

野生树莓组织培养技术研究

毕海林, 徐中志, 和加卫, 和秀云, 朱映安, 杨正松, 杨洪涛

(云南省农业科学院高山经济植物研究所, 云南 丽江 674100)

摘要 以未萌发的腋芽和单芽茎段为外植体, 对野生种刺萼粉枝莓进行了组织培养技术研究。结果表明, 未萌发的腋芽是最佳的外植体; MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L 为较佳的启动培养基; MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为最佳的增殖培养基; 生根培养基为 1/2MS+NAA 0.05 mg/L, 试管苗生根率高, 炼苗移栽成活率达 90% 以上。

关键词 刺萼粉枝莓; 组织培养; 腋芽; 单芽茎段

中图分类号: S685.12

文献标识码: A

文章编号: 1006-9690(2007)02-0068-02

树莓(*Rubus alexeterius*)为蔷薇科(Rosaceae)植物, 灌木型果树, 根、茎、叶皆有药用功效^[1], 其果实为聚合浆果, 色泽宜人, 风味独特, 既可鲜食, 也可加工成果酱、果汁、果冻及多种食品添加剂, 其营养价值和经济价值远远高于苹果、橘子、葡萄等水果, 在食品加工、医药、化妆、天然香料、食用色素等方面有着广泛用途, 是近年来世界发展最为迅速的、集营养与保健于一身的第三代新兴水果^[2]。刺萼粉枝莓的别名为刺萼悬钩子, 为蔷薇科悬钩子属野生落叶直立灌木, 目前, 刺萼粉枝莓仅分布于云南西北部, 是云南特有种^[3]。采用组织培养技术, 对其进行快速繁殖研究, 对保存我国的悬钩子种质资源和合理开发利用将发挥重要应用价值。本文报道野生树莓刺萼粉枝莓的组织培养技术, 通过研究, 筛选出了高效的培养基, 有效地解决了刺萼粉枝莓的繁殖技术, 为下一步开发利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 腋芽和单芽茎段

1.2 方法

1.2.1 外植体的预处理 选择生长健壮且无病虫害的刺萼粉枝莓植株, 取腋芽和单芽茎段为外植体; 先用洗衣粉液浸泡 10 min, 流水冲洗 1h, 然后放入

超净台, 70% 酒精消毒 30 s, 再以 0.1% 升汞溶液处理 15 min, 无菌水浸洗 5 次后供接种使用。

1.2.2 芽的诱导分化 取消毒过的外植体腋芽和单芽茎段各 80 个, 启动培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L。

1.2.3 丛生芽的继代增殖 不定芽形成后, 暂不切割, 将其转接于增殖培养基上。培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L, MS+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.2 mg/L, MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

1.2.4 生根培养 在 1/2MS+NAA 0.05 mg/L 培养基上进行根的诱导。

1.2.5 培养条件 以上培养均为固体培养基, 琼脂为 0.65%, 蔗糖为 3%, 培养基 pH 为 5.8, 培养温度为 23 ℃, 光照强度为 1 500 lx, 光照时间为 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 外植体无菌系的建立

外植体无菌体系的建立是组织培养成功的关键, 外植体取材的时间, 部位及生理状态对其成功与否具有重大影响。将消毒过的腋芽剥去外包鳞片, 露出幼嫩芽体, 将其接种于启动培养基上, 10 d 后, 腋芽基部开始有膨大, 腋芽开始萌发; 将消毒过的茎段切成 1 cm 左右的单芽茎段, 置于启动培养基上, 约 15 d 后, 单芽茎段基部形成较大愈伤组织, 芽开始萌发。启动培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L。

收稿日期: 2006-05-18

作者简介: 毕海林(1979-), 男, 云南巍山人。主要从事植物组织培养研究工作。

表1 不同外植体在启动培养过程中的生长情况

外植体	接种数	萌发数	萌发率	污染数	污染率
腋芽	80	75	93.75%	12	15%
单芽茎段	80	25	31.25%	60	75%

观察腋芽和单芽茎段萌发情况,发现腋芽萌发情况较好,污染少,而单芽茎段绝大多数被霉菌污染;腋芽和单芽茎段少数变褐坏死。见表1。由表1可以看出,腋芽直接接种在启动培养基上,其萌发率很高,且污染率很低。单芽茎段虽然其所带腋芽也有萌发,茎段切口处也形成愈伤组织,但极易污染。

以腋芽直接为外植体,其表面包被鳞片,用升汞消毒后将外层剥去,升汞对其内部芽体损伤较小,且又保证了消毒效果,在适当的诱导培养基上,能很好地直接萌发并在基部形成愈伤组织。而单芽茎段,可能是外植体较大,消毒不能彻底,一段时间后,大部分被霉菌污染,且随着初代培养时间的延续,污染率还会陆续上升。从萌发情况来看,腋芽直接接种在培养基上,其萌发率较高,就其原因来看,是因为幼嫩芽体直接接触营养物质,芽体生长点较容易吸收营养物质,从而促其萌发;而单芽茎段,接种中以茎梗接触培养基,营养物质需经茎梗运输到芽体,经切割和消毒后,茎梗运输系统势必在一定程度上受损,故芽体生长点较难吸收到营养物质,而且受消毒后变褐的鳞片束缚,故其萌发率较低。

2.2 芽诱导分化及丛芽的增殖

将初代培养中未污染的腋芽芽体不切割直接转接在4种增殖培养基上,一段时间后,均能分化出不同幼芽。培养基配方及增殖情况见表2。

表2 不同激素配比的培养基中芽增殖情况

培养基	培养基		接种数	分化数	增殖系数
	$\rho(6-BA)$ /mg·L ⁻¹	$\rho(NAA)$ /mg·L ⁻¹			
基本培养基	0.5	0	2.120	42	
MS	0.5	0.2	20	76	3.8
MS	1.0	0.2	20	110	5.5
MS	2.0	0.1	20	114	5.7

由表2可见,诱导丛芽分化的培养基中细胞分裂素浓度相同时,加生长素的培养基分化出的幼芽

要比无生长素的培养基分化出的幼芽多;而生长素用量相同,细胞分裂素偏高时分化出的丛芽较多。说明在第一次继代培养中,一定量的细胞分裂素和生长素均能促进丛芽产生。以此4种培养基连续进行继代增殖。增殖到第三代发现,其它3种培养基中试管苗生长情况较好,而MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L中有的培养瓶里少部分增殖苗畸形化,看起来略显臃肿,说明此种培养基中细胞分裂素过高。可能是随着培养的继续,试管苗产生激素累积效应,起初适合的激素浓度变得不再适合。此时将该培养基配方中的激素浓度适当降低,调为MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L,以后继代培养中分化苗已不再显畸形。

因此,在刺萼粉枝莓的继代增殖培养中,细胞分裂素不宜过高。若用6-BA,取1.0 mg/L为好;或可在起初2次继代增殖中适当高,在以后的继代培养中再适当降低。从继代增殖全程来看,MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L为最佳的增殖培养基。

2.3 根的诱导及试管苗炼苗移栽

将丛芽切成单苗接种于培养基1/2MS+NAA 0.05 mg/L培养基上进行根的诱导。3 d后,切口基部开始膨大,根原基形成。此后根逐渐变长。20 d后,形成较多根,每株苗生根5条以上,生根率为95%以上。此时可对试管苗进行“瓶炼”。把培养瓶移到室温条件下,3 d后微开瓶,隔1 d适当开大瓶盖,3 d后全开瓶,2 d之后进行炼苗移栽。移栽前,以河砂与锯屑混合作为苗床基质,用消毒剂将苗床进行消毒。移栽后要注意保持空气湿度,尽可能保证温度,遮荫养护后,成活率可达90%以上。

参考文献

- [1] 和加卫,唐开学,杨静全,等.云南省悬钩子属药用植物外资源研究[J].中草药,36(7):1078-1081.
- [2] 和加卫,杨正松,唐开学,等.树莓果实贮藏与加工性状研究[J].西南农业学报,2005,18(2):186-189.
- [3] 顾 娟,李维林,王传水.云南悬钩子种质资源考察[J].武汉植物学研究,18(1):49-55.
- [4] 黄苏珍.地被悬钩子的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(1):60.