

欧李优系试管苗增殖关键技术研究

梁伟玲, 卢彦琦, 陈翠果, 刘艳芬

(河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056021)

摘 要:以欧李优系试管苗为试材,采用单因素试验设计,研究了不同生长调节物质组合、基本培养基类型、附加物和蔗糖浓度对试管苗生长状态和增殖效率的影响。结果表明:在 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹培养基上,附加水解乳蛋白(LH) 300 mg·L⁻¹、蔗糖 35 g·L⁻¹、琼脂 5.8 g·L⁻¹,为欧李优系试管苗增殖的最佳培养条件。

关键词:欧李;试管苗;增殖;关键技术

中图分类号:S 662.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)17-0103-04

欧李(*Prunus humilis*)属蔷薇科李属落叶小灌木,是我国特有的第3代小水果。因果实中活性钙元素极为丰富,商品名又称“中华钙果”^[1]。欧李种子繁殖苗变异大,分株繁殖系数低,扦插繁殖受季节影响不易生根。利用组织培养是快速繁殖欧李优良苗木的有效方法^[2-7]。欧李组培苗增殖期间,会出现玻璃化^[6]、茎尖枯黄^[7]等问题,是制约试管苗生长和快速增殖的关键因素。现以河北工程大学试验基地欧李优系当年生茎段为外植体,诱导腋芽形成不定芽丛后,在试管苗增殖期间,研究不同生长调节物质组合、基本培养基类型、附加物和蔗糖浓度等方面对试管苗生长状态和增殖系数的影响,确定其最适的增殖培养条件,以期对欧李优系规模化快速繁殖提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为河北工程大学实习基地引自河北涉县山地的欧李优系植株,2014年4月取半木质化茎段做外植体培养的试管苗用于后续试验。

1.2 试验方法

将欧李试管苗丛剪成含3~4个不定芽的芽丛,转接到各处理培养基,每瓶转接不定芽丛4~5个。4周后观察各处理的生长状况,统计平均增殖系数。若无特殊说明,每处理的培养基中均含蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂5.8 g·L⁻¹,pH 5.8。培养温度25℃,培养箱光照强度3 000 lx。

1.2.1 生长调节物质的筛选 选择MS为基本培养基,添加不同浓度6-BA、KT和IBA进行组合。试验共设

6个处理,每处理接种10~12瓶,3次重复。统计各处理试管苗的增殖系数和生长状况。

1.2.2 基本培养基的筛选 基本培养基分别选用MS、改良MS(铁盐和KH₂PO₄均增加1/4倍)、B₅,每种基本培养基均添加6-BA 0.5 mg·L⁻¹、KT 0.5 mg·L⁻¹、IBA 0.05 mg·L⁻¹,每处理接种22~25瓶。

1.2.3 附加成分的筛选 在MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹培养基中,分别添加水解乳蛋白(LH)100 mg·L⁻¹、水解乳蛋白(LH)300 mg·L⁻¹、马铃薯汁50 mg·L⁻¹、马铃薯汁100 mg·L⁻¹、AgNO₃ 2 mg·L⁻¹、AgNO₃ 5 mg·L⁻¹,以不加附加物为对照。每处理接种22~25瓶。

1.2.4 光照强度的筛选 在前期试验的基础上,选择3个光照强度2 500、3 000、3 500 lx,分别全光照和光周期16 h·d⁻¹,共6个处理,每处理接种22~25瓶。

1.2.5 蔗糖浓度的筛选 在MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹+LH 300 mg·L⁻¹培养基中,分别添加蔗糖30、35、40 g·L⁻¹,共3个处理,每处理接种25瓶。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS统计软件分析。

2 结果与分析

2.1 生长调节物质的确定

将欧李试管苗转接到含有不同浓度生长调节物质组合的培养基上,生长状况与增殖系数有明显不同。由表1可知,处理1和处理2不定芽发生数量少,增殖系数低。随着6-BA和IBA浓度的提高,增殖系数有显著提高,但试管苗开始出现玻璃化现象。处理3、4、5、6的增殖系数均与前2个处理达到差异显著水平,但各处理均有不同程度玻璃化现象。为保证试管苗有较高增殖系数

第一作者简介:梁伟玲(1970-),女,河北邯郸人,实验师,现主要从事园艺植物组织培养等研究工作。E-mail:lwlsrx@163.com。

基金项目:邯郸市科技局资助项目(1327101071-2)。

收稿日期:2016-04-29

同时,玻璃化苗发生较少,选择处理 5(即 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹) 作为欧李试管苗增殖期间最适的生长调节物质组合,增殖系数可达 5.3。

表 1 欧李试管苗在不同生长调节物组合培养基上的生长状况

Table 1 Growth status of *Prunus humilis* plantlets in medium composed of various growth regulating substance

培养基 Medium	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA / (mg·L ⁻¹)	KT 浓度 Concentration of KT / (mg·L ⁻¹)	IBA 浓度 Concentration of IBA / (mg·L ⁻¹)	生长状况 Growth status	平均增殖系数 Average proliferation coefficient
1	0.5	0	0.05	不定芽较少	4.1b
2	0.5	0	0.10	不定芽少,基部膨大成愈伤组织	3.4c
3	1.0	0	0.05	不定芽多,枝叶细弱,玻璃化苗较多	5.5a
4	1.0	0	0.10	不定芽多,枝叶细弱,玻璃化苗较多	5.2a
5	0.5	0.5	0.05	不定芽多,有少量玻璃化苗	5.3a
6	0.5	0.5	0.10	不定芽较多,有玻璃化苗	5.0a

2.2 基本培养基的确定

由表 2 可知,在改良 MS 上试管苗生长势强,叶片深绿,明显增大,茎尖和叶尖变褐坏死现象明显改善,但增殖系数明显下降。B₅ 培养基上叶片边缘有不同程度的向下翻卷,增殖系数也较低。MS 培养基的试管苗长势虽然相对较弱,但能保持原有的增殖系数。因此,为了达到快速繁殖的目的,仍选择 MS 作为基本培养基,通过添加其它附加物解决茎尖、叶尖变褐、坏死的问题。

2.3 附加成分的确定

在 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹ 培养基中,添加不同种类和浓度的附加物。从表 3 可以看出,添加 AgNO₃ 培养基的试管苗茎尖、叶尖坏死状况均没有明显改善,增殖系数也比对照低(图 1)。添加马铃薯汁的培养基中,试管苗茎尖变褐坏死状况略有减轻,叶片舒展,但叶片明显变黄绿色,

增殖系数亦有所降低(图 2)。添加水解乳蛋白(LH)的试管苗增殖系数均比对照有所提高,同时茎尖及叶尖坏死现象明显减少。因此,最合适的添加物种类及浓度为水解乳蛋白(LH)300 mg·L⁻¹。

表 2 欧李试管苗在不同基本培养基上的生长状况

Table 2 Growth status of *Prunus humilis* plantlets in various basic medium

培养基 Medium	叶片生长状况 Growth status of leaves	每瓶茎尖坏死数量 Number of stem apex necrosis per bottle/个	平均增殖系数 Average proliferation coefficient
MS	叶片、茎尖均有变褐坏死现象	4.2	5.3
改良 MS	叶片深绿、较大,茎尖坏死较少死现象	1.9	2.7
B ₅	叶片、茎尖均有变褐坏死现象,叶片较小	4.5	4.8

表 3 欧李试管苗在不同附加物培养基上的生长状况

Table 3 Growth status of *Prunus humilis* plantlets in medium with various additives

附加物 Additives	生长状况 Growth status	每瓶茎尖坏死数量 Number of stem apex necrosis per bottle/个	平均增殖系数 Average proliferation coefficient
2 mg·L ⁻¹ AgNO ₃	茎尖、叶尖坏死现象无改善	4.0	5.2
5 mg·L ⁻¹ AgNO ₃	茎尖、叶尖坏死现象无改善	4.3	5.1
50 mg·L ⁻¹ 马铃薯汁	叶片黄绿色,茎尖坏死略有改善	3.2	5.0
100 mg·L ⁻¹ 马铃薯汁	叶片黄绿色,茎尖坏死改善不明显	3.5	4.8
100 mg·L ⁻¹ LH	茎尖坏死及叶尖坏死较少	2.8	5.4
300 mg·L ⁻¹ LH	茎尖、叶尖坏死较少	1.6	5.7
对照 CK	茎尖、叶尖坏死较多	4.2	5.3



图 1 培养基添加 AgNO₃ 的试管苗
Fig. 1 Plantlets in medium added AgNO₃



图 2 培养基添加马铃薯汁的试管苗
Fig. 2 Plantlets in medium added potato juice

2.4 光照条件的确定

欧李试管苗在不同光照条件下的生长增殖状况见表4。从光照强度来看,较低的光照强度下,试管苗不定芽枝叶较弱,玻璃化程度较重。随着光照强度的增强,枝叶逐渐健壮,玻璃化程度有所减轻。但3 000 lx与3 500 lx光照强度下,试管苗的生长状态和增殖系数均

没有明显差别。从光周期来看,相同的光照条件下,全光照和光周期16 h·d⁻¹无明显差别。因此,从节约能源的角度,继代增殖期间,选择3 000 lx光照强度条件下,光周期16 h·d⁻¹即可。从每瓶玻璃化枝条的发生数量来看,仅通过提高光照强度减轻玻璃化的发生是不可行的。还需要其它因素的进一步改善。

表4 欧李试管苗在不同光照条件下的生长状况
Table 4 Growth status of *Prunus humilis* plantlets under different illumination conditions

光照条件 Illumination conditions	生长状况 Growth status	平均每瓶玻璃化枝条数量 Number of vitrification branch per bottle/个	平均增殖系数 Average proliferation coefficient
2 500 lx,全光照	不定芽枝叶较弱,玻璃化苗较多	4.6	5.1
2 500 lx,光周期16 h·d ⁻¹	不定芽枝叶较弱,玻璃化苗较多	4.5	4.9
3 000 lx,全光照	不定芽枝叶正常,玻璃化苗较少	3.1	5.1
3 000 lx,光周期16 h·d ⁻¹	不定芽枝叶正常,玻璃化苗较少	3.0	5.2
3 500 lx,全光照	不定芽枝叶正常,玻璃化苗较少	3.1	5.2
3 500 lx,光周期16 h·d ⁻¹	不定芽枝叶正常,玻璃化苗较少	3.2	5.3

2.5 蔗糖浓度的确定

从表5可以看出,蔗糖浓度不仅影响试管苗的增殖系数,也影响试管苗的生长状态和玻璃化程度。其中,随着蔗糖浓度的提高,玻璃化程度降低,每瓶玻璃化枝条的数量明显减少,但蔗糖达到40 g·L⁻¹时,虽然玻璃化程度最轻,但是此时叶片变成苍绿色,边缘略卷曲,增殖系数下降(图3)。蔗糖为35 g·L⁻¹时,玻璃化枝条的数量明显减少,叶色葱绿舒展,生长健壮,为最适合的蔗糖浓度,增殖系数可达5.6(图4)。

表5 欧李试管苗在不同蔗糖浓度培养基上的生长状况
Table 5 Growth status of *Prunus humilis* plantlets in medium with different sucrose concentration

蔗糖浓度 Sucrose concentration /(g·L ⁻¹)	生长状况 Growth status	平均每瓶玻璃化枝条数量 Number of vitrification branch per bottle /个	平均增殖系数 Average proliferation coefficient
30	少量叶片卷曲,水浸状	3.0	5.2
35	叶片绿色、平展,长势良好	1.8	5.6
40	叶片苍绿色,不舒展	1.2	4.3



图3 培养基蔗糖浓度过高的试管苗
Fig.3 Plantlets in medium added high concentration sucrose



图4 最佳成分培养基上增殖的试管苗
Fig.4 Plantlets in the optimal proliferation medium

3 结论与讨论

欧李试管苗增殖的最佳培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹+水解乳蛋白(LH)300 mg·L⁻¹+蔗糖35 g·L⁻¹+琼脂5.8 g·L⁻¹,光周期16 h·d⁻¹,光照强度3 000 lx,培养温度25℃。在此条件下,试管苗能保持5.6的增殖系数,同时能较好的控制玻璃化的发生和茎尖、叶尖变褐坏死现象。

欧李试管苗增殖期间,细胞分裂素类对不定芽的增殖系数起着关键作用,6-BA促进不定芽发生的效果明显。当6-BA浓度较低时不定芽发生数量少,增殖系数低。随着6-BA浓度的提高,增殖系数有显著提高,但试管苗开始出现玻璃化现象。该试验表明,6-BA与KT配合使用优于6-BA单独使用时的效果,既能保证较高的增殖系数,也能保证试管苗的正常生长。这与庄丽娟等^[4]的报道相一致。6-BA与KT混合使用对于试管苗增殖的影响有待进一步研究。

增殖期间的欧李试管苗出现了茎尖、叶尖坏死现象。试验表明,虽然试管苗在MS、改良MS和B₃3种基

本培养基和不同生长调节物质组合培养基上的生长状况有所差异,但均未能抑制此现象的发生。由此说明,茎尖、叶尖坏死亡是由多种综合因素引起的。以 MS 为基本培养基,添加合适生长调节物质的前提下,添加合适浓度的水解乳蛋白对欧李试管苗茎尖、叶尖坏死有一定的抑制作用。

玻璃化是很多植物离体培养期间出现的生理病变,与光照强度、环境空气湿度、生长调节物质、培养基渗透势等多种因素有关^[8]。欧李试管苗的玻璃化现象,仅通过增加光照强度和延长光照时间难以有效控制,通过适当增加蔗糖浓度,对抑制玻璃化的发生有良好效果。欧李试管苗玻璃化发生的机理有待进一步研究。

参考文献

[1] 王有信. 欧李综合开发前景与模式[J]. 山西果树, 2010, 31(1): 41-43.

[2] 张东为, 贾天会, 舒乔生. 水保优良树种欧李的研究进展及今后研究方向[J]. 中国水土保持, 2012, 34(1): 45-47.

[3] 刘明, 穆晓鹏, 薛晓芳, 等. 欧李生物技术研究进展及其应用展望[J]. 落叶果树, 2010, 42(5): 15-17.

[4] 庄丽娟, 苏福才. 欧李的组织培养与快速繁殖技术[J]. 内蒙古农业大学学报, 2005, 26(1): 16-19.

[5] 孙新政, 申顺先, 李庆伟, 等. 钙果 4 号欧李组织培养技术研究[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 80-83.

[6] 陈书明, 姜英淑, 王秋玉. 欧李组培快速繁殖体系的建立[J]. 林业科技, 2008, 33(2): 59-62.

[7] 焦淑华, 林丽华, 李宝江. 欧李绿枝组织培养与快速繁殖研究[J]. 北方园艺, 2006(3): 117-119.

[8] 刘霞, 孙冲. 木本植物试管苗玻璃化成因与控制研究进展[J]. 西南林业大学学报, 2013, 33(5): 93-97.

Key Proliferation Technology of *Prunus humilis* Fine Strains Plantlets *in vitro*

LIANG Weiling, LU Yanqi, CHEN Cuiguo, LIU Yanfen

(College of Agriculture, Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056021)

Abstract: By single factor text, the effects of various basic culture medium, growth regulator combination, additions and sucrose concentration were studied on growth status and proliferation rate of *Prunus humilis* fine strains *in vitro* plants. The results indicated that the optimal medium of proliferation was MS+6-BA 0.5 mg · L⁻¹+KT 0.5 mg · L⁻¹+IBA 0.05 mg · L⁻¹, additional LH 300 mg · L⁻¹, sugar 35 g · L⁻¹, agar 5.8 g · L⁻¹.

Keywords: *Prunus humilis*; plantlets *in vitro*; proliferation; key technology

欢迎订阅《北方园艺》

《北方园艺》于 1977 年创刊,是面向国内外公开发行的以科学研究和技术普及相结合的园艺类综合性学术期刊。

主要栏目: 试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、贮藏保鲜加工、食用菌、中草药、新品种选育、资源与环境、产业论坛、专题综述、经验交流、农业经纬,内容涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉等研究领域的新成果、新技术、新品种、新经验。

取得成绩: 连续 7 次入选全国中文核心期刊、中国农业核心期刊、美国化学文摘社收录期刊;全国优秀农业期刊、中国北方优秀期刊、黑龙江省优秀期刊;2 次入选“农家书屋”推荐目录;2015 年获“期刊数字影响力 100 强”称号。

刊物信息: 国内外公开发行,半月刊,每月 15、30 日出版,每册定价 15.00 元,全年 360.00 元。中国标准连续出版物号:CN23-1247/S;国际标准连续出版物号:ISSN 1001-0009,邮发代号 14-150,国外代号:BM 5011。

网址:www.haasep.cn.

电话:0451-86674276

邮箱:bfiybjb@163.com

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部