

文章编号:1004-8820(2007)01-0026-05

大樱桃优质矮化砧木吉塞拉 批量组培快繁系统优化的研究

李江¹, 范志强², 孙仲序³

(1. 烟台大学药学院, 山东烟台 264005; 2. 山东省林业局, 山东济南 271018; 3. 山东农业大学园艺学院, 山东泰安 271018)

摘要:为应用组培技术批量生产优质苗木,以大樱桃优质矮化砧木吉塞拉作为试材,在组培中采用对比试验对如何获得较好的无菌外植体进行了研究.采用正交试验对分化配方和生根配方进行选择,采用多因素对比试验对室外驯化条件进行研究.研究表明:外植体材料应在温室自然光条件下培养,以0.1%升汞+0.1%升汞的灭菌方法较为适用;通过正交实验并于生产中验证得到的较佳分化配方为MS+IBA 0.3 mg/L+6-BA 0.8 mg/L+白糖 30 g/L+琼脂 7 g/L,生根配方为MS+IAA 0.3 mg/L+IBA 0.3 mg/L+NAA 0.3 mg/L+白糖 20 g/L+琼脂 6 g/L;采用温室控制光强并保持瓶苗密封处理的生根条件可以提高苗木的驯化成活率.将研究结果应用于生产达到了年批量生产30万棵吉塞拉苗木.

关键词:吉塞拉;批量;外植体;驯化;优化**中图分类号:** S662.5 **文献标识码:** A

从目前植物组培快繁技术的现状来看,常用的组培方法是在温度相对稳定、光强适宜、相对封闭无菌的环境中进行培养.这种组培方法有以下缺点:第一,无菌外植体较难获得^[1];第二,组培苗生产的技术水平要求较高;第三,配制培养基价格较高,对设备要求精细,耗电量较大,造成总体成本较高;第四,组培苗的室外移栽成活率低^[2].由于以上原因,导致试管苗比普通苗价格高几倍或几十倍,广大种植者无力购买,造成销售下降,严重限制了该技术在生产的应用.近年来,围绕着降低植物组织培养成本的研究已经取得了一定的成效.作者在采纳前人成果^[3]的基础上进行了系统的研究,最终达到工厂化育苗和规模化生产的目的,将本研究应用于生产达到了年批量生产

30万棵吉塞拉苗木.

1 材料与方 法

1.1 材 料

大樱桃的矮化砧木吉塞拉(*Gisela*)^[4,5];取自烟台龙口复发中记公司苗圃.

1.2 方 法

1.2.1 无菌外植体的获得 取吉塞拉的茎尖^[3]作为获得无菌外植体的材料,做如下研究:分别取温室自然光条件和光照培养箱条件下培养的外植体材料,研究培养条件对外植体材料叶色、健壮度、褐变率、无菌率的影响;试验采用的枝条长度约20 cm,数目为100.

采用CH(酒精+升汞)、CN(酒精和次氯酸

收稿日期:2005-11-04

基金项目:山东省科技厅资助项目(011100109;鲁科农字[2005]10号).

作者简介:李江(1979-),男,山东烟台人,讲师,硕士,研究方向:植物组织培养;通讯联系人:孙仲序,教授.

钠)、HH(升汞+升汞)、UH(紫外灯+升汞)等不同灭菌剂相结合的灭菌方法,研究其对无菌外植体获得的影响,每种方法接种30个外植体,重复3次。

1.2.2 分化配方的选择 以食用白糖、6-BA、IBA的较佳用量设计正交试验($L_9(3^3)$),根据正交表的结果得出三者的最佳用量,并根据极差得出分化中的最大影响因素,从而进行研究,每个组合取10瓶,每瓶5棵苗,实验3次取平均值。

1.2.3 生根配方的选择 将单因素生根配方得到的IBA、IAA、NAA的较佳用量进行组合,设计正交试验,据结果得出较佳的配方;每个处理取10瓶,每瓶5棵,重复3次取平均值。

1.2.4 驯化条件的研究 比较接种培养基后在室内生根和室外生根条件下的生根率以及光强保持在1500-4000 lx的条件下,比较采用自动化喷雾和盖封口膜方法保持湿度条件下苗木的驯化^[6]成活率,每个处理100棵,重复3次取平均值。

2 结果与分析

2.1 无菌外植体的获得

2.1.1 获得无菌外植体的培养条件 于2002年2月中旬取未萌发的大樱桃矮化砧木吉塞拉(*Gisela*)枝条^[3]作为外植体材料,一部分放于光照培养箱中培养,一部分放于温室(温度>10℃)自然光照条件下,进行芽生长状况的调查和无菌外植体接种试验,结果见表1。

表1 不同的培养条件对植物材料的影响

Tab.1 Effect of different culture conditions on plant material

指标	培养条件	
	温室	光照培养箱
叶色	深绿	浅绿
健壮度	较健壮	弱
褐变率/%	30	50
无菌率/%	10	4

从表1可以看出:在温室自然光条件下培养的材料在叶色、健壮性的表现指标方面明显好于光照培养箱条件下培养的材料,而且无菌外植体的褐变率显著减低,成活率大大提高;由此可以看

出,培养条件对于无菌外植体的获得起基础作用,两种培养条件下,以温室自然光条件下培养的外植体材料较好。

2.1.2 灭菌方法对无菌外植体的获得率的影响

4种不同灭菌方法得到的灭菌外植体获得率见表2。

表2 不同的灭菌方法下无菌外植体的获得率的影响

Tab.2 Effect of different sterilizing methods on getting rate of bacteria-free explants

灭菌方法*	较佳时间	获得率/%
酒精+升汞	10 s + 8 min	4
酒精+次氯酸钠	10 s + 10 min	3
升汞双重灭菌	3 min + 5 min	10
紫外灯+升汞	30 min + 6 min	7

* $\varphi_{酒精} = 75\%$, $\omega_{升汞} = 0.1\%$, $\omega_{次氯酸钠} = 1\%$

由表2可知:酒精作为灭菌剂的条件下,由于酒精使植物材料的失水严重,接种的植物材料容易死亡,最终无菌外植体的获得率相对较低;而不采用酒精作为灭菌剂的方法因为对植物材料的杀伤力较小,因而可以获得较多的无菌外植体。从生产应用的角度考虑:因使用紫外线容易使植物材料发生变异,故一般不应用于生产之中。结果表明:对于吉塞拉组培以采用0.1%升汞+0.1%升汞的双重灭菌方法较为适用。

2.2 分化培养基的选择

试验以Ms+IBA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+白糖30 g/L+琼脂7 g/L为基础设计 $L_9(3^3)$ 正交试验(表3)。由表3结果分析得出:(1)由R的结果可以得出在分化配方中6-BA的作用影响因素最大,IBA的作用效果次之,白糖的影响效果最小;(2)从三列K的值可以得出:6-BA以0.8 mg/L为最佳,IBA以0.3 mg/L为最佳,白糖以30 mg为最佳;因此将三者加以组合得出其最佳组合为MS+IBA 0.3 mg/L+6-BA 0.8 mg/L+白糖30 g/L+琼脂7 g/L。按此配方配制培养基,重复试验其增殖倍数为4.36,基本与上表的理论值相符,验证了实验结果的正确,比原来配方的增殖系数3.0增加了45%,大大增加了增殖系数。采用此配方得出的分化培养基可以提高增殖系数,在短期内大幅增加苗木数量,间接降低单株成本,提高了效益。

表 3 分化培养基的选择

Tab. 3 Choice of multiplication culture medium

标号	A(IBA/ mg · L ⁻¹)	B(6-BA/ mg · L ⁻¹)	C(白糖/ g · L ⁻¹)	增殖倍数
1	1(0.5)	1 (0.5)	1 (30)	3.25
2	1(0.5)	2 (0.3)	2 (20)	2.69
3	1(0.5)	3 (0.8)	3 (40)	3.42
4	2 (0.8)	1 (0.5)	2 (20)	2.27
5	2 (0.8)	2 (0.3)	3 (40)	2.18
6	2 (0.8)	3 (0.8)	1 (30)	3.87
7	3 (0.3)	1 (0.5)	3 (40)	3.17
8	3 (0.3)	2 (0.3)	1 (30)	3.02
9	3 (0.3)	3 (0.8)	2 (20)	3.92
K1	9.36	8.69	10.14	
K2	8.32	7.89	8.88	
K3	10.11	11.21	8.77	
R	1.79	3.32	1.37	

2.3 生根激素的正交实验

根据单激素的试验结果得出:琼脂较佳用量为 6 g/L,各激素的较佳用量分别为 IAA 0.5 mg/

L,IBA 0.3 mg/L,NAA 0.3 mg/L,据此设计选择生根培养基的正交表 L₉(3³),并根据表中各条件组合测定生根率(表 4).

表 4 生根培养基的选择

Tab. 4 Choice of rooting culture medium

标号	A(IAA/ mg · L ⁻¹)	B(IBA/ mg · L ⁻¹)	C(NAA /mg · L ⁻¹)	生根率/%
1	1(0.5)	1 (0.3)	1 (0.3)	92.6
2	1(0.5)	2 (0.2)	2 (0.2)	78.3
3	1(0.5)	3 (0.1)	3 (0.1)	72.5
4	2 (0.3)	1 (0.3)	2 (0.2)	89.1
5	2 (0.3)	2 (0.2)	3(0.1)	81.5
6	2 (0.3)	3 (0.1)	1 (0.3)	85.2
7	3 (0.1)	1 (0.3)	3 (0.1)	82.5
8	3 (0.1)	2 (0.2)	1 (0.3)	85.7
9	3 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.2)	76.7
K1	2.434	2.642	2.635	
K2	2.558	2.455	2.441	
K3	2.449	2.344	2.365	
R	0.124	0.298	0.27	

从表 4 结果直观分析可以看出:(1)由 R 的结果可以得出在生根配方中 IBA 的作用效果最

好, NAA 的作用效果次之, IAA 的影响效果最小; (2) 从三列 *K* 的值可以得出 IBA 以 0.3 mg/L 为最佳, NAA 以 0.3 mg/L 为最佳, IAA 以 0.3 mg/L 为最佳. 因此其最佳组合为 MS + IAA 0.3 mg/L + IBA 0.3 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 白糖 20 g/L. 将此配方进行重复试验其生根率为 93.5%, 基本与理论值相符, 证实实验结果的正确. 因此, 在生根配方的研究中, 先采用单独的一种激素进行生根试验, 然后将三种激素采用较佳的量设置正交实验, 形成较佳的配方, 这样可以提高生根率, 间接降低生产成本.

2.4 生根条件的简化

研究中发现: 只要培养室的光照强度小于 4000 lx 条件就可以满足生根要求. 因此, 将组培苗放于组培室和温室中两种条件下进行试验, 各

取 100 瓶, 每瓶 5 棵苗进行统计, 比较它们的生根状况. 在这两种不同生根培养条件下得到的生根结果见表 5. 从表 5 可以看出, 在温室中的生根率和日光灯条件下的生根率相差不大, 不同的生根条件下的生长状况都较好, 处于温室中的组培苗的污染率要稍高于组培室条件下的污染率. 在驯化成活率方面, 由于温室中的条件相对于组培室中的条件变化较大, 因此温室中的组培苗可以较好的适应外部的环境, 因此可以达到较好的驯化成活率; 采用传统的封口膜密封条件下成活率要稍好于喷雾条件下成活率. 综合以上的各项指标: 采用温室的生根条件可以节约组培室的电力成本和空间, 提高了组培室的利用率, 同时使组培苗更好的适应外部环境条件, 达到较高的成活率, 并将低了单株的苗木成本.

表 5 不同培养条件的生根结果

Tab. 5 Effect of rooting on different culture conditions

%

生根条件	生根率	生长状况	污染率	喷雾条件下成活率	封口膜密封条件下成活率
组培室生根	94.9	生长正常	0.08	82.8	90.2
温室生根并控制合适光强	94.2	生长正常	0.1	85.6	95.4

3 讨论

3.1 建立高效无菌外植体的影响因素

影响高效无菌外植体快速建立的原因是多方面的, 除了外植体自身的因素之外, 还有选材的季节及类型、杀菌剂、杀菌方法等原因.

3.2 分化和生根的影响因素

分化、生根过程中, 琼脂、水、培养条件、激素都对生根率有较大的影响, 任何一种条件不合适都有可能造成生根率下降. 在分化、生根配方的研究中采用数学分析的方法既提供了理论依据, 又大大提高了生产效率, 使批量生产成为可能.

3.3 驯化条件的影响因素

对于瓶外生根实验虽然有相关报道, 但因其研究结果在樱桃品种中只能达到 70%~80% 之间的驯化成活率^[7], 难以达到批量生产的目, 因此接种生根培养基后, 在室内生根和室外温室光强保持在 1500~4000 lx 条件下的生根率相差不大. 建议在生产中可以采用接种培养基后在温室中生根, 并采用盖封口膜密封方法保持湿度(这对于苗木的驯化成活率尤为重要), 可以节省育苗成本, 提高苗木的驯化成活率.

参考文献:

- [1] Mroginski L A, Bernasconi N K, Sansberro P A, et al. Micropropagation of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): effects of explant source on *in vitro* culture establishment[J]. *Phyton Buenos Aires*, 1996, 59(1-2):161-170.
- [2] 张雅君, 徐妙珍, 张方春, 等. 试管苗温室移栽成活率主要因素的研究[J]. *林业科技*, 1994, 19(4):8-9.
- [3] 王玉军. 简化植物组培快繁技术体系的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2000.
- [4] 刘庆忠, 赵红军, 王侠礼, 等. 新型大樱桃无性系矮化砧木吉塞拉(*Gisela*) [J]. *落叶果树*, 2000 (3): 18-20.
- [5] 刘庆忠, 张力思, 李勃, 等. 甜樱桃矮化砧木新品种“吉塞拉 5 号” [J]. *园艺学报*, 2005, 32(4):760.
- [6] Isutsa D K, Pritts M P, Mudge K W. A protocol for rooting and growing apple rootstock microshoots [J]. *Fruits Varieties Journal*. 1998, 52(2):107-116.
- [7] Pruski K, Astatkie T, Nowak J. Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking cherry (*Prunus tomentosa*) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 82(2):207-211.

Optimization of Tissue Culture and Rapid Propagation on Sweet Cherry Dwarf Rootstock *Gisela* in Mass Production

LI Jiang¹, FAN Zhi-qiang², SUN Zhong-xu³

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Shandong Forestry Bureau, Jinan 250014, China; 3. Horticulture Department, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China)

Abstract: *Gisela*, which is better dwarf rootstock of sweet cherry, is used as study material. In order to get better quality seedlings in mass production by using the technology of plant tissue culture, it has been studied how to get the better bacteria-free explants by contrast tests, to select the better multiplication and rooting culture medium by orthogonal tests, and to get the better domestication conditions in greenhouse on many factors by contrast experiments. The result show that explant material should be cultured at natural condition of greenhouse, the better sterilizing method of getting bacteria-free explants is 0.1% Hg + 0.1% Hg, the regenerative culture medium of MS + IBA 0.3 mg/L + 6-BA 0.8 mg/L + white sugar 30 g/L + agar 7 g/L, the rooting culture medium of MS + IAA 0.3 mg/L + IBA 0.3 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 20 g/L white sugar + agar 6 g/L are tested the better culture medium's formulation by orthogonal tests in both theory and production, and using greenhouse under the condition of sealed tissue culture rooting seedlings under controlled light intensity can improve the living rate of domestication seedlings. There has been match process of 300 thousands seedlings of *Gisela* one year by using the result in mass production.

Key words: *Gisela*; mass production; explant; domestication; optimization

(责任编辑 周雪莹)