

北美冬青‘奥斯特’的组织培养和快速繁殖

张俊林¹, 余有祥², 沈柏春¹, 丁旭升¹, 钱飞¹, 孙英坤¹, 吴光洪^{1,*}

¹杭州市园林绿化股份有限公司, 杭州310000; ²杭州润土园艺科技有限公司, 杭州310000

摘要: 以北美冬青‘奥斯特’(‘Oosterwijk’)成年雌性优良单株半木质化茎段为材料, 建立了组织培养快速繁殖体系。结果表明, WPM+6-BA 0.50 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹可作为启动培养基, 最佳的继代增殖培养基为WPM+6-BA 1.00 mg·L⁻¹+NAA 0.10 mg·L⁻¹+蔗糖20 g·L⁻¹, 25 d的增殖系数为6.1; 生根培养基为1/2WPM+IBA 0.20 mg·L⁻¹+NAA 0.40 mg·L⁻¹, 生根率达95.2%, 每株平均生根5.7条。经生根培养30 d和日光温室炼苗10 d后, 试管苗移入泥炭和珍珠岩(1:1, V/V)混合基质中, 移栽后的成活率达98%。该体系的建立为北美冬青规模化生产提供了技术平台。

关键词: 北美冬青; 组织培养; 快速繁殖

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Ilex verticillata* ‘Oosterwijk’

ZHANG Jun-Lin¹, YU You-Xiang², SHEN Bo-Chun¹, DING Xu-Sheng¹, QIAN Fei¹, SUN Ying-Kun¹, WU Guang-Hong^{1,*}

¹Hangzhou Landscaping Incorporated, Hangzhou 310000, China, ²Hangzhou RUN-TU Gardening Science and Technology Co., Ltd., Hangzhou 310000, China

Abstract: The tissue culture technology was studied in this research by using semi-lignified shoots from female individual ‘Oosterwijk’ (*Ilex verticillata*). The results showed that bud formation on the nodal explants was induced on the WPM medium supplementing with 6-BA 0.50 mg·L⁻¹ and NAA 0.05 mg·L⁻¹; the best medium for proliferation was WPM supplemented with 6-BA 1.00 mg·L⁻¹, NAA 0.10 mg·L⁻¹ and sucrose 20 g·L⁻¹, the proliferation coefficient was 6.1 after subculturing for 25 d; the optimal rooting medium was 1/2WPM supplemented with IBA 0.20 mg·L⁻¹ and NAA 0.40 mg·L⁻¹, with rooting rate up to 95.2% and 5.7 roots per shoot. After rooting culture for 30 days and acclimatization in greenhouse for 10 days, the shoots were transferred to the substrate of perlite and peaty soil (1:1, V/V) and the survival rate was 98%. These results can provide the technical basis for scale production of plantlets of *I. verticillata* ‘Oosterwijk’.

Key words: *Ilex verticillata*; tissue culture; rapid propagation

北美冬青(*Ilex verticillata*)又名轮生冬青、美洲冬青, 为冬青科冬青属多年生落叶灌木。北美冬青‘奥斯特’自2006年从荷兰引进, 通过8年安全性、适应性及生物学性状的观察(余有祥等2012), 在浙江杭州地区, 10月上旬果实成熟, 果实由绿色转为红色, 挂果期10月至翌年4月, 果实鲜红, 有光泽, 可做切枝、盆栽, 是新型优良的年宵花观果树种。

北美冬青通常采用播种、扦插和嫁接等方式繁殖。采用种子繁殖时, 由于种子深度休眠, 经处理的种子层积一个冬天发芽率为17.1%, 而对照种子则颗粒不发(徐本美等2002)。另外, 籽播苗开花结果前雌雄株难以区分; 种子苗会出现分离现象, 不能保持亲本的优良性状; 同时实生苗童期较长, 推迟了开花结果时间。采用扦插繁殖, 受季节及穗条质量限制, 影响具有优良性状植株的繁育系

数, 限制了其推广应用。利用组织培养技术对冬青属植物进行离体培养和快繁已有一些报道。李登中(2004)以日本金叶冬青(*I. crenata*)顶芽和带腋芽的嫩茎段为外植体, 获得了大量再生植株。王桂文等(1997)在进行苦丁茶(*I. kudingcha*)组织培养繁殖的研究中, 发现在MS培养基中添加1.00~4.00 mg·L⁻¹ 6-BA, 可让苦丁茶快速增殖, 而生长素NAA对苦丁茶的组培繁殖没有促进效应。李永欣等(2007)以美洲冬青带腋芽茎段为外植体进行快繁试验, 结果表明在MS+氯吡苯脲(CPPU) 1.00 mg·L⁻¹+NAA 0.50 mg·L⁻¹培养基上的增殖效果较好, 取得了组培快繁的成功。目前, 北美冬青‘奥

收稿 2014-07-21 修定 2014-08-20

资助 中央财政林业科技推广示范项目([2012]TS008号)。

* 通讯作者(E-mail: 51576419@qq.com; Tel: 0571-86020113)。

特’尚未见组培快繁的相关报道。本研究以‘奥斯特’的优良雌性单株茎段为外植体,建立了组织培养无性系工厂化生产体系,旨在短期内培育出大量优质无性系‘奥斯特’种苗,以满足市场的需求。

材料与方 法

1 外植体来源

供试材料来自杭州润土园艺科技有限公司苗圃10~12年生的北美冬青‘奥斯特’ [*Ilex verticillata* (L.) A. Gray ‘Oosterwijk’]地栽苗的优良雌株。在6月份晴天午后,采集当年抽生的15~30 cm长的健壮、无病虫害萌条,去掉叶片并保留1~2 cm叶柄,用湿润报纸包裹保湿,置于4 °C冰箱保存备用。

2 外植体处理

将枝条截成2~3 cm长带1~2个节的茎段,用饱和洗衣粉溶液浸泡,置磁力搅拌器上旋转30 min,然后用自来水冲洗干净,并用流水冲洗20 min左右。然后在超净工作台上,用75%酒精浸泡60 s,1 g·L⁻¹升汞溶液消毒7 min,再用无菌水冲洗4~5次,期间不断摇动。然后将茎段取出置于接种盘中,待风干后,将茎段两端各切去0.5~0.7 cm,切成1.0~1.5 cm长的带0.5~1.0 cm叶柄的茎段,接种至诱芽培养基上。

3 诱芽培养

诱芽培养基为WPM+6-BA 0.50 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹,另添加蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂7 g·L⁻¹,pH调至5.8。

4 继代增殖培养

L₉(3⁴)正交试验设计筛选最优增殖培养基配方试验,基本培养基分别为B₅、1/2MS和WPM,6-BA浓度分别为0.50、1.00和1.50 mg·L⁻¹,NAA浓度分别为0.05、0.10和0.20 mg·L⁻¹,蔗糖用量分别为20、30和40 g·L⁻¹的四因素三水平设计试验,以繁殖系数和生长状况为指标,筛选合适的培养基。

按照正交试验设计的生长物质配比,将诱芽培养基上形成的无菌苗切割成长0.5~1.0 cm单芽或顶芽茎段接到不同生长物质配比的增殖培养基中。每处理10瓶,每瓶接种5个茎段或顶芽,重复3次。接种25 d后,观察不同培养基对试管苗生长状况的影响。增殖系数=培养后获得的芽数/接种时的芽数(计数芽长度≥0.5 cm)。

5 生根培养

生根培养基为1/2WPM,加蔗糖20 g·L⁻¹、琼脂7 g·L⁻¹,pH 5.8。IBA的浓度为0、0.10和0.20 mg·L⁻¹;NAA的浓度为0.20、0.30和0.40 mg·L⁻¹。培养基配制后经121 °C高温高压灭菌20 min后备用。选择长1.5~2.0 cm,生长健壮、长势一致的组培苗嫩茎,分别转接到不同生长物质配比的生根培养基中。接种30 d后调查生根数,2条及以上为有效根,统计生根率。每个处理10瓶,每瓶接种10个嫩茎,重复3次,筛选合适的生根培养基,同时设置不加生长物质的培养基为对照处理。

6 培养条件

外植体芽诱导、继代增殖及生根均在(25±3) °C、光照强度40 μmol·m⁻²·s⁻¹、每天12 h光照条件下培养。

实验结果

1 无菌快繁体系的建立

未污染并成活的外植体,接种后7 d,叶柄出现松动脱落,腋芽开始膨大;10 d可见冒出的腋芽,25 d时腋芽伸长且有叶片展开,以单芽生长为主,培养40 d后嫩茎长至3~4 cm(图1-A)。切割嫩茎后接入相同的芽诱导培养基,经过2~3次继代后,腋芽分化出丛生芽,丛生芽繁殖能力增强,无菌无性系群体数量变大。

启动培养过程中出现了一个有趣的现象,茎段外植体在诱芽培养基上不但抽生了健壮的嫩茎,同时也形成了致密的绿色愈伤组织(图1-B),切割继代嫩茎的同时,将茎段外植体愈伤组织切除干净,转入芽诱导培养基中继续培养,30 d后再次收获高度3~4 cm的嫩茎,外植体基部依然出现致密绿色愈伤组织;再次同上操作后培养30 d,依然出现以上现象。反复培养了6次,收获嫩茎7次,持续时间达7个月之久。第4次收获时,抽生嫩茎叶色转黄,愈伤组织变小,第5~7次收获的嫩茎质量依次变差,最后一次收获时,嫩茎纤细、高度不足1 cm、叶片黄化、愈伤组织黄褐色、成松散状,外植体茎段干瘪。再次转接,10 d后死亡。

2 不同植物生长物质对比对北美冬青继代增殖的影响

增殖培养采用茎段切割的方式进行繁殖,选取经2~3次芽诱导培养基中培养的扩大群体内的

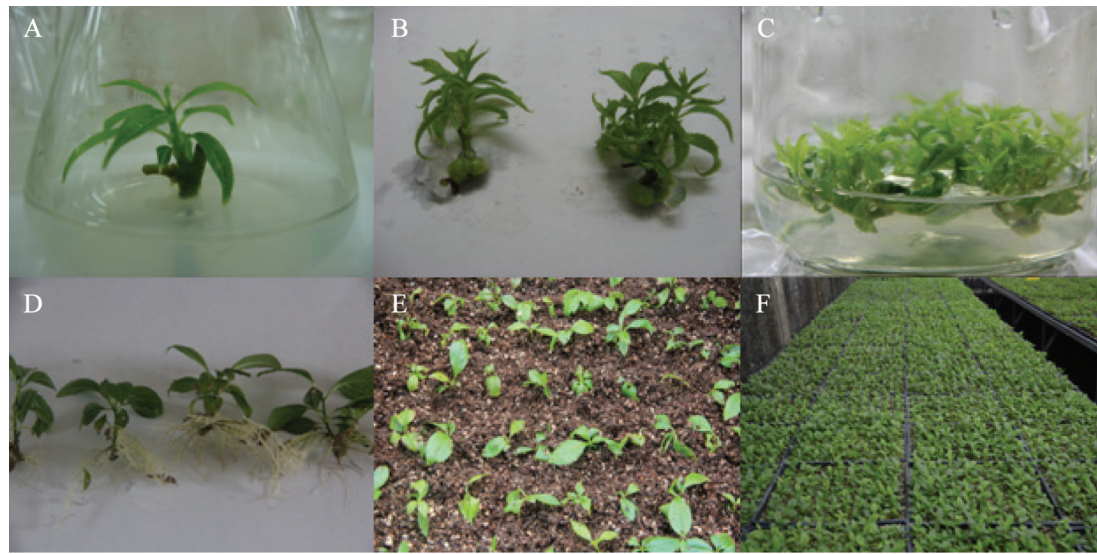


图1 北美冬青‘奥斯特’的组织培养及快速繁殖

Fig.1 Tissue culture and rapid propagation of *I. verticillata* ‘Oosterwijk’

A: 外植体萌芽; B: 芽基部形成绿色致密愈伤组织的外植体萌芽; C: 继代培养基上培养15 d形成的丛生芽; D: 根系发达的生根苗; E: 移栽至苗床的生根苗; F: 炼苗40 d的成活苗。

长势及叶片数量基本一致的茎段接种到继代培养基中。

由表1可知, 接种在WPM+6-BA $1.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + $0.10 \text{ NAA mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上增殖系数最大, 为6.1, 但在此培养基配方下, 继代培养时发现组培苗有玻璃化现象。将6-BA浓度降到 $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时玻璃化现象消失, 增殖率仍为6.1。根据试验结果得到最佳的增殖培养基配方为: WPM+6-BA

$1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 增殖系数为6.1, 芽苗健壮、叶色浓绿(图1-C)。

3 不同植物生长物质对比对北美冬青根诱导的影响

将无根壮苗转入生根培养基中进行生根诱导。统计不同浓度的IBA和NAA处理对试管苗生根的影响。从表2可以看出, 不同浓度的IBA和NAA组合对根诱导效果都明显高于不添加任何生长物质的对照处理; 添加IBA对根的诱导有促进作

表1 不同继代培养基对北美冬青增殖的影响

Table 1 Effects of different subculture mediums on the multiplication of *I. verticillata*

处理	培养基	6-BA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	NAA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	蔗糖含量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖 系数	生长状况
1	B ₅ (1)	0.50 (1)	0.05 (1)	20 (1)	2.3 ^e	新梢有死亡, 新叶黄绿
2	B ₅ (1)	1.00 (2)	0.10 (2)	30 (2)	2.6 ^{cde}	新梢有死亡, 新叶黄绿
3	B ₅ (1)	1.50 (3)	0.20 (3)	40 (3)	3.1 ^{cd}	新梢死亡严重, 新叶黄绿, 丛生芽较多
4	1/2MS (2)	0.50 (1)	0.10 (2)	40 (3)	2.9 ^{cde}	新叶黄绿
5	1/2MS (2)	1.00 (2)	0.20 (3)	20 (1)	3.3 ^{bc}	叶绿
6	1/2MS (2)	1.50 (3)	0.05 (1)	30 (2)	3.3 ^{bc}	健壮, 叶绿
7	WPM (3)	0.50 (1)	0.20 (3)	30 (2)	2.5 ^{de}	健壮, 叶浓绿
8	WPM (3)	1.00 (2)	0.05 (1)	40 (3)	4.0 ^b	健壮, 叶浓绿, 丛生芽整齐
9	WPM (3)	1.50 (3)	0.10 (2)	20 (1)	6.1 ^a	叶黄绿, 丛生芽多, 短小, 偶见玻璃化
T ₁	2.68	2.57	3.20	3.89		
T ₂	3.20	3.32	3.88	2.82		
T ₃	4.19	4.18	2.99	3.36		
R	1.51	1.61	0.89	1.07		

同列数据旁不同小写字母表示 $\alpha=0.05$ 水平下差异显著, 表2同。T₁、T₂、T₃为各因素3个水平(括号内数字)的均值; R为极差。

表2 不同浓度IBA和NAA对北美冬青根诱导的影响

Table 2 Effect of different concentration of IBA and NAA on the rooting of *I. verticillata*

处理	IBA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	平均生根率/%	平均生根数/条
1	0.20	0.40	95.2 ^a	5.7 ^a
2	0.20	0.30	93.2 ^{ab}	5.4 ^{ab}
3	0.20	0.20	91.9 ^{bc}	5.4 ^{ab}
4	0.10	0.40	91.3 ^{bcd}	5.5 ^{ab}
5	0.10	0.30	88.6 ^{de}	4.9 ^{cd}
6	0.10	0.20	82.6 ^f	4.6 ^d
7	0	0.40	90.2 ^{cde}	5.1 ^{bc}
8	0	0.30	88.3 ^e	4.9 ^{cd}
9	0	0.20	78.5 ^g	4.7 ^{cd}
对照	0	0	62.6 ^h	4.5 ^d

接种30 d后统计生根率及生根数。

用, 浓度增大, 促进效果越大, 生根率和平均生根条数都有提高。综合来看, IBA 0.20 mg·L⁻¹+NAA 0.40 mg·L⁻¹为最佳生长物质组合, 平均生根率95.2%, 平均生根5.7条(图1-D)。

4 炼苗与移栽

生根培养30 d后, 打开瓶口, 使生根苗逐渐与外界接触, 以提高其适应能力。保持较高的空气湿度, 气温高时注意遮阴, 炼苗10 d。取苗前24~36 h, 培养瓶注入干净的自来水, 以不淹没小苗为标准。取苗时, 将注水软化的培养基直接倾倒至塑料盆中, 拾取小苗, 洗净根部的培养基, 用1%的高锰酸钾溶液浸泡小苗5~10 min, 然后移入泥炭:珍珠岩=1:1 (V/V)的基质中(图1-E), 置于相对湿度80%~90%、温度30~35 °C的塑料拱棚培养, 移栽后的成活率达98%(图1-F)。

讨 论

本研究直接从优良雌性母株上取材, 诱导茎段腋芽并再生植株, 这种“以芽繁芽”的繁殖方式可保持母株的优良特性。陈芳等(2000)和刘英等(2003)分别在扁桃和西南桦组培研究中指出, 采用以芽繁芽途径, 避免了愈伤组织再生途径可能导致的遗传不稳定性, 更适于种苗工厂化快繁。

不同的培养基由于其组成成分的不同, 培养的效果也有差异。通常认为B₅培养基是高硝酸钾培养基, MS为富集元素平衡的高盐培养基, WPM培养基则属于中等无机盐的培养基, 于是不同的基本培养基组成对增殖的效果和苗的形态有较大的影响。在B₅为基本培养基的处理下, 芽苗均有不

同程度的茎尖死亡现象, 在1/2MS (大量元素减半)和WPM为基本培养基的处理下则无此现象, 这可能与B₅培养基中含有较高浓度的硝酸盐有关。在植物组织培养中, 内源激素与外源生长物质起着重要的调控作用, 影响繁殖速度的关键往往是多种激素综合及平衡作用的结果, 通过改变外源细胞分裂素或者生长素与细胞分裂素的比例, 能影响增殖系数。因此在北美冬青的继代增殖培养中设计了6-BA和NAA的组合配方, 结果表明, 北美冬青的增殖系数随6-BA浓度的升高而有所增高, 但浓度过高不利于芽苗的生长, 过高浓度的6-BA是导致芽苗玻璃化产生的重要因素。

继代培养第5代时, 已获得了一定数量的瓶苗, 第6代时, 我们尝试着诱导生根, 依据笔者的多年工作经验, 采用1/2WPM+IBA 0.10 mg·L⁻¹+NAA 0.30 mg·L⁻¹培养基配方诱导生根, 培养了约90 d, 未见根的出现; 转接继代第14次时, 在诱导培养上获得了80%以上的生根率, 继代20次后, 在不添加任何生长素的空白培养基上能获得60%以上的根诱导率。由此可推测, 北美冬青根的诱导与继代次数有一定的关系, 由于实验条件有限, 未做继代次数与生根诱导率相互变化的试验。

植物组织培养生根阶段, 通常采用大量元素减半的培养基, 同时减少蔗糖的用量, 可能的原因是降低培养基中营养成分的含量促进根原基的形成及发育。本试验采用大量元素减半的WPM作为基本培养基, 选择IBA和NAA两种植物生长素配比进行生根试验, 结果表明在IBA 0.20 mg·L⁻¹+NAA 0.40 mg·L⁻¹的处理下, 生根率最高, 为95.2%, 生根

条数也最多, 为5.7条, 同时有大量毛细根, 在炼苗移栽中发现, 这种根数多的苗更利于成活。

本研究以优良雌性单株半木质化的茎段为外植体, 获得了较高的增殖系数、生根率和移栽成活率, 筛选出了‘奥斯特’组培苗快繁过程中各个阶段所需的最佳培养基, 建立了一种稳定而高效的组织培养与快繁技术体系, 可为其工厂化快速育苗提供技术支持。

参考文献

陈芳, 马显达, 陆斌, 陈娟(2000). 扁桃茎尖组织培养的研究. 云南林

业科技, (2): 24~28

李登中(2004). 金叶日本冬青的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 40 (5): 592

李永欣, 王晓明, 陈明皋, 易霏琴, 聂启英(2007). 美洲冬青的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 43 (2): 315

刘英, 曾炳山, 裘珍飞, 谌红辉, 曾杰(2003). 西南桦以芽繁芽组培快繁研究. 林业科学研究, 16 (6): 715~719

王桂文, 周兴, 李海鹰, 范嘉晔(1997). 木本经济植物苦丁茶组培增殖研究. 广西农业大学学报, 16 (2): 115~119

徐本美, 史晓华, 孙运涛, 黎念林(2002). 大果冬青种子的休眠与萌发初探. 种子, (3): 1~3

余有祥, 周正宝, 徐旻昱, 徐绍远(2012). ‘奥斯特’北美冬青繁育技术. 中国花卉园艺, (14): 32~35