

笃斯越桔离体培养及植株再生体系的建立

顾地周¹, 高捍东^{2*}, 顾美影¹, 朱俊义¹, 姜云天¹

(1. 通化师范学院生物系, 吉林 通化 134002, 2. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 以笃斯越桔新生嫩芽为外植体, 应用均匀设计法筛选其最适合的基部直接再生芽苗和生根的培养基, 结果表明, 最适合的基部直接再生芽苗诱导培养基为: DR+ 22ip 2 75 mg# L⁻¹ + IAA 0.10 mg# L⁻¹, 诱导率为 99%; 生根培养基: MS(改良) + IAA 1.00 mg# L⁻¹ + Kt 0.30 mg# L⁻¹, 生根率达 98%; 以再生植株的茎节为材料进行快繁的结果表明, 在 25 d 的一个培养周期内增殖倍数平均达 40 以上, 快繁培养基: MS(改良) + IAA 0.50~ 1.00 mg# L⁻¹ + Kt 0.30 mg# L⁻¹ + GA₃ 0.20 mg# L⁻¹。建立了笃斯越桔的植株再生和快繁体系。

关键词: 笃斯越桔; 离体培养; 植株再生; 均匀设计

中图分类号: S722.3 文献标识码: A

In vitro Culture and Plant Regeneration System of *Vaccinium uliginosum*

GU Di Zhou¹, GAO Han Dong², GU Mei Ying¹, ZHU Jun Yi¹, JIANG Yun Tian¹

(1. Department of Biology Tonghua Normal University, Tonghua 134002, Jilin, China

2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract The tender buds of *Vaccinium uliginosum* were used as explants for the experiment. Uniform Design was applied to select the most suitable media for shoots regeneration at base of tender buds and rooting. The results showed that DR+ 22ip 2 75 mg# L⁻¹ + IAA 0.10 mg# L⁻¹ fitted for shoots regeneration at base of tender buds, the rate of regeneration was 99%; MS(modified) + IAA 1.00 mg# L⁻¹ + Kt 0.30 mg# L⁻¹ for rooting, the rate of rooting was 98%; Stems each with one node were cut from regenerated shoots and cultured for propagation, and a 40 fold proliferation rate was achieved within 25 days. MS(modified) + IAA 0.50~ 1.00 mg# L⁻¹ + Kt 0.30 mg# L⁻¹ + GA₃ 0.20 mg# L⁻¹ for rapid propagation of plant regeneration. Plant Regeneration and Rapid Propagation system of *Vaccinium uliginosum* has been successfully established.

Key words *Vaccinium uliginosum*; in vitro culture; plant regeneration; Uniform Design

笃斯越桔 (*Vaccinium uliginosum* Linn.), 又称笃斯、黑豆树 (大兴安岭), 甸果、地果、龙果、蛤塘果 (吉林)、讷日苏 (蒙古族语)。笃斯越桔是杜鹃花科 (Ericaceae) 越桔属 (*Vaccinium* L.) 落叶小灌木, 5 吉林省野生动植物保护管理暂行条例 6 中定为省级一类重点保护植物。是野生观赏植物和珍稀濒危药用

植物^[1-3], 主要功能为清热、收敛等。果可生食, 酸甜可口, 汁液丰富, 做果酒、果醋、果酱、果汁及提取天然食用色素的原料。被国际粮农组织定为五大健康食品之一。其分布区甚狭, 长白山区数量非常稀少, 仅在长白山国家级自然保护区内有较大种群分布^[4]。因其常规繁殖有很大难度, 开发和利用受到

收稿日期: 2007204230

基金项目: 通化师范学院自然科学基金资助项目 (XS060074), 吉林省科技厅资助项目 (200705C05)

作者简介: 顾地周 (1973), 男, 吉林通化人, 讲师, 主要研究方向: 长白山区珍稀濒危植物和药用植物研究。E-mail: gudizhou@163.com

* 通讯作者: 高捍东, 男, 教授, 博士生导师。

极大限制。为了更好地开发利用这一极具经济价值的野生珍贵资源, 利用植物组织培养技术建立了高效、遗传稳定的快繁体系。同时, 应用均匀设计对培养基进行筛选, 达到了预期目的。本文结果可能对其开发和利用有一定的参考意义。目前, 与其同属其他种植物的组织培养已有报道^[5-7]。但笃斯越桔的离体培养和植株再生迄今未见。

1 材料与方 法

1.1 外植体材料的处理

3月于长白山北坡海拔 1 300 m 针阔混交林下采笃斯越桔休眠枝条在实验室内水培促使腋芽萌发。

待腋芽萌发并长至 3~5 cm 时剪下, 在超净工作台上用 75% 酒精涮洗 30 s, 用含 3% 青霉素的次氯酸钠 (1%) 溶液浸泡 10 min, 无菌水冲洗 8 次。用无菌滤纸吸干表面水分, 切除被杀菌消毒剂损伤部分后作为外植体备用^[8]。

1.2 嫩芽基部直接再生芽苗诱导培养基的筛选

以 DR 为基本培养基, 附加蔗糖 20 g# L⁻¹, 琼脂粉 8.5 g# L⁻¹, pH 值 5.5, 温度 (24±2) °C, 光照强度 1 300 lx, 光照周期 12 h# d⁻¹。将经过处理的外植体接种到附加不同浓度的 22p 和 IAA 培养基上进行基部直接再生芽苗诱导培养。筛选最适宜的分化培养基及激素浓度配比。统计并计算出芽苗诱导率。

1.3 生根培养基的筛选

以改良 MS (1/4 大量元素、1/2 微量元素、1/2 铁盐和 1/3 有机成分) 为培养基, 附加不同浓度的 IAA、IBA 和 NAA, 同时加入 Kt 0.30 mg# L⁻¹ (壮苗)。蔗糖 10 g# L⁻¹, 琼脂 8.00 g# L⁻¹, pH 值 5.5, 温度 (22±2) °C, 光照强度 1 000 lx, 光照周期 10 h# d⁻¹。筛选最适宜的生根培养基。统计并计算出生根率。

1.4 再生植株快繁体系的建立

采用节培法进行快繁, 以再生植株的茎节为材料进行快繁。将生根的苗切割成一叶一段转接到优化后的培养基中, 同时进行腋芽萌发、伸长及生根培养。统计并计算出增殖周期和增殖倍数。

1.5 数据分析

数据分析与处理采用均匀设计 (Uniform De2 sign) 软件。

2 结果与分析

2.1 DR 培养基中不同浓度 22p 和 IAA 的交叉对比对笃斯越桔基部直接再生芽苗的影响

将笃斯越桔嫩茎段和茎尖接种于不同培养基中进行再生芽苗诱导培养, 每个处理数为 30。为了提高笃斯越桔再生芽苗的速度和诱导率, 采用均匀设计法, 选用 U₁₀ (10⁸) 均匀表 (见表 1), 考察了细胞分裂素 22p 和生长素 IAA (由预试验可知浓度范围分别为 1.00~3.25, 0.05~0.12 mg# L⁻¹) 浓度交叉对比对分化率的影响 (在表和方程中, X₁ 为 22p 浓度, X₂ 为 IAA 浓度, Y 为诱导率, 结果见表 2)。

表 1 U₁₀ (10²) 因素及水平设计

水平	因素 / (mg# L ⁻¹)	
	X ₁	X ₂
1	1.00	0.05
2	1.25	0.06
3	1.50	0.07
4	1.75	0.08
5	2.00	0.09
6	2.25	0.10
7	2.50	0.11
8	2.75	0.12
9	3.00	0.11
10	3.25	0.12

表 2 U₁₀ (10²) 均匀设计实验安排及结果

处理号	因素 / (mg# L ⁻¹)		Y/%
	X ₁	X ₂	
1	1.00	0.11	73.0
2	1.25	0.07	80.5
3	1.50	0.12	75.5
4	1.75	0.10	80.0
5	2.00	0.06	87.5
6	2.25	0.11	82.5
7	2.50	0.09	87.5
8	2.75	0.05	95.0
9	3.00	0.12	87.0
10	3.25	0.08	92.0

嫩茎段培养至 60 天统计诱导率, 数据经均匀设计软件处理, 得回归方程 $Y = 81.3 + 7.20X_1 - 138X_2$, 样本容量 $N = 10$, 显著性水平 $A = 0.01$, 复相关系数 $R = 0.9950$, 检验值 $F_1 = 349.3$, 临界值 $F_{(0.01, 2, 7)} = 9.547$, $F_1 > F_{(0.01, 2, 7)}$, 显著, 回归方程有意义。对方程项进行显著性检验可知: 各方程项对 Y 值影响均显著。根据回归方程求出 Y 的最优组合为: $X_1 = 3.25$, $X_2 = 0.05$, 在此组合基础上求得最优解: $y = 97.8$, 此解为回归方程的解析解, 按公式 $Y = y \cdot L_A \# s$ 计算出

优化值区间估计为 $Y = 97.8(\pm 2.77)$, 即 95.03% ~ 100.57%。通过表 2 发现, 当 22ip 的浓度超过 $2.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱导率下降 (说明过高的 22p 浓度对基部直接再生芽苗起抑制作用); 当 IAA 浓度超过 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时嫩芽基部产生愈伤组织, 可能是 22ip 和 IAA 共同作用的结果。为确保笃斯越桔经组培快繁后的遗传稳定性, 不采取愈伤组织再分化产生芽苗的方式, 经过对比发现 IAA 浓度为 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时苗的长势最好且基部无愈伤组织产生, 芽苗均为基部直接再生。以免 22p 浓度在 $2.75 \sim 3.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间出现高诱导率, 又以 IAA 浓度 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 22p 浓度 $2.75, 2.76, 2.77, 2.78 \sim 3.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 做了 26 个梯度试验, 结果发现诱导率均在 8% 以下。因此, 对优化值进行改良, 即 22ip $2.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 IAA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 再进行验证试验 (重复数为 30), 培养 35 天, 发现基部有锥形突起, 继续培养至 60 天锥形突起伸长为芽苗, 培养至 75 天再生苗可长到 2.00 cm 以上, 且苗壮而整齐 (图 1a), 诱导率达 99%, 在估计区间范围内, 且比所有实验 Y 值都大, 说明实验结果是正确的。因此, 笃斯越桔嫩芽基部直接再生芽苗的最佳培养基为: DR + 22p $2.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 改良 MS 培养基中不同生长素浓度的交叉对比对笃斯越桔组培苗生根的影响

由预试验可知, 采用改良 MS 并附加生长素 IAA、IBA 和 NAA, 由单一因子试验可知: 浓度均控制在 $0.10 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 超过 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 幼苗基部膨胀或产生愈伤瘤, 继续培养根从膨胀部或愈伤瘤上发出, 这样的苗在移栽时, 根随愈伤瘤从苗基部脱落, 移栽成活率几乎为零, 可能是根与苗茎的纤维疏导组织连接不完整所致, 在培养基中附加 $\text{Kt} 0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 生根苗较未附加的粗壮。为了提高笃斯越桔的生根率, 采用均匀设计法, 每个处理数为 50, 选用 $U_{10}(10^3)$ 均匀表 (见表 3), 同时考察了生长素 IAA、IBA 和 NAA 浓度交叉对比对生根率的影响 (在表和方程中, X_1 为 IAA 浓度, X_2 为 IBA 浓度, X_3 为 NAA 浓度, Y 为生根率, 结果见表 4)。

采取逐步回归分析法, 数据经均匀设计软件处理, 得回归方程 $Y = 41.5 + 56.9X_1 - 3.0X_2 - 8.4IX_3$, 样本容量 $N = 10$, 显著性水平 $A = 0.01$, 复相关系数 $R = 0.9138$, 检验值 $F_t = 10.12$, 临界值 $F_{(0.01, 3, 6)} = 9.780$, $F_t > F_{(0.01, 3, 6)}$, 回归方程显著。对方程项进行显著性检验: 检验值 $F_{(2)} = 6.173e^{-2}$, 临界值 $F_{(0.01, 1, 6)} = 13.75$, $F_{(2)} [F_{(0.01, 1, 6)}$, 此方程项不显著,

表 3 $U_{10}(10^3)$ 因素及水平设计

水平	因素 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	X_1	X_2	X_3
1	0.10	0.10	0.10
2	0.20	0.20	0.20
3	0.30	0.30	0.30
4	0.40	0.40	0.40
5	0.50	0.50	0.50
6	0.60	0.60	0.60
7	0.70	0.70	0.70
8	0.80	0.80	0.80
9	0.90	0.90	0.90
10	1.00	1.00	1.00

表 4 $U_{10}(10^3)$ 均匀设计实验安排及结果

处理号	因素 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			Y/%
	X_1	X_2	X_3	
1	0.10	0.50	0.70	30.0
2	0.20	1.00	0.30	45.0
3	0.30	0.40	1.00	53.0
4	0.40	0.90	0.60	58.0
5	0.50	0.30	0.20	66.5
6	0.60	0.80	0.90	72.0
7	0.70	0.20	0.50	88.5
8	0.80	0.70	0.10	92.0
9	0.90	0.10	0.80	80.0
10	1.00	0.60	0.40	79.5

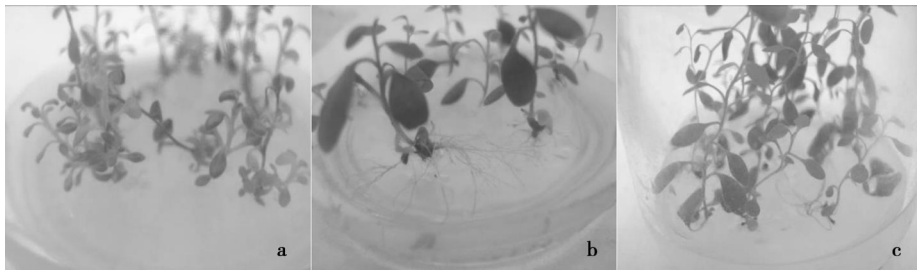
需要剔除; 剔除不显著方程项再建回归方程 $Y = 38.7 + 58.0X_1 - 7.58X_3$, 复相关系数 $R = 0.9192$, 检验值 $F_t = 17.50$, 临界值 $F_{(0.01, 2, 7)} = 9.547$, $F_t > F_{(0.01, 2, 7)}$, 回归方程显著。再对新建各方程项进行显著性检验可知: 检验值 $F_{(2)} = 0.5356$, 临界值 $F_{(0.01, 1, 7)} = 12.25$, $F_{(2)} [F_{(0.01, 1, 7)}$, 此方程项不显著, 需要剔除; 同理, 剔除不显著方程项第三次建立回归方程的 $Y = 33.7 + 59.5X_1$, 复相关系数 $R = 0.9059$, 检验值 $F_t = 36.59$, 临界值 $F_{(0.01, 1, 8)} = 11.26$, $F_t > F_{(0.01, 1, 8)}$, 回归方程显著, 对方程项进行显著性检验可知: 检验值 $F_{(1)} = 36.59$, 临界值 $F_{(0.01, 1, 8)} = 11.26$, $F_{(1)} > F_{(0.01, 1, 8)}$, 此方程项显著。根据回归方程求出 Y 的最优组合为: $X_1 = 1.0$, 在此组合基础上求得最优解: $y = 93.2$, 按公式 $Y = y \pm L_{\alpha} \cdot s$ 计算出优化值区间估计为 $Y = 93.2(\pm 30.0)$, 即 63.2% ~ 123.2%。以最优组合做验证试验, 将生长健壮的丛生苗切下, 然后将其移入附加 IAA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的改良 MS 培养基中, 培养 20 天开始生根, 35 天后幼苗基部或茎部直接发出 3~5 条不定根, 45 天后苗高可达 3.0 cm 以上, 有的产生了侧根, 根和苗的形态、发育均正常 (图 1b), 生根率达 98%。在估计区间范围内, 且比所有实验 Y 值

都大, 说明实验结果是正确的。可见, 笃斯越桔最佳生根培养基为: MS(改良) + IAA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Kt $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 再生植株快繁体系的建立

采取节培法进行快繁^[9-10], 以再生植株的茎节为材料进行快繁。待生根的苗伸长至 5.00 cm 以上时, 在超净工作台上打开培养瓶留一叶剪下苗干, 将其切割成一叶一段转接到附加 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃

(有利于茎段腋芽的迅速萌发和伸长) 的生根培养基中进行节伸长及生根培养。25 天为 1 个继代增殖周期, 每瓶增殖倍数平均达 40 以上(图 1c)。随着继代次数的增加可适当降低生长素 IAA 浓度(以免激素积累), 继代次数达 10 次后, IAA 浓度可降至 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 因此, 笃斯越桔继代增殖培养基为 MS(改良) + IAA $0.50 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Kt $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA₃ $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



a 芽苗直接再生; b 生根培养; c 节增殖培养

图 1 笃斯越桔离体培养及植株再生各阶段的培养物形态

3 结论

实验证明, 培养基 DR + 22ip $2.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对笃斯越桔嫩芽基部直接再生芽苗的诱导效果最好, 笃斯越桔离体培养采取新生嫩芽基部直接再生方式, 遗传稳定性好, 速度快、分化率高。培养基 MS(改良) + IAA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Kt $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 较适合于笃斯越桔的生根, 在培养基中附加 $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Kt, 生根苗较未附加的粗壮且长势好。快繁采取节培法, 以再生植株的茎节为材料进行快繁, 在生根培养基的基础上进行优化, 附加 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA₃ 有利于茎段腋芽的迅速萌发和伸长, 从而缩短了继代增殖周期, 提高了增殖倍数。方法简捷, 经济实用, 可操作性强, 达到了再生植株快繁的目标, 可用于笃斯越桔工厂化育苗。同时, 应用均匀设计处理、分析数据和再试验大大缩短了培养基配方的摸索周期, 为今后长白山野生越桔的工厂化育苗提供可行性依据。

参考文献:

- [1] 周 磊. 长白山区野生珍稀濒危药用植物资源评价体系的初步研究 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(3): 599- 605
- [2] 周 磊. 长白山区珍稀濒危植物优先保护序列的研究 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(6): 740- 749
- [3] 周 磊. 长白山区野生木本观赏树木调查 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2004, 30(5): 524- 535
- [4] 周 磊. 长白山区杜鹃花科稀有濒危植物的区系特点和保护评价 [J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2006, 28(4): 393- 406
- [5] 和加卫, 徐中志, 唐开学, 等. 云南越桔的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 320
- [6] 林宝山, 杜凤国. 越桔品种 - 爱国者. 的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(5): 912
- [7] 唐晓杰, 葛春华, 杜凤国, 等. 北土越桔组织培养快速繁殖技术研究 [J]. 北华大学学报(自然科学版), 2005, 6(3): 261- 263
- [8] 顾地周, 何晓燕, 朱俊义, 等. 细叶杜香的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(5): 898
- [9] 顾地周, 丛小力, 姜云天, 等. 色木槭的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 432
- [10] 顾地周, 丛小力, 宋利丽, 等. 木通马兜铃的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 136