

采用均匀设计法优化高山笃斯越桔微体繁殖体系

顾地周¹, 高捍东^{2*}, 王晓双³, 王玉方⁴, 顾美影¹, 朱俊义¹

(1. 通化师范学院 生物系, 吉林 通化 134002; 2. 南京林业大学 资源与环境学院, 江苏 南京 210037;
3. 通化市第一中学, 吉林 通化 134001; 4. 农业部特种经济动植物及产品质量监督检验测试中心, 吉林 吉林 123109)

摘 要:以高山笃斯越桔嫩茎段为外植体,应用均匀设计法筛选最适合的培养基,结果表明:最适合外植体嫩茎段腋芽萌发生长的培养基为:DR+ZT3.00 mg·L⁻¹+IAA0.10 mg·L⁻¹+GA₃1.50 mg·L⁻¹,萌发率达98%以上;腋芽生长及生根的培养基为:MS(改良)+IAA0.10 mg·L⁻¹+IBA0.30 mg·L⁻¹+GA₃1.10 mg·L⁻¹,再生率达99%以上。成功建立了高山笃斯越桔的微繁体系。

关键词:高山笃斯越桔;组织培养;微繁;均匀设计

中图分类号:S722.37 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2009)03-0085-03

Uniform Design for Micropropagation System of *Vaccinium uliginosum* var. *alpinum*

GU Di-zhou¹, GAO Han-dong², WANG Xiao-shuang³, WANG Yu-fang⁴, GU Mei-ying¹, ZHU Jun-yi¹

(1. Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China; 3. No.1 Middle School of Tonghua City, Tonghua, Jilin 134001, China; 4. Supervision and Testing Center for Special Economic Animal and Plant Product Quality, Ministry of Agriculture, Jilin, Jilin 123109, China)

Abstract: Young stems of *Vaccinium uliginosum* var. *alpinum* were used as explants and suitable medium compositions for axillary bud growing and rooting were screened through uniform design experiments. The results showed that the suitable media for the germination of axillary bud was DR+ZT3.00 mg·L⁻¹+IAA0.10 mg·L⁻¹+GA₃1.50 mg·L⁻¹, from which the germination rate was as high as 98%; for the growth of axillary bud and rooting, the media was MS(modified)+IAA0.10 mg·L⁻¹+IBA0.30 mg·L⁻¹+GA₃1.10 mg·L⁻¹, from which the regeneration rate was more than 99%. Micropropagation system of *V. uliginosum* var. *alpinum* has been successfully established.

Key words: *Vaccinium uliginosum* var. *alpinum*; tissue culture; micropropagation; uniform design

高山笃斯越桔(*Vaccinium uliginosum* var. *alpinum*)属杜鹃花科越桔属常绿低矮匍匐灌木,是吉林省一类重点保护植物,为野生珍稀濒危药用植物,主要功能为清热、收敛等。果可生食,含糖量极高,汁液丰富,是果酒、果酱、果醋、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。高山笃斯越桔生于高山冻原和石质山坡,耐贫瘠,抗干旱,是水土保持和维持生态平衡的优良树种,在长白山区数量稀少,分布区域十分狭窄,仅集中分布在长白山国家级自然保护区海拔1 500~2 500 m的高山苔原带及岳桦林下。因其播种、扦插

等常规繁殖成活率极低,开发及利用受到很大的限制。因此,在保护现有野生资源的同时,应对这一野生珍贵稀有植物进行离体快繁。愈伤组织再分化芽苗途径具有增殖系数高等优点,但存在外植体诱导愈伤组织周期较长、获得不定芽速度较慢、愈伤组织长期连续增殖极易发生退化和变异等缺点。相对于愈伤组织再分化芽苗过程,腋芽增殖并同时生根途径不仅成苗速度快、增殖系数高,而且遗传稳定性强,大大提高了种苗生产效率。应用均匀设计对高山笃斯越桔嫩茎的腋芽伸长生长和茎段生根条件进行筛选,以期确定最佳培养条件。

收稿日期:2008-08-22 修回日期:2008-12-29

基金项目:吉林省科技厅项目(200705C05),通化师范学院自然科学基金项目(XS070077)

作者简介:顾地周,男,讲师,主要从事长白山区珍稀濒危植物和药用植物研究。

*通讯作者:高捍东,男,教授,博士生导师。

1 材料与方法

1.1 外植体处理

2005年2月初,于长白山管委会科学院植物园采集高山笃斯越桔休眠枝条,在实验室内水培促使腋芽萌发。待腋芽萌发并长至3.0 cm时剪下,用70%酒精涮洗60 s,再用饱和次氯酸钠溶液浸泡8 min,无菌水冲洗10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,切割成一叶一段,作为外植体备用。

1.2 外植体茎段腋芽萌发生长培养基的筛选

以DR为基本培养基^[1],添加蔗糖15 g·L⁻¹,琼脂粉8.5 g·L⁻¹,pH 5.6,温度24±2℃,光照强度1 100 lx,光周期10 h·d⁻¹。将经过处理的外植体接种到附加不同浓度的ZT、IAA和GA₃中,浓度分别为2.50~3.00 mg·L⁻¹、0.10~1.00 mg·L⁻¹和1.50~2.00 mg·L⁻¹。采用均匀设计法^[2],每个处理接种外植体30个。选用U₁₀(10³)均匀表(表1),同时考察了ZT、IAA和GA₃的浓度交叉配比对外植体嫩茎段腋芽萌发率的影响,筛选最适宜外植体嫩茎段的腋芽萌发生长培养基。

表1 U₁₀(10³)因素及水平设计

Table 1 U₁₀(10³) factors and levels design

水平	因素/(mg·L ⁻¹)		
	ZT(X ₁)	IAA(X ₂)	GA ₃ (X ₃)
1	2.50	0.10	1.50
2	2.60	0.20	1.60
3	2.70	0.30	1.70
4	2.80	0.40	1.80
5	2.90	0.50	1.90
6	3.00	0.60	2.00
7	2.70	0.70	1.70
8	2.80	0.80	1.80
9	2.90	0.90	1.90
10	3.00	1.00	2.00

1.3 腋芽生长及茎段生根培养基的筛选

以改良MS(1/4大量元素、1/3微量元素、1/3铁盐和1/3有机成分)为基本培养基,附加蔗糖20 g·L⁻¹,琼脂粉8.5 g·L⁻¹,pH 5.7,温度24±2℃,光照强度1 100 lx,光周期10 h·d⁻¹。待外植体嫩茎段的腋芽萌发后长至2.0 cm时将其切下,并切割成一叶一段,转接到附加不同浓度的IAA、IBA、NAA和GA₃(IAA和GA₃采取过滤灭菌方式加入到培养基中)的改良MS培养基中,进行腋芽伸长生长及生根培养,由预试验可知浓度范围分别为IAA 0.10~0.40 mg·L⁻¹、IBA 0.10~0.30 mg·L⁻¹、NAA 0.07~0.12 mg·L⁻¹和GA₃ 1.10~1.80 mg·L⁻¹,低于控

制范围的植物生长调节物质不能促使高山笃斯越桔生根和腋芽伸长生长,过高的植物生长调节物质导致幼苗基部膨胀或产生愈伤瘤而抑制腋芽萌发生长,继续培养,根从膨胀部或愈伤瘤上发出,这样的小苗在移栽时,根随愈伤瘤从苗基部脱落,移栽成活率几乎为零。为了提高高山笃斯越桔植株再生的速度和再生率,选用U₁₀(10³)均匀表(表2),每个处理接种茎段数为30,同时研究了IAA、IBA、NAA和GA₃浓度交叉对比对高山笃斯越桔腋芽伸长生长及生根的影响,考察再生率,同时以腋芽伸长生长和茎段生根为标准,筛选最适宜的培养基。

表2 U₁₀(10⁴)因素及水平设计

Table 2 U₁₀(10⁴) factors and levels design

水平	因素/(mg·L ⁻¹)			
	IAA(X ₁)	IBA(X ₂)	NAA(X ₃)	GA ₃ (X ₄)
1	0.10	0.10	0.07	1.10
2	0.15	0.15	0.08	1.20
3	0.20	0.20	0.09	1.30
4	0.25	0.25	0.10	1.40
5	0.30	0.30	0.11	1.50
6	0.35	0.30	0.12	1.60
7	0.40	0.25	0.10	1.70
8	0.30	0.20	0.09	1.80
9	0.35	0.15	0.08	1.70
10	0.40	0.10	0.07	1.80

1.4 数据分析

采用均匀设计软件进行数据分析。我国数学家方开泰将数论和多元统计相结合,在正交设计的基础上,创造出一种适用于多因素、多水平试验设计的新方法。他指出正交设计为了照顾“整齐可比”性(使分析结果方便),对任意两因素,它必须是全面试验,每个因素的各水平必须有重复,这样试验点在其试验范围内,并不能做到充分地“均匀分散”(使被挑选的点具有代表性);为了达到“整齐可比”,试验点应足够多。若舍弃“整齐可比”性,且在其试验范围内充分地“均匀分散”,这样,每个试验点即具有更好的代表性;试验点的数目较正交设计大幅度地减少。

2 结果与分析

2.1 生长调节物质浓度对高山笃斯越桔外植体茎段腋芽萌发生长的影响

试验结果(表3)经均匀设计软件分析处理后(表4)可知,回归方程显著。对方程项进行显著性检验表明,各方程项对Y影响均显著。根据回归方程求出Y的最优组合为:X₁=3.00, X₂=0.10, X₃=1.50,在此组合基础上求得最优解:y=99.9,按公式Y=y±ua·s计算出优化值区间估计为Y=

100±3.08,即96.92~103.08。用试验得到的优化值ZT3.00 mg·L⁻¹+IAA0.10 mg·L⁻¹+GA₃1.50 mg·L⁻¹进行验证,将外植体茎段接种到附加ZT3.00 mg·L⁻¹、IAA0.10 mg·L⁻¹和GA₃1.50 mg·L⁻¹的DR培养基上进行外植体茎段的腋芽萌发生长培养,外植体茎段腋芽在此组合的培养基上培养20 d后腋芽开始萌动,继续培养30 d后,腋芽生长为茎叶体(图1a),40 d后苗高可达2.0 cm以上,萌发率为98%以上,在估计区间范围内,且Y值最大。因此,高山笃斯越桔外植体嫩茎段腋芽萌发生长的培养基为:DR+ZT3.00 mg·L⁻¹+IAA0.10 mg·L⁻¹+GA₃1.50 mg·L⁻¹。

表4 高山笃斯越桔微体繁殖不同阶段的回归分析结果^①

Table 4 Regression analysis result of regeneration shoots directly form young leaves and rooting in stages of <i>V. uliginosum</i> var. <i>alpinum</i>				
培养阶段	回归方程	复相关系数(R)	检验值(F _r)	回归分析结果
腋芽萌发生长	$Y = -34.7 + 52.0X_1 - 23.0X_2 - 12.6X_3$	0.998 3	584.3	$F_r > F(0.01, 3, 6)$ 回归方程显著
腋芽生长及茎段生根	$Y = 119.0 - 98.1X_1 + 18.3X_2 - 13.0X_4$	0.999 0	1 017.0	$F_r > F(0.01, 3, 6)$ 回归方程显著

①显著性水平α=0.01,样本容量N=10,F(0.01,3,6)=9.780。

2.2 植物生长调节物质交叉配比对高山笃斯越桔腋芽生长及茎段生根的影响

试验结果(表5)经均匀设计软件分析处理后(表4)可知,回归方程显著。对方程项进行显著性检验表明,各方程项对Y影响均显著。

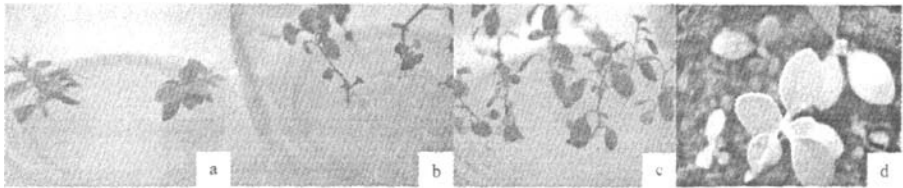
表5 U₁₀(10⁴)均匀设计实验安排及结果

处理	因素/(mg·L ⁻¹)				再生率(Y)/%
	IAA(X ₁)	IBA(X ₂)	NAA(X ₃)	GA ₃ (X ₄)	
1	0.10	0.20	0.10	1.50	92.00
2	0.15	0.30	0.09	1.80	86.50
3	0.20	0.15	0.07	1.40	84.00
4	0.25	0.10	0.11	1.70	74.00
5	0.30	0.25	0.08	1.30	77.00
6	0.35	0.25	0.08	1.80	65.00
7	0.40	0.10	0.12	1.20	65.50
8	0.30	0.15	0.07	1.70	70.00
9	0.35	0.30	0.09	1.10	75.50
10	0.40	0.20	0.10	1.60	62.00

表3 U₁₀(10³)均匀设计及结果

Table 3 U ₁₀ (10 ³)uniform design test plan and result				
处理	因素/(mg·L ⁻¹)			萌发率(Y)/%
	ZT(X ₁)	IAA(X ₂)	GA ₃ (X ₃)	
1	2.50	0.50	1.70	62.00
2	2.60	1.00	1.70	56.00
3	2.70	0.40	2.00	71.50
4	2.80	0.90	2.00	64.50
5	2.90	0.30	1.60	90.50
6	3.00	0.80	1.90	79.00
7	2.70	0.20	1.90	78.00
8	2.80	0.70	1.50	76.00
9	2.90	0.10	1.80	93.00
10	3.00	0.60	1.80	85.50

根据回归方程求出Y的最优组合为:X₁=0.10,X₂=0.30,X₄=1.10,在此组合基础上求得最优解:y=100,此解为方程解析解,按公式Y=y±ua·s计算出优化值区间估计为Y=100±2.00,即98.0%~102.0%。以最优组合做验证试验,将高山笃斯越桔嫩茎段接种到附加IAA0.10 mg·L⁻¹+IBA0.30 mg·L⁻¹+GA₃1.10 mg·L⁻¹的改良MS培养基中,培养18 d后,嫩茎基部开始出现根锥;25 d后腋芽开始萌动生长;继续培养至40 d,嫩茎基部直接发出3~5条不定根(图1b);50 d后苗高可达4.0 cm以上,有的产生了侧根,根和苗的形态、发育均正常,再生率达99%以上,在估计区间范围内,且Y值最大。可见,高山笃斯越桔嫩茎段生根和腋芽伸长生长的最佳培养基为:MS(改良)+IAA0.10 mg·L⁻¹+IBA0.30 mg·L⁻¹+GA₃1.10 mg·L⁻¹。



a. 外植体茎段的腋芽萌发 b. 腋芽生长及生根 c. 茎节增殖培养 d. 移栽

图1 高山笃斯越桔微繁殖各阶段的培养物形态

Fig. 1 Form of micropropagation in various stage of *V. uliginosum* var. *alpinum*

以再生植株茎节为材料进行快繁,结果表明,在45 d的培养周期内,每段增殖倍数平均达6以上(图1c),每瓶年增殖倍数可达50以上。

2.3 炼苗和移栽

待苗根长至2.0 cm以上时,从培养瓶中取出试

(下转第94页)

3 小结与讨论

适宜的氮、磷、钾配比能促进小苍兰植株的高生长,然而,氮的过量施入影响小苍兰的高生长。当氮、磷、钾浓度分别为 $100, 100, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,植株高生长量达到最大值。

花芽分化及发育期施用氮、磷、钾浓度别为 $100, 100, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,最有利于小苍兰花枝的伸长,花枝的伸长有利于切花生产;氮、磷、钾的浓度分别为 $100, 200, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,小苍兰的总花朵数最多,因此,有效地施用磷肥可促进小苍兰花朵的发育,有利于小花朵数的增多;不同氮、磷、钾对比对小苍兰花期的影响不大,但施肥能促进小苍兰的营养生长,使花期推迟。

花芽分化及发育期施用不同氮、磷、钾配比肥料都可促进小苍兰的新球球径和球重的增加,氮、磷、钾的浓度分别为 $200, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,新球球重最大。氮、磷、钾的浓度分别为 $100, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,新球球径最大。

小苍兰具有易倒伏性,氮、磷、钾配比施用引起的植株过高易引起小苍兰倒伏,降低小苍兰的观赏价值,影响了小苍兰的切花生产效益。因此,在施肥过程中要注意控制小苍兰的株高生长,可以考虑在今后的试验中,把水分、温度等外界环境因素与施肥

结合起来,进一步研究适合小苍兰生长的最佳条件,以克服小苍兰的倒伏。

参考文献:

- [1] 刘燕. 园林花卉学[M]. 北京, 中国林业出版社, 2003, 262.
- [2] 北京林业大学花卉教研室. 花卉学[M]. 北京, 中国林业出版社, 1990, 18-32.
- [3] 薛秋华. 小苍兰无土栽培营养条件的初步研究[J]. 福建农业大学学报, 1998, 27(1), 62-68.
- [4] 秦文英, 罗震伟, 金为民, 等. 小苍兰基质栽培试验研究[J]. 上海农学院学报, 1994, 12(1), 42-47.
- [5] 金为民, 秦文英, 林祥源. 温度对小苍兰生长发育的影响[J]. 上海农学院学报, 1994, 12(1), 16-19.
- [6] 刘玉艳, 于凤鸣, 张凯旋. 香雪兰生长发育与矿质营养的吸收规律[J]. 河北科技师范学院学报, 2005, 19(2), 9-13.
- [7] 李树和, 刘运霞, 廖增, 等. 不同氮、磷、钾对比对砂培生菜长势影响[J]. 北方园艺, 2001(3), 15-16.
- [8] 毛洪玉, 刘迪, 韩晓日. 仙客来无土栽培营养液氮磷钾最佳组合和适宜浓度的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(1), 75-79.
- [9] 赵九洲, 陈洁敏, 陈松笔, 等. 基质与氮磷钾比例对蝴蝶兰生长发育的影响[J]. 园艺学报, 2000, 27(5), 383-384.
- [10] 秦鱼生, 涂士华, 孙锡发, 等. 不同氮钾水平对萝卜产量和硝酸盐含量的影响[J]. 西南农业学报, 2003, 16(增), 113-115.
- [11] 宋春风, 徐坤. 氮钾肥施对芋头产量和品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(2), 167-170.

(上接第 87 页)

管苗, 在含有 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 杀毒矾溶液中洗去苗上残留琼脂, 然后植入经 20 倍杀毒矾消毒过的腐烂松针、泥炭土和细河砂 ($2:1:1$) 混合的基质中, 用透光的塑料薄膜覆盖以保湿保温, 空气湿度保持在 75%, 温度控制在 $18 \pm 2^\circ\text{C}$, 每天自然光照 8 h, 每天中午通风换气 10 min, 10 d 后揭去薄膜, 每天早、晚喷洒清水各 1 次, 成活率达 95% 以上(图 1d)。

3 结论与讨论

研究表明, 较高浓度的 ZT 和较低浓度的 IAA 配以适当浓度的 GA_3 , 有利于高山笃斯越桔外植体茎段腋芽的迅速萌发和生长, 萌发率达 98% 以上, 高于前人对其他越桔茎段萌发的研究结果^[3-4], 培养基 $\text{DR} + \text{ZT} 3.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA} 0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{GA}_3 1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对高山笃斯越桔外植体茎段的腋芽萌发生长的效果显著; 经过改良的 MS 培养基附加 IAA、IBA 和 GA_3 加快了高山笃斯越桔的腋芽伸长生长及茎段生根, 提高了植株的再生率, 再

生率达 99%, 高于其他越桔的再生率^[5-6], 可能是越桔的种不同所致。此方法可一步成苗, 缩短了增殖周期, 提高了增殖倍数, 方法简捷, 经济实用, 可操作性强, 达到了高效快繁的目的。应用均匀设计法处理和数据分析数据大大缩短了培养基配方的摸索周期。

参考文献:

- [1] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州, 甘肃科学技术出版社, 2002.
- [2] 方开泰. 均匀设计—数论方法在试验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4), 363-372.
- [3] 和加卫, 徐中志, 唐开学, 等. 云南越桔的组织培养[J]. 植物生理学报, 2007, 43(2), 320.
- [4] 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.
- [5] 刘树英, 张志东, 吴林, 等. 兔眼越桔芽增殖诱导培养基及激素的筛选[J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(1), 55-57.
- [6] 张长青, 李广平, 朱士农, 等. 兔眼越桔茎段快繁高效技术研究[J]. 果树学报, 2007, 24(6), 837-840.