

马媛春,张粉粉,程宗明. 柳叶栒子组培快繁体系的建立[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):50-53.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.011

柳叶栒子组培快繁体系的建立

马媛春,张粉粉,程宗明

(南京农业大学园艺学院,江苏南京 210095)

摘要:以柳叶栒子的实生苗为试验材料,建立无性快繁体系。结果表明,适宜的初代培养基为 MS + 0.8 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA) + 0.02 mg/L α -萘乙酸(NAA) + 1.2 mg/L PPM(plant preservative mixture,植物组培抗菌剂);最适宜柳叶栒子继代增殖的培养基是 MS + 1.0 mg/L 6-BA;最适宜柳叶栒子的生根培养基是 F + 0.05 mg/L NAA;生根苗驯化移栽后的成活率可达 72% 以上。

关键词:柳叶栒子;组织培养;腋芽诱导;继代增殖;驯化移栽

中图分类号: S686.04⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0050-04

柳叶栒子(*Cotoneaster salicifolius*)为栒子属植物,多生于山地沟边杂林中、海拔 1 800~3 000 m 处,一般分布于我国的湖北、湖南、四川、贵州等地^[1]。柳叶栒子的叶片呈革质而油亮,果实红而累累,不但可以作为一种优美的园林植物来应用,而且柳叶栒子是一味珍贵的中药材,对于治疗咳嗽、除风热有很好的疗效。我国对栒子属植物的研究和开发利用起步较晚。过去柳叶栒子主要依靠播种繁殖,不仅繁殖速度慢,繁殖的量也很少,柳叶栒子并没有发挥其应有的园林及药用价值,关于柳叶栒子的研究更是少之又少,几乎没有。而如今,随着组织培养^[2]和细胞培养^[3]等新技术的产生,使得柳叶栒子的大量扩繁有了可能,通过组织培养技术将可以在短时间内培育出大量柳叶栒子幼苗。除柳叶栒子外,我国还有 57 种栒子植物,约占全世界栒子植物数量的 2/3,但是全国各地对于栒子引种栽培的报道很少^[4-6],关于组培快繁成功的案例更是少之又少。所以通过建立柳叶栒子组培快繁体系,对栒子属植物的组培快繁体系的研究也有帮助。

收稿日期:2017-08-07

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(16)1005]。

作者简介:马媛春(1986—),女,甘肃临夏人,博士,助理研究员,主要从事果树系统生物学研究。E-mail:myc@jaas.ac.cn。

通信作者:程宗明,博士,教授,主要从事果树系统生物学研究。E-mail:zmc@njau.edu.cn。

4 结论

本研究以山东银莲花幼嫩茎段为外植体,分析了外植体消毒和不同激素配比对增殖、生根培养的影响,成功建立了其组织培养植株再生体系。结果表明,1% HgCl₂ 处理 10 min 可以降低外植体污染率、褐化率,存活率较高;最佳增殖培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 25 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂;最佳生根培养基为 1/2 MS + 10.0 mg/L IBA + 35 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂;最佳组培苗移栽基质配比为珍珠岩、蛭石、草炭体积比为 1:2:2。从外植体培养到植株再生共需 16 周左右。山东银莲花组培再生体系的建立为进一步探讨其遗传多样性奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以柳叶栒子的实生苗为试验材料(种子来自加拿大的城市公园,于 2016 年 3 月份播种于南京农业大学生科楼 7 楼果树生物学实验室育苗室),进行消毒灭菌后,接种培养。

1.2 方法

1.2.1 外植体灭菌 选取长势较好的实生苗,剪切成 4 cm 左右的带芽茎段作为试验材料,放入容器中,在自来水下冲洗 2 h,后移至超净工作台内,用 70% 乙醇浸泡外植体 30 s 后用无菌水冲洗 3 次,然后用浓度为 4% 的次氯酸钠分别处理 3、4、5、6 min,再用无菌滤纸吸干茎段表面的水分^[7],将其切成 1 cm 左右的带芽茎段,最好可以保留 1~2 张小叶片,再接种^[8]。每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 1 个外植体,重复 3 次,30 d 后统计成活率。

1.2.2 腋芽诱导培养 将无菌茎段接种到腋芽诱导培养基上,首先为了确定腋芽在何种基本培养基上诱导的效果更好,选取 MS、1/2MS、1/2WPM 3 种基本培养基^[9],在 3 种基本培养基内添加浓度相同的 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)^[10]进行预试验,20 d 后发现,腋芽在 MS 培养基上诱导的效果最好,因此在初代培养时选择 MS 作为基本培养基,另外发现,在培养基中加入抗菌物质 1.2 mg/L PPM(plant preservative mixture,

参考文献:

- [1]王 莺,逢玉娟,刘传林,等. 稀有植物山东银莲花(*Anemone shikokiana* (Makino) Makino)的分布格局及影响因子分析[J]. 植物研究,2014,34(4):440-445.
- [2]臧得奎,李 健,于东明. 山东特有野生花卉的初步研究. 烟台师范学院学报,1999,15(3):221-224.
- [3]臧得奎,孙述涛. 山东植物区系中的特有现象[J]. 西北植物学报,2000,20(3):454-460.
- [4]徐晓艳,刘庆超,刘庆华,等. 山东银莲花种子萌发特性研究[J]. 北方园艺,2011(6):72-74.
- [5]刘 琼. 山东银莲花的遗传多样性研究[D]. 济南:山东师范大学,2014.

植物组培抗菌剂)可以大大降低污染率^[11-12]。由于初代培养的目的是为了诱导新芽,因此加入的细胞分裂素的浓度应高一些,生长素的浓度应该低一些^[13-14],本试验选取的细胞分裂素为 6-BA,浓度为 0.5~3.0 mg/L,生长素为 NAA(即 α -萘乙酸,在预试验中,得出最适宜的 NAA 浓度为 0.02 mg/L),共组成 4 种培养基:MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA + 1.2 mg/L PPM、MS + 0.8 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA + 1.2 mg/L PPM、MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA + 1.2 mg/L PPM、MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA + 1.2 mg/L PPM。在每种培养基接种 20 瓶,每瓶接种 1 个外植体,先放置在暗环境^[15-16]中培养 1 周,再移至光环境下培养,来减轻褐化现象^[17-18],重复 3 次,30 d 后统计腋芽萌发率。

1.2.3 丛生芽增殖培养 将初代培养 30 d 的组培苗新生芽剪下,切成 1 cm 左右的带芽茎段,保留 1~2 张小叶片,转入继代培养基进行增殖培养。首先经过预试验,确定继代培养的最佳基本培养基也是 MS 培养基,并且发现继代培养时不适宜加入 NAA、IBA,只适宜加入 6-BA^[19-21],浓度为 0.5~2.0 mg/L,共组成 4 种培养基:MS + 0.5 mg/L 6-BA、MS + 1.0 mg/L 6-BA、MS + 1.5 mg/L 6-BA、MS + 2.0 mg/L 6-BA,每种培养基接种 20 瓶,每瓶接种 1 个外植体,重复 3 次,30 d 后统计增殖率。

1.2.4 壮苗培养 由于前面阶段所获得的柳叶栒子无茵苗都比较矮小,不适宜直接用于诱导生根,需要经过壮苗培养,使苗长得强壮一些再进行生根培养。

1.2.5 生根培养 这个阶段主要是诱导组培苗生出不定根^[22-23]。在壮苗培养的过程中发现,组培苗在 1/2MS、F 培养基内有生根现象,因此选择 F、1/2MS 作为生根的基本培养基。另外在壮苗培养中还发现,生长素浓度过高的培养基中几乎没有生根现象^[14],因此在生根培养基中选择加入低浓度的 NAA,浓度为 0~0.1 mg/L,IBA 浓度为 0~0.3 mg/L,共组成 8 种培养基:1/2MS + 0.05 mg/L NAA、1/2MS + 0.1 mg/L IBA、1/2MS + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA、1/2MS + 0.3 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA、F + 0.05 mg/L NAA、F + 0.1 mg/L IBA、F + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA、F + 0.3 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA。每种培养基接种 20 瓶,每瓶接种 1 个外植体,重复 3 次,30 d 后统计生根率。

1.2.6 组培苗的驯化移栽

1.2.6.1 组培苗的驯化 将生根健壮的组培苗从培养室移出来,放入温室内,共 6 种炼苗方式:闭瓶炼苗 0 d,开瓶炼苗 0 d;闭瓶炼苗 0 d,开瓶炼苗 7 d;闭瓶炼苗 7 d,开瓶炼苗 0 d;闭瓶炼苗 4 d,开瓶炼苗 3 d;闭瓶炼苗 7 d,开瓶炼苗 4 d;闭瓶炼苗 7 d,开瓶炼苗 7 d。每种方式处理 20 瓶,每瓶 1 个外植体,重复 3 次。为了防止在开瓶炼苗期间湿度降低造成小苗干枯,每天要定时用纯净水喷洒小苗 1 次。

1.2.6.2 组培苗的驯化 在经过一段时间的炼苗处理之后,将长势依旧茁壮的小苗从瓶中移出来,在移出来的过程中要用镊子慢慢地小心地夹取小苗,以免小苗受到破坏。然后再将小苗放在自来水下,将残留的培养基物质冲洗干净。另外还要剪去小苗多余的叶片,以降低小苗的蒸腾作用,冲洗干净后把小苗移入蛭石、泥炭土、珍珠岩体积比=2:1:1 的基质

中,移栽之前应对基质进行灭菌,本试验采用的方法是将基质放入高压蒸汽灭菌锅内灭菌 3 h,再冷却 1 d,待气味散去之后再继续进行移栽。

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌

污染率随着消毒时间的增加而减少,但是褐化率却几乎随着消毒时间的增加而升高,当用 4% 次氯酸钠消毒 5 min 时,组培苗的成活率最高,因此先用浓度为 70% 的乙醇对外植体消毒 30 s,再用浓度为 4% 的次氯酸钠消毒 5 min 是最适宜的灭菌方式。

2.2 腋芽诱导

6-BA 对腋芽诱导有很大的影响,结果见表 1。从生长情况来看,经过 30 d 初代培养后,各培养基内的生长情况有很大区别,当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,丛生芽几乎纠结成团,变畸形,颜色有些呈深褐色,详见图 1。当 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时,丛生芽比较细弱,还有些玻璃化,颜色较淡。当 6-BA 浓度为 0.8 mg/L 时,丛生芽长势较好,颜色正常,详见图 2。从各培养基内丛生芽的数量来看,当 6-BA 浓度为 0.8 mg/L 时,丛生芽数量最多,平均有 12.33 个,诱导率也最高,为 61.65%;不添加 6-BA 的 MS 培养基中一直都没有产生丛生芽;而当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,丛生芽的数量平均只有 3.33 个,诱导率仅为 16.65%。另外,各培养基内丛生芽的数量随着时间的变化趋势也不尽相同,最早产生丛生芽的培养基是 MS + 0.8 mg/L 6-BA,且丛生芽数量一直在增加,增加得也最快;最晚产生丛生芽的培养基是 MS + 2.0 mg/L 6-BA,丛生芽的数量基本保持不变。综上可以得出,最适宜的腋芽诱导培养基是 MS + 0.8 mg/L 6-BA。

表 1 不同浓度 6-BA 对腋芽诱导的影响

培养基	诱导率 (%)	生长情况
MS	0e	无丛生芽
MS + 0.5 mg/L 6-BA	41.65b	丛生芽少,较矮小
MS + 0.8 mg/L 6-BA	61.65a	丛生芽多,节间稍长
MS + 1.5 mg/L 6-BA	31.65c	丛生芽较少,节间短
MS + 2.0 mg/L 6-BA	16.65d	丛生芽很少,有畸形苗

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

2.3 丛生芽增殖

经过 30 d 的继代培养后发现,培养基中添加的 6-BA 浓度不同,丛生芽增殖的结果也不同,详见表 2。从丛生芽数量来看,随着 6-BA 浓度的逐渐升高,丛生芽的数量也在一定范围内逐渐增多,但当 6-BA 浓度过高时,即 MS + 2.0 mg/L 6-BA 培养基中丛生芽的数量反而比培养基 MS + 1.5 mg/L 6-BA 中的少很多。从组培苗的平均生长量来看,在 MS + 1.0 mg/L 6-BA 培养基中,丛生芽长得最快也最健壮,详见图 3;在培养基 MS + 2.0 mg/L 6-BA 上,丛生芽长得很慢,有畸形苗,长势最差,详见图 4。从整体上来看,最适宜的继代增殖培养基是 MS + 1.0 mg/L 6-BA。另外,在继代培养时还发现,继代次数对丛生芽增殖有一定的影响,在对柳叶栒子组培苗进行了 7 次继代后发现,丛生芽增殖能力最强的是第 3、



图1 培养基 MS+2.0 mg/L 6-BA 的腋芽诱导结果

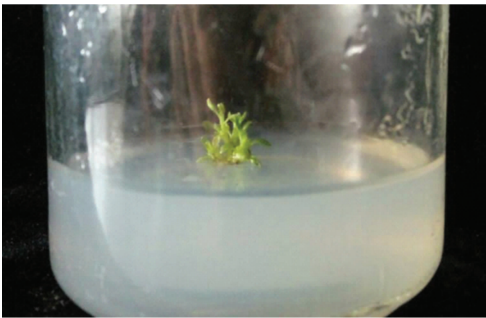


图2 培养基 MS+0.8 mg/L 6-BA 的腋芽诱导结果

4 次继代,增殖倍数分别为 8.95、9.25,增殖能力最弱的是第 7 次继代,增殖倍数仅为 3.90,第 4 次继代的增殖倍数比第 7 次的高 1 倍以上。前 4 次继代丛生芽的增殖能力都很强,而在第 5 次继代之后,增殖能力逐渐减弱。因此可以看出,继代

的次数不一定是越多越好,随着继代次数的增加,组培苗体内的激素也会慢慢积累,从而抑制组培苗增殖。因此在平时继代时,要对定期继代的组培苗更换培养基,或者及时进行再次初代培养。

表 2 不同浓度 6-BA 对丛生芽增殖的影响

培养基	平均增殖芽数(个)	平均增殖倍数	生长情况
MS + 0.8 mg/L 6-BA	65.00d	3.25d	丛生芽较少,苗长势较弱
MS + 1.0 mg/L 6-BA	179.00a	8.95a	丛生芽多,节间粗壮,叶片较大,比较健壮
MS + 1.5 mg/L 6-BA	115.33b	5.76b	丛生芽少,茎细长,叶片细小
MS + 2.0 mg/L 6-BA	86.67c	4.33c	丛生芽较少,畸形,玻璃化严重

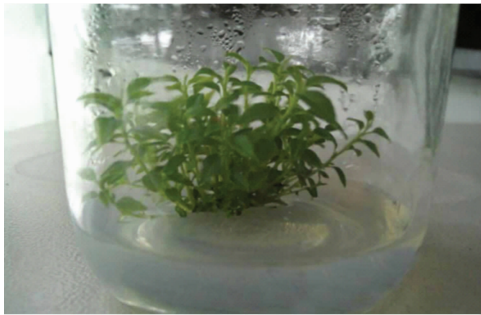


图3 培养基 MS+1.0 mg/L 6-BA 的腋芽诱导结果

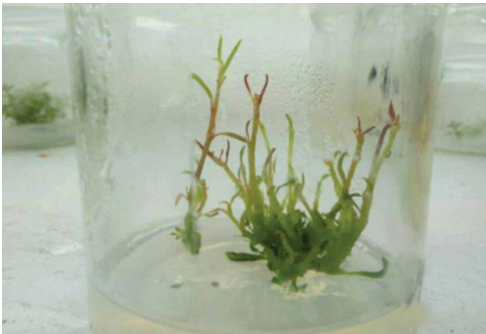


图4 培养基 MS+2.0 mg/L 6-BA 的腋芽诱导结果

2.4 生根培养

由表 3 可以看出,IBA、NAA 及基本培养基的类型都对组培苗的生根有影响。当基本培养基为 F 时,NAA 对生根的影响大于 IBA,当 NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,根系长势最好。当以 1/2MS 作为基本培养基时,IBA、NAA 对生根的影响都

很大。只考虑 IBA 的影响时,当 IBA 浓度为 0.1 mg/L 时,生根较早;只考虑 NAA 浓度的影响时,当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,根系最粗壮。综合 3 个因素来看,生根率较高、根的长势较好的培养基组合是 F + 0.05 mg/L NAA。

表 3 不同培养基组合对组培苗生根的影响

培养基	平均生根苗数(株)	生根率(%)	生长情况
1/2MS + 0.05 mg/L NAA	14.00a	70.00a	生根早,根较粗
1/2MS + 0.1 mg/L IBA	9.67b	48.35b	生根较早,根较细长
1/2MS + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA	11.00b	55.00b	生根早,根细长,叶色微黄
1/2MS + 0.3 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA	7.67c	38.35c	生根较晚,根较细弱
F + 0.05 mg/L NAA	10.33b	51.65b	生根晚,根粗
F + 0.1 mg/L IBA	10.00b	50.00b	生根较早,根较细长
F + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA	13.33a	66.65a	生根早,根较粗
F + 0.3 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA	8.00c	40.00c	生根晚,根细

2.5 炼苗移栽

经过炼苗的 5 个试验组的成活率都远远高于空白对照组第 1 组。在本研究的 6 种炼苗方式中,只闭瓶炼苗或只有开

瓶炼苗的成活率都低于既有闭瓶炼苗过程又有开瓶炼苗过程处理方式的成活率,而其中成活率最高的是先闭瓶炼苗 7 d,再开瓶炼苗 4 d 处理,成活率为 72.58%。由此可以得出以下

结论:(1)组培苗在移栽前需要进行炼苗;(2)在炼苗时要注意对时间的控制;(3)炼苗需要开瓶与闭瓶相结合才能取得理想的效果;(4)对柳叶栒子组培苗比较适合炼苗方式是先将其闭瓶炼苗 7 d,再将其开瓶炼苗 4 d。

在移栽时发现,当基质中只有泥炭土与只有泥炭土与蛭石时,基质的透气性差,小苗根部容易被淹,成活率极低;当基质中只有蛭石与珍珠岩时,基质的透气性虽好,但几乎不保水,导致小苗逐渐干枯,缺水症状严重,成活率也不高;当基质中泥炭土、蛭石、珍珠岩三者都有时,成活率较高,详见图 5,但是如果三者比例不当,小苗的长势也不是很好。最后,筛选出最适宜柳叶栒子组培苗移栽的基质是蛭石、泥炭土、珍珠岩体积比为 2:1:1。



图5 移栽后成活的柳叶栒子

3 结论与讨论

在柳叶栒子腋芽诱导时期,适宜的培养基为 MS + 0.8 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA + 1.2 mg/L PPM;在丛生芽增殖时期,最适宜柳叶栒子继代增殖的培养基是 MS + 1.0 mg/L 6-BA;在生根培养时,最适宜的生根培养基是 F + 0.05 mg/L NAA,最佳炼苗方式是先闭瓶炼苗 7 d,再开瓶炼苗 4 d;最适宜的移栽基质是蛭石、泥炭土、珍珠岩体积比 = 2:1:1,移栽成活率高达 72% 以上。在选择外植体时,最初用的是柳叶栒子的一年生茎段,最后因为污染非常严重而失败,后来改用柳叶栒子实生苗作为外植体,进行灭菌后成活率较高。植物的不同部位所含菌量不同,采集外植体时要加以仔细选择。继代次数对于柳叶栒子丛生芽增殖有影响,不同植物受继代次数的影响也不同。东方百合在进行继代培养时,继代 3 次后小苗的分化能力逐渐变弱,长势也逐渐变差^[24]。本研究中,在进行生根之前先对组培苗进行壮苗培养,在这个过程中只加入植物激素 NAA,除了植物激素外,还可以考虑加入一些其他天然添加物,如香蕉泥、番茄泥等天然添加物,以及活性炭和马铃薯泥、椰子汁等物质,这些天然添加物价格低廉而且便于获取,效果会很明显,在以后的壮苗培养时可以适量加入。

通过建立柳叶栒子组培快繁体系来繁殖柳叶栒子,生产周期短,仅为 4 个月,而且繁殖速度非常快,生产出来的苗特别多,性状也一致,可以实现柳叶栒子的工厂化生产,使得柳叶栒子在不久的将来可以大规模应用于园林中,从而为中国的园林绿化增添一抹亮色。

参考文献:

[1] 刘尚武. 青海植物志[M]. 西宁:青海人民出版社,1996.

[2] 巩振辉. 园艺植物生物技术[M]. 北京:科学出版社,2009.

[3] 朱大宝. 国外杨树组织微繁殖技术的进展[J]. 北京林业大学学报,1990(1):84-91.

[4] 徐筱昌. 栒子属(*Cotoneaster* Medik)植物的选择应用和栽培[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),1987(3):251-256.

[5] 王军涛,查振道. 秦岭野生栒子属植物引种栽培试验[J]. 陕西林业科技,2008(3):37-39.

[6] 李艳萍. 青海省栒子属观赏植物引种栽培试验[J]. 河北林果研究,2002,17(2):137-140.

[7] 郝云凤,李可伟,张培宏,等. 植物组织培养操作过程中常见的污染问题及解决办法[J]. 内蒙古农业科技,2004(增刊2):156-158.

[8] 李青林,邹永田,刘广林,等. 木本观赏植物组织培养技术[J]. 河北农业科学,2010,14(6):38-41.

[9] 张明丽,李青. 木本观赏植物组织培养及植株再生的研究进展[J]. 河北林业科技,2004(2):23-26.

[10] 张法勇,刘向东,高秀丽. 木本植物组织培养器官发生植株再生研究进展[J]. 河北林果研究,2005,20(3):234-238.

[11] 周发辉,杨妙贤,李春霞,等. 在培养基中加入抗生素防止万年青茎段培养污染的研究[J]. 广西植物,2005,25(3):233-235.

[12] 翟建中,顾梅俏. 长春蔓组培生产中污染菌的防除[J]. 中国森林病虫,1999(4):30-32.

[13] 程广有,杨振国,唐晓杰. 东北红豆杉茎尖组织培养[C]//中国林学会林木遗传育种年会,1997:209-211.

[14] 张红晓,经剑颖. 木本植物组织培养技术研究进展[J]. 河南科技大学学报(农学版),2003,23(3):66-69.

[15] Gibson D M, Ketchum R E, Vance N C, et al. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific yew) [J]. Plant Cell Reports,1993,12(9):479-482.

[16] 李晓强,岑秀芬,韦鹏霄,等. 杨梅组织培养防污染与防褐化研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(19):65-67.

[17] Kozai T, Kushihashi S, Kubota C, et al. Effect of the difference between photoperiod and dark period temperatures, and photosynthetic photon flux density on the shoot length and growth of potato plantlets *in vitro* [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science,2008,61(1):93-98.

[18] 胡忠,王一欣,吴奕瑞,等. 光照和植物生长物质对宁夏枸杞正常根和发状根离体生长的影响[J]. 中国中药杂志,2006,31(2):106-110.

[19] Bhadra R, Morgan J A, Shanks J V. Transient studies of light-adapted cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*: growth and indole alkaloid accumulation [J]. Biotechnology and Bioengineering,1998,60(6):670-678.

[20] 刘青林,陈俊愉. 梅花愈伤组织培养研究初报[J]. 北京林业大学学报,1999(2):100-105.

[21] 王振龙,张雷,翟玉敏,等. 美国红枫种胚愈伤组织诱导,增殖培养技术研究初报[J]. 辽宁农业职业技术学院学报,2005,7(4):6-7.

[22] 王宏信,李向林,王楠,等. ABT1 处理对降香黄檀硬枝扦插生根及其关联酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):138-141.

[23] 贾新社,袁文丽. 芸乙酸·吡啶丁酸促进杨树生根试验[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):96-99.

[24] 蒲秀琴,王舰,薛寒青. 不同继代次数对东方百合组培苗分化的影响[J]. 青海农林科技,2008(1):55-56.