

黑穗醋栗试管苗生产工艺流程的研究

郭春慧 马凤桐 梅立新 张巧绒

(陕西省黄土高原治理研究所)

摘 要 采用黑穗醋栗“丰产薄皮”与“亮叶厚皮”品种,对茎尖组织进行离体培养。通过调整培养基中BAP含量,获得了每20 d达4.7的幼苗分化指数;幼苗在半量的MS无激素培养基上暗处理1~3 d,接种密度每瓶3苗,生根率达83.3%~96.0%;将生根苗移栽于装有蛭石的木箱中,成活率达97%,并成功地移栽于大田,试管苗生长旺盛。建立了黑穗醋栗实用化快繁技术程序。

关键词 黑穗醋栗,试管苗,无性系繁殖技术,暗培养,蛭石

中图分类号 S663.903.5

黑穗醋栗 (*Ribes nigrum*) 系虎耳草科,茶藨子属,小灌木,果实为浆果,富含多种维生素,尤以Vc含量较高。该种植物具有较强的抗旱、耐寒性能,在陕西省北部种植不仅对绿化陕北黄土高原具有重要作用,且因果实又可作为食品原料而更具有经济价值。关于黑穗醋栗的组织培养,国内外已有报道,但幼苗分化指数不稳定,试管苗生根率低,多限于试管外生根^[1-3]。本试验的目的在于研究制定高效实用化组培技术,为在陕北丘陵沟壑区尽快建立黑穗醋栗生产基地提供优质苗木,以期为该地区开辟一条既保持水土、又有较高经济效益,使农民脱贫致富的新途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于1988~1990年进行。采用品种“丰产薄皮”与“亮叶厚皮”,由黑龙江省引进。取1年生基生枝,用自来水冲洗0.5 h,截成具有1~2个芽的小段,用70%酒精对枝条表面消毒10 s,0.1%的升汞灭菌10 min,再用无菌水冲洗4次,待用。

1.2 方 法

在无菌条件下,切取长1~2 mm的茎尖,接种在加有适量植物生长调节剂的MS培养基上;将经过分化培养所获得的0.4 cm以上的幼苗,转至不加植物生长调节剂的半量MS培养基上(100 mL三角瓶盛25 mL培养基),进行暗培养促进生根。

研究暗培养时间与接种密度等对幼苗生根的影响,每处理供试材料20株,重复3次。其余幼苗则转至分化培养基作继代培养。

1.3 培养条件

温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,光照1500 lx,光周期16 h。

1.4 试管苗移栽

当生根的试管苗高0.5~1.5 cm时,移栽至装有6 cm蛭石的木箱(50 cm × 42 cm

×20cm),用塑料薄膜覆盖,置于过渡培养间炼苗(温度 $15\pm 2^{\circ}\text{C}$,光强4000 lx,光周期16 h),并逐渐加大通气面,约经15 d揭去覆盖物,置室内散射光下培养7~10 d,移栽至大田。不同基质、不同容器及不同苗龄等对移栽效果的影响,每处理供试材料20株,重复3次。

2 结果与分析

2.1 幼苗分化

获得快速大量分化的幼苗是无性系繁殖技术的重要一环,也是建立试管苗生产程序的基础。

由表1可见,幼苗转培至MS+BAP 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L的培养基,经20 d培养,平均分化指数为4.7,苗高可达0.5~1.5 cm(图1-1),幼苗分化指数与生长量均优于其他培养基,而且继代培养时,幼苗分化力持续稳定。当BAP浓度增加时,幼苗分化数增加,但幼苗变小、变弱。GA₃也未能显示促使幼苗伸长的作用。

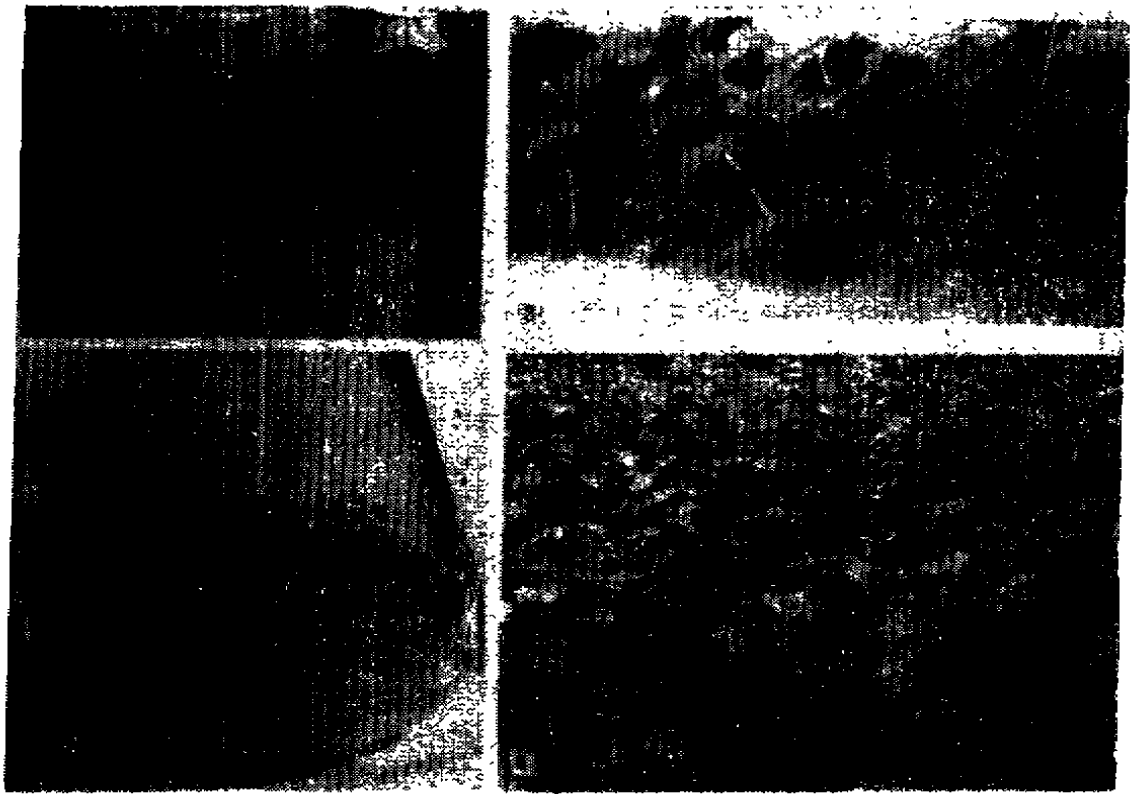


图1 黑穗醋栗茎尖离体培养图

1. 建立无菌培养后20 d应及时转培。接种后35 d摄。左:未及时转培的幼苗;右:转培后15 d生长正常的幼苗;
2. 经暗培处理诱导生根的试管苗,转培至生根培养基后35 d摄;
3. 移栽于装有蛭石的木箱里的试管苗,移栽后21 d摄;
4. 移栽于大田的试管苗,移栽后45 d摄;

表1 不同培养基对幼苗分化的影响

培养基 (mg/L)	外植体数 (个)	分化指数	平均苗高 (cm)	幼苗色泽
MS+BAP 1.0+IAA 0.1	30	4.7	0.9	绿
MS+BAP 1.5+GA ₃ 2.0	30	3.1	0.6	黄绿
MS+BAP 2.0+GA ₃ 1.0	30	5.8	0.4	黄绿、纤细
MS+BAP 3.0+GA ₃ 1.0	30	6.2	0.2	黄绿、细弱
MS+BAP 1.0+IAA 0.1+GA ₃ 1.0	30	2.8	0.6	黄绿
MS+KT 0.5+IAA 0.1	30	2.5	1.0	深绿

2.2 幼苗生根

暗培养促进生根,是试管苗生产程序的中心环节。

2.2.1 暗培养时间长短对幼苗生根的影响 由表2可见,将转培至生根培养基的芽苗,经暗培养3 d,平均生根率为83.3%,平均根长1.8 cm,每苗有根5~8条(图1~2),而暗培养5 d时,生根率则下降至10.0%,暗培养10 d和对照的生根率均为零。

表2 暗培养时间对幼苗生根的影响

暗培养天数 (d)	外植体数 (个)	生根率 (%)	干死苗 (%)	平均苗高 (cm)
0 (CK)	30	0.0	0.0	0.5
3	30	83.3	0.0	0.9
5	30	10.0	66.7	0.5
10	30	0.0	88.9	0.6

注:密度为3苗/瓶,幼苗转至生根培养基后30 d调查。

关于暗培养时间的进一步试验结果表明:暗培1~3 d生根效果无显著性差异,其生根率均在90%以上,而苗高则随着暗培养时间的延长,略有降低(见表3)。

表3 暗培养1~3 d对幼苗生根的影响

暗培天数 (d)	外植体数 (个)	生根率 (%)	平均苗高 (cm)
1	90	95.6	1.1
2	90	90.0	0.9
3	90	95.6	0.8

注:试验与调查方法同表2。

2.2.2 暗培养密度对幼苗生根的影响 由图2可以看出:①试管苗生根率与单位容器内幼苗密度成负相关。以暗培养3 d为例,单位容器1苗的生根率为100%,3苗的生根率为83.3%,15苗的生根率只有40%;②以3 d为临界期随暗培养时间的延长幼苗生根率降低,而干死苗率增加。以每瓶3苗为例:暗培养1~3 d无干死苗,暗培养5 d干死苗率为66.7%,暗培养10 d则上升为88.9%。

2.2.3 暗培养对不同级别幼苗促进生根的效果 依照高度将幼苗分为三级,转培后3周调查,结果如表4。由表4可见:不同级别的幼苗生根率均在85%以上。说明暗培养对I~Ⅲ级幼苗均具有良好的生根效果,因而通过分化培养可以提供生根处理的幼苗范围大、数量多、效率高。

2.2.4 暗培养促生根与其它生根试验的比较 ①以IAA 100 μg/mL预处理幼苗15,30,

表4 不同级别幼苗暗培养促进生根的效果

苗高 (cm)	外植体 (个)	生根率 (%)	平均苗高 (cm)
I 级 (>0.7)	35	100.0	1.3
II 级 (0.4~0.6)	35	97.1	0.7
III 级 (0.2~0.3)	35	85.7	0.4

60 min, 结果以30 min效果较好,但其生根率也只有27.7%,远不如暗培养1~3 d生根率83.3%~96%的效果好;②参照国内外有关报道^[1,2]所设计的几种生根培养基,效果也很差,生根率未超过15%。

综上所述,暗培养是促进黑穗醋栗试管苗生根的一项关键技术。而暗培养1~3 d,密度每瓶3苗是此项技术程序适宜技术的指标。

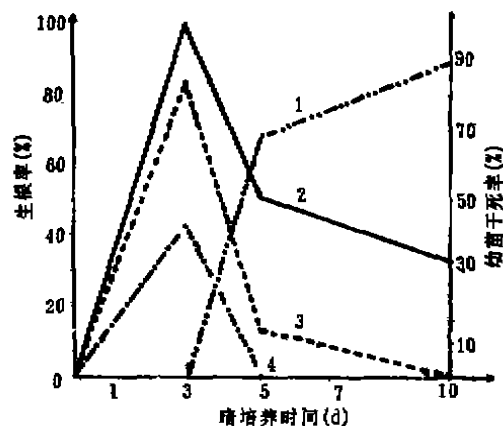
2.3 试管苗的移栽

成功的移栽是完成试管苗由人工控制环境培养到自然条件下生活的根本转变。因而是建立试管苗生产程序的一项重要技术。

2.3.1 不同基质对试管苗移栽效果的影响

泥炭藓和细沙是国外通用的盆栽、试管苗

移栽等的主要基质^[4],细沙在国内文献报道中曾作为黑穗醋栗试管苗的移栽基质,蛭石作为移栽基质也曾见于多种植物的报道。为筛选黑穗醋栗试管苗的最佳移栽基质,本文设置了包括榆林产低位泥炭、黄绵土、蛭石、加拿大产泥炭藓、细沙(0.1~0.5 mm)在内的移栽基质试验,移栽后5周调查结果见表5。由表5可知,黄绵土的移栽成活率最低,仅为55%,细沙(CK)的移栽成活率(66%)极显著低于蛭石和泥炭藓(即①号基质),⑨号基质的成活率显著低于蛭石和泥炭藓,而其余基质的移栽成活率都在



附图 暗培养时间与密度对幼苗生根率的影响

1. 干死苗百分率; 2. 每瓶1苗;
3. 每瓶3苗; 4. 每瓶15苗

表5 不同基质对试管苗移栽成活率与生长的影响

基 质	比率 (%)	供试苗数 (个)	成活率 (%)	苗鲜重 (g)	平均苗高 (cm)
①蛭石, 泥炭藓	50 : 50	20	100	76.0	9.5a
②蛭 石	100	60	96.7	68.0	9.4a
③蛭石 : 细沙	70 : 30	40	95.0	45.0	5.2b
④蛭石 : 细沙	50 : 50	40	97.5	30.0	3.8c
⑤蛭石 : 细沙	30 : 70	40	100	33.0	3.5c
⑥细沙 (CK)	100	50	66.0	25.0	2.9c
⑦蛭石 : 低位泥炭	76 : 30	40	100	22.0	2.8c
⑧蛭石 : 低位泥炭	30 : 70	40	100	19.0	2.3c
⑨蛭石 : 低位泥炭, 细沙	50 : 25 : 25	40	87.5	16.0	2.1c
⑩黄绵土	100	40	55.0	14.3	1.6d

注: 苗鲜重为20株苗的总重量; 苗高为20株苗的平均值; 成活率测定用百分数假设测验法, 苗高用LSR法(下同)。

96.7%以上; 方差分析结果表明: 以蛭石作基质的试管苗生长高度与①号基质相较, 无显著差异, 但显著地高于③号基质, 极显著地高于细沙 (CK) 以及其他不同配比的移栽基质。英国学者研究认为^[4], 一种好的基质或将其略加修饰, 即可适用于多种植物。蛭石是否具有此种广泛适用性, 尚待进一步研究。

2.3.2 不同容器对试管苗移栽效果的影响由表6可见, 以木箱作移栽容器, 其试管苗移栽成活率及苗高均优于其他容器。这主要是由于木箱容积较大, 有利于使移栽基质所固有的保湿、通气及吸附养分等性能处于良好的物理状况所致。

表6 不同容器对试管苗移栽效果的影响

容 器 (cm)	供试苗数 (个)	成活率 (%)	平均苗高 (cm)
木箱 (50×42×40)	60	98.3	7.2
木箱纸钵 (50×42×20)	60	96.7	5.1
黑色塑料钵 (φ10, 高8)	60	65.0	4.6
商品周转箱 (64×36×20)	60	59.4	4.4
瓦 盆 (φ18, 高11)	60	55.0	3.9

注: 供试材料为1.5月苗, 随机取样, 移栽后周6调查。

2.3.3 不同苗龄的试管苗对移栽效果的影响由表7可知: 黑穗醋栗的最适移栽苗龄与1.5月。其成活率极显著地高于1月苗龄, 显著地高于2月苗龄, 平均苗高与2月苗龄无显著差异, 而显著地高于1月苗龄。

表7 不同苗龄的试管苗移栽效果

苗龄 (月) *	移栽苗数 (个)	成活率 (%)	平均苗高 (cm)
2.0	60	91.7	9.0a
1.5	60	100.0	8.7a
1.0	60	75.0	5.7b

注: * 暗培到移栽的间隔时间。

3 讨 论

黑穗醋栗品种“丰产薄皮”和“亮叶厚皮”茎尖离体培养, 通过调整培养基中的BAP浓度以获得幼苗分化数量与幼苗伸长的平衡, 这一方法与Orlikowska的研究结果相近似^[6]; 但本试验在培养基中添加低浓度的IAA有利于苗分化, 而Orlikowska则证明: 在培养基中添加任何种类和浓度的生长素都对黑穗醋栗品种 Roodknop 的培养呈负作用^[4]。有的研究表明: 添加GA₃可以促进黑穗醋栗品种“丰产薄皮”分化幼苗的伸长^[1], 然而在本项研究中添加GA₃却没有呈现积极作用。

Hermen和Hess曾观察到大豆白化苗上胚轴的组织分化力较绿苗为弱, 但其生根力却高于绿苗^[6]。因而推论植物的组织分化力与其再生力呈负相关。此外, 在柑桔微型嫁接时, 以暗培白化苗作砧木的嫁接成功率也显著高于绿苗^[7]。暗培养可能提高了幼苗的生长素含量, 因而具有促进生根作用。然而生长素只为形成根源基阶段所必需, 而对根系的发展不利, 因而暗培养诱导生根的临界期为3 d, 一旦根原基形成即应转为光培, 以促进根系发展和幼苗生长。

Orlikowska观察到以IBA溶液预处理幼苗,诱导生根效果显著,然而要求苗高为10 mm以上,而通过暗培养诱导生根,即使2~3 mm的小苗,亦获得了很好的生根效果。

Sachiko Matsubara曾报道了芦笋腋芽离体培养的群体效应^[8],本研究室在芦笋腋芽离体培养中也证实了这一结果。但在黑穗醋栗的暗培养诱导生根密度试验中却表现了负的群体效应。其原因可能是由于外植体在培养过程中通过新陈代谢释放了某种或某些物质,当释放的物质有利于植物生长时即表现出正的群体效应,反之则呈现负的群体效应。

蛭石作为移栽基质具有保湿、保温和通气性良好等优点,同时因蛭石为高温煅烧而成,有利于培养无病苗。细沙虽通气性良好,但不易保持适宜的温、湿度。

本文所报道的实用化黑穗醋栗茎尖培养技术的应用,将为利用组培技术进行黑穗醋栗的快速繁殖、育种,抗性品种筛选及脱毒等工作提供技术参考。

参 考 文 献

- 1 吴绵云,黄定球.黑穗醋栗的茎尖培养.见:陈正华编.木本植物组织培养及其应用.北京:高等教育出版社,1986.369~383
- 2 Mokra A M. V. Meristem culture and micropropagation of currants. Vedecke prace vyskumneho ustavu dvoecných a okrasných drevin v bojniciach. 1986 (6), 111~116
- 3 Brennan R, Davidson D, Wilshin A *et al.* An assessment of the in-vitro multiplication rates of fourteen black currant cultivars. *Journal of Horticultural Science*, 1989, 64 (6), 679~681.
- 4 Kenneth Baker F. The U. C. system for producing healthy containergrown plants. Australia University of California Division of Agricultural Sciences. 1985, 86~93
- 5 Teresa Orlikowska. Micropropagation of roodknop cv. black currant. *Fruit Science reports (Skiernewice Poland)*, 1984, 9 (1) 5~17
- 6 Herman D E, Hess C E. The effect of etiolation upon the rooting of cuttings. *Proc Inter Plant Prop Soc*, 1963, 13: 42~46
- 7 Navaro L, Roistacher C N, Murashige T. Improvement of Shoot-tip grafting in vitro for Virus-free citrns. *Amer Soc Hort Sci*, 1975, 100 (5), 471~479
- 8 Sachiko Matsubara. Population effect in lateral bud culture of Asparagus and promotion of root formation by transplanting. *J Japan Soc Hort Sci*, 1977, 42 (2), 142~146

Technological Process for Producing Plantlet of *Ribes nigrum*

Guo Chunhui Ma Fengtong

Mei Lixin Zhang Qiaorong

(Shaanxi Research Institute for the Loess Plateau Control, Mizhi, Shaanxi)

Abstract *Ribes nigrum* varieties — Bopi and Houpi were adopted to carry out shoot tip culture in vitro. An average multiplication rate of 4.7 of shoots which were 1.4–3.1 times higher than that previously reported was achieved within 20 days by regulating BAP concentration in the medium. 83.3%~96% of rooting was obtained following 1–3 days of dark treatment with shoots at the density of 3 shoots per vessel on a half strength MS medium without growth hormones. With the substrate of vermiculite in wooden box, 97% of survival in prickling plantlets was made. The plantlets were successfully transplanted to the nursery with a vigorous growth. A practical procedure for commercial plant production in *Ribes nigrum* by micropropagation was established.

Key words *Ribes nigrum*, plantlet, clonal propagation, dark treatment, vermiculite