

# 兔眼蓝莓愈伤组织的诱导研究

杨通银

贵州神奇药业有限公司, 贵州 贵阳

收稿日期: 2021年10月29日; 录用日期: 2022年1月3日; 发布日期: 2022年1月13日

## 摘要

以兔眼蓝莓茎段为外植体, 以MS和WPM为基本培养基, 通过添加不同配比的6-BA、NAA、ZT植物激素, 探讨外植体愈伤组织的诱导。研究表明: 7月采集的兔眼蓝莓最佳外植体消毒时间为75%酒精10 s、0.1% HgCl<sub>2</sub>为10 min, 其成活率达85.7%。愈伤组织诱导的最佳培养基为WPM + ZT 1.5 mg/L (以上培养基中均加入蔗糖2.0%, 琼脂0.8%, pH值为5.6), 其诱导率高达88.0%。

## 关键词

兔眼蓝莓, 组织培养, 愈伤组织, 植物激素

# Induction Research on *Vaccinium ashei* Callus

Tongyin Yang

Guizhou Shenqi Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang Guizhou

Received: Oct. 29<sup>th</sup>, 2021; accepted: Jan. 3<sup>rd</sup>, 2022; published: Jan. 13<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

Stem segment of *Vaccinium ashei* was used as explants, and MS and WPM as basic media to explore the callus induction of explants by adding 6-BA, NAA and ZT plant hormones of different mixture ratios. The results showed that the optimal disinfection time of *Vaccinium ashei* explants collected in July was 10 seconds of 75% alcohol and 10 minutes of 0.1% HgCl<sub>2</sub>, achieving a survival rate of 85.7%. The optimal medium for callus infection was WPM + ZT 1.5 mg/L (the above media, with a pH of 5.6, were all added with 2.0% of sucrose and 0.8% of agar), and its induction rate was as

high as 88.0%.

## Keywords

*Vaccinium ashei*, Tissue Culture, Callus, Plant Hormone

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 前言

蓝莓(Blueberry)属杜鹃花科越桔属灌木、小浆果,果实呈蓝色,近圆形,单果重 0.5~2.5 克,果肉细腻,种子极小,甜酸适度,且具有清爽的香气,既可鲜食,又可加工成果汁饮料、果酒、糖果、小食品等[1] [2]。原产于美洲,事实上它是少数原产于北美的水果之一。越桔酸类植物(Vaccinium)是所有蓝莓的总称,包含 450 多种不同的品种[3]。这种植物在世界各地自然生长,人们给不同的蓝莓起了许多不同的名字。鉴于实际考虑和商业目的,目前主要集中研究三种不同类型的蓝莓:1) 北方高灌木(Corymbosum), 2) 南方兔眼(Ashei), 3) 矮灌木,也被称作“野生蓝莓”(Angustifolium) [3] [4]。蓝莓果实中含有丰富的营养成分,属高氨基酸、高锌、高钙、高铁、高铜、高维生素的营养保健果品。它不仅具有良好的营养保健作用,还具有防止脑神经老化、强心、抗癌软化血管、增强人机体免疫等功能。其营养价值远高于苹果、葡萄、橘子等水果,VC 含量是苹果的几十倍,堪称“世界水果之王”。是上等的保健食品,风靡欧美各国,备受人们的推崇和喜爱。国际粮农组织将其列为人类五大健康食品之一。世界各地的研究中心都证实:蓝莓可大大减少疾病发生率(抗氧化、抗衰老、可以降低“坏”胆固醇引起的心血管疾病和中风的发病率、预防泌尿道感染还、缓解视力衰退等)。现今,高灌木蓝莓已覆盖美国 38 个州及众多加拿大省份。在南美洲、澳大利亚、新西兰和欧洲,高灌木蓝莓产业也有所发展。据联合国食品和农业组织统计,每年有超过 42,000 吨的蓝莓丰收。尽管美国和加拿大是最大的蓝莓生产商,拥有最大的蓝莓消费市场,但是世界其他各地的蓝莓市场也在迅速崛起,特别是日本,它已经成为一个非常喜欢蓝莓的国家。在我国引进比较晚,由于市场前景可观,在我国蓝莓也迅速地发展,但相关的研究资料报道还比较少,大规模生产还很少,目前我国仅贵州、江苏等地有种植[3]。一些大公司也把眼光迅速地放到蓝莓的市场上来,比如蒙牛集团新推出的蓝莓味酸酸乳、雀巢公司开发研究的活力蓝莓、康师傅的果香蓝莓甜酥夹心、光明乳业的蓝莓味——光明心的酸奶伴、家乐福超市的蓝莓味酸牛奶等[5]。

植物组织培养也叫离体培养,是指在无菌条件下,将离体的植物器官(如根、茎、叶、茎尖、花果等)、组织(如形成层、表皮、皮层、髓部细胞、胚、胚芽等)、细胞(如大孢子、小孢子及体细胞)以及原生质体,培养在人工控制的环境里,使其再生形成完整的植株。Schwann 和 Schleiden 创立细胞学说后,1902 年英国人 Steward 在美国将胡萝卜髓细胞培养成一个完整的植株,到 20 世纪 70 年代植物组织培养迅速发展,在快速繁殖、脱毒技术等方面都取得很大成功,目前由于蓝莓刚刚被引进,市场可观。所以蓝莓苗的市场需求大,而传统的种子和扦插繁殖法繁殖率低,时间长,还可能退化。植物组织培养与快速繁殖技术可以快速、高效地进行植物的繁殖[6] [7] [8]。20 世纪以来,组织培养与快速繁殖技术已经广泛应用于各种植物,但是有关蓝莓的组织培养与快速繁殖技术公开报道的尚少,本研究利用组织培养的方法,研究蓝莓的快速繁殖技术以提高兔眼蓝莓的繁殖率,这为我国快速发展蓝莓产业提供了一定的参考[9]。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

蓝莓的茎段，实验材料来源于贵州麻江县，采集时间是7月份。

以WPM为基本培养基，附加ZT激素，培养室温度为 $25^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$ ，光照强度1000~2000 lx，光照时间12 h/d。

### 2.2. 实验步骤

从健壮的蓝莓植株上切取茎尖为外植体，自来水冲洗1~2 h后，洗洁净清洗，自来水冲洗后，蒸馏水清洗外植体，先用75%酒精浸泡消毒(见表1)，再用0.1%升汞浸泡(见表2)，然后无菌水冲洗5~6次。剪取茎尖(0.5~1 cm)接种到培养基上。

**Table 1.** Effect of 75% alcohol on stem segment pollution of blueberry in rabbit eyes

**表 1.** 75%酒精对兔眼蓝莓茎段污染的影响

75%酒精(s)	0.1%升汞(min)	接种数(株)	污染率(%)	成活率(%)
5	15	35	57.1	42.9
10	15	35	22.9	65.7
15	15	35	8.6	62.8
20	15	35	0	39.4
25	15	35	0	31.2
30	15	35	3.1	21.9

**Table 2.** Effect of 0.1%  $\text{HgCl}_2$  on pollution of rabbit eye blueberry stem

**表 2.** 0.1%  $\text{HgCl}_2$  对兔眼蓝莓茎段污染的影响

75%酒精(s)	0.1%升汞(min)	接种数(株)	污染率(%)	成活率(%)
10	4	30	66.7	31.0
10	7	35	42.8	54.3
10	10	35	5.7	85.7
10	13	33	3.0	51.5
10	16	31	0	35.5
10	9	32	0	21.9

### 2.3. 培养条件

所选用的培养基为MS和WPM，按不同处理方案，添加不同类型和浓度的生长素NAA和细胞分裂素6-BA、ZT。用0.1 mol/L NaOH和0.1 mol/L HCl调节pH值为5.6，高温高压( $121^{\circ}\text{C}$ 、0.1~0.15 MPa)灭菌25 min。接种后置于培养室培养，温度为 $25^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$ 摄氏度，光照强度为1000~2000 lx，光照时间为12 h/d [10] [11]。

### 2.4. 愈伤组织培养

将外植体茎段(0.5~1 cm)接种在附加一定激素配比的培养基上进行愈伤组织诱导。

### 3. 实验结果

#### 3.1. 75%酒精处理时间对兔眼蓝莓茎段污染的影响

外植体消毒是组织培养中很重要的一个环节,75%酒精是外植体消毒常用的一种消毒剂,下表是75%酒精不同消毒时间对兔眼蓝莓污染的影响作了单因子实验。结果表明:75%酒精消毒时间太短,污染太严重,消毒时间太长,虽然污染率小,但是外植体死亡率也高,所以,7月份采集的兔眼蓝莓外植体75%酒精最佳消毒时间为10s时外植体的成活率最高为65.7%。

#### 3.2. 0.1% HgCl<sub>2</sub> 不同处理时间对兔眼蓝莓茎段污染的影响

0.1% HgCl<sub>2</sub>是组织培养外植体消毒中最常用的一种消毒剂,前面利用单因子实验以确定75%酒精消毒最佳时间为10s。确定酒精消毒时间后,改变HgCl<sub>2</sub>的消毒时间。从下表可以看出,75%酒精消毒10s,0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒为10min是7月采集的兔眼蓝莓茎段最佳消毒时间,成活率达到85.7%。

#### 3.3. 愈伤组织的诱导

##### 3.3.1. MS 为基本培养基的诱导

通过不同配比的激素诱导(表3)表明,兔眼蓝莓茎段在MS为基本的培养基,添加生长素NAA和细胞分裂素6-BA的情况下,在激素浓度相对宽的范围内都能诱导出愈伤组织[12]。但是不同配比的激素浓度对其诱导率和愈伤组织生长情况都有显著的差异。由表3中1~12号可以看出6-BA和NAA的比例为15:1时,即:MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L诱导的愈伤组织相对比较高。随着NAA的浓度增大,兔眼蓝莓的茎段愈伤组织诱导率减少,长势变差。6-BA在1.5 mg/L时,兔眼蓝莓的茎段愈伤组织诱导率高,当6-BA大于或小于1.5 mg/L时,其诱导率相对较底,长势也相对较差。

Table 3. Callus induction

表3. 愈伤组织的诱导

编号	基本培养基	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	ZT (mg/L)	接种数(个)	愈伤组织数(个)	出愈率(%)
1	MS	0.1	1.0	0	25	1	4.0
2	MS	0.1	1.5	0	30	10	33.3
3	MS	0.1	2.0	0	30	4	13.3
4	MS	0.1	2.5	0	27	1	3.7
5	MS	0.3	1.0	0	26	0	0
6	MS	0.3	1.5	0	28	1	3.6
7	MS	0.3	2.0	0	28	3	10.7
8	MS	0.3	2.5	0	27	2	7.4
9	MS	0.5	1.0	0	27	0	0
10	MS	0.5	1.5	0	27	0	0
11	MS	0.5	2.0	0	25	1	4
12	MS	0.5	2.5	0	30	2	6.7
13	MS	0	0	0.5	27	10	37
14	MS	0	0	1.0	27	15	55.6
15	MS	0	0	1.5	25	22	88
16	MS	0	0	2.0	28	20	71.4
17	MS	0	0	2.5	26	18	69.2

### 3.3.2. WPM 为基本培养基的诱导

愈伤组织诱导培养基上接种兔眼蓝莓的茎段接种 30 d 左右, 在茎段伤口处出现小白色颗粒状愈伤组织[13]。随时间增加, 愈伤组织不断增多、加厚(达高 0.3 cm, 直径 0.8 cm)形成愈伤组织团, 40 d 后, 整个兔眼蓝莓的茎段全部被愈伤组织包裹, 颜色由最初伤口处的白色细胞小颗粒变为淡黄色愈伤组织团, 再变成浅绿色组织团(如图 1)。以 WPM 为基本培养基, ZT 偏离 1.5 mg/L 时, 诱导率也相应减少, 由表 3 中 13~17 号可知, ZT 大于 1.5 mg/L 比 ZT 小于 1.5 mg/L 时诱导率的变化相对偏慢, 但总体来说比 MS 为基本培养基时诱导率高。因此, WPM + ZT 1.5 mg/L 是兔眼蓝莓愈伤组织诱导的最佳培养基, 在此激素配比的培养基上, 茎段愈伤组织出愈率高达 88.0%, 并且愈伤组织生长良好(如图 2)。



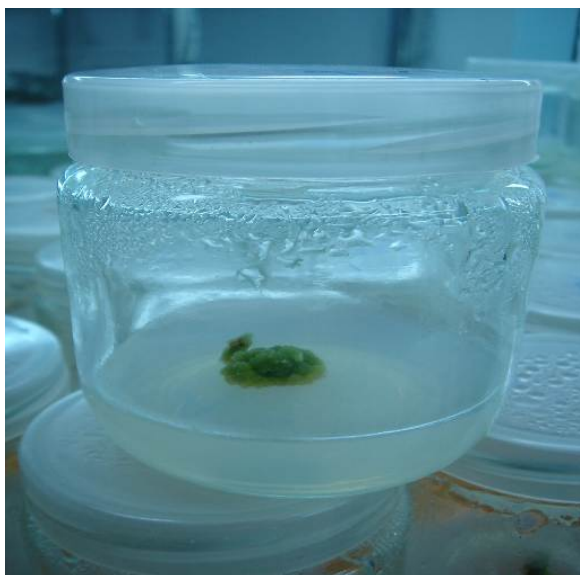
Figure 1. Increment of blueberry callus  
图 1. 蓝莓愈伤组织的增值



Figure 2. Subculture of blueberry callus  
图 2. 蓝莓愈伤组织的继代培养

### 3.3.3. 愈伤组织的继代培养

兔眼蓝莓茎段诱导出愈伤组织后, 取愈伤组织于含有 WPM + ZT 1.5 mg/L 固体培养基上进行继代培养, 愈伤组织细胞团增大。一个月后, 愈伤组织积累量几乎不再增加, 愈伤组织团颜色也发生变化, 由原来的浅黄色变成浅绿色(如图 3)。



**Figure 3.** Callus induced from stem segments of blueberry  
**图 3.** 蓝莓的茎段诱导的愈伤组织

#### 4. 讨论

在组织培养中，无菌材料的获得是植物组织培养取得成功的前提条件，因此，对兔眼蓝莓茎段进行杀菌处理是工作中的重要环节之一。为了彻底对外植体进行消毒，应当正确地选择消毒剂、消毒时间。本文选择了 75% 的酒精和 0.1%  $\text{HgCl}_2$  作为消毒剂，75% 的酒精是最常用的一种消毒剂，从表 1 中可以看出，当 0.1%  $\text{HgCl}_2$  的消毒时间一定时，酒精的消毒时间在 10 s 时效果最好，外植体的成活率最高。酒精消毒时间太短，消毒不彻底，外植体污染太大，酒精消毒时间太长，虽然外植体污染率降低，甚至为零，但死亡率太高。实验研究结果表明：兔眼蓝莓的茎段在 75% 酒精消毒 10 s、 $\text{HgCl}_2$  的消毒时间为 10 min 时兔眼蓝莓的成活率最佳。



**Figure 4.** Aseptic seedlings induced by stem segments of blueberry  
**图 4.** 蓝莓的茎段诱导的无菌苗



外植体的采集时间也对外植体的成活率起关键作用,不同的采集时间外植体生长情况不一样,因此,对其处理也不一样。一般生长季节比休眠时期的茎尖消毒较容易。且生长季节的外植体对诱导的反应可能比休眠时期的快,较容易成活。

选择合适的培养基、合适的激素和激素配比是组织培养的关键步骤。植物组织培养的成功与否,除了培养材料本身的因素外,很大程度上取决于培养基的选择。培养基的种类、成分等直接影响培养材料的生长发育。首先选用最常用的 MS 为基本培养基,但结果不太理想。后来又根据常用的木本培养基和蓝莓喜酸性土壤生长,据一些资料报道,选择了 WPM 作为基本培养基。WPM 的 PH 值 5.6,且属于木本植物的理想培养基。结果表明,WPM 培养基比 MS 培养基更好地诱导兔眼蓝莓的愈伤组织(见表 3)。此外,植物激素对愈伤组织的诱导及分化具有重要的影响。在通常条件下生长素和细胞分裂素对诱导和保持愈伤组织的高速生长是必要的,特别是当生长素和细胞分裂素配合使用时,能有效地诱导愈伤组织的形成。在 MS 中选用了 6-BA 和 NAA,在一定的范围内,能诱导兔眼蓝莓愈伤组织,但诱导率并不很好。在 WPM 中选用了 ZT 作为细胞分裂素直接诱导愈伤组织,诱导率很高,当 ZT 浓度达到 1.5 mg/L 时,诱导率达最高,即:WPM + ZT 1.5 mg/L 是兔眼蓝莓愈伤组织诱导的最佳培养基(如图 4)。

### 参考文献

- [1] 刘庆忠,赵红军. 高灌蓝莓的组织培养及快速繁殖[J]. 生理学通讯, 2002, 38(3): 253.
- [2] 马艳萍. 蓝莓的生物学特性、栽培技术与营养保健功能[J]. 中国水土保持, 2006(2): 47-49.
- [3] 王侠礼,钟士传,郑亚琴,等. 美国高罐蓝莓的引进及微体快繁技术研究[J]. 中国种业, 2003(12): 40-41.
- [4] 黄文江,刘庆忠,阚显照. 高罐蓝莓离体繁殖的研究[J]. 陕西师范大学学报, 2004, 27(3): 314-315.
- [5] 韩素菊,陈光登,黎云祥,等. 活血丹组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 广西植物, 2007, 27(2): 265-271.
- [6] 张东方. 植物组织培养技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2004.
- [7] 潘瑞织. 植物组织培养[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2001.
- [8] 李江,马正炳,孙仲序,等. 植物组织培养的简化[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 152-158.
- [9] 徐宝安. 蓝莓及其市场开发前景[J]. 特种经济动植物(果树园), 2005, 8(12): 28.
- [10] 张红晓,经剑颖. 木本植物组织培养技术研究进展[J]. 河南科技大学学报, 2003(3): 51-55.
- [11] 刘庆忠,等. 莓微体繁殖技术研究初报[J]. 落叶果树, 2001(5): 1-3.
- [12] 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.
- [13] 周毅,张宇斌. 香石竹组织培养的研究[J]. 学生科研论文集, 2001(1): 57-60.