

黑莓的组织培养快速繁殖技术

蒋小满, 柏新富, 赵建萍

(鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要:以黑莓茎尖和带芽茎段为外植体, 筛选组织培养各阶段适宜培养基。结果表明: 外植体以茎段为宜。初始培养基以 MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L 最好, 出芽率达 93%; 继代增殖培养基以 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.05~0.2 mg/L 最理想, 增殖系数可达 8 倍; 生根培养基以 1/2 MS+IBA 0.1 mg/L 和 1/2 MS+NAA 0.05 mg/L 最佳, 生根率可达 100%。以园土:珍珠岩:蚯蚓粪按 1:1:1 的比例混合的基质移栽成活率达到 96.9%, 移栽苗生长健壮。

关键词:黑莓; 组织培养; 快速繁殖; 植物激素

中图分类号:S 663.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)10-0173-03

黑莓为浆果类蔷薇科(Rosaceae)悬钩子属(*Rubus*)植物, 一般把聚合果成熟时与花托分离的种类称为“树莓”(Raspberry), 把聚合果成熟时与花托不分离的种类称为“黑莓”(Blackberry)^[1]。黑莓是一种生态及经济效益较好的多年生落叶半灌木树种, 聚合果营养成分丰富, 是近年来国内外兴起的第三代水果之一^[1,2]。此外, 黑莓生长快、耐瘠薄、耐干旱, 尤其是耐盐碱, 是优良的水土保持植物, 具有广阔的开发前景^[3]。迄今国内黑莓优良品种多从欧美引进, 栽培面积较小^[4]。生产上采用扦插、根蘖、压条等传统繁殖方法^[5], 其繁殖系数低, 速度慢, 影响优良品种的开发和推广。采用组培快繁技术可以避免上述弊端^[6]。有关黑莓的组织培养国内已有一些报道^[7-9], 但尚未解决繁殖系数低这一问题, 远不能满足生产上的需求, 因此有必要研究和完善黑莓组培高效快繁技术。现以加拿大的耐寒黑莓品种 Karvar 为材料, 对影响其快繁效率的激素因素进行研究, 筛选各培养阶段最佳培养基配方, 为在短期内获得大量种苗及工厂化育苗生产奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黑莓品种 Karvar, 由鲁东大学生命科学学院组培室提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体的表面消毒 采集试验田黑莓的 1 a 生未木质化枝条, 剪成 2 cm 长、带 1 个芽的茎段或茎尖。用洗衣粉液冲刷表面, 流水洗净。在无菌条件下, 将材料放入 70% 酒精浸泡 10 s, 再用 0.1% HgCl₂ 溶液处理

3~8 min, 最后用无菌水冲洗 5~7 遍。

1.2.2 培养基和培养条件 试验所用培养基均为 MS 基本培养基, 培养基中蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂为 6.5~7.0 g/L, pH 5.8。培养温度为 (25±2) °C, 光强 1 500~2 000 lx, 光照 14 h/d。

1.2.3 芽的分化 将已消毒的茎段和茎尖接种于 BA 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L, IAA 为 0.1 mg/L 的 4 种起始培养基上诱导芽的分化, 30 d 后调查分化率。

1.2.4 增殖继代 外植体分化出新芽后, 将芽切成 1~2.0 cm 长, 每个茎段留 2~3 片叶。转接到以 MS 为基本培养基并附加不同激素的 12 种培养基(表 1)上进行继代增殖培养, 30 d 后调查其生长增殖情况。

1.2.5 试管苗的生根 选取高于 3 cm 的芽苗, 从基部切下, 单株接种到 16 种生根培养基(表 2)上进行生根培养, 20 d 后统计其生根情况。

1.2.6 试管苗的移栽 试管苗根长达到 2~3 cm 时进行练苗移栽。揭开瓶盖, 在自然光照下练苗 2 d, 洗净根部的培养基, 移栽到不同基质中(表 3), 搭塑料薄膜小拱棚。在移栽前一周注意保湿, 温度保持在 27 °C, 湿度保持在 80%~90%之间, 阳光强烈时适当遮荫。后期逐渐通风并增加光照。移栽苗生长 20 d 后统计成活率。

1.2.7 试管苗扦插 剪取苗高为 3 cm 以上的无根芽苗, 将苗基部在 0.5 g/L IBA 溶液浸蘸 10 s 后, 移栽基质中(草炭土:珍珠岩:蛭石=1:1:1)。行株距为 3 cm×1.5 cm。管理同移栽管理。25 d 后统计生根率并移栽。

2 结果与讨论

2.1 不同培养基对外植体萌发的影响

表面消毒后的外植体接种到起始培养基上, 第 2 天部分外植体表面轻度变褐, 第 6 天茎尖开始萌动, 幼叶展开。第 8 天茎段上的腋芽也开始萌动。从褐化情况来看, 适合茎尖表面消毒的 HgCl₂ 处理时间为不超过

第一作者简介: 蒋小满(1964), 女, 理学硕士, 教授, 主要从事植物生物技术及植物生理学方面的研究。E-mail: jxmldu@163.com.
收稿日期: 2007-06-26

3 min, 未木质化茎段 4~5 min, 半木质化茎段 5~6 min 为宜。超过时间褐化率升高, 时间太短污染率增加。从萌动芽生长情况看, 以茎尖为外植体, 尽管萌动早, 但后期生长慢, 且会出现畸形芽, 这可能与表面灭菌的伤害有关。茎段上长出的腋芽生长较好, 部分茎段切口处愈伤化。因此, 黑莓以茎段为外植体为宜。从供试的4种起始培养基来看, MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L 的培养基适合外植体萌发, 出芽率 93%。

2.2 BA 和 NAA 组合对黑莓的不定芽增殖的影响

由表 1 可以看出, 不同的激素配比影响黑莓不定芽的增殖数量。在 BA 浓度一定的情况下, 随着 NAA 浓度的增加, 腋芽的增殖系数逐渐增加, 但愈伤化程度也在加强。在 NAA 浓度一定的情况下, 随着 BA 浓度的增加, 不定芽苗的增殖数和平均高度逐步增加, 但当 BA 浓度超过 1.0 后, 不定芽成丛生状, 平均苗高降低, 不利于下一阶段的生根培养。当培养 15 d 后, 在苗丛基部长出 不定根, 不定根的数量随培养基中 NAA 的增加而增多。即黑莓芽段在增殖培养基下可一次性成苗。但由于不定根是从不定芽丛基部发出, 给后期分株移栽造成困难, 在分株时造成部分无根苗, 影响移栽成活率。如果移栽时与继代培养配合进行, 增殖培养基中一次性成苗, 可以大大缩短成苗培养周期, 节约出苗成本。从试验可见 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.05~0.2 mg/L 均适合试管苗增殖, 增殖系数达 8.0。

表 1 不同浓度的激素对黑莓试管苗不定芽增殖的影响

BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	调查数	增殖系数	平均苗高/cm	生长情况
0.25	0	20	3.9	2.5	基部分化出不定根较少
0.5	0	20	4.2	3.1	基部分化出少量不定根较少
1	0	20	5.0	2.9	基部分化出少量不定根
2	0	20	6.2	1.8	基部分化出少量不定根
0.25	0.05	20	4.6	3.2	基部分化出不定根
0.5	0.05	20	7.1	3.5	基部分化出不定根
1	0.05	20	7.6	3.2	基部分化出不定根
2	0.05	20	8.0	1.8	基部愈伤化并分化出不定根
0.25	0.2	20	4.8	3.0	基部愈伤化并分化出大量不定根
0.5	0.2	20	7.2	3.4	基部愈伤化并分化出大量不定根
1	0.2	20	8.2	3.1	基部愈伤化并分化出大量不定根
2	0.2	20	8.6	1.5	基部愈伤化严重并分化出不定根

2.3 黑莓的生根培养

将无根试管苗单株转接到含有不同浓度 IBA 和 NAA 的 MS 培养基和 1/2 MS 培养基上, 培养 20 d 后, 统计生根情况。从表 2 可以看出, 大量元素减半的 MS 培养基中生根率普遍比 MS 培养基中高。在添加 NAA 培养基中不定根发根早, 转接后第 6 天即有不定根生出, 根较细长, 当 NAA 浓度超过 0.5 mg/L 时生根被抑制, 基部愈伤化严重。添加 IBA 的培养基发根较晚, 第 10 天才生出, 不定根较粗。适合黑莓 karvar 生根的培养基为 1/2 MS+IBA 0.1 mg/L 或 1/2 MS+NAA 0.05

mg/L, 生根率可达 100%。

表 2 不同培养基和激素对黑莓苗生长的影响

培养基 /mg·L ⁻¹	调查数 /株	生根率 /%	每株根数 /条	生长情况
MS+IBA 0.05	25	72	8.5	根较粗
MS+IBA 0.1	25	92	9.4	根较粗
MS+IBA 0.5	25	80	8.5	根较粗
MS+IBA 1.0	25	72	7.0	根较粗, 基部轻度愈伤化
MS+NAA 0.05	25	92	8.5	根较细
MS+NAA 0.1	25	84	5.2	根较细
MS+NAA 0.5	25	32	1.3	根较细, 基部愈伤化
MS+NAA 1.0	25	0	0	基部愈伤化
1/2MS+IBA 0.05	25	84	8.3	根较粗
1/2MS+IBA 0.1	25	100	10.2	根较粗
1/2MS+IBA 0.5	25	92	7.6	根较粗
1/2MS+IBA 1.0	25	80	5.4	根较粗, 基部轻度愈伤化
1/2MS+NAA 0.05	25	100	12.1	根较细长
1/2MS+NAA 0.1	25	92	9.3	根较细长
1/2MS+NAA 0.5	25	72	4.5	根较细, 基部愈伤化
1/2MS+NAA 1.0	25	0	0	基部愈伤化

2.4 移栽

将试管苗移栽到不同配方的基质中, 移栽成活率见表 3。总体看黑莓移栽较易成活。移栽的黑莓苗在园土:珍珠岩:蚯蚓粪=1:1:1 比例构成的移栽基质中 长势最好, 其成活率达到 96.9%。

表 3 不同基质对黑莓苗移栽成活的影响

移栽基质种类	移栽数	成活数	成活率/%	生长情况
园土:珍珠岩=2:1	64	52	81.3	叶色发黄
草炭土:珍珠岩=2:1	64	60	93.8	叶色绿
蛭石:珍珠岩=2:1	64	61	95.3	叶色发黄
草炭土:珍珠岩:蛭石=1:1:1	64	60	93.8	叶色绿
草炭土:珍珠岩:蚯蚓粪=1:1:1	64	61	95.3	苗健壮, 叶色绿
园土:珍珠岩:蚯蚓粪=1:1:1	64	62	96.9	苗健壮, 叶色绿

2.5 无根苗扦插

将 54 棵无根试管苗直接扦插于草炭土:珍珠岩:蛭石按 1:1:1 混合的基质中, 25 d 后经观察, 有 39 棵生根, 生根率为 72.2%。将生根苗进行移栽, 移栽成活率为 100%。由此可见, 采用无根试管苗扦插的方式, 尽管生根率不如生根培养基的高, 但可以缩短培养周期, 后期移栽成活率高, 因此, 采用无根苗扦插的方法也不失为一条降低出苗成本的途径。

参考文献

[1] 姜河, 修英涛, 蔡骞. 我国树莓发展现状及产业化前景分析[J]. 辽宁农业科学, 2006(2): 45-48.
[2] 卞贵建, 周庆阳. 树莓主要经济性状的主成分分析及其优种的选择[J]. 四川林业科技, 2006(2): 68-71.
[3] 徐玉秀, 王友升, 王贵禧. 树莓的利用研究及其在我国的发展前景[J]. 经济林研究, 2003(1): 64-66.
[4] 贺善安, 顾姻, 孙醉君, 等. 黑莓引种理论导向[J]. 植物资源与环境, 1998(1): 1-9.
[5] 樊广英. 树莓的繁殖方法[J]. 中国林副特产, 2006(2): 47-48.
[6] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1999.

盾叶薯蓣胚乳的组织培养

郭永兵, 江道菊, 李特林

(长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

摘 要: 分别以盾叶薯蓣成熟种子和未成熟种子的胚乳为材料进行组织培养。结果表明: 愈伤组织诱导培养中, 无论是成熟胚乳还是未成熟胚乳, 采用 $MS+6-BA\ 1.0\ mg\cdot L^{-1}+NAA\ 0.1\ mg\cdot L^{-1}$ 培养基诱导效果最佳, 诱导率分别达到 83.3% 和 90.0%; 以 $1.0\ mg\cdot L^{-1} 6-BA+0.2\ mg\cdot L^{-1} NAA+MS$ 培养基进行继代培养可达到比较理想效果; $0.1\ mg\cdot L^{-1} 6-BA+0.05\ mg\cdot L^{-1} NAA+蔗糖\ 3\%+500\ mg\cdot L^{-1} CH+MS$ 培养基诱导芽的分化, 效果最好, 成熟胚乳和未成熟胚乳芽诱导率分别为 80.0% 和 90.0%。用 1/2MS 培养基进行生根培养时, ABT 生根粉溶液处理的生根效果, 在浓度 200~300 mg/L 范围内没有显著差异, 成熟胚乳再生植株生根率为 76.6%, 未成熟胚乳再生植株为 83.3%。

关键词: 盾叶薯蓣; 胚乳; 组织培养

中图分类号: S 632.103.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)10-0175-03

纵观胚乳培养研究历史, 很多研究已经充分肯定了胚乳细胞在离体条件下可以无限增生和进行器官分化^[1,2]。对于已收获根茎的盾叶薯蓣来说, 种子发育好坏甚至是否发育对种植业来说无关大局。因此, 利用三倍体的胚乳来培育三倍体的植株以提高盾叶薯蓣产量在理论上是可行的。目前利用盾叶薯蓣的根茎等营养

器官进行组织培养比较容易成功^[3,4], 而关于其胚乳进行组织培养的研究尚未见报道。研究可以为进一步通过细胞工程进行盾叶薯蓣品种改良或新品种的选育提供新的思路, 也为推广应用和大量快速繁殖优质苗打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料和基本培养基

供试材料为当年收获的长江大学植物资源圃的盾叶薯蓣成熟果实和未成熟的果实。基本培养基(BM)2种: BM1 为 MS 培养基, BM2 为 MS 培养基+蔗糖 3%+

第一作者简介: 郭永兵(1972-), 男, 湖北仙桃人, 讲师, 在读博士生, 主要从事野生植物资源与利用研究。E-mail: guoyb@scbg.ac.cn.
收稿日期: 2007-06-26

[7] 徐桂娟, 罗晓芳, 姚洪军. 黑树莓的组织培养与快速繁殖[J]. 北京林业大学学报, 2002(1): 99-100.

[8] 刘兰英, 李春玲. 树莓的组培快繁技术研究[J]. 园艺学报, 2004(4): 173-174.

[9] 蒋桂华, 吴延军, 谢鸣等. 树莓、黑莓组织培养及遗传转化研究进展[J]. 果树学报, 2006(4): 593-598.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of Blackberry

JIAN G Xiao-man, BAI Xin-fu, ZHAO Jian-ping

(School of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China)

Abstract: Using stem segments with buds as explants, tissue culture and rapid propagation of Blackberry were studied. The results indicated that the appropriate media for respective culture stages were: for germination of axillary buds: $MS+BA\ 1.0\ mg/L+IAA\ 0.1\ mg/L$; for multiplication: $MS+BA\ 1.0\ mg/L+NAA\ 0.05\sim0.2\ mg/L$, the multiple for multiplication reached to 8; for rooting: $1/2MS+IBA\ 0.1\ mg/L$ or $1/2MS+NAA\ 0.05\ mg/L$ and the rate of rooting was 96.3%. Transplanting rooted plantlet to a different substrata, the results showed that substrata which consists of garden-soil, perlite and wormcast was the most suitable for transplant and late growth, and survival rate was up to 96.9% and transplant plantlet grow healthy.

Key words: Blackberry; Tissue culture; Rapid Propagation; Plant hormone