

陈晓丹, 李爱民, 张正海, 等. 蓬蘽悬钩子组织培养繁殖技术[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 74-76.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.020

蓬蘽悬钩子组织培养繁殖技术

陈晓丹, 李爱民, 张正海, 张悦

(中国农业科学院特产研究所, 吉林长春 130112)

摘要:以蓬蘽悬钩子的带腋芽嫩茎段为外植体, 建立组织培养再生体系。结果表明: 适宜腋芽诱导培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA, 诱导率可达 86.7%; 适宜增殖培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA; 适宜生根培养基为改良的 1/2MS + 0.1 mg/L NAA; 适宜炼苗时间为 7 d, 移栽成活率可达 98%; 以 6 月中旬移栽到田的当年苗木生长发育状态最佳。

关键词:蓬蘽悬钩子; 初代培养; 继代培养; 根诱导; 移栽

中图分类号: S663.204+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0074-02

蓬蘽悬钩子 (*Rubus crataegifolius* Bunge) 为蔷薇科 (Rosaceae) 悬钩子属 (*Rubus*) 植物, 别称托盘儿、覆盆子等, 是我国长白山区分布量较大的野生树莓种质资源。蓬蘽悬钩子抗寒性强, 果实品质好、营养丰富^[1], 且根、茎、叶、果均可入药^[2-3], 开发利用前景广阔。2013 年以来, 笔者在系统开展蓬蘽悬钩子野生驯化研究的同时, 进行组织培养快繁技术研究, 以期优良种质资源快速高效利用、建立我国寒地特色树莓产区、实现栽培良种化和生产规范化提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料(嫩茎)取自中国农业科学院特产研究所实验基地(吉林市昌邑区左家镇)蓬蘽悬钩子栽培试验园。

1.2 试验方法

1.2.1 启动培养 在 5 月中下旬, 选择生长健壮且无病虫害的蓬蘽悬钩子单株, 剪取嫩梢。在室内剪去嫩梢叶片, 剪成 2 cm 左右的带芽茎段。茎段用适当浓度洗衣粉液浸泡 20 min, 自来水冲洗 12 h 后接种。接种前先用 75% 乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 再以 0.1% HgCl₂ 溶液处理 10 min, 用无菌水冲洗 4~5 次。将消毒茎段上下部切去少许, 分别接种于 B5、MS、改良的 1/2MS (大量元素、微量元素、铁盐和肌醇均减半) 和改良的 1/4MS (大量元素、微量元素、铁盐和肌醇均减为正常量的 1/4) 的诱导培养基上 (以上培养基均附加 0.5 mg/L 6-BA、0.1 mg/L NAA), 每个处理接种 20 瓶, 每瓶 3 个茎段。接种后, 每周观察外植体生长状况, 2 周后统计侧芽萌动情况, 计算萌发率。

萌芽率 = 萌芽数 / 接种数 × 100%;

平均萌芽数 = 萌芽总数 / 接种数。

1.2.2 继代培养 将启动培养中获得的无菌芽苗进行增殖培养。以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA (0.5、1.0、1.5 mg/L) 和 NAA (0.1、0.2、0.3 mg/L), 每个处理 3 次重复, 每个处理接种 10 瓶 (每瓶 4 个外植体), 50 d 后观察芽的分化和生长状况, 并统计分析各处理芽的增殖倍数。

1.2.3 生根培养 将继代培养得到的大量增殖苗分离后转入生根培养基中。生根培养以改良的 1/2MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 NAA (0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.40 mg/L), 每种培养基接种 15 瓶 (每瓶 3 株无根苗), 接种 30 d 后, 观察试管苗生根和苗木生长情况并统计生根率、平均生根数和平均根长。相关公式为: 生根率 = 生根苗数 / 接种数 × 100%; 平均生根数 = 总根数 / 生根苗数; 平均根长 = 根的总长度 / 总生根数。

1.2.4 炼苗移栽 当根长至 2~3 cm 时, 将通过生根培养得到的生根苗分别进行 3、7、10 d 炼苗, 然后以细河沙与腐殖土按 1:3 的比例混合作为移栽基质, 在移栽前 1 d 用 0.2% 高锰酸钾溶液消毒基质并覆膜 24 h, 并加强移栽后的环境调控, 以期获得较高的移栽成活率。

1.2.5 当年苗木生长发育状况调查 分别于 5 月中旬、6 月中旬和 7 月中旬将移栽到营养钵中的小苗进行圃地栽培, 并于 5 个月, 即生长期结束后, 对其生长发育情况进行调查分析。相关公式为: 平均分蘖数 = 总分蘖数 / 总苗数; 平均茎粗 = 总茎粗 / 总苗数; 平均生长高度 = 生长高度总和 / 总苗数; 平均成熟高度 = 主干的平均生长高度 - 主干梢部枯死的平均长度。

1.3 培养条件

在以上培养基中加 3% 蔗糖、0.5% 琼脂, 调节 pH 值为 5.8~6.0。培养条件: 温度为 (25 ± 3) °C, 光照度为 1 000~2 000 lx, 光—暗周期为 14 h—10 h。

2 结果与分析

2.1 初代培养

表 1 试验结果表明, 不同的基本培养基中外植体的萌芽率差异显著, 其中基本培养基以 MS 对蓬蘽悬钩子嫩茎的诱导效果最好, 接种 3 d 后就开始启动萌发, 培养 20 d 时萌芽率达到 86.7%, 外植体在培养基上生长良好, 叶大嫩绿, 芽体

收稿日期: 2015-05-18

基金项目: 吉林省科技发展计划 (编号: 20110917)。

作者简介: 陈晓丹 (1987—), 女, 河南宝丰人, 硕士研究生, 从事药用植物研究。E-mail: 418088431@qq.com。

通信作者: 李爱民, 研究员, 主要从事药用植物研究。Tel: (0431) 81919871; E-mail: zuojialam@163.com。

较高;其次是改良的1/2MS、1/4MS,培养20 d时萌芽率分别达到66.7%、60.0%,外植体生长一般,叶梢小且偏黄绿色,芽体略矮小。而在B5培养基上,一方面外植体发生的褐化

现象严重,另一方面接种5 d后才开始缓慢萌发且萌芽率很低,只有28.5%,此外芽体很小,呈黄绿色。综合以上分析可知,蓬蘽悬钩子初代培养以MS作为基本培养基为宜。

表1 基本培养基中萌芽率的比较

| 培养基 | 接种数(个) | 启动时间(d) | 平均萌芽数(个) | 平均萌芽率(%) | 生长状态 |
|-------|--------|---------|----------|----------|------------------|
| B5 | 60 | 5 | 5.7d | 28.5a | 萌发的芽体叶很小,偏黄绿色,低矮 |
| MS | 60 | 3 | 17.3a | 86.7b | 萌发的芽体叶大,嫩绿色,较高且壮 |
| 1/2MS | 60 | 3 | 13.3b | 66.7c | 萌发的芽体叶稍小,嫩绿色,稍矮 |
| 1/4MS | 60 | 3 | 12.0c | 60.0d | 萌发的芽体叶偏小,黄绿色,较矮 |

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下表同。

2.2 增殖培养

将诱导得到的萌发芽体接种到增殖培养基中后,围绕芽体这一中心,都能分化出一定数量的不定芽。6-BA、NAA不同浓度组合的增殖倍数之间存在显著性差异,因为6-BA、NAA 2种激素与芽体增殖密切相关,激素的绝对浓度和搭配比例对组培苗的增殖有很大的影响。当6-BA浓度为1.0 mg/L、NAA浓度为0.2 mg/L时,增殖倍数最高,可达33.14;当6-BA浓度为1.5 mg/L、NAA浓度为0.1 mg/L时,增殖倍数次之,为32.85。这2个处理(即处理5、处理7)的增殖倍数没有显著差异(表2)。因此,适宜蓬蘽悬钩子的增殖培养基为MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA。

表2 6-BA和NAA浓度组合对增殖的影响

| 处理 | 6-BA浓度(mg/L) | NAA浓度(mg/L) | 接种数(个) | 增殖系数 |
|----|--------------|-------------|--------|--------|
| 1 | 0.5 | 0.1 | 40 | 23.30c |
| 2 | 0.5 | 0.2 | 40 | 19.20f |
| 3 | 0.5 | 0.3 | 40 | 14.50h |
| 4 | 1.0 | 0.1 | 40 | 28.70b |
| 5 | 1.0 | 0.2 | 40 | 33.14a |
| 6 | 1.0 | 0.3 | 40 | 20.65e |
| 7 | 1.5 | 0.1 | 40 | 32.85a |
| 8 | 1.5 | 0.2 | 40 | 21.55d |
| 9 | 1.5 | 0.3 | 40 | 16.95g |

2.3 根的诱导

不同浓度的NAA与蓬蘽悬钩子无根苗生根率均有密切关系,在9种培养基中都能诱导生根,即在生根培养基中不添加生长素也可生根。当NAA浓度为0.05、0.10 mg/L时,平均生根数之间差异不显著,但平均根长差异显著。当NAA浓度大于0.15 mg/L时,组培苗基部膨大产生愈伤组织块,植株矮小,叶片黄化,不适于移栽。根数越多,根长适宜且粗壮的,移栽成活率高(表3)。因此综合考虑,在改良的1/2MS培养基中,NAA浓度在0~0.10 mg/L范围内,幼苗生根数随着NAA浓度升高而增加;当NAA浓度大于0.10 mg/L时,生根数反而随着NAA浓度的升高而减少;蓬蘽悬钩子适宜的生根培养基为1/2MS + NAA 0.10~0.15 mg/L。

2.4 炼苗移栽

组培苗长期生长在光照、温度和湿度等相对适宜和稳定

表3 NAA浓度对生根的影响

| NAA浓度(mg/L) | 接种数(个) | 平均生根率(%) | 平均生根数(条/株) | 平均根长(cm) |
|-------------|--------|----------|------------|----------|
| 0 | 60 | 100 | 9.10ab | 1.20ef |
| 0.01 | 60 | 100 | 9.35ab | 2.65c |
| 0.05 | 60 | 100 | 10.31a | 2.88cd |
| 0.10 | 60 | 100 | 11.21a | 4.42ab |
| 0.15 | 60 | 100 | 8.89ab | 4.86a |
| 0.20 | 60 | 100 | 7.73bc | 3.37bc |
| 0.25 | 60 | 100 | 6.32c | 2.09cd |
| 0.30 | 60 | 100 | 5.95cd | 1.03ef |
| 0.40 | 60 | 100 | 3.67d | 0.75f |

的环境中,体表几乎没有什么保护组织,如果直接移栽到外界环境中,因其本身适应性差,再加上环境变化较大,很难成活。因此需要进行适当的“炼苗”,使其能逐步适应外界的环境变化,提高成活率。不同的炼苗时间处理下组培苗的移栽成活率差异显著。当炼苗时间为3 d时,可能由于组培苗木质化程度低,仍处于“异养”状态,因此较难适应瓶外的环境,从而使成活率大大降低;当炼苗时间为10 d时,组培苗虽然已经达到“异养”状态,但是培养基已受到外界有菌环境的污染,且根部培养基干燥,较难清洗干净,残留的营养容易引起移栽苗烂根死亡,使成活率降低;而炼苗时间为7 d时,组培苗已经完成驯化且培养基较易清洗干净,移栽苗的成活率最高,可达98%(表4)。

表4 炼苗时间对移栽成活率的影响

| 炼苗时间(d) | 处理数(个) | 成活率(%) |
|---------|--------|--------|
| 3 | 100 | 37c |
| 7 | 100 | 98a |
| 10 | 100 | 62b |

2.5 当年苗木生长发育状况调查

只有将组培苗进行圃地栽培,才能达到苗木繁育的最终目的。5月中旬将苗移栽到大地,此时气温和地温等均较低,不利于根系的生长;6月中旬气温和地温都有所上升,苗木生长较好;而7月中旬移栽苗木时,苗的整体生长期大大缩减。因此从平均分蘖数、平均茎粗、平均成熟高度、平均生长高度等几个方面综合考虑,组培苗进行圃地栽培时,以6月中旬移栽入大地较为适宜(表5)。

表5 当年苗木生长发育情况调查结果

| 移栽时间 | 总苗数(株) | 平均分蘖数(个) | 平均侧枝数(个) | 平均茎粗(mm) | 平均生长高度(cm) | 平均成熟高度(cm) |
|------|--------|----------|----------|----------|------------|------------|
| 5月中旬 | 170 | 3.33 | 0.47 | 3.12 | 70.36 | 63.38 |
| 6月中旬 | 176 | 2.32 | 1.94 | 4.17 | 79.99 | 72.17 |
| 7月中旬 | 172 | 2.19 | 1.02 | 2.36 | 64.83 | 51.24 |

郭婷婷,周晓婴,张维,等.甘蓝型油菜离体培养再生体系的优化[J].江苏农业科学,2016,44(7):76-79.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.021

甘蓝型油菜离体培养再生体系的优化

郭婷婷^{1,2},周晓婴²,张维²,陈锋²,彭琦²,陈松²,张洁夫²

(1.南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏南京 210095;

2.江苏省农业科学院经济作物研究所/农业部长江下游棉花与油菜重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:为优化甘蓝型油菜离体培养再生体系,本研究分析了影响再生频率的多个关键因素,包括品种、外植体类型、苗龄、预培养时间以及激素浓度与配比等。结果表明:品种对再生频率影响较大,Westar的外植体再生频率高于宁油18号和中双11号;不同外植体再生频率也存在差异,子叶柄的再生频率显著高于下胚轴;苗龄以4 d较好,预培养时间以2 d较适宜;预培养基中激素2,4-D最适浓度为1 mg/L,分化培养基中,6-BA/NAA比例为10:1时子叶柄的再生频率最高,为70.79%,6-BA/NAA比例为9:1时下胚轴的再生频率最高,达到96.73%。经过优化后,油菜外植体再生频率得到显著提高。

关键词:油菜;离体培养;再生;优化;影响因素

中图分类号: S634.304+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0076-04

油菜为世界第二大油料作物^[1-3],也是我国重要油料作物之一,在人类的生活和农业生产上有着极其重要的作用。油菜花具有一定观赏价值,可用作旅游资源;油菜的茎叶可食用,还可用来饲养动物;油菜种子不仅可用来榨取食用油,饼粕还可用来做饲料。此外,油菜属于可再生资源,低芥酸菜籽油中的脂肪酸碳链组成与柴油分子碳数相近,因此被认为是生物柴油最理想的原料^[4]。当今育种学家把提高油菜产量和品质,培育抗病和抗逆油菜新品种作为重要内容来研究^[5]。

目前,组织培养技术被广泛地应用到油菜育种中^[6],并得到了大量不同优良特性的油菜种质资源^[7-12]。高效的植株再生体系是油菜基因工程育种中的重要环节。在已有的研究报道中^[13-18],油菜可用下胚轴、子叶柄、根、茎、小孢子等作为外植体来进行组织培养。经过多年研究,国内外许多机构已建立了较为成熟的油菜离体培养再生体系^[19-21]。然而,研究表明,在油菜组织培养中,不同基因型、不同外植体之间的最佳再生条件存在差异,这在一定程度上阻碍了油菜转基因研究的发展。本研究主要对影响油菜离体培养再生体系的关键因素进行分析,以期摸索出一套稳定、高效的油菜遗传转化体系,为油菜组织培养提供基础数据,并进一步为通过植物转基因技术获得预期优良性状的油菜新种质奠定基础。

收稿日期:2015-06-10

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2010BAD01B10);江苏省科技支撑计划(编号:BE2013435);江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(13)2023]。

作者简介:郭婷婷(1989—),女,安徽蚌埠人,硕士研究生,研究方向为油菜遗传育种。E-mail:954640585@qq.com。

通信作者:张洁夫,博士,研究员,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail:jjefu_z@163.com。

3 结论与讨论

本研究以蓬蘽悬钩子嫩梢为试验材料,将带腋芽茎段用75%乙醇消毒30 s,再用0.1% HgCl₂溶液消毒10 min,最后,接种到MS培养基上。最佳的增殖培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA,其次为MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;进行壮苗培养时,最适宜的培养基为MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA或者MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;瓶内生根最适培养基为改良的1/2MS+0.10~0.15 mg/L NAA,生根率为100%,平均根数最多可达11.21条/株,平均根长最长可达4.86 cm,根粗壮。对组培苗当年植株生长发育情况调查发现,以6月中旬移栽到大田的生长发育状态最佳。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试油菜品种有Westar、宁油18号、中双11号,由江苏省农业科学院经济作物研究所提供。

蓬蘽悬钩子因其具有较高营养保健价值,日益受到人们的青睐,对其进行组织培养快繁技术研究,可实现野生资源的最大化利用。本研究以蓬蘽悬钩子带腋芽茎段为试材,采用不同培养基、植物激素及其浓度组合,建立了稳定的离体快繁体系,为今后组培苗的工厂化生产提供技术指导,更重要的是可对优质品种的推广利用提供经验借鉴。

参考文献:

- [1]赵伟伟,李爱民,张正海,等.野生树莓蓬蘽悬钩子光合特性研究[J].中国果树,2014(1):28-30.
- [2]和加卫,唐开学,杨静全,等.云南省悬钩子属药用植物资源研究[J].中草药,2005,36(7):1078-1081.
- [3]解瑞彬,李秋菊,曹媛媛,等.树莓的组织培养快繁研究[J].天津农业科学,2009,15(3):23-25.