黄菠萝嫩茎离体培养再生体系的建立

王新天¹, 王新宇², 李晓萍¹, 王红艳¹, 王伶俐¹, 郭志新¹, 张成婧¹, 韩学慧¹, 刘欣³

(1. 双辽市林木种苗管理站, 吉林四平 136400; 2. 双辽市郑家屯街林业站, 吉林四平 136400; 3. 吉林省林业勘察设计院, 吉林长春 130033)

摘要 [目的]优化黄菠萝离体培养再生体系。[方法]以黄菠萝带腋芽的嫩茎为外植体,采用正交设计研究其离体培养再生体系。[结果]诱导黄菠萝的最佳初代培养基是 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.06 mg/L NAA + 20 g/L 蔗糖,继代培养的最佳培养基组合是 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA,最佳生根培养基组合是 1/2MS + 0.4 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖。[结论]以黄菠萝带腋芽的嫩茎为外植体,采用正交设计研究其离体培养和植株再生技术方法是可行的。

关键词 黄菠萝;组织培养;再生体系;正交设计

中图分类号 S604⁺.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)17-310-03

Establishment for Regeneration System of Younger Stem of *Phellodendron amurense* Rupr. *in vitro*

WANG Xin-tian¹, WANG Xin-yu², LI Xiao-ping¹ et al (1. Shuangliao City Forest Tree Seedlings Station, Siping, Jilin 136400; 2. Shuangliao City Zhengjiatun Forest Station, Siping, Jilin 136400)

Abstract [Objective] To optimize *Phellodendron amurense* Rupr. *in vitro* culture regeneration system. [Method] By using axillary bud-bearing young stem of *Phellodendron amurense* as explants, the orthogonal experimental design was employed to study the *in vitro* culture and regeneration condition. [Result] The optimum primary medium was MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.06 mg/L NAA + 20 g/L sucrose, the best growth regulatory substance combination of medium for subculture was MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, and the best rooting medium was 1/2MS + 0.4 mg/L NAA + 30 g/L sucrose. [Conclusion] Taking axillary bud-bearing young stem of *Phellodendron amurense* as explants, adopting orthogonal design to study its *in vitro* culture and plants regeneration technique is feasible.

Key words *Phellodendron amurense* Rupr.; Tissue culture; Regeneration system; Orthogonal design

黄菠萝 (*Phellodendron amurense* Rupr.), 属芸香科黄檗属落叶阔叶乔木, 是国家级重点保护植物。目前对黄菠萝的研究较少, 一般偏重于采种^[1]、育苗^[2]、嫩枝扦插^[3]、药用价值^[4]方面的研究。近年来, 黄菠萝资源日益减少, 甚至在某些地区濒临灭绝。黄菠萝组织培养方面已有报道, 如郭勇^[5]用黄菠萝茎段诱导愈伤组织和不定芽进而再生植株, 愈伤组织诱导率为 82%, 由于经过愈伤组织分化阶段, 体细胞变异的可能性较大, 在快速繁殖中一般不采用这种方式。丛生芽增殖方式是指茎尖或腋芽在适宜的培养基上诱导, 不断发生腋芽, 再从芽的叶腋内长出小芽, 腋芽不断形成又不断萌动, 形成丛生苗, 然后转入生根培养基, 诱导生根成苗, 扩大繁殖。由于在其增殖过程中, 无需经过愈伤组织而可以再生, 直接从芽到芽, 是其无性系后代最能保持原品种特性的一种繁殖方式。这种增殖方式在数量、质量和经济等方面都优于其他传统的繁殖方式, 因此, 是林木快繁中运用最为广泛的一种繁殖方式。建立黄菠萝的组织培养体系, 不仅可以迅速地获得大量优质的造林苗木, 还可以为以后用作生物技术和基因工程方法对植物进行遗传改良。为此, 笔者以带腋芽的

茎段为外植体, 以丛生芽增殖方式形成幼苗, 采用正交设计方法研究影响黄菠萝离体再生的主要因素, 建立高效离体再生的组培体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理 黄菠萝采自吉林省露水河林业局的天然近熟群体林, 于 2 月份取成年树一年生的无病虫害枝条, 带回实验室置于水中培养, 取带腋芽的茎段为外植体, 将其新萌发的幼嫩枝条采下后先在流水下反复冲洗 0.5~1.0 h, 再用饱和中性洗衣粉液洗涤枝条, 流水彻底冲洗, 滤纸吸干表面水分, 转移到灭菌的超净工作台上, 用 70%~75% 乙醇表面消毒 15 s, 将外植体在 0.1% HgCl₂ 溶液中消毒 8 min 后, 接种在初代培养基上, 每瓶接种 1 个外植体, 每处理接种 30 瓶。

1.2 试验设计 采用正交设计, 不同培养阶段各种因素水平见表 1, 每组试验重复 3 次。在正交试验中, 初代培养统计外植体的诱导率, 继代培养统计试管苗的高净增量, 生根培养统计试管苗的生根数。

表 1 不同培养阶段的因素水平

水平	初代培养				继代培养				生根培养			
	因素				因素				因素			
	基本培养基(A)	6-BA(B) //mg/L	NAA(C) //mg/L	蔗糖(D) //mg/L	6-BA(A) //mg/L	NAA(B) //mg/L	IBA(C) //mg/L	基本培养基(A)	6-BA(B) //mg/L	NAA(C) //mg/L	蔗糖(D) //mg/L	
1	1/2MS	0.5	0.02	10	0.5	0.05	0.1	1/2MS	0	0.2	10	
2	MS	1.0	0.04	20	1.0	0.10	0.2	MS	0.1	0.4	20	
3	WPM	1.5	0.06	30	1.5	0.15	0.3	WPM	0.2	0.6	30	
4	B5	2.0	0.08	40				B5	0.3	0.8	40	

作者简介 王新天(1978-), 男, 吉林双辽人, 从事林木种苗生产和管理工作。

收稿日期 2015-04-07

1.3 培养条件 所有培养基 pH 为 5.8, 在 121 °C 条件下高压灭菌 15 min。培养温度为 (22 ± 2) °C, 光周期为 14 h/d, 光

照强度为 50 ~ 70 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

1.4 数据处理 对数据进行方差分析和多重比较,统计分析用 SPSS 完成。

2 结果与分析

2.1 初代最佳培养基的筛选 由表 2 可知,诱导黄菠萝的最佳初代培养基为 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.06 mg/L + 蔗糖 20 g/L,即最佳工艺组合是 $A_2B_3A_3D_2$ 。方差分析结果表明,A、B、C、D 4 个因素差异极显著。此外,4 种基本培养基对茎段的诱导能力依次为 MS > 1/2MS > WPM > B5,它们之间差异均达到显著水平,且 MS 与其他 3 种达到极显著水平。从长势情况来看,MS 培养基上茎段诱导的不定芽,叶片伸展,叶色鲜绿,节效果最好。

表 2 初代培养正交试验结果

试验号	因素				诱导率 %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	32.0
2	1	2	2	2	60.3
3	1	3	3	3	65.7
4	1	4	4	4	42.0
5	2	1	2	3	54.3
6	2	2	1	4	63.3
7	2	3	4	1	73.3
8	2	4	3	2	67.7
9	3	1	3	4	43.3
10	3	2	4	3	51.0
11	3	3	1	2	54.3
12	3	4	2	1	29.0
13	4	1	4	2	26.0
14	4	2	3	1	25.0
15	4	3	2	4	29.0
16	4	4	1	3	23.0
k_1	50abB	39bB	43bB	40bB	
k_2	65aA	50aA	43bB	52aA	
k_3	44cB	56aA	51aA	49abAB	
k_4	26dC	41bB	48aAB	44bB	

2.2 继代最佳培养基的筛选 方差分析结果表明,6-BA 各水平间差异极显著,NAA 各水平间差异显著,IBA 各水平间差异不显著。各个因素的主次依次是 A、B、C,表明在继代培养中细胞分裂素起的作用最大,2 种生长素 NAA 比 IBA 的效果好。由于 IBA 各水平差异不显著,因此只对 6-BA 和 NAA 各水平间进行多重比较。由表 3 可知,2 个因素均为第二个水平效果最好,由于 IBA 差异不显著,在 2 种生长素中只选择 NAA,继代培养最佳激素组合为 A_2B_2 ,即 6-BA 1.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L。

2.3 生根最佳培养基的筛选 方差分析结果表明,基本培养基各水平间差异极显著,6-BA 各水平间差异不显著,NAA 各水平间差异极显著,蔗糖各水平间差异极显著。各个因素的主次依次是 A、C、D、B。由于 6-BA 差异不显著,因此只对其他 3 个因素的水平间进行多重比较(表 4)。由表 4 可知,生根培养的最佳组合为 $A_1C_2D_3$,即培养基为 1/2MS,NAA 浓度为 0.4 mg/L,蔗糖浓度为 30 g/L。

表 3 继代培养正交试验结果

试验号	因素			苗高增 长量//cm
	A	B	C	
1	1	1	1	1.10
2	1	2	2	1.17
3	1	3	3	1.13
4	2	1	2	2.13
5	2	2	3	2.43
6	2	3	1	2.10
7	3	1	3	1.90
8	3	2	1	2.10
9	3	3	2	1.70
k_1	1.13cC	1.71bAB		
k_2	2.22aA	1.90aA		
k_3	1.90bB	1.64bB		

表 4 生根培养正交试验结果

试验号	因素				生根 个数
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	3.77
2	1	2	2	2	4.47
3	1	3	3	3	5.73
4	1	4	4	4	4.67
5	2	1	2	3	5.37
6	2	2	1	4	4.57
7	2	3	4	1	4.10
8	2	4	3	2	4.40
9	3	1	3	4	3.63
10	3	2	4	3	3.40
11	3	3	1	2	2.97
12	3	4	2	1	4.23
13	4	1	4	2	2.50
14	4	2	3	1	1.83
15	4	3	2	4	3.27
16	4	4	1	3	2.60
k_1	4.88aA		3.48cBC	3.61bcB	
k_2	4.61aA		4.55aA	3.80bB	
k_3	3.56bB		4.03bB	4.23aA	
k_4	2.68cB		3.67cB	4.03abAB	

3 结论与讨论

培养基中含有外植体生长所需要的营养物质,是组织培养中外植体赖以生存和发展的基础。在初代培养中 4 种基本培养基对茎段诱导率的大小为 MS > 1/2MS > WPM > B5,它们之间差异均达到显著水平,且 MS 与其他 3 种达到极显著水平,从长势情况来看,MS 培养基上茎段诱导的不定芽,叶片伸展,叶色鲜绿,节效果最好。而在生根培养阶段则需要低浓度的盐,4 种基本培养基对根诱导率的大小为 1/2MS > MS > WPM > B5。另外在组织培养的各个阶段,基本培养基都是最重要的因素,因此选择合适的培养基是组织培养成功与否的关键因素。

该研究使用的细胞分裂素是结构比较稳定的人工合成的 6-BA。研究发现,在初代培养中,6-BA 的 4 个水平中分出了 2 个等级,尽管 2、3 水平上差异不显著,从方差分析的角度两者皆可选,但考虑 3 水平的平均值略高于 2 水平,所

以选择了3水平的浓度,即6-BA选择1.5 mg/L。而在继代培养中对6-BA共设置了3个梯度,结果表明各水平间差异极显著,其中以1.0 mg/L最好。在生根培养中对6-BA共设计4个梯度,结果表明,4个水平下的6-BA差异不显著,因而在生根培养中6-BA的影响不大。综合来看,在初代培养中需要高浓度的细胞分裂素,在继代培养中6-BA的浓度有所降低,而在生根培养中6-BA的作用很小,甚至可以不加。

该研究所使用的生长素是NAA。研究发现,在初代培养中,4个因素中NAA的作用最小,但4个水平差异显著,3、4水平之间差异不显著,但只有3水平与其他2个水平差异极显著,而4水平与其他2个水平差异则不显著,因而选择3水平的0.06 mg/L作为NAA的最优浓度。在继代培养中NAA的作用明显优于IBA,IBA的作用不显著,与他人的结果不一致,可能是所设的浓度不理想所致。而NAA的浓度以0.1 mg/L为最佳。在生根培养中,NAA在4个因素中也比较重要,4个水平差异极显著,其中以0.4 mg/L诱导的根数最多。综合来看,在这3个培养阶段,NAA的浓度变化较大,且浓度逐渐升高。

糖是培养基中不可缺少的碳源,该试验选用的糖源是蔗糖,在不同培养阶段用量也不完全相同。在初代培养中,蔗糖含量对诱导率产生显著和极显著的影响,4个水平分出了2个等级,在2个较好的水平中,只有2水平下的结果与其他2个水平的结果差异极显著,因此2水平下的20 g/L蔗糖为最佳浓度。在生根培养中,4个蔗糖浓度水平下的生根数差异显著或极显著,比较而言3水平下的蔗糖浓度最好,即30 g/L。综合来看,在初代培养中蔗糖需求量不大,而在生根培养中则需要较高浓度的蔗糖。

正交设计是多因素分析的有力工具,可以从许多因素中选出主要影响因素及最佳水平,用较少的试验次数获得较多的信息^[6]。正交设计可以精简试验次数、克服在培养基

配方设计上的盲目性、提高工作效率和试验的可靠性^[7]。近年来正交设计等统计方法应用于许多植物的离体培养^[8-10],并取得良好的试验效果,但在黄菠萝组织培养中尚未见该方法的报道。该试验采用正交设计的方法,仅用较少的试验组合,通过统计学分析,明确了黄菠萝初代、继代、生根培养各阶段的主要因素,同时优化筛选了最佳培养基,简化了研究方案,加快了研究进程。成功应用正交设计法的关键是参试因子和试验水平范围的正确选择。该试验中大多数参试因子产生的效应存在明显差异,筛选出来的培养基中各因子的水平基本在试验水平范围之内,能大体反映全部组合的试验效果,因此该试验对参试因子和试验水平范围的选择是较适宜的。该研究未考虑因子间的交互作用,需要在以后的研究和实践中进一步完善。

参考文献

- [1] 张泉,朱成仁.黄菠萝采种及育苗技术的研究[J].林业勘察设计,2005(3):44-47.
- [2] 龙作义,苑国,周敬伟.温室效应对塑料大棚黄菠萝育苗的影响[J].牡丹江师范学院学报,2005(2):17-20.
- [3] 于树成,张淑华,闫红霞,等.黑龙江省主要阔叶树种绿枝扦插效果初步分析[J].林业勘察设计,2003(1):25-28.
- [4] 李霞,阎秀峰,刘剑锋.氮素形态对黄檗幼苗三种生物碱含量的影响[J].生态学报,2005,25(9):2159-2164.
- [5] 郭勇,石大兴,孙雁霞,等.黄檗的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2005,41(6):792.
- [6] 李春喜,姜丽娜,邵云,等.生物统计学[M].北京:科学出版社,2005:177-183.
- [7] 王建华,王义,孙国伟,等.人参组织培养的多因子正交试验研究[J].吉林农业大学学报,2006,28(6):648-651.
- [8] 张菊红,谢好,汪承刚,等.正交设计在欧洲松蓝组织培养中的应用[J].湖北大学学报,2006,28(2):183-186.
- [9] 宋莉英,谭净,高峰.苦瓜愈伤组织诱导的多因子正交试验研究[J].西南师范大学学报,2004,29(3):462-465.
- [10] 李成慧,蔡斌,单丽丽,等.应用正交设计法探讨蝴蝶兰叶片类原球茎的诱导[J].扬州大学学报,2004,25(2):76-78.
- [11] 李强,霍守亮,王晓伟,等.巢湖及其入湖河流表层沉积物营养盐和粒度的分布及其关系研究[J].环境工程技术学报,2013,3(2):147-155.
- [12] 揣小明,杨柳燕,程书波,等.太湖和呼伦湖沉积物对磷的吸附特征及影响因素[J].环境科学,2014,35(3):951-957.
- [13] 王圣瑞,赵海超,王娟,等.有机质对湖泊沉积物不同形态氮释放动力学影响研究[J].环境科学学报,2012,32(2):332-340.
- [14] HOHENER P, GACHTER R. Nitrogen cycling across the sediment-water interface in an eutrophic, artificially oxygenated lake[J]. Aquatic Sciences, 1994, 56(2):115-132.
- [15] FOG K. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter[J]. Biological Reviews, 1988, 63(3):433-462.
- [16] SMALL G E, COTNER J B, FINLAY J C, et al. Nitrogen transformations at the sediment-water interface across redox gradients in the Laurentian Great Lakes[J]. Hydrobiologia, 2014, 731(1):95-108.

(上接第290页)

- [5] 胡康博,王毅力,徐昕照.昆明湖沉积物的组成和理化性质的粒度响应[J].环境科学与技术,2011,34(1):90-95.
- [6] 范成新,张路.太湖一沉积物污染与修复原理[M].北京:科学出版社,2009.
- [7] 范成新,张路,王建军,等.湖底淤泥疏浚对内源释放影响的过程与机理[J].科学通报,2004,49(15):1523-1528.
- [8] URBAN N R, DINKEL C, WEHRLI B. Solute transfer across the sediment surface of a eutrophic lake: I. Porewater profiles from dialysis samplers[J]. Aquatic Sciences, 1997, 59(1):1-25.
- [9] 王志齐,李宝,梁仁君,等.南四湖内源氮磷释放的对比研究[J].环境科学学报,2013,33(2):487-493.
- [10] 殷志强,秦小光,吴金水,等.中国北方部分地区黄土、沙漠沙、湖泊、河流细粒沉积物粒度多组分分布特征研究[J].沉积学报,2009,27(2):343-351.