

冬青的组织培养与快速繁殖技术

陈家龙¹,王广东²,郝日明²

(1. 温州科技职业学院(筹)园林系,浙江 温州 325006;2. 南京农业大学园艺学院,江苏 南京 210095)

摘要:以冬青的新梢茎段为外植体进行了离体培养与快速繁殖研究,筛选出适宜的诱导、增殖及生根培养基。结果表明:适宜的启动培养基为 MS+6-BA0.5 mg·L⁻¹+GA31.0 mg·L⁻¹+蔗糖 3%和 MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA0.05 mg·L⁻¹+蔗糖 3%;适宜继代增殖培养基为 MS+6-BA0.5~1.0 mg·L⁻¹+NAA0.05 mg·L⁻¹+蔗糖 3%;最适宜生根培养基为:1/2MS+NAA0.4 mg·L⁻¹+2.5%蔗糖。上述培养基均添加 0.6% 琼脂,pH5.8,培养温度为 25±2℃,光照强度为 2000 lx,光照时间 12h/d。采用混合基质作栽培基质,移栽成活率可达 80%。

关键词:冬青;离体培养;快速繁殖

冬青(*Ilex chinensis* Sims)为冬青科冬青属常绿乔木,枝叶繁茂,葱郁如盖,果长球形,成熟时红色光亮,红若丹珠,分外艳丽,经冬不落,是优良的庭院观赏和绿化树种,也可作绿篱栽培,特别在园中的叠石和小丘上种植甚美;其材质坚韧致密,可制作工艺品;叶、树皮、种子及根可供药用,具有抗菌、清热解毒等功效。产于江苏、安徽、浙江、江西、福建、台湾、湖南、两广地带,生于海拔 500~1000m 的山坡常绿阔叶林中或林缘^[1,2]。如何快速繁殖这种几乎还是处在野生状态的优良树种,发挥其经济和生态作用,是目前园艺工作者面临的问题。常规播种繁殖,种子有隔年发芽的特性,生长缓慢,且种子繁殖后代性状分离不能保持母本的优良性状,难以短期满足苗木市场的巨大需求;利用组织培养可以在短时期内获得大量的优良无性系植株。冬青属植物的组织培养取得了一定的成果。李登中^[3]对

金叶日本冬青(*Ilex crenata*)的组织培养与快速繁殖进行了相关的研究;梁珍海和刘根林等^[4]利用大叶冬青(*Ilex latifolia* Thunb.)叶外植体诱导的愈伤组织,形成再生体系。但目前对冬青的离体快繁尚未见报道。本研究对冬青离体培养与快速繁殖进行了初步研究,为冬青的快速繁殖提供参考,也为进一步建立遗传再生体系和工厂化育苗提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试冬青材料于 2004 年 10 月上旬取自南京中山植物园内生长健壮植株的新梢茎段。

1.2 试验方法

1.2.1 灭菌 剪取冬青生长健壮的枝条,除去叶片和虫病斑,用自来水流水冲洗 30min。然后在

[收稿日期] 2007-11-08

[作者简介] 陈家龙(1981.10-),男,安徽铜陵人,硕士,助理农艺师,从事园林科研与教学工作。

超净工作台上用 75% 的乙醇处理 10 s, 再用 0.1% 的 HgCl_2 溶液灭菌 15 min, 无菌水冲洗 6 次。将材料切成带顶芽和腋芽的长 1.0 cm 的茎段接种到启动培养基。

1.2.2 培养基配方 ①诱导培养基:基本培养基为 MS, 添加 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和不同浓度 GA3 组合; 添加不同浓度的 6-BA (0.5 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 NAA (0.05 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组合。②增殖培养基:基本培养基为 MS, 在培养基中添加不同的细胞分裂素, 即 KT、6-BA、2iP, 浓度设置为 0.5 、 1.0 、 1.5 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 四个梯度, 每个处理均添加 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。在培养基中添加不同的生长素, 即 NAA、IAA、IBA, 浓度设置为 0.05 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个梯度, 每个处理均添加 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。③生根培养基:在 MS 培养基中添加不同浓度的 NAA 和 IBA, 浓度设置为 0.05 、 0.1 、 0.2 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 四个处理。上述除生根培养基添加 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, 其余添加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8。

1.2.3 培养条件 温度为 $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 光照时间为 12 h/d, 光照强度为 2000 lx。

1.2.4 培养方法 ①芽的诱导:将灭菌的茎段切成 1.0 cm 左右的带腋芽茎段, 接种于诱导培养基上, 每瓶接种 5 个外植体, 重复 6 次。②增殖培养:将诱导的腋芽新梢切下, 转接到增殖培养基上。③生根培养:选择长势较壮、高约 3.0 cm 的芽转接到生根培养基。④驯化移栽:将根系发

达、植株健壮的瓶苗打开瓶塞, 移到自然光下炼苗 1 周, 洗净根部培养基, 移栽到珍珠岩和腐熟土 (1:1) 的基质中, 前期适当遮阴, 保持较高的湿度。

2 结果与分析

2.1 冬青茎段腋芽的诱导

2.1.1 赤霉素 GA3 对冬青腋芽萌发率的影响 冬青带腋芽茎段灭菌后, 接种于诱导培养基中。根据木本植物的特殊性, 诱导培养有时添加赤霉素, 更利于腋芽的萌发。添加不同浓度的 GA3 对冬青萌发的影响如表 1, 随着赤霉素的增加, 萌发率随之增加。不添加赤霉素只有细胞分裂素 6-BA 时, 萌发率为 33.3%, 在处理中最低; 当赤霉素浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 萌发率在各处理中达到最大值, 为 46.7%; 赤霉素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 萌发率处于两者之间。即 GA3 在 $0 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随着浓度的增加, 有助于外植体腋芽的萌发, 且腋芽伸长为新梢, 节间较长。

表 1 赤霉素 GA3 对冬青萌发率的影响

赤霉素浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数	萌发数	萌发率(%)
0	30	10	33.3
0.5	30	11	36.7
1.0	30	14	46.7

表 2 6-BA 及 NAA 组合对冬青腋芽萌发率的影响

编号	激素组合 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数	萌发数	萌发率(%)
1	6-BA0.5	30	10	33.3
2	6-BA0.5+NAA0.05	30	13	43.3
3	6-BA0.5+NAA0.1	30	11	36.7
4	6-BA1.0	30	13	43.3
5	6-BA1.0+NAA0.05	30	16	53.3
6	6-BA1.0+NAA0.1	30	14	46.7

2.2.2 6-BA 及 NAA 组合对冬青萌发率的影响 不同细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 组合对冬

青无菌系诱导的影响如表 2 所示, 在各处理中, 以组合 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的萌

发率最高,长势最旺。随着细胞分裂素的浓度增加,萌发率升高,生长素 NAA 超过 0.05 mg·L⁻¹ 时,表现出抑制作用,萌发所需时间长。

2.2 冬青无菌苗增殖培养研究

2.2.1 细胞分裂素种类和浓度对冬青无菌苗增殖的影响 将冬青诱导培养阶段获得的无菌腋芽接种于增殖培养基中,不同细胞分裂素对冬青的增殖的影响如表 3 所示,总体趋势为细胞分裂素浓度在 0.5~2.0 mg·L⁻¹ 范围时,随着浓度升高,增殖率下降。在相同浓度下,6-BA 比 KT、2iP 的效果好,具体表现在 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ 处理的植株生长良好,形成大量单株苗,其高度和粗度以及节间距离较均匀,且均生长良好,而在其他 3 种水平上,由于浓度过高,抑制增殖,节间较短,且部分出现弱苗现象,不适于大规模繁殖;经过 KT 处理生长的植株节间短,且部分不能伸长;经过 2iP 处理的无菌苗,在较低浓度下,植株生长良好,高度和节间均较理想,生长势较强,但是较高浓度下,会出现生长不良,甚至不分化、不增殖的现象。这是不同细胞分裂素对不同植物表现的不同特性。

表 3 不同浓度 6-BA、KT、2iP 对增殖培养的影响

细胞分裂素	浓度 (mg·L ⁻¹)	接种数	增殖数	增殖系数
BA	0.5	30	144	4.80
	1.0	30	90	3.00
	1.5	30	71	2.37
	2.0	30	69	2.30
KT	0.5	30	70	2.33
	1.0	30	59	1.97
	1.5	30	55	1.83
	2.0	30	53	1.77
2iP	0.5	30	90	3.00
	1.0	30	67	2.23
	1.5	30	58	1.93
	2.0	30	50	1.67

mg·L⁻¹ 之间,平均根数与根长都随之增加,而生根率却以 0.05 mg·L⁻¹ 时最高。NAA 在 0.05~0.4 mg·L⁻¹ 之间,平均根数、根长也随之增加,而生

2.2.2 生长素种类和浓度对冬青无菌苗增殖的影响 不同的生长素及其浓度对冬青无菌苗的增殖影响如表 4 所示,在增殖过程中,细胞分裂素起主要作用,生长素辅助调节作用。在增殖率上看,以 NAA 最高,IAA 次之,IBA 最低。在 0.05~0.1 mg·L⁻¹ 浓度范围内,NAA、IAA 的增殖率有逐渐升高趋势;IBA 增殖率表现相反,但均有相同趋势,即随着浓度的升高,丛生性增强。从苗的质量来看,以 NAA 为好,单株较高,节间长;IAA 处理形成节间短、高度较低丛生苗,不利于后期生长,需要壮苗,综合考虑,以 NAA 为宜。

2.3 生根培养

2.3.1 不同的生长素对冬青组培苗生根的影响 将增殖阶段获得的无根冬青无菌苗接种于生根培养基中。不同生长素对冬青生根的影响如表 5 所示。在相同浓度下,NAA 的生根率远高于 IBA,NAA 在 0.4 mg·L⁻¹ 时生根率达到 83.3%,而 IBA 的生根率最高为 20.0%。总根数和平均根长方面,NAA 的效果均比 IBA 的效果好,NAA 与 IBA 在生根率和总根数上存在显著差异,即 NAA 在生根效果上比 IBA 好。IBA 在 0.05~0.4

表 4 不同浓度 NAA、IBA、IAA 对增殖培养的影响

生长素	浓度 (mg·L ⁻¹)	接种数	增殖数	增殖系数
NAA	0.05	30	88	2.93
	0.1	30	107	3.57
IBA	0.05	30	84	2.80
	0.1	30	58	1.93
IAA	0.05	30	96	3.20
	0.1	30	104	3.47

根率随浓度的增加先降低后升高,在 NAA 0.4 mg·L⁻¹ 时,根系状态最好,根系白色,侧根多而长。

2.4 驯化移栽

根长达 2.0cm 左右、植株 5.0cm 以上时,打开瓶盖炼苗 1 周,然后用镊子从培养瓶中取出试

管苗,洗净根部培养基,栽入灭菌的珍珠岩和腐熟土混合的栽培基质中。前期适当遮阴,保持较高的湿度,加强管理,20d 统计成活率达到 80%。

3 结 论

3.1 以冬青茎段为外植体,接种于添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

L^{-1} 6-BA 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA3 的 MS 培养基有助于冬青的腋芽萌发,萌发率达到 46.7%;不添加 GA3,只添加细胞分裂素和生长素时,以 $6\text{-BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的激素组合萌发率高,长势较好,腋芽萌发率可达到 53.3%。

3.2 增殖培养中发现,在相同浓度下,6-BA 比 KT、2iP 的增殖效果好,随着细胞分裂素浓度的

表 5 不同浓度 NAA、IBA 对冬青无菌苗生根培养的影响

生长素	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数	生根苗数	生根率 (%)	总根数	平均根数	平均根长 (mm)
IBA	0.05	30	6	20.0	6	1.00	1.0
	0.1	30	3	10.0	3	1.00	1.0
	0.2	30	5	16.7	6	1.2	1.5
	0.4	30	5	16.7	7	1.4	2.0
NAA	0.05	30	24	80.0	38	1.58	1.5
	0.1	30	18	60.0	34	1.89	2.0
	0.2	30	15	50.0	30	2.00	2.0
	0.4	30	25	83.3	58	2.32	3.5

增加,增殖率有下降之趋势,表现出抑制作用。在 NAA 为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,配以 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 或 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2iP 可以获得较高的增殖率。增殖系数最高的培养基为 $\text{MS} + 6\text{-BA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖} 3\%$,达到 4.80;综合考虑组培苗的质量和增殖率,生长素以 NAA 为佳, $0.05 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内可获得生长质量较好的冬青苗,且增殖率较高。

3.3 生根培养研究中,对生长素 NAA 和 IBA 在不同浓度下的生根效果进行比较发现,在相同的浓度水平上,NAA 的生根率远高于 IBA,NAA 在 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时生根率达到 83.3%,总根数、平

均根长均比 IBA 效果好。

参考文献:

- [1] 中国植物志编委会.中国植物志:第 45 卷(2).北京:中国科技出版社,1999:1~62.
- [2] 陈有民.园林树木学.北京:中国林业出版社,1988:412~413.
- [3] 李登中.金叶日本冬青的组织培养与快速繁殖.植物生理学通讯,2004,40(5):592.
- [4] 梁珍海,蒋泽平,刘根林.大叶冬青外植体愈伤组织诱导与不定芽再生.南京林业大学学报,2003,27 (3):51~53.