

文章编号:1002-2724(2017)06-0022-04

黑果枸杞组培无菌体系获得及组培快繁技术研究

李媛媛¹,赵红霞¹,赵学彩¹,刘欣¹,李承科¹,孙仲序^{2*}

(1.山东博华高效生态农业科技有限公司,山东 滨州 256500;2.山东农业大学)

摘要:以黑果枸杞茎段为外植体,研究枝条不同位置、酒精和升汞不同消毒时间对无菌体系获得的影响,研究不同激素配比对丛生芽增殖及生根培养的影响,筛选出最佳配方,从而建立黑果枸杞组织培养和快繁技术体系。结果表明:获得无菌体系最佳茎段为枝条顶端,最佳消毒试剂时间为酒精 10s、升汞 16min;最优增殖配方为 MS+KT0.2mg/L+NAA0.02mg/L;最优生根配方为 1/2MS 基本培养基中添加 0.2~0.3mg/L 的 IBA。

关键词:黑果枸杞;组培快繁;无菌体系

中图分类号:Q813.1+2

文献标识码:A

1 引言

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)为茄科枸杞属多年生小灌木,属于一种盐生药用植物,具有抗旱、抗寒、耐盐碱、根蘖性强和耐土壤贫瘠等诸多优点,是盐碱地治理、护坡、防止水土流失的良好树种。无论在经济产品开发,还是在生态环境治理方面都具有广泛的市场前景和开发潜力,可以成为医药保健、经济林建设和盐碱地生物防治的重要经济树种^[1]。目前,黑果枸杞的研究绝大多数集中在对其生理生态、有效成分分析、开发利用以及治理荒漠化和野生种源驯化等方面,而关于黑果枸杞组织培养与快速繁殖方面的研究报道较少。

本研究筛选出最佳无菌体系获得方案,以及最适增殖和生根配方,从而建立黑果枸杞组织培养和快繁技术体系。并利用组织培养快繁技术对筛选出的适宜山东地区盐碱地种植的黑果枸杞优良品种进行快速繁殖,来保留植株原有的优良性状,将优良单株快速繁殖成无性系,并在生产中大量推广。

2 材料与方法

2.1 材料

材料来源于山东博华高效生态农业科技有限公司实验田(东经 118.07,北纬 37.07)2年生枸杞实生苗枝条。选择健康植株的中层当年生整枝为材料。

2.2 方法

2.2.1 无菌体系建立

6月选取优良黑果枸杞枝条的不同位置茎段作为组织培养的外植体(枝条顶端、枝条上部、枝条中部、枝条下部),剪去叶片,保留叶柄基部0.5cm,洗洁精浸泡洗净,置于自来水下流水冲洗2h。外植体消毒酒精消毒时间(10s、20s、30s、40s),升汞消毒时间(4min、8min、12min、16min)。整个消毒过程在无菌条件下进行,消毒后材料切成1~1.5cm的茎段(包含1~2个腋芽),而后接种到已灭菌的初代培养基上,每组10瓶,每瓶3株,重复3次,接种7d后开始对外植体生长状况进行观察。

2.2.2 芽增殖继代培养

选取初代培养25d后的组培苗,以MS为基本培养基,考察添加6BA(苄基腺嘌呤)、KT(激动素)、NAA(萘乙酸),对不定芽增殖的影响。每种培养基接种10瓶,每瓶接3个,重复3次。30d后观察组培苗的生长状况,并统计各处理芽的分化率。

2.2.3 生根培养

以MS和1/2MS为基本培养基,添加不同浓度的IBA(吲哚乙酸)(0.1、0.2、0.3mg/L),接种14d观察,30d统计配方生根情况。

2.2.4 培养条件

温度 25±2℃,光照强度 3000 lx,12 h/d。

收稿日期:2017-10-17

基金项目:滨州市枸杞资源开发工程技术研究中心(滨科技字(2014)18号);山东省首批省级农业科技园项目(博兴省级农业科技园)。

作者简介:李媛媛(1988-),硕士,从事组织培养工作,E-mail:nicoleysmile@163.com。

*通讯作者:孙仲序(1946-),教授,研究方向:林木遗传育种和植物生物技术。E-mail:abcde05@163.com。

3 结果与分析

3.1 黑果枸杞无菌体系获得

建立黑果枸杞无菌体系,使用单因素分别归类进行成数统计分析,以枝条部位、酒精消毒时间、升汞消毒时间3个因素进行归类分析结果见下表。

3.1.1 枝条不同部位处理对黑果枸杞启动率的影响

表1 黑果枸杞枝条不同部位处理对启动率的影响

处理	外植体部位	外植体个数/个	污染/个	死亡/个	成活数/个	启动率/%
1	枝条顶端	360	78	67	215	59.72
2	枝条上部	360	104	107	149	41.39
3	枝条中部	360	140	99	121	33.61
4	枝条下部	360	141	120	99	27.50

表2 表1处理间差异分析

计 算						
		总数 n		变数 v		%
处理 1		360		215		59.72
处理 2		360		149		41.39
计算	P	0.5056	Q	0.4944		
结果	T	4.9197				

如表1所示,枝条不同部位灭菌成活率如下:枝条顶端>枝条上部>枝条中部>枝条下部。根据表1的成活率,将平均成活率最高的枝条顶端成活株数和较高的枝条上部成活株数进行成数显著性测定,见表2,结果如下:t=4.9179>1.96 差异显著;t=4.9179>2.58 差异极显著。二者呈极显著差异,故采用枝条顶端为材料,成活率较高。

3.1.2 酒精消毒时间对黑果枸杞启动率的影响

表3 酒精消毒时间对黑果枸杞启动率的影响

编号	酒精消毒时间/s	外植体个数/个	污染/个	死亡/个	成活数/个	启动率/%
1	10	360	116	82	162	45.00
2	20	360	94	82	184	51.11
3	30	360	90	92	178	49.44
4	40	360	163	137	60	16.67

表3所示,酒精消毒10s、20s、30s的处理组成活率高于酒精消毒40s的处理组,根据表3中的数据,将平均成活率最高的处理2和平均成活率较高的处理3进行成数显著性测定,结果如表4:t=0.4472<1.69,不显著。根据表4,将平均成活率较低

表4 表3处理间差异分析

		总数 n		变数 v		%
处理 2		360		184		51.11
处理 3		360		178		49.44
计算	P	0.5028	Q	0.4972		
结果	T	0.4472				

表5 表3处理间差异分析

		总数 n		变数 v		%
处理 1		360		162		45.00
处理 4		360		60		16.67
计算	P	0.3083	Q	0.6917		
结果	T	8.2314				

的处理1和平均成活率最低的处理4进行统计:t=8.2314>1.96 差异显著;t=8.2314>2.58 差异极显著。统计知灭菌10s、20s、30s的成活率之间差异不显著。灭菌10s的比灭菌40s的差异极显著。所以酒精消毒10s、20s、30s都可以,以10s最佳。

3.1.3 升汞消毒时间对黑果枸杞启动率的影响

表6 升汞消毒时间对黑果枸杞启动率的影响

处理	升汞消毒时间/min	外植体个数/个	污染/个	死亡/个	成活数/个	启动率/%
1	4	360	138	75	147	40.83
2	8	360	140	123	97	26.94
3	12	360	110	95	155	43.06
4	16	360	75	100	185	51.39

表7 表6处理间差异分析

		总数 n		变数 v		%
处理 4		360		185		51.39
处理 3		360		155		43.06
计算	P	0.4722	Q	0.5278		
结果	T	2.2395				

如表6所示,升汞消毒启动率处理4>处理3>处理1>处理2,将启动率较高的处理4和处理3进行成数显著性测定,见表7,结果如下:t=2.2395>1.96,差异显著。灭菌16分钟显著优于灭菌12分钟,更显著优于4和8分钟灭菌的效果。

综上所述,综合应用较好的理论组合应该是:采用枝条顶端+酒精灭菌10秒钟+升汞灭菌16分钟,实际结果该组合的成活率达到84.4%,符合理论结论。所以,该组合是最佳组合。

3.2 不同激素配比对增殖的影响

表8 不同激素对比对黑果枸杞增殖的影响

处理	6-BA concentration /mg/L	KT concentration/mg/L	NAA /mg/L	增殖系数 Proliferation multiple// times	玻璃化率 Vitrification rate
1	0.2	0	0.02	5.89 a	玻璃化严重
2	0.4	0	0.04	1.06 d	
3	0.6	0	0.06	1 d	
4	0.8	0	0.04	1 d	
5	1	0	0.1	1 d	
6	0	0.2	0.02	3.83 b	
7	0	0.4	0.04	3.67 bc	
8	0	0.6	0.06	3.7 bc	
9	0	0.8	0.08	2.2 bc	
10	0	1	0.1	1.86 cd	

注:表中大写字母不同表示差异显著(p<0.01),小写字母不同代表差异显著(p<0.05)

根据表8可看出,处理1增殖系数最高为5.89,且与其它实验号差异显著,但是该处理玻璃化现象严重,有效不定芽数少。比较各处理间增殖系数,分裂素使用KT的组合比6BA的组合更稳定,处理6、7、8、9增殖系数为3.83、3.67、3.7、2.2,各处理间差异不显著,但以使用激素浓度小,增殖系数大为佳,所以筛选MS+KT0.2mg/L+NAA0.02mg/L为最优配方。

3.3 不同培养基和不同激素组合对生根的影响

本处理使用成数分析法分析,编号3、B、C与其他处理间差异显著,3个处理间差异不显著。具体表

现形式为生根率较高,且侧根和平均每株根数较多。由上表可看到,以1/2MS和MS作为基础培养基的两类生根培养基,生根率随IBA质量浓度的增加呈递增趋势。IBA浓度为0.3mg/L时黑果枸杞的生根率最高,为73.3%和74.1%,IBA浓度为0.2mg/L和0.1mg/L时,生根率1/2MS>MS。说明基础培养基使用1/2MS效果较好。综合以上,筛选出生根配方使用1/2MS为基本培养基中添加0.2~0.3mg/L的IBA生根效果最佳。

4 讨论

本研究确定了无菌体系获得最佳条件为选用枝条顶端、酒精灭菌10秒钟、升汞灭菌16分钟。不同位置茎段位置启动率差异较大,一般选择幼嫩部位作为启动材料。此外,大田中材料带菌较多,可通过一段时间的室内培养再进行避免。日常培养时为避免材料浪费可在培养基中添加一定浓度的农用杀菌剂既能有效防止真菌污染,又能在一定程度上促进组培苗生长发育^[2]。

黑果枸杞丛生芽增殖最 适合培养基为MS+KT0.2mg/L+NAA0.02mg/L,将分化系数控制在4以内,苗壮且无玻璃化现象。孙晓红^[3]研究发现,增殖最佳分裂素为ZT,叶片愈伤诱导使用分裂素6BA,且随分裂素浓度升高,分化率增加,玻璃化增加,有效不定芽数减少,本研究中增殖时使用6BA也出现了严重的玻璃化现象。

马彦军^[4]研究发现黄果枸杞组培快繁时发现1/2MS培养基作为生根培养的基本培养基效果最佳,Siyu SUN等研究黑果枸杞组培发现生根培养时使用IBA生根率较高^[5],与本研究结果一致,最后获得最佳生根培养基配方为1/2MS为基本培养基中添

表9 不同培养基和不同激素组合对生根的影响

处理编号	配方	总数	生根数量	生根率	侧根数量	平均条数
1	MS+IBA0.1mg/L	30	12	40.0% b	多	2.25
2	MS+IBA0.2mg/L	30	12	40.0% b	少	2.42
3	MS+IBA0.3mg/L	30	22	73.3% A	多	3.14
4	MS	30	12	40.0% b	少	1.42
A	1/2MS+IBA0.1mg/L	30	19	63.3% a	多	2.16
B	1/2MS+IBA0.2mg/L	30	21	70.0% A	多	3.24
C	1/2MS+IBA0.3mg/L	27	20	74.1% A	多	4.4
D	1/2MS	30	16	53.3% a	少	1.31

注:表中大写字母不同表示差异显著(p<0.01),小写字母不同代表差异显著(p<0.05)

加 0.2~0.3mg/L 的 IBA。

参考文献:

[1]刘王锁.产业化种植黑果枸杞的可行性分析[J].林业通讯,2015,(2):31-32,40.
 [2]李晓莺,罗青,张曦燕,等.杀菌剂对枸杞组织培养中真菌污染的控制作用[J].安徽农业科学,2008,(36):15804,15841.
 [3]孙晓红,位书磊,宋强,等.黑果枸杞的叶片分化与快速

繁殖[J].植物生理学报 2016, 52 (5): 653-658.
 [4]马彦军,杨万鹏,杨坤,等.黄果枸杞愈伤组织诱导及快繁技术研究[J].干旱区资源与环境,2017,31(6):179-184.
 [5]Siyu SUN,Hounan CAO,Hang YAO.Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of Lycium ruthenicum Murr. [J].Agricultural Science & Technology, 2016, 17 (5): 1060-1064.

(上接第 21 页)

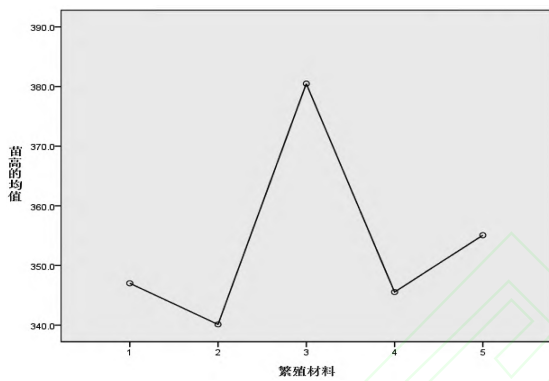


图 2 苗高均值图

表 10 I-107 杨复病虫害感染调查表

试验材料	虫害	锈病	黑斑病	白粉病	冻害
1	食叶害虫	轻	轻	轻	无
2	食叶害虫	轻	无	无	无
3	食叶害虫	轻	无	无	无
4	食叶害虫	轻	无	无	无
CK	食叶害虫	轻	轻	重	无

表 11 I-107 杨复幼干形调查表

调查时间:2016年12月1日

试验材料	重复 I	重复 II	重复 III	重复 IV	干形
1	直	直	直	直	直
2	弯	弯	弯	弯	弯
3	直	直	直	直	直
4	弯	弯	弯	弯	弯
CK	直	直	直	直	直

从表 11 可得知,材料 1、3 干形直,而材料 2、4 干形弯,主要是雨季大风所致,采取了竹杆固定,但效果不甚理想。脱毒苗不抗风应该与组培过程中材料采用部位有关。

3 结论

通过对 I-107 杨五种材料进行扦插幼化苗成活率、生长量、病虫害感染及干形指标的对比试验研究,采穗圃插条材料表现最好,平均地径为 2.6cm,高于对照 8.3%,平均苗高 373.3cm,高于对照 8.7%,成活率较高,并且干形直,病虫害轻微,无冻害。而其他材料,伐桩留床苗干和脱毒苗一年苗干成活率较高,但生长量较低,而且脱毒苗一年苗干干形弯。综上指标,目前最佳 I-107 杨幼化苗材料为采穗圃材料。

4 讨论

一是组培幼化苗表现不很理想,干形弯是个严重缺陷,建议对 I-107 杨选取茎尖部分进行重新组培,并进一步幼化育苗试验;二是将所有参试材料全部平茬,特别是对脱毒苗进一步观察,看一看来年干形如何。同时,选取其中一个重复的材料建一片示范林,进行长期调查研究,观察各材料后期表现,以作出最终科学论断。