

风箱果组织培养不定芽的试管外生根及植株再生¹⁾

魏晓慧 殷东生 张丽杰 沈海龙 张鹏

(东北林业大学, 哈尔滨, 150040)

摘要 以风箱果幼苗顶芽为外植体, 诱导不定芽, 通过试管外生根技术建立植株再生体系。结果表明: 以 MS + BA1.0 mg · L⁻¹ + NAA1.0 mg · L⁻¹ 为诱导培养基, MS + BA0.8 mg · L⁻¹ + NAA0.4 mg · L⁻¹ 为增殖培养基, MS + IBA0.5 mg · L⁻¹ + GA₃0.3 mg · L⁻¹ 为壮苗伸长培养基, 效果较好; 试管外生根以 100 mg · L⁻¹ NAA 处理 30 min 效果最佳, 生根成活率为 93.1%。

关键词 风箱果; 组织培养; 不定芽; 试管外生根; 植株再生

分类号 S723.132

Ex Vitro Rooting and Plantlet Regeneration of Adventitious Shoots from Microshoots of *Physocarpus amurensis* (Maxim.) Maxim. / Wei Xiaohui, Yin Dongsheng, Zhang Lijie, Shen Hailong, Zhang Peng (Northeast Forestry University, Harbin 150040, P. R. China) // Journal of Northeast Forestry University. - 2006, 34(3). - 42 - 44

In vitro adventitious shoot was induced from apical bud of *Physocarpus amurensis* seedlings, and establishment of plantlet regeneration system was studied by ex vitro rooting of the in vitro regenerated microshoots. Results showed that the optimum culture media were obtained as MS + BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ for apical bud germination, MS + BA 0.8 mg · L⁻¹ + NAA 0.4 mg · L⁻¹ for shoot proliferation, and MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹ + GA₃ 0.3 mg · L⁻¹ for shoot elongation and strengthening. The best treatment for ex vitro rooting was 100 mg · L⁻¹ NAA soaked for 30 min, and the rooting and survival rate reached 93.1%.

Key words *Physocarpus amurensis*; Tissue culture; Adventitious shoots; Ex vitro rooting; Plantlet regeneration

风箱果 (*Physocarpus amurensis*) 观赏性好、耐寒、耐旱、耐瘠薄^[1], 又是药用植物^[2], 但目前其自然居群分布范围极窄、种群数量很低, 已经处于濒危状态, 迫切需要加强保护和扩繁。笔者在前期研究中发现, 试管内生根效果虽然较好, 但移植效果不理想; 而试管外生根, 生根和驯化同时进行, 成本低, 用时少^[3]。为此, 笔者进行了风箱果组织培养不定芽的试管外生根及植株再生试验, 旨在为建立风箱果商业化微繁和苗木培育体系、保护和扩繁珍稀植物提供一定的参考依据。

1 材料与与方法

风箱果种子采自东北林业大学帽儿山实验林场的自然居群, 进行播种育苗, 待幼苗 3 个月时切取幼嫩顶芽作为初始外植体。外植体先用自来水冲洗 30 min, 在超净工作台上用 75% 酒精处理 10 ~ 20 s, 滴 2 滴 Tween-20 后, 用 H₂O₂ 处理 3 min, 然后用无菌水冲洗 3 ~ 5 遍, 按无菌操作要求, 接种于培养基上。选取生理状态较好的顶芽, 剥除顶芽最外层叶片, 接种于诱导培养基上; 然后切下通过诱导培养产生的腋芽, 接种于增殖培养基上, 诱导丛生芽; 通过增殖产生的芽较小、细弱, 节间太短, 达不到生根的要求, 因此, 必须使增殖芽伸长和增壮, 故将诱导产生的丛生芽接种于壮苗培养基上。基本培养基为 MS 培养基, 附加 25 g · L⁻¹ 蔗糖、7 g · L⁻¹ 琼脂, pH 值为 5.8。培养温度 (25 ± 2) °C, 光照强度为 30 ~ 40 μmol · m⁻² · s⁻¹, 光照时间为 16 h · d⁻¹, 湿度 60% ~ 70%。每瓶接入 1 个外植体, 各处理重复 5 次。待试管苗长到 2 cm 以上时进行生根培养。

试管内生根培养基 (单位为 mg · L⁻¹): (1) 1/2MS + IBA0.1; (2) 1/2MS + NAA0.1 + IBA0.5; (3) 1/2MS + NAA0.1 + IBA1.0; (4) 1/2MS + NAA0.5 + IBA0.5; (5) 1/2MS + NAA0.5 + IBA1.0; (6) MS + IBA0.1; (7) MS + IBA0.1; (8) MS + IBA0.5; (9) WPM + IBA0.1; (10) WPM + IBA1.0。

组培苗试管外生根: 经过壮苗培养后, 选择生长健壮、高度在 2 cm 以上的不定芽进行试管外生根。首先将培养瓶的瓶

盖打开, 与外界空气接触锻炼。在培养室锻炼 7 d 后, 移出不定芽进行生根。

不同质量浓度的 NAA 对生根的影响: 用清水及 50、100、200 mg · L⁻¹ 的 NAA 溶液处理组培苗基部 30 min; 1 000 mg · L⁻¹ NAA 处理苗基部 10 s。

不同浸泡时间对生根的影响: 选用 100 mg · L⁻¹ NAA 分别浸基部 15、30、60 min, 然后扦插于草炭和蛭石 (V_{草炭}: V_{蛭石} = 2:1) 的混合基质中。

不定芽基部用上述不同质量浓度的 NAA 处理不同时间后, 插入塑料育苗筐中的生根基质中。开始时育苗筐要密封, 以保持高湿度环境, 以后随时检查, 并逐步将育苗筐盖打开, 以便边生根边锻炼驯化, 必要时可以适当遮荫。1 个月后观察统计生根成活情况。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度的激素对顶芽萌发的影响

接种 10 d 后, 顶芽萌动抽叶, 20 d 后在叶腋处长出新芽。从表 1 可以看出, 不含激素的培养基 (1 号) 没有产生增殖腋芽, 试验中只是观察到高生长, 长势也较弱, 而添加激素 BA 和 NAA 的培养基, 外植体大部分发生增殖, 长势也较好。含有 BA1.0 ~ 3.0 mg · L⁻¹ 和 NAA0.1 ~ 1.0 g · L⁻¹ 的培养基均可诱导腋芽增殖, 但在诱导频率和产生芽的数量上差异明显。其中以 BA1.0 mg · L⁻¹ 和 NAA1.0 g · L⁻¹ 处理的诱导效果最好, 诱导率达 80%, 繁殖系数为 14.3 个。在研究中发现, 再生的不定芽玻璃化较重, 尤其在 BA 水平较高时表现更为突出。BA 在 0.5 g · L⁻¹ 水平上, NAA 只有 1.0 g · L⁻¹ 时发生增殖; BA 在 1.0 g · L⁻¹ 水平上, 不同质量浓度 NAA 均发生增殖, 并且随 NAA 质量浓度的增加, 繁殖系数也增加, 在 1.0 g · L⁻¹ 时最高; BA 在 3.0 g · L⁻¹ 水平上, 随 NAA 质量浓度的增加, 繁殖系数反而下降, 而且玻璃化相当严重。

2.2 不同质量浓度的激素对腋芽增殖的影响

4 周后将 7 号培养基诱导产生的腋芽接种于增殖培养基上, 30 d 后观察增殖情况, 结果见表 2。

在增殖培养中, 大部分组合产生腋芽增殖, 且不定芽个数少, 仅有 BA0.8 g · L⁻¹ 和 NAA0.4 g · L⁻¹、BA1.2 g · L⁻¹ 和 NAA0.6 g · L⁻¹ 发生大量丛芽 (见表 2)。新芽转接到增殖

1) 黑龙江省科技攻关项目 (GB02B103)。

第一作者简介: 魏晓慧, 女, 1965 年 2 月生, 东北林业大学研究生部, 副教授。

收稿日期: 2006 年 3 月 10 日。

责任编辑: 李金荣。

培养基 20 d 后,在基部产生大量芽点,4 周后在基部产生大量丛生芽。从表 2 可以看出,BAO.8 g·L⁻¹ 和 NAA0.4 g·L⁻¹ 为风箱果离体茎端增殖适宜的外源生长调节剂质量浓度,再生频率为 100%,每个外植体上产生 18 个以上的不定芽,产生的不定芽发育较整齐一致。观察发现,不定芽发生部位主要在外植体基部的切口处。

表 1 风箱果实生幼苗顶芽的诱导培养

培养基 序号	BA/ mg·L ⁻¹	NAA/ mg·L ⁻¹	繁殖系 数/个	诱导 率%	生长状况
1	0	0	0	0	叶片小、嫩绿,长势弱,无腋芽增殖
2	0.5	0.1	0	0	叶片小、嫩绿,长势一般,无腋芽增殖
3	0.5	0.5	0	0	叶片卷曲、透明,长势一般,无腋芽增殖
4	0.5	1.0	10.2	60	叶片小,腋芽增殖较多
5	1.0	0.1	3.0	20	叶片小,叶片黄绿平展,长势一般,芽较短
6	1.0	0.5	10.8	60	叶片大(1.0 cm),卷曲透明,腋芽增殖多
7	1.0	1.0	14.3	80	叶片较大,腋芽增殖较多,芽长势好
8	3.0	0.1	3.0	20	叶片较大(0.5~1.0 cm),长势好
9	3.0	0.5	1.0	20	叶片大(0.5~1.0 cm),卷曲透明,长势弱
10	3.0	1.0	0.8	80	叶片较大,卷曲透明,长势好

表 2 BA 和 NAA 对风箱果离体顶芽再生不定芽的影响

培养基 序号	BA/ mg·L ⁻¹	NAA/ mg·L ⁻¹	繁殖系 数/个	再生频 率%	生长状况
1	0.8	0.4	>18.5	100	丛芽,纤细、小,数量多,长势较好
2	0.8	0.6	5.3	100	腋芽,芽小,长势一般
3	0.8	0.8	3.0	66.7	腋芽,芽较大,长势较好
4	1.0	0.4	7.0	100	腋芽,芽小,长势一般
5	1.0	0.6	7.5	100	腋芽,芽较大,长势较好
6	1.0	0.8	9.3	100	腋芽,芽大,长势好
7	1.2	0.4	9.0	66.7	腋芽,芽大
8	1.2	0.6	>10.7	100	丛芽,芽较大,长势较好
9	1.2	0.8	7.7	100	腋芽,芽大,长势较好

2.3 增殖芽的伸长和壮苗培养

通过增殖培养产生的不定芽小、节间短、纤细,达不到生根要求。为了使不定芽伸长和增壮,试验中在 MS 培养基内添加不同质量浓度的 GA₃,15 d 后观察生长效果。从表 3 可以看出,只有在培养基中加入 GA₃ 后才能使茎轴伸长,0.5~3.0 g·L⁻¹GA₃ 能够不同程度地使不定芽伸长,而且伸长效果随着 GA₃ 质量浓度的增加而加强;但质量浓度过高,芽质量下降。在试验中发现,GA₃ 在 1.0~3.0 g·L⁻¹ 时,由于节间伸长明显,茎轴细弱,发生倒伏现象,茎梢枯萎,叶片细长,在 2.0~3.0 g·L⁻¹ 时尤为严重;而在培养基中添加 0.5 g·L⁻¹ IBA 和 0.3 g·L⁻¹ GA₃ 时,苗高均超过 2 cm,且生长正常、健壮。因此,培养基中添加 0.5 g·L⁻¹ IBA 和 0.3 g·L⁻¹ GA₃ 为最佳的增殖芽伸长和壮苗培养激素组合,即可保证节间伸长,又可使茎轴粗壮,提高苗的质量。

表 3 不同质量浓度的 GA₃ 对芽伸长的影响

培养基 序号	IBA/ mg·L ⁻¹	GA ₃ / mg·L ⁻¹	不定芽 数/个	各长度范围芽数所占的比例%			
				≥3 cm	2~3 cm	1~2 cm	≤1 cm
1	0	0	10	0	0	0	100
2	0	0.5	11	0	0	90.9	9.1
3	0	1.0	30	3.3	30.0	66.7	0
4	0	2.0	28	25.0	35.7	35.7	3.6
5	0	3.0	31	45.2	25.8	29.0	0
6	0.5	0.3	33	63.6	36.4	0	0

2.4 组培苗试管外生根

通过壮苗培养后,组培苗粗壮,高度超过 2 cm,达到了生根要求。笔者在试管内生根研究中,使用了 10 种生根培养基,但生根效果不理想,有的不生根,有的生根率很低(不超

过 20%),生根状态也不好。因此,在生根过程中采用试管外生根,采用不同质量浓度的 NAA 进行不同时间的处理。

表 4 不同质量浓度的 NAA 对生根的影响

NAA 质量浓 度/mg·L ⁻¹	处理 株数	成活 株数	成活 率%	根数/条	根长/mm
0	28	4	14.29	10.50 ± 2.10a	11.37 ± 1.96a
50	29	5	17.24	11.00 ± 1.53a	19.40 ± 4.39ab
100	29	27	93.10	18.67 ± 3.33bc	29.98 ± 0.79c
200	25	22	88.00	20.50 ± 1.55c	21.39 ± 3.27bc
1 000(速蘸)	30	14	46.67	13.67 ± 1.33ab	17.35 ± 2.74ab

注:相同字母表示在 $p=0.05$ 水平差异不显著,不同字母表示差异显著;根数和根长为平均值 ± 标准误。

在培养室培养 1 个月,不定芽长出新叶片,经检查证明已经生根,形成小苗。不同质量浓度 NAA 处理的生根效果差异明显,生根效果大致随着质量浓度的升高,先升高后降低(见表 4),当 NAA 质量浓度在 100 g·L⁻¹ 时效果最好,生根率达 93.1%,根数为 (18.67 ± 3.33) 条,根长为 (29.98 ± 0.79) mm。通过方差分析,不同质量浓度的 NAA 处理后生根数差异达到显著水平(见表 5),根长达到极显著水平(见表 6)。不经过 NAA 处理的组培苗在试管外也能生根,成活率、生根数及根长均是所有处理中最低的,但与 NAA50 和 1 000 g·L⁻¹ 的生根情况差异不显著,NAA100 和 200 g·L⁻¹ 处理的组培苗的成活率、生根数及根长均高于其它处理,两者差异不显著。说明低质量浓度和高质量浓度的 NAA 对生根均不利,适于风箱果组培苗试管外生根的适宜质量浓度为 100~200 g·L⁻¹。

表 5 不同质量浓度的 NAA 处理生根数方差分析结果

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F	显著水平
组内	295.608	4	73.902	5.116	0.012
组间	173.333	12	14.444		
总计	468.941	16			

从表 7 可知,不同 NAA 处理时间中,以处理 30 min 的生根率最高(93.1%),60 min 的次之(65.52%),15 min 的生根率最低(23.81%)。方差分析表明:生根数差异达到显著水平(见表 8)。处理 60 min 的生根数显著高于 15 min 的生根数,与处理 30 min 的差异不显著;处理 15 min 和处理 30 min 差异也不显著。根长在所有的处理中差异均不显著。

表 6 不同质量浓度的 NAA 处理根长方差分析结果

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F	显著水平
组内	621.904	4	155.476	5.512	0.009
组间	338.471	12	28.206		
总计	960.375	16			

表 7 不同处理时间对生根的影响

处理时 间/min	处理 株数	成活 株数	成活 率%	根数/条	根长/mm
15	21	5	23.81	9.00 ± 4.00a	28.47 ± 1.51a
30	29	27	93.10	18.67 ± 3.33ab	29.98 ± 0.79a
60	29	19	65.52	24.33 ± 1.67b	26.99 ± 1.81a

注:相同字母表示在 $p=0.05$ 水平差异不显著,不同字母表示差异显著;根数和根长为平均值 ± 标准误。

表 8 不同处理时间生根数方差分析结果

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F	显著水平
组内	282.542	2	141.271	6.124	0.045
组间	115.333	5	23.067		
总计	397.875	7			

通过上述分析可知,在使用草炭和蛭石(2:1)混合基质进行试管外生根时,以 NAA100 g·L⁻¹ 预处理增壮后的不定芽 30 min,生根效果最佳。根据 NAA 效果曲线(见图 1)推断,实际使用 NAA120~130 g·L⁻¹ 预处理不定芽 30 min,可能会达到最佳效果,生根成活率可望达到 97.5%。

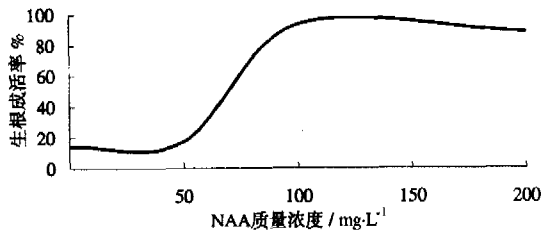


图1 风箱果不定芽试管外生根成活效应图

3 结论与讨论

风箱果幼嫩顶芽的萌发对生长调节剂质量浓度的要求较严格,对生长调节剂的反应不是很敏感。在BA质量浓度较低的情况下不产生腋芽,BA $1.0\sim 3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和NAA $0.1\sim 1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 均能诱导产生腋芽,但随着BA质量浓度的升高,玻璃化现象严重。为了既克服组培苗的玻璃化,又能达到理想的增殖效果,生长调节剂质量浓度以BA $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和NAA $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理诱导效果最好,诱导率达80%,繁殖系数为14.3个。维持BA和NAA成一定比例,对器官发生是至关重要的。风箱果经诱导阶段产生的腋芽在继代增殖培养时,BA和NAA的比例过高或过低效果均不理想,以BA $0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和NAA $0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合为适宜的外源生长调节剂质量浓度,再生频率达100%,每个外植体上产生18个以上的不定芽,且发育较整齐一致。虽然在增殖阶段获得了大量的不定芽,但这些不定芽茎轴不

(上接32页)

表1 斑羚冬季的食物组成

食物种类	出现频率(F)%	平均密度(D)	相对密度(RD)%
杨(<i>Populus</i> spp.)	10.2	0.108	10.3
柳(<i>Salix</i> spp.)	5.8	0.060	5.7
桦(<i>Betulla</i> spp.)	3.7	0.038	3.6
紫椴(<i>Tilia amurensis</i>)	14.3	0.154	14.7
糠椴(<i>T. mandshurica</i>)	4.1	0.042	4.0
蒙古柞(<i>Quercus mogolica</i>)	14.9	0.161	15.3
色木(<i>Acer mono</i>)	4.4	0.045	4.3
青梢槭(<i>A. tegmentosum</i>)	1.3	0.013	1.2
榛子(<i>Corylus heterophylla</i>)	3.7	0.038	3.6
苔藓(<i>Bryophyta</i>)	5.1	0.052	5.0
苔草(<i>Carex</i> spp.)	9.2	0.097	9.2
满山红(<i>Rhododendron dawricum</i>)	11.7	0.107	11.3
冷杉(<i>Abies nephrolepis</i>)	1.7	0.017	1.6
云杉(<i>Picea jezoensis</i>)	0.7	0.007	0.6
红松(<i>Pinus koraiensis</i>)	1.0	0.100	1.0
其他	12.2	0.013	12.4

3.2 斑羚冬季采食植物的营养分析

根据表2的结果可知:青杨枝、柞树枝、糠椴枝、紫椴叶、紫椴枝的粗蛋白含量高于17%,羽枝青藓、色木叶、青杨叶及苔草的粗蛋白含量低于9.5%;红松、满山红、青杨枝、色木叶、紫椴叶、柞树叶的粗脂肪含量高;羽枝青藓的粗脂肪含量低。对斑羚食物组成中树枝和树叶的粗蛋白含量进行方差检验($F=14.187, F_{0.05}(1,18)=4.41, F_{0.01}(1,18)=8.29, F>F_{0.01}$),说明食物组成中植物的枝和叶的粗蛋白含量有显著差异。对斑羚食物组成中树枝和树叶的粗脂肪含量进行方差检验($F=0.772, F_{0.05}(1,18)=4.41, F_{0.01}(1,18)=8.29, F>F_{0.05}$),说明食物组成中植物的枝和叶的粗脂肪含量没有显著差异。

4 讨论

斑羚在冬季的食物主要是各种阔叶植物,而针叶类植物,如红松,云杉却很少取食。斑羚的食物基本上是以高蛋白和高脂肪组成。

明显,节间短,苗高平均不足1cm,芽虽多却无法选出适宜的生根材料,降低了产量和质量。GA₃在组织培养中的作用已有不少报道^[4-5],低质量浓度时能促进矮生小植株茎节伸长。培养基中添加IBA $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和GA₃ $0.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最佳的风箱果增殖芽伸长和壮苗培养激素组合,即可保证节间伸长,又可使茎轴粗壮,提高苗的质量。

植物组织培养能直接形成完整植株是该技术的优越性,但有些植物试管诱导生根较难,利用试管外扦插生根可获得较好的效果。同时试管外生根较试管内生根有很多优点。由于风箱果在试管内按常规方法诱导生根效果不理想,而采用试管外扦插生根能获得良好根系,不但有较多的根系,而且移栽成活率高。风箱果组培苗试管外生根的最佳处理为NAA $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理30min,生根率达到93.1%。据NAA效果曲线推断,NAA $120\sim 130\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理不定芽30min,生根成活率可望达到97.5%。

参考文献

- [1] 周以良,聂绍荃,董世林.黑龙江树木志[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1986:284-286.
- [2] 杨健,孟有朋,段全猛.风箱果的栽培技术[J].中国林副特产,2004(69):13.
- [3] 沈海龙.植物组织培养[M].北京:中国林业出版社,2005.
- [4] 张小红,陈彦生,康冰,等.激素对香椿腋芽增殖生长的效应[J].西北植物学报,2001,21(4):756-760.
- [5] 卜朝阳.GA₃在桉树离体培养中对芽的伸长及瓶苗质量的影响[J].广西农业科学,2004,35(4):265-268.

表2 植物粗蛋白和粗脂肪的含量(干物质)

植物种类	粗蛋白含量%	粗脂肪含量%	植物种类	粗蛋白含量%	粗脂肪含量%
羽枝青藓	5.49	2.60	山杨枝	13.34	7.10
色木叶	6.13	9.12	柞树叶	14.88	8.53
青杨叶	7.69	7.00	红松	15.53	13.90
苔草	9.06	6.60	色木枝	16.84	7.70
毛叶苔	9.67	4.60	云杉	17.28	8.30
山杨叶	10.28	8.50	紫椴枝	17.94	4.30
满山红	11.68	11.70	紫椴叶	19.16	8.90
石苔	11.68	1.30	糠椴枝	20.07	5.20
糠椴叶	12.47	5.10	柞树枝	21.22	5.20
绒苔	12.91	2.20	青杨枝	34.34	9.20

从植物的营养成分分析来看,红松、云杉的粗蛋白和粗脂肪含量高。其中,红松的粗蛋白为15.53%,粗脂肪为13.90%,云杉的粗蛋白为17.28%,粗脂肪为8.30%。而斑羚取食红松、云杉的比例却较少,红松为1%,云杉为0.7%。这是因为,自然选择总是使动物在觅食过程中尽可能地增大净收益,因为动物只有通过最有效的觅食,才能使其生存和繁殖成功的机会增加。斑羚很少取食红松、云杉,是由于斑羚取食了其它林下植物和落叶的原因。斑羚食用很多能量不高的食物,是因为冬季也是斑羚食物贫乏期,此时,无论是食物种类还是食物质量,都处于最低限。所以,保护区为了更好地保护好珍稀濒危有蹄类,可以采用人工补饲的办法,以提高有蹄类食物的质量。

参考文献

- [1] 于孝臣,秋岩明,宁波.原麝和斑羚冬季种间关系的研究[J].林业科技,2000,25(2):41-45.
- [2] 吴华,张泽均,胡锦鑫.唐家河自然保护区斑羚冬季对生境的选择[J].华东师范大学学报:自然科学版,2002(2):92-97.
- [3] 陈蓉伯.大青山地区斑羚(*Naemorhedus goral*)的数量分布[J].内蒙古大学学报:自然科学版,1999,30(2):227-229.
- [4] 白力军.斑羚[J].内蒙古林业,1994(9):13.
- [5] 陈化鹏,萧前柱.带岭林区马鹿冬季食物研究[J].兽类学报,1989,9(1):8-15.