



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106613939 B

(45)授权公告日 2018.11.27

(21)申请号 201610867326.3

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2016.09.30

C12N 5/00(2006.01)

A01H 4/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106613939 A

审查员 冀敏

(43)申请公布日 2017.05.10

(73)专利权人 温州科技职业学院

地址 325026 浙江省温州市瓯海区东方南路38号温州市国家大学科技园孵化器

专利权人 温州市农业科学研究院

(72)发明人 余宏傲 王法格 叶朝军 金微微 康华靖

(74)专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司 33212

代理人 周世骏

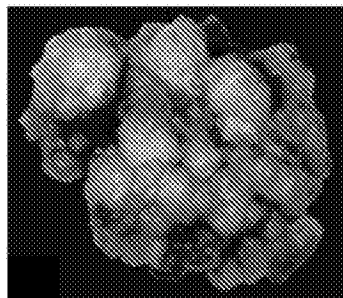
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

用于高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养基及培养方法

(57)摘要

本发明涉及植物的组织培养领域,旨在提供一种用于高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养基及培养方法。该方法包括:配制四种培养基;在无菌操作条件下,取高丛蓝莓无菌试管苗带叶柄的茎段;进行愈伤组织低温弱光液体浅层培养后,进行蓝莓胚性愈伤组织半凝固培养基低温、黑暗分化增殖培养;蓝莓胚状体固体培养基全光、常温分化成苗培养后,再进行蓝莓生根苗培养。本发明降低了愈伤组织诱导过程中的非胚性愈伤组织的增殖速度,减少了高温和长期不继代引起的褐变风险。采用的四种细胞分裂素低浓度配合使用,较好的维持了胚性愈伤组织的愈伤组织状态,有利于其在诱导成功后的增殖;生根苗不粘有培养基和其他基质,移栽效率较高,显著降低了人工成本。



1. 一种高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养方法,其特征在于,包括下述步骤:

(1)按下述配方配制用于高丛蓝莓体细胞胚间接再生中不同培养阶段的培养基;

(1.1)高丛蓝莓愈伤组织碳饥饿液体诱导培养基:在改良 1/2MS 基本培养基中添加ZT 0.5-1.0mg/L、TDZO.1-0.25mg/L、2-ip 0.25mg/L和CPPU 0.75mg/L,继续添加蔗糖 5-10 g/L,不加琼脂,调节pH为5.0;

(1.2)高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基:在改良1/2MS基本培养基中添加ZT 1mg/L、TDZO.2mg/L、2-ip 0.5mg/L和CPPU 1.5mg/L,继续添加蔗糖30g/L,琼脂 3-5g/L,调节pH 为 5.0;

(1.3)高丛蓝莓体细胞胚的成熟分化、成苗再生的有机物培养基:在改良1/2MS基本培养基中添加ZT 1-2.0mg/L和IBA 0.1mg/L,继续附加蔗糖20g/L、椰乳100mg/L、AC 0.5g/L、琼脂 5-7g/L,调节pH 为 5.0;

(1.4)高丛蓝莓分化苗的生根培养基:在改良1/6 MS 基本培养基中添加IBA 1.0mg/L、蔗糖3.5g/L、AC 0.5g/L,不加琼脂,调节pH为5.0;

(2)选材与处理:

在无菌操作条件下,取增殖旺盛的高丛蓝莓无菌试管苗,将其上部幼嫩部分剪切成长度为1cm、带叶柄的茎段;

(3)愈伤组织低温弱光液体浅层培养:

将所述高丛蓝莓愈伤组织碳饥饿液体诱导培养基分装到200ml的三角瓶中,每瓶10ml,以塑料透气膜扎口,作为液体浅层培养基;在无菌操作条件下,将10株幼嫩部分的茎段接入液体浅层培养基,在温度  $18 \pm 2$  °C、光照强度  $1000 \pm 100$  lx,光照时间 12 h/d的条件下连续培养3个月;培养材料不进行继代转接,经培养生成愈伤组织材料;

(4)蓝莓胚性愈伤组织半凝固培养基低温、黑暗分化增殖培养:

将所述高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基分装到9×9cm的培养皿中,在无菌操作条件下,将步骤(3)中获得的愈伤组织材料切割分离,并挑选呈现黄绿色的愈伤组织;剔除残存的茎段、出芽以及褐变的部分,接种于高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基;继续在温度  $18 \pm 2$  °C,全黑暗条件下培养3个月,每3周继代一次,每次继代继续挑选呈现黄绿色、松散、易碎的愈伤组织继续继代培养,获得胚性愈伤组织,用于继续继代增殖;

(5)蓝莓胚状体固体培养基全光、常温分化成苗培养:

将所述高丛蓝莓体细胞胚的成熟分化、成苗再生的有机物培养基分装于容量为200ml以上的三角瓶中,挑选步骤(4)中获得的增殖旺盛、组织质地松散且未褐变的胚性愈伤组织,接种于有机物培养基中;在温度  $25 \pm 1$  °C、光照强度  $2000 \pm 100$  lx的条件下培养3个月,每4周继代一次,每次挑选分化出芽部分与愈伤分开继代接种,获得长度和粗度符合预期的蓝莓芽苗;

(6)蓝莓生根苗培养:

取12×12cm培养皿,在底部先垫入脱脂棉,然后覆盖大小相近的滤纸;将高丛蓝莓分化苗的生根培养基分装于培养皿中,分装量以浸湿脱脂棉和滤纸为准;剪取健壮的蓝莓芽苗置于培养皿中,每个培养皿接种15株;在温度  $25 \pm 1$  °C的条件下,黑暗培养7天;再置于光照强度  $2000 \pm 100$  lx条件下,培养21天,获得蓝莓生根苗;

所述改良1/2MS 基本培养基的具体配方为:

大量元素:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  825 mg/L,  $\text{KNO}_3$  950 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  220 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  185 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85 mg/L;

微量元素:  $\text{KI}$  0.83 mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3 mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6 mg/L,  $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25 mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8 mg/L,  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.3 mg/L;

有机成分: 肌醇 100 mg/L, 烟酸 0.5 mg/L, 盐酸吡哆醇 0.5 mg/L, 盐酸硫胺素 0.5 mg/L, 甘氨酸 2 mg/L ;

所述改良1/6 MS 基本培养基的具体配方为:

大量元素:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  275 mg/L,  $\text{KNO}_3$  317 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  73 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  62mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  28.3 mg/L;

微量元素:  $\text{KI}$  0.83 mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3 mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6 mg/L,  $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25 mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8 mg/L,  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.3 mg/L;

有机成分: 肌醇 20 mg/L, 烟酸 0.1mg/L, 盐酸吡哆醇 0.1 mg/L, 盐酸硫胺素0.1mg/L, 甘氨酸 0.4 mg/L。

## 用于高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养基及培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及蓝莓的胚性愈伤组织的高频诱导、增殖及体细胞胚分化成苗方法,属于植物的组织培养领域。

### 背景技术

[0002] 愈伤组织是一团脱分化后的细胞,经过细胞分裂,产生无组织结构,无明显极性的、松散的细胞团。根据组织学观察、外观特征及其再生性、再生方式等,愈伤组织分成两大类:胚性愈伤组织(embryonic callus, EC)和非胚性愈伤组织(non-embryonic callus, NEC,如图1)。一般胚性愈伤组织质地较坚实,颜色有乳白色或黄色,表面具球形颗粒,其生长缓慢;从细胞学来看,胚性愈伤组织由等直径细胞组成,细胞较小,原生质浓厚,无液泡,常富含淀粉粒,核大,分裂活性强。胚性愈伤组织又可分为致密型胚性愈伤组织和易碎型胚性愈伤组织(如图4)。胚性愈伤组织具有以下特性:高度的胚性或再分化能力,能再生植株;分散性好,容易散碎,便于建立优良的悬浮系或分离原生质体;旺盛的自我增殖能力,可以制作人工种子作为种苗快繁的新途径;经过长期继代保存而不丧失胚性,可进行各种遗传操作。

[0003] 植物组织培养技术中植物体细胞的再生分为直接再生和间接再生,直接再生一般经由外植体直接诱导胚状体再成苗的方法,胚状体保持时间短,不可以进行继代和增殖,无法进行遗传转化、辐射诱变等操作。间接再生一般经历外植体(或种子、胚)---愈伤组织---胚性愈伤组织---体细胞胚---分化成苗等阶段。间接再生的胚性愈伤组织可进行继代增殖,在合适培养基和继代条件下可一直保持其愈伤组织状态,是进行遗传转化、细胞培养、辐射诱变及制作人工种子等操作必须的试验材料。果树作为木本植物现有技术大多采用胚性预决定的组织(如种子、胚乳、花粉等)诱导胚性愈伤组织的产生,而利用胚性重决定的组织(如叶片、茎段、根等)诱导胚性愈伤组织较难实现,但胚性重决定的组织材料易取得,可选择具有优良品种特性的材料,因此育种上更具有意义。

[0004] 蓝莓果实的保健价值、经济价值在水果中属于佼佼者,其花青苷含量是其他水果的很多倍,因此是一种世界公认的具有很强保健功能的珍贵果品资源。最新资料显示,目前蓝莓已跃居全世界浆果栽培面积和产量第二位,因此发展蓝莓产业具有很高的经济价值和开发前景。我国蓝莓产业化栽培始于本世纪初,现有的品种资源均引自国外,多数品种国内栽培在适应性、丰产性、品质等方面表现较差,开发具有自主知识产权的新品种,对我国蓝莓产业的可持续发展具有重要意义。

[0005] 中国专利申请《一种蓝莓胚状体的诱导方法》(公开号CN103598093A)中公开了一种培养基:WPM为基础培养基,添加吲哚乙酸IAA0.5-1mg、吲哚丁酸IBA0.5~1mg、玉米素ZT0.1~0.5mg、蔗糖30g和琼脂7g,pH为5.2~5.4;。该申请成功之处在于建立了蓝莓茎尖直接诱导胚状体的方法;但不足之处体现在:未经过愈伤组织脱分化成苗的过程,未能获得可增殖的胚性愈伤组织、未有芽生根的培养基配方,因此在分子育种特别是后续的细胞培养和原生质体培养方面无明显的应用价值。

[0006] 崔广荣等“蓝莓离体叶片胚状体高效发生及其组织学观察”(《激光生物学报》, 2008第17卷,第5期)同样公开了一种培养基:高灌蓝莓叶片胚状体发生及成苗的培养基为WPM+TDZ 0.04mg/L+ZT 0.25~2.0mg/L+蔗糖20~40g/L,而培养基WPM+ZT0.5~1.0mg/L+蔗糖20g/L适合于丛芽继代生长。此配方为蓝莓叶片胚状体的直接发生,而非间接再生,如何利用叶片、茎段等胚性重决定外植体诱导可继代增殖的胚性愈伤组织,有利于进一步进行细胞培养、遗传转化等转基因遗传操作,从细胞层面来说具有更加重要的意义。

[0007] 因此,解决蓝莓的胚性愈伤组织高频再生的难题,对蓝莓产业的可持续发展而言具有重要意义。

## 发明内容

[0008] 本发明要解决的技术问题是,克服现有技术中蓝莓的胚性愈伤组织高频再生的难题,提供一种用于高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养基及培养方法。

[0009] 为解决技术问题,本发明所采取的技术方案为:

[0010] 提供一种用于高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养基,包括用于高丛蓝莓体细胞胚间接再生中不同培养阶段的下述四种培养基:

[0011] (1) 高丛蓝莓愈伤组织碳饥饿液体诱导培养基:在改良1/2MS基本培养基中添加ZT 0.5-1.0mg/L、TDZ0.1-0.25mg/L、2-ip 0.25mg/L和CPPU 0.75mg/L,继续添加蔗糖5-10g/L,不加琼脂,调节pH为5.0;

[0012] (2) 高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基:在改良1/2MS基本培养基中添加ZT 1mg/L、TDZ0.2mg/L、2-ip 0.5mg/L和CPPU 1.5mg/L,继续添加蔗糖30g/L,琼脂3-5g/L,调节pH为5.0;

[0013] (3) 高丛蓝莓体细胞胚的成熟分化、成苗再生的有机物培养基:在改良1/2MS基本培养基中添加ZT 1-2.0mg/L和IBA 0.1mg/L,继续附加蔗糖20g/L、椰乳100mg/L、AC 0.5g/L、琼脂5-7g/L,调节pH为5.0;

[0014] (4) 高丛蓝莓分化苗的生根培养基:在改良1/6MS基本培养基中添加IBA 1.0mg/L、蔗糖3.5g/L、AC 0.5g/L,不加琼脂,调节pH为5.0;

[0015] 所述ZT、TDZ、2-ip、CPPU、IBA、AC分别指:玉米素、噻苯隆、N6-异戊烯基腺嘌呤、氯吡苯脲、吲哚丁酸、活性炭。

[0016] 所述改良1/2MS基本培养基是对MS培养基的配方进行了调整,其中大量元素减半,微量元素和有机物不变;调整后的具体配方为:

[0017] 大量元素:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  825mg/L,  $\text{KNO}_3$  950mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  220mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  185mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85mg/L;

[0018] 微量元素: KI 0.83mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6mg/L,  $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.3mg/L;

[0019] 有机成分:肌醇100mg/L,烟酸0.5mg/L,盐酸吡哆醇0.5mg/L,盐酸硫胺素0.5mg/L,甘氨酸2mg/L;

[0020] 所述改良1/6MS基本培养基是对MS培养基的配方中大量元素进行了调整,其中大量元素减至原配方的1/6,微量元素不变,有机物调整为原配方的1/5;具体配方为:

[0021] 大量元素： $\text{NH}_4\text{NO}_3$  275mg/L,  $\text{KNO}_3$  317mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  73mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  62mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  28.3mg/L;

[0022] 微量元素： $\text{KI}$  0.83mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6mg/L,  $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.3mg/L;

[0023] 有机成分：肌醇20mg/L, 烟酸0.1mg/L, 盐酸吡哆醇0.1mg/L, 盐酸硫胺素0.1mg/L, 甘氨酸0.4mg/L。

[0024] 本发明进一步提供了前述培养基进行高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养方法, 包括下述步骤:

[0025] (1) 按所述配方配制四种培养基;

[0026] (2) 选材与处理:

[0027] 在无菌操作条件下, 取增殖旺盛的高丛蓝莓无菌试管苗, 将其上部幼嫩部分剪切成长度为1cm、带叶柄的茎段;

[0028] (3) 愈伤组织低温弱光液体浅层培养:

[0029] 将所述高丛蓝莓愈伤组织碳饥饿液体诱导培养基分装到200ml的三角瓶中, 每瓶10ml, 以塑料透气膜扎口, 作为液体浅层培养基; 在无菌操作条件下, 将10株幼嫩部分的茎段接入液体浅层培养基, 在温度 $18 \pm 2^\circ\text{C}$ 、光照强度 $1000 \pm 1001\text{x}$ , 光照时间12h/d的条件下连续培养3个月; 培养材料不进行继代转接, 经培养生成愈伤组织材料;

[0030] (4) 蓝莓胚性愈伤组织半凝固培养基低温、黑暗分化增殖培养:

[0031] 将所述高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基分装到 $9 \times 9\text{cm}$ 的培养皿中, 在无菌操作条件下, 将步骤(3)中获得的愈伤组织材料切割分离, 并挑选呈现黄绿色的愈伤组织; 剔除残存的茎段、出芽以及褐变的部分, 接种于高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基; 继续在温度 $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , 全黑暗条件下培养3个月, 每3周继代一次, 每次继代继续挑选呈现黄绿色、松散、易碎的愈伤组织继续继代培养, 获得胚性愈伤组织, 用于继续继代增殖;

[0032] (5) 蓝莓胚状体固体培养基全光、常温分化成苗培养:

[0033] 将所述高丛蓝莓体细胞胚的成熟分化、成苗再生的有机物培养基分装于容量为200ml以上的三角瓶中, 挑选步骤(4)中获得的增殖旺盛、组织质地松散且未褐变的胚性愈伤组织, 接种于有机物培养基中; 在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度 $2000 \pm 1001\text{x}$ 的条件下培养3个月, 每4周继代一次, 每次挑选分化出芽部分与愈伤分开继代接种, 逐渐获得符合预期的具有一定长度和粗度的蓝莓芽苗;

[0034] (6) 蓝莓生根苗培养:

[0035] 取 $12 \times 12\text{cm}$ 培养皿, 在底部先垫入脱脂棉, 然后覆盖大小相近的滤纸; 将高丛蓝莓分化芽苗的生根培养基分装于培养皿中, 分装量以浸湿脱脂棉和滤纸为准; 剪取健壮的蓝莓芽苗置于培养皿中, 每个培养皿接种15株; 在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的条件下, 黑暗培养7天; 再置于光照强度 $2000 \pm 1001\text{x}$ 条件下, 培养21天, 获得蓝莓生根苗。

[0036] 本技术方案采用的愈伤组织初期低温低光照液体培养基诱导、胚性愈伤低温全黑暗半凝固培养基分化和增殖、胚状体常温高光照固体培养基分化成苗、分化苗棉花滤纸桥生根等方法, 成功获得了可持续增殖培养的蓝莓胚性愈伤组织, 目前继续继代20次以上仍

然保持旺盛的增殖能力,系统解决了蓝莓体细胞培养和遗传转化所需的稳定中间体及其增殖问题,同时建立了蓝莓体细胞胚的间接再生完整技术体系。

[0037] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0038] (1) 蓝莓愈伤组织诱导阶段和增殖培养阶段均采用低温培养,降低了愈伤组织诱导过程中的非胚性愈伤组织的增殖速度,减少了高温和长期不继代引起的褐变风险。低温诱导培养有利于胚性细胞的增殖和发育在蓝莓这一树种上得到验证,也值得其他植物材料在诱导胚性愈伤组织时借鉴。

[0039] (2) 采用 $1000 \pm 1001 \times$ 低光照和延长继代培养时间,愈伤组织在低光照和液体培养基水分减少引起的缓慢脱水条件下促使其向胚性愈伤组织转变,又不至于诱导成苗,同时液体培养基减少了长期不继代时有害物质的积累,又保证了养分的供应;

[0040] (3) 激素配比是胚性愈伤组织诱导和增殖的关键,采用的四种细胞分裂素低浓度配合使用,发挥各自作用,较好的维持了胚性愈伤组织的愈伤组织状态,不至于分化成苗,增殖阶段将其浓度适当提高(加倍),更加有利于其在诱导成功后的增殖;

[0041] (4) 以适当的细胞分裂素与生长素的配比,改变培养条件为固体培养基、常温、组培全光照条件,接下来顺理成章的诱导胚状体分化成苗。

[0042] (5) 生根采用棉花滤纸桥作为支持物的室内瓶外生根方法,使用了添加含有低浓度生长素IBA的生根营养液,生根率高,保持了湿度无需每天加水操作方便,生根苗不粘有培养基和其他基质,移栽效率较高,显著降低了人工成本。

#### 附图说明

[0043] 图1为非胚性愈伤组织;

[0044] 图2为质地坚实的愈伤组织(瘤状愈伤组织);

[0045] 图3为松散型胚性愈伤组织形成期;

[0046] 图4为松散胚性愈伤组织;

[0047] 图5为胚性愈伤组织诱导出苗;

[0048] 图6为愈伤组织诱导;

[0049] 图7为瘤状愈伤组织培养;

[0050] 图8为松散型胚性愈伤组织培养;

[0051] 图9为成苗培养;

[0052] 图10为胚性愈伤组织切片。

#### 具体实施方式

[0053] 下面结合具体实施例子,对本发明的实现方法进行详细描述。

[0054] 一、四种培养基的制备

[0055] 本发明所述用于高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养基,包括用于高丛蓝莓体细胞胚间接再生中不同培养阶段的四种培养基,分别是:(1)高丛蓝莓愈伤组织碳饥饿液体诱导培养基、(2)高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基、(3)高丛蓝莓体细胞胚的成熟分化、成苗再生的有机物培养基、(4)高丛蓝莓分化苗的生根培养基。

[0056] 四种培养基的配制示例如下:

[0057] 实施例1

[0058] (1) 高丛蓝莓愈伤组织碳饥饿液体诱导培养基:在改良1/2MS基本培养基中添加ZT 0.5mg/L、TDZ0.1mg/L、2-ip 0.25mg/L和CPPU 0.75mg/L,继续添加蔗糖5g/L,不加琼脂,调节pH为5.0;

[0059] (2) 高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基:在改良1/2MS基本培养基中添加ZT 1mg/L、TDZ0.2mg/L、2-ip 0.5mg/L和CPPU 1.5mg/L,继续添加蔗糖30g/L,琼脂3g/L,调节pH为5.0;

[0060] (3) 高丛蓝莓体细胞胚的成熟分化、成苗再生的有机物培养基:在改良1/2MS基本培养基中添加ZT 1mg/L和IBA 0.1mg/L,继续附加蔗糖20g/L、椰乳100mg/L、AC 0.5g/L、琼脂5g/L,调节pH为5.0;

[0061] (4) 高丛蓝莓分化苗的生根培养基:在改良1/6MS基本培养基中添加IBA 1.0mg/L、蔗糖3.5g/L、AC 0.5g/L,不加琼脂,调节pH为5.0;

[0062] 实施例2

[0063] (1) 高丛蓝莓愈伤组织碳饥饿液体诱导培养基:添加ZT 0.7mg/L、TDZ0.15mg/L、蔗糖8g/L,其余与实施例1相同;

[0064] (2) 高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基:添加琼脂4g/L,其余与实施例1相同;

[0065] (3) 高丛蓝莓体细胞胚的成熟分化、成苗再生的有机物培养基:添加ZT 1.6mg/L琼脂6g/L,其余与实施例1相同;

[0066] (4) 高丛蓝莓分化苗的生根培养基:与实施例1相同;

[0067] 实施例3

[0068] (1) 高丛蓝莓愈伤组织碳饥饿液体诱导培养基:添加ZT 1.0mg/L、TDZ0.25mg/L、蔗糖10g/L,其余与实施例1相同;

[0069] (2) 高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基:添加琼脂5g/L,其余与实施例1相同;

[0070] (3) 高丛蓝莓体细胞胚的成熟分化、成苗再生的有机物培养基:添加ZT 2.0mg/L、琼脂7g/L,其余与实施例1相同;

[0071] (4) 高丛蓝莓分化苗的生根培养基:与实施例1相同。

[0072] 上述各实施例中:

[0073] 改良1/2MS基本培养基具体配方为:

[0074] 大量元素:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  825mg/L,  $\text{KNO}_3$  950mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  220mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  185mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85mg/L;

[0075] 微量元素: KI 0.83mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6mg/L,  $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.3mg/L;

[0076] 有机成分:肌醇100mg/L,烟酸0.5mg/L,盐酸吡哆醇0.5mg/L,盐酸硫胺素0.5mg/L,甘氨酸2mg/L;

[0077] 改良1/6MS基本培养基是对MS培养基的配方中大量元素进行了调整,其中大量元素减至原配方的1/6,微量元素不变,有机物调整为原配方的1/5;具体配方为:

[0078] 大量元素： $\text{NH}_4\text{NO}_3$  275mg/L,  $\text{KNO}_3$  317mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  73mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  62mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  28.3mg/L;

[0079] 微量元素： $\text{KI}$  0.83mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6mg/L,  $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.3mg/L;

[0080] 有机成分：肌醇20mg/L, 烟酸0.1mg/L, 盐酸吡哆醇0.1mg/L, 盐酸硫胺素0.1mg/L, 甘氨酸0.4mg/L。

[0081] 二、高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养方法

[0082] 利用本发明所述培养基进行高丛蓝莓体细胞胚间接再生的培养方法,包括下述步骤:

[0083] (1) 按实施例2中所述配方配制四种培养基;

[0084] (2) 选材与处理:

[0085] 在无菌操作条件下,取增殖旺盛的高丛蓝莓无菌试管苗,将其上部幼嫩部分剪切成长度为1cm、带叶柄的茎段;

[0086] (3) 愈伤组织低温弱光液体浅层培养:

[0087] 将所述高丛蓝莓愈伤组织碳饥饿液体诱导培养基分装到200ml的三角瓶中,每瓶10ml,以塑料透气膜扎口,作为液体浅层培养基;在无菌操作条件下,将10株幼嫩部分的茎段接入液体浅层培养基,在温度 $18 \pm 2^\circ\text{C}$ 、光照强度 $1000 \pm 1001\text{x}$ ,光照时间12h/d的条件下连续培养3个月(如图2,6);培养材料不进行继代转接,经培养生成愈伤组织材料;

[0088] (4) 蓝莓胚性愈伤组织半凝固培养基低温、黑暗分化增殖培养:

[0089] 将所述高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基分装到 $9 \times 9\text{cm}$ 的培养皿中,在无菌操作条件下,将步骤(3)中获得的愈伤组织材料(如图3)切割分离,并挑选呈现黄绿色的愈伤组织(如图4);剔除残存的茎段、出芽以及褐变的部分,接种于高丛蓝莓胚性愈伤组织诱导及增殖半凝固培养基(如图7),继续在温度 $18 \pm 2^\circ\text{C}$ ,全黑暗条件下培养3个月,每3周继代一次,每次继代继续挑选呈现黄绿色、松散、易碎的愈伤组织继续继代培养,获得胚性愈伤组织(如图8);

[0090] (5) 蓝莓胚状体固体培养基全光、高温分化成苗培养:

[0091] 将所述高丛蓝莓体细胞胚的成熟分化、成苗再生的有机物培养基分装于容量为200ml以上的罐头瓶中,挑选步骤(4)中获得的增殖旺盛、组织质地松散且未褐变的胚性愈伤组织,接种于有机物培养基,在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度 $2000 \pm 1001\text{x}$ 的条件下培养3个月,每4周继代一次,获得蓝莓芽苗(如图5,9);

[0092] (6) 蓝莓生根苗培养:

[0093] 取 $12 \times 12\text{cm}$ 培养皿,在底部先垫入脱脂棉,然后覆盖大小相近的滤纸;将高丛蓝莓分化苗的生根培养基分装于培养皿中,分装量以浸湿脱脂棉和滤纸为准;剪取健壮的蓝莓芽苗置于培养皿中,每个培养皿接种15株;在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的条件下,黑暗培养7天;再置于光照强度 $2000 \pm 1001\text{x}$ 条件下,培养21天,获得蓝莓生根苗。

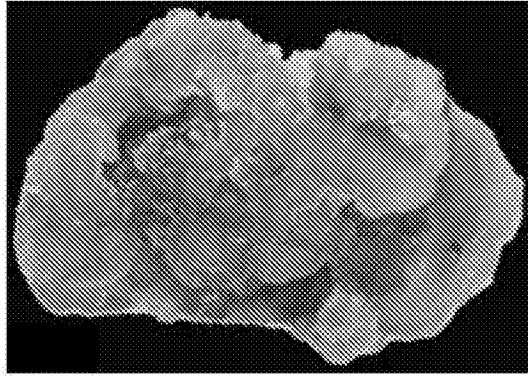


图1

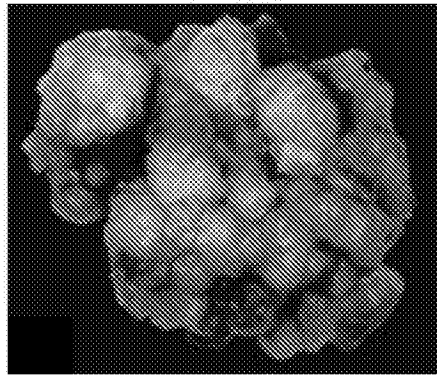


图2

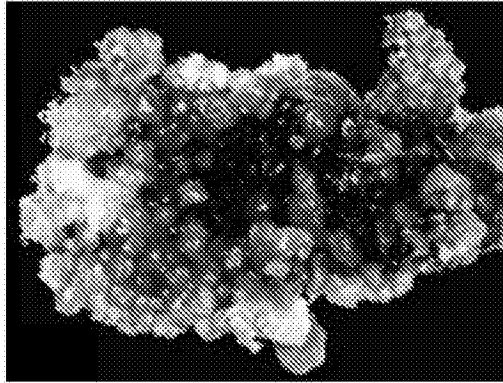


图3

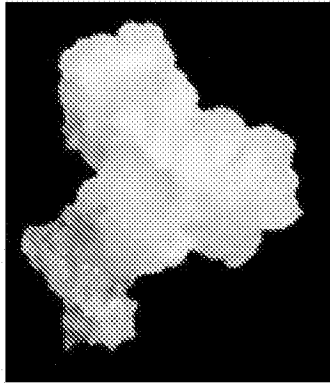


图4

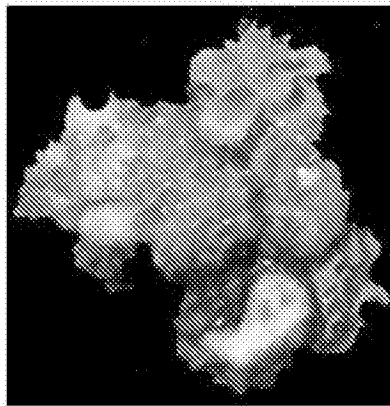


图5

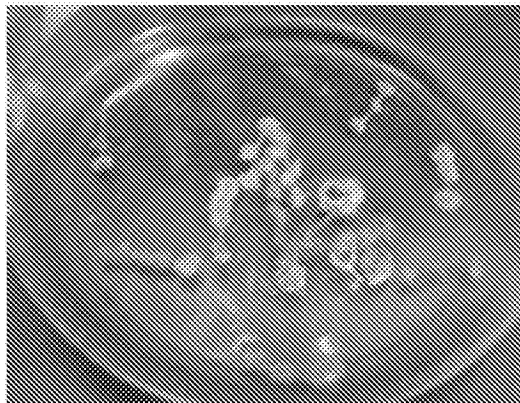


图6

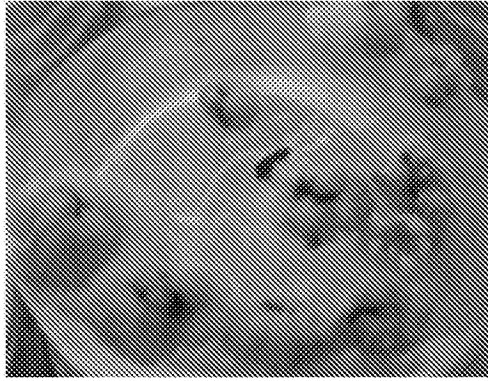


图7

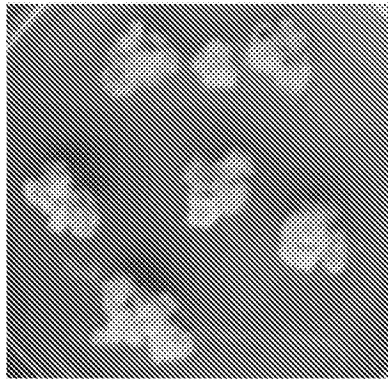


图8



图9

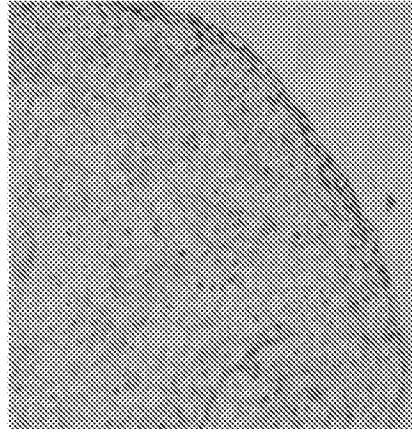


图10