维普资讯 http://www.cqvip.com

A C T A AGRICULTURAE BOREALI-SINICA 华北农学报·2006,21(专辑):27-31

北海道特产小果树 HASKAOP 高效再生体系的建立

杨晓艳,石 岭

(内蒙古农业大学 农学院,内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要:北海道特产小果树 HASKAOP 具有很高的营养价值,是重要的野生果树资源。但由于其是木本植物,苗木繁殖周期长。因此对其节间培养及其增殖的条件进行了探讨,建立了高效再生体系。结果表明:其最适宜的不定芽诱导培养基为 1/2MS+BA0.5mg/L 和 1/2MS+CPPU0.15mg/L,并且 CPPU 的作用强于 BA;根系最适宜的诱导培养基为 1/2MS+IBA0.5mg/L。生根率高达 90%。

关键词:节间组培;BA;CPPU;高效再生体系

中图分类号:S665 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2006)专辑-0027-05

Hokkaido Specialty Little Fruit Tree HASKAP High Effect Rebirth Systematic Foundation

YANG Xiao-yan, SHI Ling

(Collage of Agriculture Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010019, China)

Abstract: Hokkaido specialty little fruit tree have quite supernal nutrition value, it is also an important wilding resource. But because the plant reproduce period is very long, So we did researches on the internodal tissue culture and the condition of proliferation, founded the high effect rebirth system. The results showed, the optimum medium for adventitious bud formation was 1/2MS+6-BA0.5mg/L and 1/2MS+CPPU0.15mg/L, besides, the effect of CPPU is better than 6-BA, the optimum medium for culturing strong roots was1/2MS+IBA0.5mg/L. The rooting rate was 90%.

Key words: Internodal tissue culture; BA; CPPU; High effect rebirth system

世界发达国家对高营养果树的研究非常重视,美国、加拿大、日本等发达国家,利用野生果树资源,不仅对可直接利用的加以利用,而且还育成了很多新品种,得到了广泛的应用。我国对丰富的野生果树资源也进行了开发和利用,最典型的是山葡萄[1],其广泛分布在东北地区,利用价值很高,东北的黑龙江、吉林、辽宁等省先后建立了以山葡萄为主要原料的葡萄酒加工厂,在国内外都有广阔的市场。既为国家创造了大量的外汇,又为山区的经济发展做出了很大贡献。

北海道特产小果树 (*Lonicera caeruleal.*Var. emphyllacaryx NAKAi)属于蔷薇科,具有很高的经济价值。果实中含有多种维生素和钙质,Vc 含量居果品中的前列,尤其是具有抗酸性强的花青素含量特别高。可加工成果酱、罐头、饮料等,很受消费者的欢迎。但对北海道特产小果树 HASKAOP 组织培养的研究很少,至今尚未见报道。因此,本试验对北海道特产小果树 HASKAOP进行节间组织培养、建立高效再生体系等方面进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验所用的材料是北海道特产小果树 HASKAOP幼苗。

1.2 培养基配制

本试验所用培养基均以 1/2MS 培养基为基本培养基,蔗糖 30g/L,琼脂 7.0g/L,pH 值用 NaOH 或 HCl 调到 5.8,121℃高压灭菌 20min。

收稿日期:2006-11-13

作者简介:杨晓艳(1981-),女,内蒙古赤峰人,内蒙古农业大学硕士研究生,研究方向为蔬菜育种及其生物技术。

通讯作者:石 岭(1960-),男,内蒙古土默特左旗人,内蒙古农业大学农学院硕士生导师,教授,研究方向为蔬菜育种及其生物技术。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 培养条件

培养温度25±2℃。在光照培养箱中培养，光照强度为1600~3000Lux，光照时间为14h/d。

1.4 试验方法

将去掉小叶的嫩茎用75%的乙醇进行表面消毒20s，无菌水冲洗1次，然后用0.1%的$HgCl_2$分别浸泡5min、10min、15min，充分摇匀，用无菌水冲洗5~6次，切除与药液接触的伤口部位，将嫩茎剪成2cm左右带腋芽茎段或顶芽，将其接种于培养基(1/2MS+6-BA0.23mg/L+GA0.35 mg/L)上，进行增殖培养。

以1/2MS为基本培养基，以带芽茎段分化出来的试管苗为试材，分别添加BA(0.01mg/ L、0.10mg/ L、0.50mg/L、1.00mg/L)、CPPU (0.01mg/ L、0.05mg/ L、0.10mg/L、0.15mg/L)进行处理。每个处理4瓶，每瓶4株，重复4次，每14d观察记载1次。比较生长状况，筛选出最适宜激素浓度。其他条件为蔗糖30g/L，琼脂7g/L，pH值5.8。

当分化产生的不定芽长到2~3cm时，将其转入生根培养基中进行不定根诱导。生根培养基为1/2MS+IBA (0.01mg/ L、0.10mg/L、0.50mg/L、1.00mg/L)处理，每个处理5瓶，每瓶4株，重复4次，每14d观察记载一次。比较生长状况，筛选出最适宜激素浓度。其他条件为蔗糖30g/L，琼脂7g/L，pH值5.8。

2 结果与分析

2.1 无菌体系建立

外植体体表灭菌中筛选适当的消毒剂以及筛选适宜的灭菌处理时间是建立无菌体系的重要环节。本试验通过对北海道特产小果树HASKAOP的嫩茎消毒处理，用0.1%的$HgCl_2$进一步体表灭菌，进行不同时间的处理。其结果见表1。

表1 0.1%的$HgCl_2$不同灭菌时间对嫩茎体表灭菌效果

Tab.1 Effect of different sterilization times of 0.1% $HgCl_2$ on culm

灭菌时间(min)	接种数量(个)	污染数(个)	污染率(%)[1]	枯死率(%)[2]
5	20	20	100	0
10	20	4	20	0
15	20	0	0	100

注：1)污染率=污染外植体数量/接种外植体总数量×100%；2) 枯死率=枯死外植体数量/接种外植体总数量×100%

由表1结果表明：用0.1%$HgCl_2$体表灭菌10min效果最好，其污染率为10%。消毒时间太短，不能彻底消毒，致使材料污染；消毒时间过长，容易将组织细胞杀死，使材料干枯死亡，培养基褐化。

2.2 不定芽的增殖

将北海道特产小果树HASKAOP的茎段分别接种于以1/2MS为基本培养基，分别添加不同浓度BA、CPPU，筛选最佳不定芽增殖的激素及其浓度(图1~图4)。

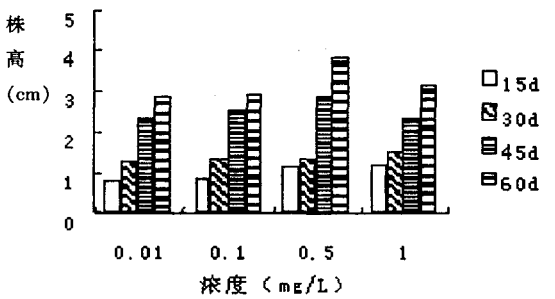

图1 BA对不定芽生长生长势的影响

Fig.1 Effect of different corcentrations and times of BA on adventitious bud growth

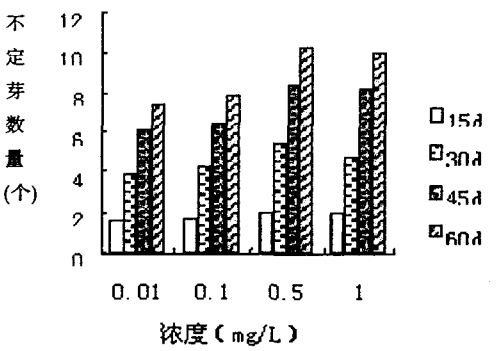

图2 BA对不定芽增殖的影响

Fig.2 Effect of different corcentrations and times of BAon adventitious bud formation

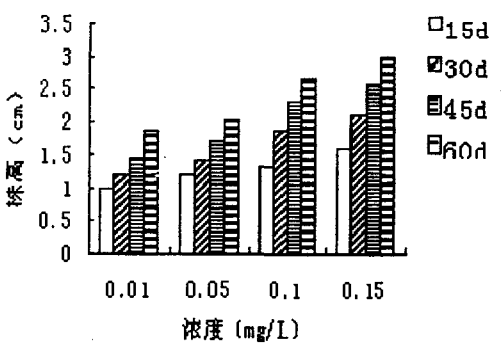

图3 CPPU对不定芽生长生长势的影响

Fig.3 Effect of different corcentrations and times of CPPUon adventitious bud growth

维普资讯 http://www.cqvip.com

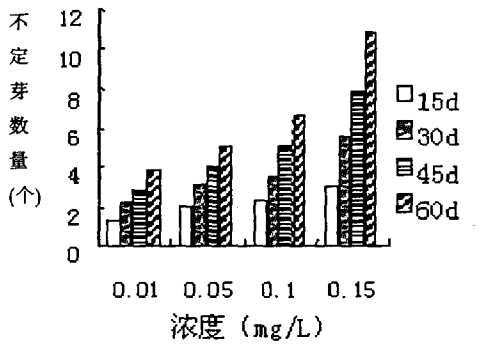

图 4 CPPU 对不定芽增殖的影响

Fig.4 Effect of different corcentrations and times of CPPU on adventitious bud formation

注:不定芽数量为接种外植体诱导产生的不定芽的平均值;不定芽的株高为接种外植体株高生长量的平均值

由图 1 和图 2 结果表明:BA 浓度在 0.01~0.5mg/L 范围内对不定芽的生长势、增殖的影响是随着浓度的增加而增加的,而 BA 浓度高于 0.5mg/L,有抑制作用。所以 BA 促进生长和诱导不定芽的最适宜浓度为 0.5mg/L,同时 BA 对生长势及不定芽的诱导,随着培养天数的增加而递增。并由图 3 和图 4 的结果表明:CPPU 对不定芽的生长势和增殖都是随着浓度的增加而增加的,浓度越高,不定芽的分化率越高,不定芽生长越快,越健壮,产生的不定芽数越多。所以 CPPU 的诱导不定芽的最适宜浓度为 0.15mg/L,最适宜培养时间为 60d。

由表 2 结果表明:在培养基中添加不同浓度 BA 时,当 BA 浓度由 0.01mg/L 增大到 0.5mg/L 时,不定芽的增殖系数、生长系数均随 BA 浓度的增大而增大,增殖系数由 7.375 增大到 10.250,生长系数由 2.8938 增大到 3.838,丛生芽紧密,生长健壮,当 BA 浓度增至 1.0mg/L 时,增殖系数从 10.25 下降到 9.9375,不定芽出现枯萎现象,说明 0.5mg/L 的 BA 较适合不定芽增殖,最大增殖度为 39.3344。

在添加 CPPU 的培养基中,不定芽的增殖系数、生长系数均随 CPPU 浓度的增大而增大,当 CPPU 浓度从 0.01mg/L 增大到 0.15mg/L 时,增殖系数由 3.8 增大到 10.9,生长系数由 1.85 增大到 3.00,不定芽生长良好。所以当 CPPU 浓度为 0.15mg/L 时,增殖度最大为 32.7,较适合不定芽增殖。

表 2 不同浓度 BA、CPPU 对不定芽增殖系数的影响

Tab.2 Effect of Plant growth regulator compositious on adventitious bud proliferation

激素组合(mg/L)		接种苗数	平均增殖系数	平均生长系数	平均增殖度
BA	CPPU				
0.01	0	16	7.38	2.8938	21.3414
0.10	0	16	7.81	2.9375	22.9492
0.50	0	16	10.25	3.8375	39.3344
1.00	0	16	9.94	3.1500	31.3031
0	0.01	16	3.80	1.8500	7.0300
0	0.05	16	5.20	2.0300	10.5560
0	0.10	16	6.60	2.6600	17.5560
0	0.15	16	10.90	3.0000	32.7000

注:每处理 4 瓶,每瓶 4 株,接种 60d 后记录;平均增殖系数=增殖后的丛生芽数/原接种丛生芽数;平均生长系数=生长平均总量/原接种节间平均长度;平均增殖度=增殖系数×生长系数

通过本试验表明,CPPU 只需用 BA 的 10%的激素水平就可以产生与 BA 激素水平的同等效果,所以在细胞分裂素类物质中,CPPU 较 BA 活性高,说明 CPPU 的作用强度比 BA 大。

2.3 不定根的诱导

当分化产生的不定芽长到 2~3cm 时,将其转入生根培养基中进行不定根诱导。观察发现,大部分材料 10d 左右即可长出根原基,45d 左右可以长成可以移栽的完整植株,生根情况见表 3。

由表 3 中可以看出,4 种浓度的 IBA 都能够促进北海道特产小果树 HASKAOP 生根,并且是随着浓度的加大,生根效果越好,培养在 15~45d 的范围内,随着培养时间的延长,生根效果也越好。但在培养 45d 后各浓度生根率变化不大。但结合其植株生长状况看,前两个浓度生出的根细弱,苗的生长缓慢,长势弱,不利于移栽。用 0.5mg/LIBA 生根效果最好,不仅生根率高,而且根粗壮,试管苗粗壮、叶绿,能起到壮苗的作用。当 IBA 浓度为 1.0mg/L 时,试管苗生长状况不好,有的叶片干枯脱落,枯死率较高。因此 1/2MS+IBA0.5mg/L 为最佳诱导不定根分化培养基,最佳培养时间为 45~60d。

3 结论与讨论

通过组织培养技术对一些苗木繁殖周期长的

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 不同浓度IBA对生根的影响

Tab.3 The effect of IBA Concentration to rooting

培养时间	浓度(mg/L)	接种苗数(苗)	生根苗数(苗)	平均每株生根数(根)	生根率(%)
15d	0.01	20	4	0.40	20
	0.10	20	8	0.45	40
	0.50	20	10	0.60	50
	1.00	20	10	0.80	50
30d	0.01	20	8	0.80	40
	0.10	20	12	0.85	60
	0.50	20	13	1.15	65
	1.00	20	17	2.20	85
45d	0.01	20	10	0.85	50
	0.10	20	14	1.00	70
	0.50	20	14	1.25	70
	1.00	20	18	2.60	90
60d	0.01	20	10	0.90	50
	0.10	20	14	1.00	70
	0.50	20	15	1.25	75
	1.00	20	18	2.60	90

果树进行快速繁殖，不仅能为生产提供大量优良种苗，而且还有利于种质资源的保护，提高经济效益。但不同的树种其培养条件各不相同，就蔷薇科植物而言不同的种类、品种及不同的外植体其培养条件有所不同。

植物组织培养中，外植体不定芽的诱导及增殖不仅与植物生长调节剂有关，而且还与它的浓度及培养条件有关。大量研究发现[3]：细胞分裂素对组织培养中不定芽的分化及增殖有着显著作用，不同种类的细胞分裂素对不同的植物种类作用差异较大，但大多数植物种类以BA最为有效，不同种类的植物BA的最适宜浓度不同。本试验研究了细胞分裂素类物质——BA和CPPU对北海道特产小果树HASKAOP的不定芽诱导的作用。结果表明，BA对不定芽的诱导是随着浓度的增加而增强的，稍低浓度的BA可以促进不定芽的分化，浓度过高则产生丛生芽，并抑制节间伸长，BA的诱导不定芽的最适宜浓度为0.5mg/L。CPPU对不定芽的诱导是随着浓度的增加而增强的，浓度越高，不定芽的分化率越高，不定芽生长越快、越健壮，产生的不定芽数越多。在本试验所设4个浓度处理中，CPPU的诱导不定芽的最适宜浓度为0.15mg/L。而且从试验结果可以看出，CPPU只需用BA的10%的激素水平就可以产生与BA激素水平的同等效果，所以在细胞分裂素类物质中，CPPU较BA活性更高。这与Pinol[4]等培养烟草愈伤组织的结果基本一致。Pinol等对烟草愈伤组织进行培养，结果是BA的适宜浓度为10mg/L，而CPPU的适宜浓度为小于1mg/L。Tanimoto等报道，在篮猪耳属植物组织培养中，CPPU可以促进茎尖的形成[5]。CPPU诱导桑树下胚轴分化新梢的效果显著好于BA，切下的嫩梢以后发根形成小苗。目前，国外已开始把CPPU广泛应用于植物的快速繁殖。

生长素对组织培养中外植体不定根的诱导有着比较显著的作用。通过对不同浓度生长素IBA作用效果差异的研究发现，前两个浓度生出的根细弱，苗的生长缓慢，长势弱，不利于移栽。用0.5mg/LIBA生根效果最好，不仅生根率高，而且根粗壮，试管苗粗壮、叶绿，能起到壮苗的作用。当IBA浓度为1.0mg/L时，试管苗生长状况不好，有的叶片干枯脱落，枯死率较高。大量的对不同生长素作用效果差异的研究发现[3]，多数种类中IBA不仅促进生根效果好，而且根的进一步生长较正常。在一些种类中，IAA和NAA也被广泛应用。一般认为生长素在较低浓度对发根有利。这与本实验研究结果相一致。

本研究建立的北海道特产小果树节间培养再生体系，不仅可以对其繁殖周期长的HASKAOP小果树进行大规模繁殖，为生产提供大量优良种苗，而且还有利于种质资源的保护，提高经济效益。也为其优良地方品种的快速繁殖及迅速推广应用奠定基础。内蒙古是我国边疆少数民族地区，其土地面积辽阔，但利用率很低，经济效益不高，急需培育出适合于本地区栽培的小果树新品种，促进内蒙古的经济发展。经大量资料表明[2]，在内蒙古发展小型果树是很有前途的，但包括全国在这方面的研究很少，若继续进行深入的研究，进一步选育出适合于内蒙古地区栽培的抗寒性强而高营养的

维普资讯 http://www.cqvip.com

小型果树新品种,充分利用内蒙古的自然资源,将来发展成为生产加工一条龙的小型果树产业化基地,将为促进内蒙古少数民族地区的经济建设做出贡献。

参考文献:

[1] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等出版社,1986.

[2] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等出版社,1986.

[3] 崔丽华.植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用[J].辽宁师专学报,2000,(6):97-99.

[4] Pinol T,et al.Effects of the growth regulator 4PU-30 on growth K^+ content and alkaloid Production in tobacco callrs cultures[J]. J plant GrowthRegul,1987,(5):183-189.

[5] Tanimoto S,et al.Effects of cytokinin and anticytokinin on the initial stageof bud differentiation in the epidermis of Torenta Stem segments [J].Plant & Cell physiol,1982,(23):1371-1376.

[6] 刘慧鑫,闫致琛,曹鑫罡,等.组织培养在三倍体毛白杨中的应用研究[J].内蒙古农业科技,2004,(S2):32-33.

[7] 梁艳荣,李荣富,胡晓红,等.苹果优良抗寒砧木组培快繁技术的研究 J].内蒙古农业科技,2001,(3):32-33.

[8] 张焱如,袁静宇,刘志萍.北海道黄杨的组织培养与快繁研究[J].华北农学报,2003,18(专辑):126-129.

[9] 刘玉冬,李树和,郭美娜.捕蝇草组织培养快繁的研究 [J].华北农学报,2003,18(专辑):129-131.