

无刺红树莓组织培养快速繁殖技术研究*

朴日子, 曹后男, 陈艳秋, 宗成文, 陈 蕾
(延边大学农学院, 龙井 133400)

摘 要: 以无刺红树莓带芽茎段和茎尖为外植体, 筛选各组织培养阶段高频、稳定的适宜培养基。结果表明: 外植体以茎段为佳。分化培养基以 $1/2$ MS + 6-BA 1.0 mg/L + 活性炭 0.1% 最好, 分化率可达 100%; 继代增殖培养基以 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最理想, 增殖倍数可达 7 倍; 生根培养基以 $1/2$ MS + IBA 1.0 mg/L + 活性炭 1.0 g/L 最佳, 生根率可达 93.33%。生根类型多为皮部生根。采用 2 步移栽法进行移栽时, 第 1 次移栽以河砂为基质移栽成活率达到 98%, 第 2 次移栽成活率 100%。

关键词: 无刺红树莓; 茎段; 组织培养; 激素

中图分类号: S663.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2006)04-0411-04

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of Thornless Red Raspberry *Idaeus*

PIAO Ri-zi, CAO Hou-nan, CHEN Yan-qiu, ZONG Cheng-wen, CHEN Lei

(College of Agriculture, Yanbian University, Longjing 133400, China)

Abstract: Using stem segments with buds and tips as explants, tube rapid propagation of Red Raspberry was studied. The results indicated that the appropriate media for respective culture stages were: for germination of auxiliary buds: $1/2$ MS + 6-BA 1.0 mg/L; for differentiation and multiplication: MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, the multiple for multiplication was up to 7; for rooting: $1/2$ MS + IBA 1.0 mg/L + active carbon 1.0 g/L and the rate of rooting was 93.33%. After 20-day acclimatization, the rooted plantlets were transplanted to substrata in two successive steps, the survival rates of which were 98% and 100% respectively.

Key words: thornless red raspberry; stem; tissue culture; hormone

树莓(*Rubus idaeus*)又称木莓, 蔷薇科悬钩子属, 是一种生态及经济效益较好的多年生落叶半灌木树种, 其果实为聚合果, 是近年来国内外兴起的第 3 代水果之一。树莓果实味道鲜美可口, 营养极其丰富, 可鲜食, 也是饮品深加工的上好原料, 其加工品主要有果酒、果汁、果酱、蜜饯等^[1]。据前苏联报道, 每 100 g 树莓果实含水杨酸 0.5 ~ 2.5 mg, 可用作发汗剂, 是治疗感冒、流感和咽喉炎的良好祛热药。树莓是一种具有开发潜力的药用植物, 国内货源一直紧俏, 市场前景十分广阔^[2]。迄今国内树莓优良品种多从欧美引进, 栽

培面积小, 产量较低。生产上采用扦插、根蘖、压条等传统繁殖方法, 其繁殖系数低, 速度慢, 受季节限制, 影响优良品种的开发和推广。采用组培快繁技术可以避免上述弊端^[3]。有关树莓的组织培养国内已有一些报道^[2-6], 但尚未解决繁殖系数低这一技术关键, 还远远不能满足生产上的需求, 因此有必要研究和完善红树莓高频、稳定的组培快繁技术体系。本研究以俄罗斯的无刺红树莓(又称短刺红树莓)品种为试材, 对影响其快繁效率的多种激素因素进行了研究, 筛选各培养阶段最佳培养基配方, 为在短期内获得大量种苗并进

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30560091)

作者简介: 朴日子(1958-), 女, 实验师, 主要从事植物组织培养及生物技术研究。

收稿日期: 2005-12-24 修回日期: 2006-01-16

一步获得脱毒苗木及大规模商业化生产奠定理论基础。

1 材料与方

1.1 材料

试验用无刺红树莓为从俄罗斯引入品种,2003 年采自中国农业科学院特产研究所,试材选择一年生枝条的茎段和茎尖。

1.2 方法

1.2.1 外植体的建立 2004 年 3 月 15 日,采集温室内盆栽的无刺红树莓的一年生未木质化枝条,将茎剪成 3~4 cm 长、带一个芽的茎段。用洗衣粉液轻刷表面,自来水冲洗干净。在无菌条件下,将材料放入 70% 酒精浸泡 30 s,再用 1.0 mL/L HgCl 溶液消毒 3 min,最后用无菌水冲洗 4~6 遍备用。

1.2.2 芽的分化 将已消毒的茎段和茎尖接种于 6 种起始培养基(表 1)上诱导芽的分化,25 d 后调查分化率。培养基中蔗糖质量浓度为 30 g/L,琼脂为 7~8 g/L,活性炭 0.1%,pH 5.8。培养温度为(25±2)℃,光强 2 000~2 500 lx,光照 12 h/d。

1.2.3 增殖继代 待外植体萌发展叶并分化出新芽后,将新芽切成 1~1.5 cm,转接到以 MS 为基本培养基并附加不同激素的 4 种培养基(表 2)上进行继代增殖培养,30 d 后调查其生长增殖情

况。

1.2.4 试管苗的生根 芽苗继代培养达到一定数量后,选取 3 cm 高的芽苗,从基部切下,单个接种到 1/2 MS 附加 IBA 的生根培养基(表 3)上进行培养。35 d 后抽样调查各处理 15 株,统计其生根情况。培养基配方及培养条件同本文“1.2.2”。

1.2.5 试管苗的移栽及管理 试管苗根长达到 2~3 cm 时进行驯化移栽。揭开瓶盖,在自然光照下炼苗 2 d,洗净根部的培养基,移栽到消毒过的河砂苗床中,搭上塑料薄膜小拱棚。每隔 3 d 喷 1 次 1/2 MS 营养液,保湿培养。炼苗初期温度保持在 20℃,相对湿度保持 90% 以上,适当遮荫,后期逐渐通风和增加光照。15 d 后调查成活率。将苗床的小苗移到腐殖质土与河砂(3:1)的营养钵中,共处理 100 株,20 d 后统计移栽成活率。。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对外植体萌发的影响

消毒后的外植体接种到起始培养基上,经 5 d 的培养,茎尖开始萌动。1 周后茎段上的腋芽也开始萌动。培养 10 d 后,大部分茎尖由于消毒过重,逐渐褐变死亡或者变为畸形芽,但茎段上长出的腋芽生长正常,芽可伸长约 0.5~1.0 cm。因此其后的试验所用外植体均为茎段。培养 25 d 后调查芽分化情况(见表 1)。

表 1 不同培养基对外植体萌发的影响

Table 1. Effect of different media on explant germination

处 理 Treatment	基本培养基 Basic medium	$\rho(\text{激素})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ Hormone				外植体接种数 No. of inoculation	褐变死亡数 No. of browning	出芽数 No. of germination	出芽率/% Growing rate	生长情况 Germination viability
		6-BA	NAA	IBA	GA ₃					
1	1/2 MS	1.00	0	0	0	18	0	18	100.00 ^a	芽生长快,深绿,健壮
2	1/2 MS	1.00	0.03	0	6.00	18	1	12	70.59 ^{de}	芽生长缓慢,细弱,黄
3	1/2 MS	1.00	0	0.03	6.00	18	0	17	94.44 ^{ab}	侧芽纤细,伸长缓慢
4	MS	1.00	0.00	0.00	0.00	18	2	15	93.75 ^{bc}	芽生长较快,较粗壮
5	MS	1.00	0.03	0.00	6.00	18	4	10	71.42 ^e	芽细弱,生长缓慢
6	MS	1.00	0.00	0.03	6.00	18	2	13	81.25 ^{cd}	侧芽纤细,伸长缓慢

由表 1 可见,激素的种类和质量浓度对萌芽有一定的影响。6 种培养基上的萌芽率为 70.59%~100%。未添加任何生长素的处理 1 和处理 4 萌芽率相对较高,分别为 100%和 93.75%,在这 2 种培养基上萌发的腋芽生长迅速而且较粗

壮。处理 3 和处理 6 萌芽率也较高,分别为 94.44%和 81.25%,但茎段上萌发的腋芽生长势不如处理 1 和处理 4 培养基;处理 2 和处理 5 的萌芽率只有 70.59%和 71.43%,明显低于处理 1 和处理 4,芽的生长缓慢而细弱。

在分化培养中,使用 1/2 MS 培养基的处理分化率相对高于使用 MS 为基本培养基的处理,而且褐变现象也明显降低,这表明无机盐浓度与酚类物质的氧化有关^[7]。由表 1 可以看出,本研究中无刺红树莓起始培养的最佳培养基为 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + 活性炭 0.1%。

2.2 不同培养基对继代增殖的影响

初代培养获得的芽苗,还需要进一步继代培

养增殖,才能发挥组织培养快速繁殖的优势。不同培养基对无刺红树莓芽增殖的影响见表 2。由表 2 可知,不同激素水平对无刺红树莓的增殖有显著的影响。经过 30 d 的培养,处理 1 在芽的基部形成很多丛生状不定芽,增殖倍数达 7.09 倍,与处理 3 和处理 4 差异极显著,但与处理 2 无显著差异。处理 2 与处理 3 株高差异极显著的,与其他处理差异不显著。

表 2 不同培养基对无刺红树莓增殖的影响

Table 2. Effect of different media on multiplication of thornless red raspberry

处 理 Treatment	基本培养基 Basic media	$\rho(\text{激素})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ Hormone				调查数 No. of investigation	增殖倍数 Times of multi- plication	株高 h/cm Mean height of plantlets	生长情况 Germination viability
		6-BA	NAA	IBA	GA_3				
1	MS	1.00	0.10	0	0	21	7.09 ^A	2.88 ^{AB}	苗粗壮,叶较小,株矮,深绿色,不定芽特多
2	MS	1.00	0.10	0	2.00	21	6.57 ^{ABC}	3.14 ^A	苗壮,叶大,浅绿色,腋芽萌发多
3	MS	1.00	0	0.10	0	21	5.19 ^{BC}	2.00 ^B	长势一般,不定芽多
4	MS	1.00	0	0.10	2.00	21	3.81 ^C	2.76 ^{AB}	长势较好,腋芽萌发多

从芽苗生长情况看,处理 1 的苗壮,植株呈深绿色,不定芽特别多,但比处理 2 的叶小、株矮;处理 2 的苗壮,叶大,腋芽萌发较多,但植株呈浅绿色。综合考虑苗木的生长势和增殖倍数,认为处理 1 即 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为本试验中继代增殖培养的最佳培养基。丛生芽或腋

芽转接到处理 1 培养基上,不断继代分离,芽的数量可得到大量的增殖。

2.3 IBA 对试管苗生根的影响

不同质量浓度的 IBA 对无刺红树莓生根的影响见表 3。

表 3 IBA 浓度对无刺红树莓生根率及根系生长的影响

Table 3. Effect of concentration of IBA on rooting rate and growth of root of thornless red raspberry

处 理 Treatment	基本培养基 Basic medium	$\rho(\text{IBA})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	调查数 No. of investigation	生根率/% Rooting rate	单根长 l/cm Average root length	单株发根数 No. of roots per plant
1	1/2 MS	0.10	15	40.00 ^c	1.50 ^c	1.87 ^c
2	1/2 MS	0.50	15	73.77 ^b	3.10 ^b	4.00 ^b
3	1/2 MS	1.00	15	93.33 ^a	4.80 ^a	5.80 ^a
4	1/2 MS	1.50	15	60.00 ^b	1.83 ^c	2.73 ^c

由表 3 可见,无刺红树莓在附加不同质量浓度 IBA 的培养基上均能生根,但生根率和根系生长量有很大差异。0.1 ~ 1.0 mg/L 范围内,随着 IBA 质量浓度的提高,生根数也增加,1.0 mg/L 的处理生根率可达 93.33%,单株根条数 5.80 条,根长 4.80 cm,与其他处理差异显著。但当质量浓度达到 1.5 mg/L 时,生根率为 60.00%,单株根条数和根长只有 3 条和 1.83 cm,这说明 IBA 质量浓度高抑制芽苗的生根。4 种处理中,1/2 MS + IBA

1.0 mg/L + 活性炭 1.0 g/L 的生根培养基生根效果最佳,每株平均发根数为 5 ~ 6 条,根系发育良好,侧根较多。

试验中还观察到无刺红树莓生根类型多为皮部生根,当接种约 15 d 时,切口处出现较明显的愈伤组织和白色根状突起物。因此,转入生根培养时应注意使切口位于叶柄下约 2 ~ 3 cm 处。

2.4 试管苗的移栽

生根苗经自然光下炼苗 2 d 后移栽到河砂苗

床中,8 d 时长出 0.2 cm 的新根,15 d 后一次成活率达到了 98%。二次移栽到营养钵中的幼苗生长迅速,木质化程度不断增加,移栽 20 d 后的成活率可达 100%。

3 结论

1) 无刺红树莓的茎段初代培养时在 1/2 MS 培养基中的萌芽率相对高于 MS 培养基,而且褐变率也明显降低,这表明在起始培养时适宜的无机盐浓度可以显著减轻材料的褐变^[8]。用 1/2 MS 可显著降低生产成本。试验中发现无刺红树莓的起始培养阶段无需添加任何生长素,生长良好。这可能是外植体本身所含有的生长素满足了起始培养需求。

2) 无刺红树莓在进行商品苗生产时,建议在增殖培养中根据培养目的选择培养基。以增殖为目的时,可采用 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基;以壮苗为目的时,选用 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + GA₃ 2.0 mg/L 培养基。

3) 无刺红树莓生根类型多为皮部生根,这保证了根与茎之间维管束的正常连接,有利于移栽成活。这与徐桂娟等人对黑树莓试管生根的研究

结果相似^[5]。

4) 侧芽是无刺红树莓快繁的理想外植体,芽生长快,且遗传性稳定^[4]。茎尖易褐变死亡,若消毒处理时间短则易污染。分化培养最佳培养基为 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + 活性炭 1.0 g/L,增殖培养基以 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最理想,生根培养基以 1/2 MS + IBA 1.0 mg/L + 活性炭 1.0 g/L 为好。

参考文献:

- [1] 夏国京,郝 萍,张力飞. 第三代果树野生浆果栽培与加工技术[M]. 北京:中国农业出版社,2002:37-59.
- [2] 肖娅萍,王哲之,张志勤,等. 红树莓植株再生系统的建立[J]. 中草药,2001,32(8):738-741.
- [3] 刘计权. 树莓的组培快繁研究[J]. 北方园艺,2003(2):47.
- [4] 董丽芬,张晓英,张宗勤,等. 树莓的组织培养技术[J]. 西北林学院学报,2003,18(2):42-43.
- [5] 徐桂娟,罗晓芳,姚洪军. 黑树莓的组织培养与快速繁殖[J]. 北京林业大学学报,2002,24(1):99-100.
- [6] 安 伟,李亚东,张志东,等. 红宝玉树莓茎段培养及试管繁殖[J]. 吉林农业大学学报,2002,24(3):43-45,56.
- [7] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1999:48-49.
- [8] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社,1986:24-38.
- [9] 朱玉英,龚 静,吴晓光,等. 青花菜细胞质雄性不育系叶绿素和内源激素含量变异初探[J]. 上海农业学报,2002,18(4):42-46.
- [10] 李英贤,张爱民,黄铁城. 小麦细胞质雄性不育与花药组织内源激素的关系[J]. 农业生物技术学报,1996,4(4):307-313.
- [11] 戴雄泽,唐冬英,邹学校. 辣椒雄性不育与花蕾内源激素含量变化的关系[J]. 辣椒杂志,2001(1):10-13.
- [12] 白 薇,田自华,盖连玉,等. 甜菜胞质雄性不育系与其保持系激素含量的差异[J]. 内蒙古农业大学学报,2004,25(3):48-51.
- [13] 田长恩,段 俊,梁承邳,等. 水稻细胞质雄性不育系及其保持系幼穗发育过程中内源激素的变化[J]. 热带亚热带植物学报,1998,6(2):137-143.
- [14] Sawhney V K, Shukla A. Male sterility in flowering plants: are plant growth substances involved [J]. Amer J Bot, 1994, 81(12):1640-1647.
- [15] Singh S, Sawhney V K. Cytokinins and abscisic acid in roots of the normal and stamenless-2 mutants of tomato [J]. Report of the tomato genetic cooperative, 1992, 42: 34-35.
- [16] Singh S, Sawhney V K. Cytokinins in a normal and the ogura (ogu) cytoplasmic male-sterile line of rapeseed (Brassic anapus. L) [J]. Plant Science, 1992, 86: 147-154.

(上接第 410 页)