

越桔品种‘达柔’离体培养快繁技术体系的研究

段祖安¹, 李建华¹, 强薇¹, 候立群²

(1. 山东农业大学林学院农业生态与环境研究室, 山东 泰安 271018; 2. 山东省林业科学研究院, 山东 济南 270000)

摘要: 以越桔(*Vaccinium* ssp)茎段为外植体, 探讨不同植物激素ZT、IBA、IAA的浓度对试管苗增殖以及植株再生的影响, 建立一整套越桔离体培养的技术体系。实验结果表明: 越桔的初代培养为改良培养基WPM+ZT 1.0 mg·L⁻¹ + IAA 1.0 mg·L⁻¹ + 糖30 g·L⁻¹ + 琼脂6.5 g·L⁻¹, 分化培养培养为改良WPM+ZT 1.0 g·L⁻¹ + IBA 0.4 mg·L⁻¹ + 糖20 g·L⁻¹ + 琼脂6.5 g·L⁻¹ 培养基, 生根培养为改良1/2WPM+IBA 0.15 mg·L⁻¹ + 糖20 g·L⁻¹ + 琼脂6.5 g·L⁻¹。通过正交试验也得出同样的结论。炼苗移栽时, 土与蛭石(1:1)基质配比成活率最高, 且生长旺盛。

关键词: 越桔; 组织培养; 正交试验; 快速繁殖

中图分类号: S 663 文献标识码: A 文章编号: 1000-2324 (2008) 04-0506-05

收稿日期: 2007-06-13

基金项目: 山东省农业良种工程项目, 鲁科农字 [2005] 99号

作者简介: 段祖安 (1965-), 男, 农业推广硕士, 主要从事林木栽培。

STUDY ON SYSTEM OF EXBODY CULTURE AND RAPID PROPAGATION OF VACCINIUM 'DARONG'

DUAN Zu-an¹, LI Jian-hua¹, QIANG Wei¹, HOU Li-qun²

(1. Lab of Agricultural & Zoology and Environment Forestry College, Shandong Agricultural University, Taian 27100, China; 2. College of the Forestral Science Shandong Province, Jinan 271000, China)

Abstract: Using the stem segment of *Vaccinium* ssp as the explant, this paper probes the effects of phytohormone of different concentration ZT, IBA, IAA on proliferation and regeneration of individual plant about cuvette seedling so that explant culture system is set up in *Vaccinium* ssp scientifically. The results shows that the appropriate medium for first culture is WPM(improved)+ZT 1.0 mg L⁻¹ + IAA 1.0 mg·L⁻¹ + sugar 30 g·L⁻¹ + agar 6.5 g·L⁻¹, the medium of multiplication is WPM(improved)+ZT 1.0 g·L⁻¹ + IBA 0.4 mg·L⁻¹ + sugar 20 g·L⁻¹ + agar 6.5 g·L⁻¹, the medium of rooting is 1/2WPM(improved)+IBA 0.15 mg·L⁻¹ + sugar 20 g·L⁻¹ + agar 6.5 g·L⁻¹, and same results is proved through orthogonal test. basic rate(1:1) in the soil and vermiculite has high survival rate when one is planted after trainde seedling.

Key words: *Vaccinium* ssp; tissue culture; orthogonal tests plantlet; rapid propagation

1 材料和方法

1.1 材料

来源于山东农业大学林学院实习苗圃, 取当年生越桔茎段。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 改良WPM培养基, 附加20 g·L⁻¹~30 mg·L⁻¹的蔗糖, 6.5 g·L⁻¹琼脂, pH 为5.8~6.0, 光照16 h, 培养温度25 ± 2 °C, 光照强度3000 Lx。

1.2.2 材料处理 剪去当年生枝条上的叶片, 自来水冲洗干净, 放入自制的消毒液和0.1%绿化合中5~35分钟, 在无菌室中的工作台上, 无菌水冲洗2~3遍, 于无菌瓶中。

1.2.3 正交试验[5] 将越桔茎段接入附加不同种类、不同浓度激素的培养基中。试验方案按L₈(2³)正交设计[6] (表1)。

表1 正交表

Table 1 The orthogonal table

A	B	A×B	C	A×C	B×C
1	1	1	1	1	1
1	1	1	2	2	2
1	2	2	1	1	2
1	2	2	2	2	1
2	1	2	1	2	1
2	1	2	2	1	2
2	2	1	1	2	2
2	2	1	2	1	1

注:A ZT为2 水平 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; B IBA为 2 水平浓度 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C IAA 为2 水平浓度 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ×:代表互作。

Note:A ZT stand for 2 level on $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; B IBA stand for 2 level on $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; CIAA stand for 2 level on $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; × stand for mutual act

1. 2. 4 IBA 生根试验 取继代培养3 cm 以上试管苗, 接种到附加不同浓度IBA 的1/ 2 改良WPM培养基中。每个处理接种10 株, 培养时间50 d, 生根后对其进行炼苗、移栽。

2 结果与分析

2. 1 不同的灭菌剂的灭菌时间对消毒效果的影响

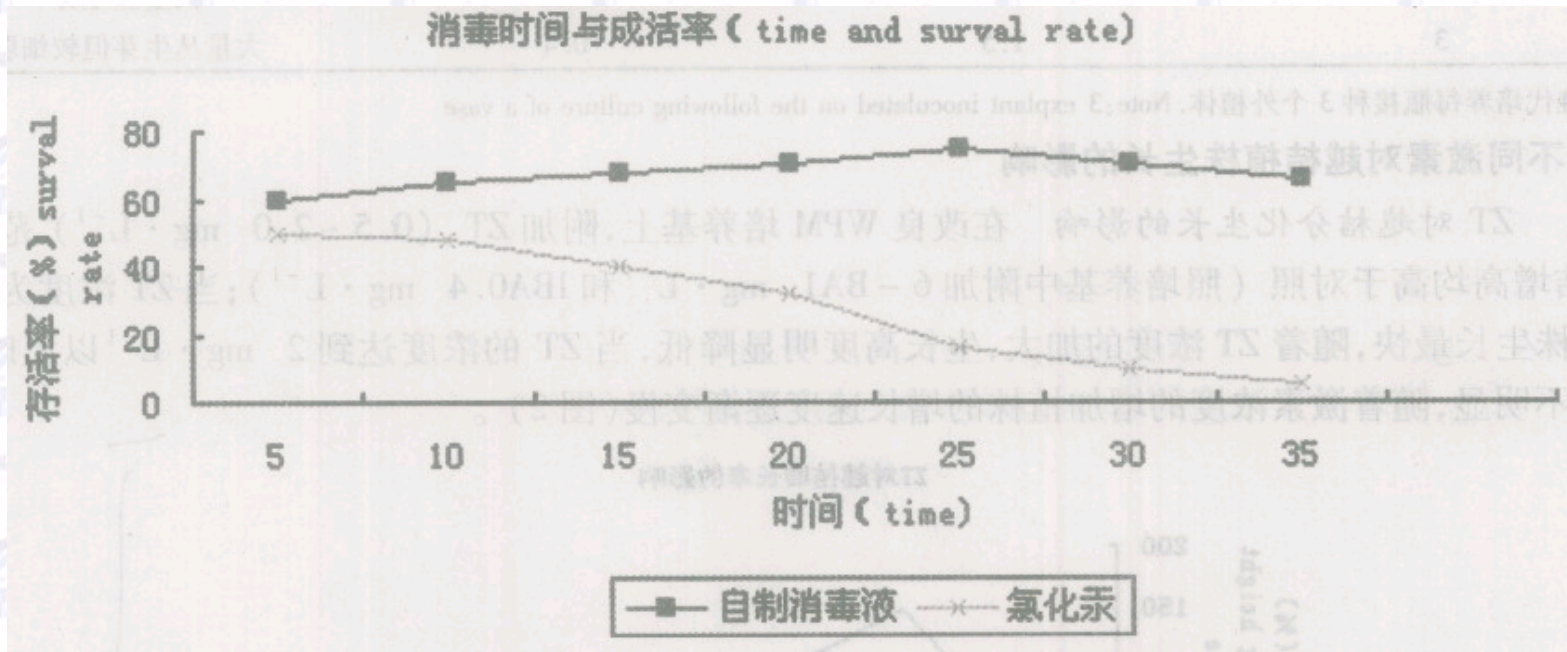


图1 不同消毒时间对越桔茎段消毒效果的影响

Fig. 1 The effect of different sterilization time on stem segment (注: 每个时间段接种10个外植体 Note: 10 explant inoculated in a time.)

灭菌试剂采用0.1%的氯化汞和自配的消毒剂, 灭菌效果如图1, 试验结果表明, 使用自制的消毒液对越桔茎段灭菌时, 以 25 min 为宜, 污染率与杀死率降到最低, 成活率最高可达75%(见图1)。灭菌时间短, 杀死率低, 污染率提高, 成活率降低; 灭菌时间过长, 污染率降低, 但杀死率升高, 成活率同样也降低。采用氯化汞灭菌时, 只有在消毒时间5 min时, 成活率为50%, 随着时间的延长, 接种成活率逐渐降低, 而杀死外植体几率增大, 成活率也降低, 从图1可以看出, 自配消毒剂在消毒时间和存活率关系上, 影响较小。

2. 2 初代接种芽生长情况

初代培养50d 左右, 部分茎段可直接诱导产生萌生芽, 在附加ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和IAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的改良WPM中, 不定芽的萌芽率最高, 达到86.67%(表2)。

表2 初代接种萌芽率

Table 2 The bud ratio of first generation

处理 Treatment	ZT浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration of ZT	IAA浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration of IAA	出芽数 Numbers of buds	出芽率 (%) Bud ratio
1	0.5	0.5	4	13.33
2	0.5	1.0	6	20.00
3	0.5	1.5	3	10.00
4	1.0	0.5	20	66.67
5	1.0	1.0	26	86.67
6	1.0	1.5	18	60.00

7	1.5	0.5	7	23.33
8	1.5	1.0	9	30.00
9	1.5	1.5	4	13.33

注：初代培养每种处理接种30。

Note:30 disposal inoculatde in the original cuiture

2. 3 不同浓度的激素对比对越桔不定芽诱导的影响

将萌生的越桔茎段接种到改良WPM培养基中，同时附加不同组合浓度的激素，30d后观察越桔的分化情况，结果表明继代培养以附加ZT1.0 mg·L⁻¹和IBA0.4mg·L⁻¹的改良WPM培养基为宜(见表3)。

表3 芽的继代培养

Table 3 Subculture of buds

处理 Treatment	ZT浓度(mg·L ⁻¹) Concentration of ZT	IBA浓度(mg·L ⁻¹) Concentration of IBA	分化状况 Conditions of cell differentiation
1	0.5	0.1	少量丛生芽
2	1.0	0.4	大量丛生芽
3	1.5	0.4	大量丛生芽但较细弱

注：继代培养每瓶接种3个外植体。

Note:3 explant inoculated on the following culture of a vase

2. 4 不同激素对越桔植株生长的影响

2. 4. 1 ZT 对越桔分化生长的影响 在改良WPM培养基上，附加ZT(0.5~2.0mg·L⁻¹) 范围的激素，越桔增高均高于对照（照培养基中附加6-BA1 mg·L⁻¹和IBA0.4 mg·L⁻¹）；当ZT 浓度为1 mg L⁻¹时植株生长最快，随着ZT浓度的加大，生长高度明显降低，当ZT 的浓度达到2 mg·L⁻¹以上时，植株的增高不明显，随着激素浓度的增加植株的增长速度逐渐变慢(图2)。

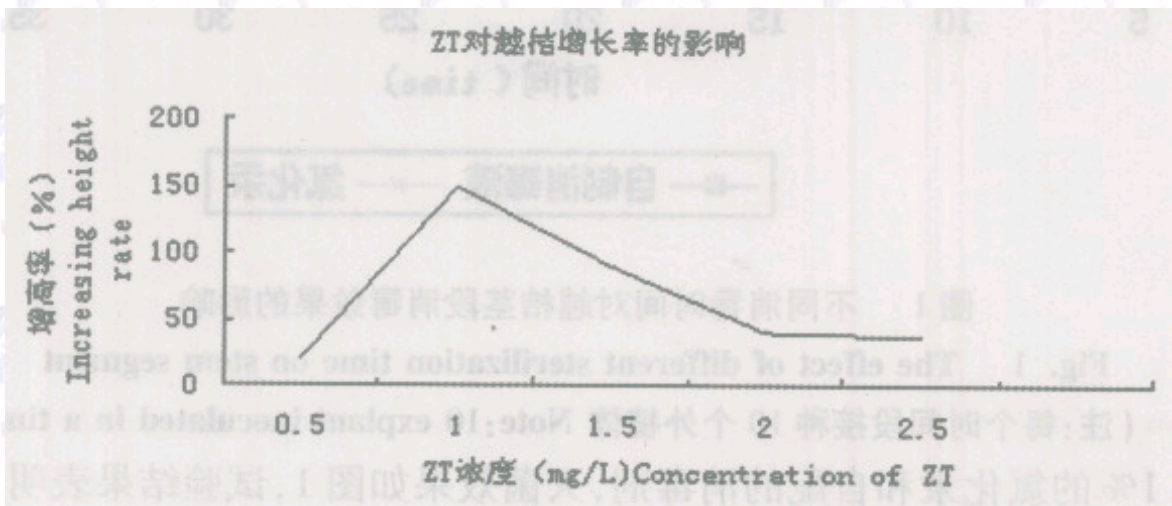


图2 ZT对越桔增长率的影响

Fig.2 The effect of ZT on plant height increasing rate

注：增高率为ZT培养基中的越桔平均高与6-BA培养基中平均高之差同6-BA培养基中平均高的百分比

2. 4. 2 IBA 对越桔植株的影响 IBA 浓度为0.2~0.6 mg·L⁻¹时，会显著促进越桔植株的增高；但当IBA 浓度大于等于0.7mg·L⁻¹时，明显抑制植株的增高(图3)。

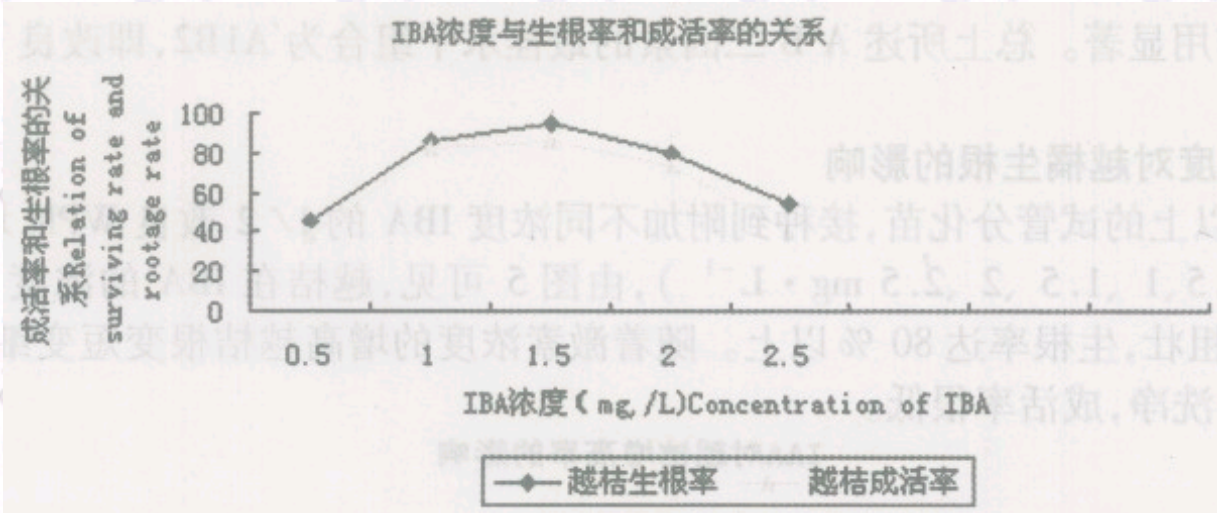


图3 IBA对植株增高率的影响

Fig. 3 The effect of IBA on plant height increasing rate

在试验中观察到，较低浓度的IBA 可以诱导越桔生根。多数植株附加IBA 水平在 $0.4\sim 0.6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上培养40d时已生根。

2.4.3 IAA 对越桔植株的影响 IAA的浓度范围为 $0.2\sim 1.6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，对越桔植株的增长有促进作用(图4)。IAA 同IBA 类似，其显著的特点是可以诱导越桔生根和生成愈伤组织。在试验中发现，越桔在IAA的浓度为 $1.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增高最明显。附加上述任何激素，浓度超过一定的范围，基部都会产生愈伤组织，说明上述激素可以诱导越桔愈伤组织形成。

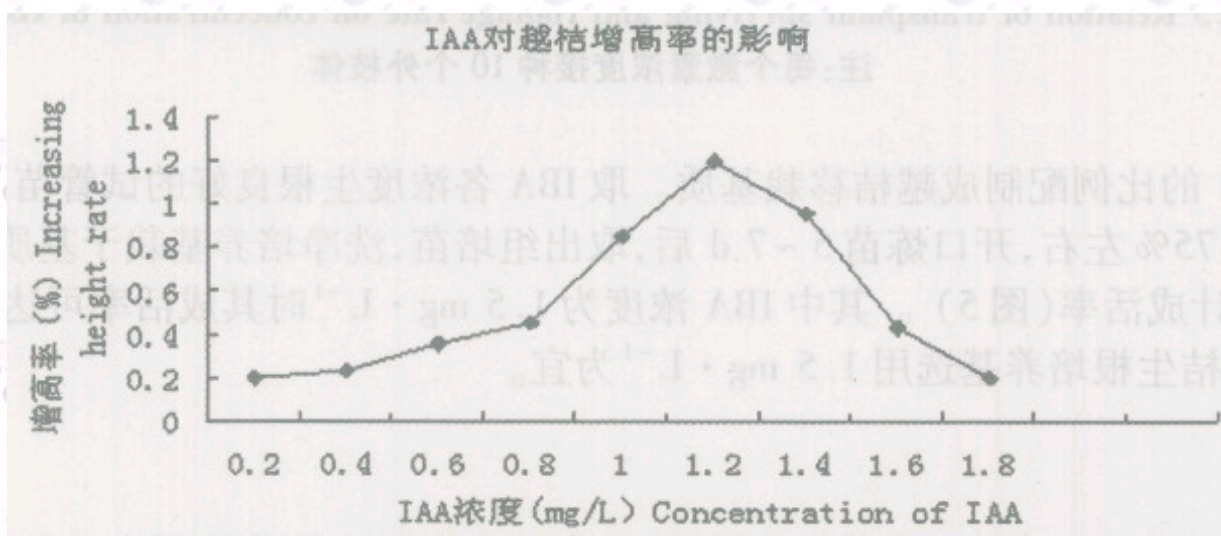


图4 IAA对植株增高率的影响

Fig. 4 The effect of IAA on plant height increasing rate

2.5 正交试验分析 通过正交分析来进一步证实各种激素对越桔的作用（见表4）

表4 正交分析表

Table 4 The orthogonal analytical table

水平列处理	1A	2B	3 A × B	4C	5 A × C	6 B × C	增高率%
Treatments							eight increasing rate
1	1	1	1	1	1	1	0.18
2	1	1	1	2	2	2	0.46

3	1	1	2	1	1	2	1.26
4	1	2	2	2	2	1	1.38
5	2	2	2	1	2	1	0.11
6	2	1	2	2	1	2	0.20
7	2	2	1	1	2	2	0.57
8	2	2	1	2	1	1	0.31

表4经SAS分析可知： $Pr>F=0.0439<0.05$ ，则A B C三因素存在显著的差异，在C因素中，由于 $Pr>F=0.3638>0.05$ ，所以C因素作用不显著。在A因素的2水平中，由于A1水平为0.82大于A2水平的0.275，所以A因素的A1水平作用显著。在B因素中，由于B因素的B2水平0.88大于B1水平的0.2375，所以B2水平作用显著。综上所述A B二因素的最佳水平组合为A1B2，即改良WPM+ZT1.0 mg/L+IBA0.4

2. 6 不同的IBA浓度对越橘生根的影响

将生长到3 cm 以上的试管分化苗，接种到附加不同浓度IBA 的1/ 2 改良WPM培养基中(IBA 的浓度从左到右依次为0.5、1 、1.5 、2 、2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)，由图5 可见，越桔在IBA 的浓度为1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ~1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时生根长且粗壮，生根率达80 %以上。随着激素浓度的增高越桔根变短变细成须根状，易掉，且在移栽时培养基不易洗净，成活率很低。

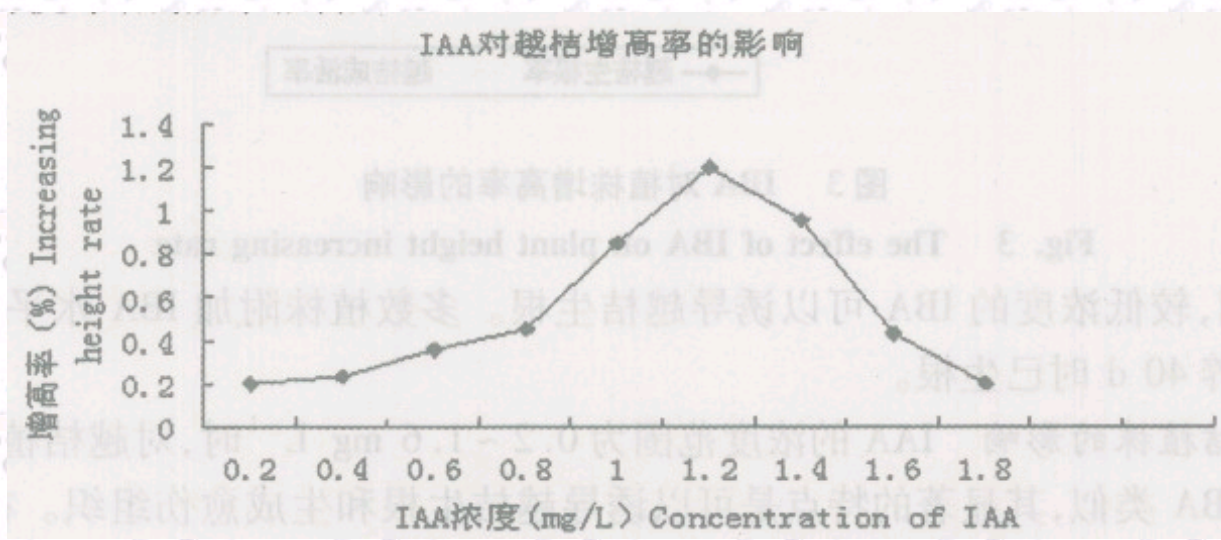


图5 IBA浓度与越桔生根率和移栽成活率的关系

Fig.5 Relation of transplant surviving and rootage rate on concentration of IBA

注：每个激素浓度接种10个外枝体

2. 7 炼苗与移栽

将土与蛭石1：1 的比例配制成越桔移栽基质。取IBA 各浓度生根良好的试管苗10 株进行炼苗。在温室中保持空气湿度75%左右，开口炼苗5~7d 后，取出组培苗，洗净培养基栽于基质并用塑料薄膜保湿10~15d，20d 后统计成活率(图5)。其中IBA 浓度为1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时其成活率可达95%。综合考虑生根与炼苗状况诱导越桔生根培养基选用1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。

3 讨论

越桔在离体培养时，对 H^{-1} 离子浓度非常敏感， H^{-1} 离子浓度的最适范围为3.2~4.5，稍有提高，在同等条件下就会出现愈伤组织化或者褐化干枯，影响植株体的再生[7, 8, 9]。当 H^{-1} 离子的浓度达到5时，越桔基本停止生长，这可能是与植物本身的遗传特性有关系。另外通过正交试验进一步确定了越桔增殖的较适宜培养基，初步探讨了激素对越桔增高的影响，发现了ZT与IBA 互作在影响越桔增高率方面所达到的显著水平，而ZT与IAA 的互作极小[10, 11, 12]。由此可见，在试验中要确定最佳的培养基配方，一定要考虑到激素之间的相互作用。当越桔生根培养基附加1.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭时，根细且色发黄，成活率低，这与以往组织培养报道不同。

参考文献

- [1] 刘庆忠, 赵红军. 高灌蓝莓微体繁殖技术研究初报[J]. 落叶果树, 2001(5): 1-3
- [2] 林宝山, 杜凤国. 越桔品种‘爱国者’的组织培养和快速繁[J]. 殖植物生理学通讯, 2006, 42(5): 912

- [3] 黄美娟, 邓小梅, 符树根, 等. 越橘‘红罗宾’组培快繁技术研究[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25 (4):604 -607
- [4] 李玉巧. 金边常春藤快繁试验[J]. 江苏林业科技, 1992, 19(3):17-18
- [5] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000
- [6] 李春喜, 王志和, 王文林. 生物统计学[M] (2 版). 北京: 科学出版社, 2000 :153-155
- [7] 宛成刚, 夏重立, 张启香, 等. 芦荟试管苗快繁技术研究[J] . 南京农专学报, 2001 ,17 (4) :19-22
- [8] KANNIAH RAJASEKARAN ,MICH B. Endogenous abscisic acid and indole232 acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of pennisetum purpureum Schcu .Effect in vivo and in vitro of glyphosate ,fluridone ,and paclobutrazol [J]. Plant physiol ,1987 (6) :84-47
- [9] 王光萍, 黄敏仁. 福建山樱花的组织培养及植株再生[J]. 南京林业大学学报, 2002, 26(3): 73-75
- [10] 韩美丽, 唐玉贵. 几种天南星科荫生观叶植物组织培养研究[J]. 广西林业科技, 1998, 27(2): 53-56
- [11] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992. 324-359
- [12] RAJASKARAN K, HEIN M B , DAVIS G C, et al. Endo genesis growth regulators in leve and tissue cultures of pennisetum purpureum Schcum [J]. Plant physiol, 1987, 7:130-133

[返回](#)