350 ± 0.850b	苗部分叶片变黄色,生根快、长、壮,有分枝
700	86.0 ± 4.0b	6.333 ± 0.333bc	苗部分叶片变黄色,生根快、长、壮,有分枝

3 结论与讨论

李亚东^[10]、刘庆忠等^[11]研究表明:培养物愈伤组织的产生与 6-BA 浓度成正比,高浓度的 6-BA 可以直接从茎、叶上诱导出愈伤组织,由愈伤组织形成不定芽。本研究结果表明,随着 NAA 浓度的增加,笃斯越橘优系 SL-1 愈伤诱导效果越好,当 NAA 为 0.8 mg/L、6-BA 为 4 mg/L 时,愈伤诱导率最好,其中叶片诱导效果更好。随着 NAA 浓度升高,笃斯越橘优系 SL-1 愈伤组织再生分化能力先提高后降低,当 NAA 为 0.2 mg/L、6-BA 为 4 mg/L 时,愈伤再生分化效果最好,其中叶片再生效果更好。本试验采用 2 种生根方法:一种是在培养基中直接添加 IBA,生根速度慢,易形成愈伤组织,生出的根纤细,形成的分叉少;另一种是将试管苗基部在 IBA 溶液中浸蘸 10 s,1 周后可看到接种的试管苗叶腋处长出淡黄色、半透明状的根尖,10 d 后,根迅速伸长,形成很多分枝根。本试验结果表明,当 IBA 浓度为 300 mg/L 时,笃斯越橘试管苗生根率最高,平均生根条数最多,生根效果最佳,这与韩德伟的研究结论^[12]相同。浸蘸 IBA 最佳浓度为 300 mg/L,当 IBA 浓度为 500 mg/L 时有烧苗现象,700 mg/L 时烧苗严重,由于 IBA 浓度过高,导致植物水分不停向外界渗透,试管苗失水,细胞壁可塑性过强,难以进行一系列生理反应,导致试管苗叶片发黄甚至死亡。本试验结果表明,当 NAA 为 0.8 mg/L、6-BA 为 4 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 叶片出愈率最高,达 100%,出愈量最多;当 NAA 为 0.2 mg/L、6-BA 为 4 mg/L 时,笃斯越橘优系 SL-1 叶片愈伤再生分化效果最好,分化率达 66.7%,平均再生分化苗数可达 5.765 株。当浸蘸 IBA 浓度为 300 mg/L 时,笃斯越橘试管苗生根率最高,平均生根条

数最多,生根效果最佳。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 陶建敏,耿其芳,庄智敏,等. 蓝浆果叶片高效再生体系的建立[J]. 西北植物学报,2006,26(3):610-614.
- [3] Dweikat M, Lyrene P M. Adventitious shoot production from leaves of blueberry cultured *in vitro* [J]. HortScience, 1998, 23: 629.
- [4] Rowland L J, Ogden E L. Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf action of high blueberry [J]. HortScience, 1992, 27(10): 1127-1129.
- [5] 姚平,孙书伟. 蓝莓组织培养瓶内复壮瓶外生根快繁技术[J]. 北方园艺, 2009(4): 161-162.
- [6] 张成覆,吴红,高克利,等. 花叶玉簪组培苗快速生根技术[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 126-127.
- [7] 林桂玉,李美芹,吕金浮,等. 藤本月季紫皇后组织培养技术[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 56-58.
- [8] 李正民,王安石,王健,等. 蝴蝶兰不定芽的组培快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 46-49.
- [9] 余桂红,张旭,孙晓波,等. 大麦苏啤 4 号幼胚愈伤组织的诱导及植株的高频再生[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(5): 953-956.
- [10] 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.
- [11] 刘庆忠,赵红军. 高灌蓝莓的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 253.
- [12] 韩德伟. IBA 对蓝莓组培苗瓶内生根的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 38-40.