

文章编号:1001-7380(2018)02-0025-05

乌饭树组织培养苗瓶外生根技术研究

周 鹏,张 敏*,黄 婧,孙海楠

(江苏省林业科学研究院,江苏 南京 211153)

摘要:为了优化乌饭树组织培养苗的瓶外生根技术,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验和隶属函数评价法,研究植物生长调节剂的种类、质量浓度及其处理时间和基质类型对其瓶外生根的影响。结果表明:影响其瓶外生根效果的主次顺序为基质类型、植物生长调节剂的处理时间、质量浓度与种类。选用质量浓度为 500 mg/L 的 ABT1 号,处理时间为 5 s,基质用珍珠岩时,其瓶外生根效果最佳,生根率达 100.0%,每株平均根数 19.0 条,最长根长 4.42 m,株高达 3.24 cm,每株鲜质量为 0.272 g。

关键词:乌饭树;瓶外生根;优化;隶属函数;组织培养;植物生长调节剂

中图分类号:Q943.1;S793.9

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2018.02.007

Studies on ex vitro rooting of microshoots of *Vaccinium bracteatum*

ZHOU Peng, ZHANG Min*, HUANG Jing, SUN Hai-nan

(Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China)

Abstract: In order to explore the factors affecting the ex vitro rooting of micro-shoots of *Vaccinium bracteatum*, simplify the rooting method, and reduce the production cost, we studied the effect of plant growth regulator type, concentration, processing time, cutting substrate on the ex vitro rooting by using $L_9(3^4)$ orthogonal test design and subordinate function method. We found that the cutting substrate was a dominant factor on rooting of cutting followed by processing time and concentration while regulator type had the least impact on rooting. The preferable technical demands of the ex vitro rooting were that the micro-shoots were pretreated with 500 mg/L ABT1 for 5 s, then planted in perlite substrate, which could reach 100.0% rooting rate, 19.0 average root number per plantlet, 4.42 cm longest root length, 3.24 cm height and 0.272 g fresh weight per plantlet.

Key words: *Vaccinium bracteatum*; Ex vitro rooting; Optimization; Subordinate function; Tissue culture; Plant growth regulator

乌饭树(*Vaccinium bracteatum*)为杜鹃花科(Ericaceae)越桔属常绿灌木,分布于长江以南各省,适应性强,富含黄酮类、氨基酸和矿质元素等成分,具有重要的食用和药用价值,是一种极具开发利用潜力的树种^[1-2]。国内外学者已在乌饭树种质资源收集和优良品种选育方面开展了大量研究工作,而扦插和组织培养是良种繁育最主要的方式。课题组

前期研究发现,乌饭树扦插繁殖生根难,成苗率低于 50%^[3-4],无法在短期内获得大量无性系苗木。因此,组织培养已成为乌饭树良种快繁的重要手段,其中,试管苗生根是组织培养快繁的必经过程^[5]。目前,乌饭树试管苗生根仍采用瓶内生根^[6],存在生产成本高、育苗周期长、移栽成活率低等问题。因此,如何提高组织培养苗生根移栽效率

收稿日期:2017-12-14;修回日期:2018-02-28

基金项目:江苏省林业三新工程项目“乌饭树工厂化育苗技术研发与示范”(LYSX[2016]38);江苏省林业科学研究院青年科技基金项目“LED 光质对乌饭树组培苗生长及叶片黄酮积累的调控研究”(JAF-2016-04);江苏省林业科学研究院青年科技基金项目“基于 SNP 标记技术的乌饭树群体遗传多样性研究”(JAF-2016-07)

作者简介:周 鹏(1989-),男,汉,江苏东台人,研究实习生,硕士。主要从事树木资源学和树木生理生化研究。

* **通信作者:**张 敏(1980-),女,内蒙古人,副研究员,博士。主要从事生物技术与林木花卉良种繁育工作。

成为乌饭树规模化繁育的重要研究方向。

瓶外生根技术是瓶内快速繁殖与试管外扦插技术相结合的繁殖方法,继代增殖苗经过处理后,在有菌和自养环境中进行移栽生根,有效地将试管苗生根和驯化结合起来,既降低了生产成本,又缩短育苗周期,提高了生产效率^[5, 7, 8]。高方可等^[9]研究发现,黑果腺肋花楸在瓶内生根和移栽共需 40 d,而瓶外生根可缩短 15—20 d。王蓉等^[8]研究表明,葡萄瓶外生根的根系质量优于瓶内,移栽驯化时间较瓶内缩短了 20 d,移栽成活率可提高 34%。Debergh 等^[10]研究认为,组织培养苗瓶外生根可降低试管苗生产成本 35%—75%。本研究探讨了植物生长调节剂和扦插基质对乌饭树试管苗瓶外生根的影响,优化乌饭树试管苗瓶外生根技术,以降低组织培养成本,简化操作程序,为实现乌饭树工厂化育苗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为江苏省林业科学研究选育的乌饭树良种“苏林南烛 1 号”组织培养苗。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 设计 $L_9(3^4)$ 正交表,考察植物生长调节剂的种类、质量浓度、处理时间及基质 4 个因素对瓶外生根的影响,每因素 3 个水平,不考虑交互作用(见表 1)。随机以 50 根插穗为 1 个处理,共有 9 组处理组合,重复 3 次。

表 1 正交设计试验因素与水平			
因素	水平		
	1	2	3
A	NAA	IBA	ABT 1 号生根粉
B/(mg/L)	200	500	1 000
C	5 s	1 min	1 h
D	泥炭	蛭石	珍珠岩
A:植物生长调节剂种类;B:质量浓度;C:处理时间;D:基质			

1.2.2 瓶外生根 将苗从瓶内取出,选择生长健壮、长势一致的苗作为瓶外生根的插穗供体,用剪刀剪去芽苗根部膨大部分,清水清洗掉培养基,剪成长度为 3 cm 带 1 个叶片的茎段。

根据试验方案,将处理的插穗分别进行植物生长调节剂处理。随后,用镊子捏住插穗基部,插入基质,深度为 1.5—2 cm。插后用薄膜覆盖保湿,膜

内湿度保持在 80% 左右。置于温度 25 ℃,光照 2 000—2 500 lx,光周期 16 h 的环境条件下培养,处理 30 d 后调查幼苗的生根生长情况。

1.3 数据处理

统计各处理的生根率、生根数和最长根长,数据采用 SPSS 统计软件进行方差和极差分析。方差分析前对生根率进行反正弦转换,多重比较采用 Duncan 法。同时,通过隶属函数法对生根效果进行综合评价。

隶属函数值计算公式^[11]: $R(X_i) = (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$, $i = 1, 2, 3, \dots, n$

式中, X_i 为指标测定值; X_{\min} 和 X_{\max} 分别为不同处理中某一指标的最小值和最大值。将测定值 X_i 利用公式换算成相应的隶属函数值 $R(X_i)$,并加和计算不同处理各指标综合隶属函数值。

2 结果与分析

2.1 不同处理因素对组织培养苗生根率的影响

表 3 方差分析结果表明,不同处理因素对组织培养苗生根率的影响不同,各处理因素 F 比值由大到小顺序为基质、处理时间、调节剂质量浓度及种类。基质、处理时间、质量浓度显著影响生根率($P < 0.05$),而生长调节剂种类对生根率影响差异不显著($P > 0.05$)。

由表 4 可以看出,不同质量浓度生长调节剂处理,500 mg/L 处理的生根率最高,显著高于 200 mg/L 处理和 1 000 mg/L 处理($P < 0.05$);处理时间为 5 s 时生根率显著高于其他处理($P < 0.05$);不同基质中,珍珠岩和泥炭生根率较大,分别比蛭石提高了 19.8% 和 24.9%,且达到显著差异($P < 0.05$),而珍珠岩和泥炭之间的生根率差异不显著($P > 0.05$)。

表 2 正交设计 $L_9(3^4)$ 试验结果									
处理	因素				生根率/ %	生根数/ 条	最长 根长/ cm	株高/ cm	单株 鲜质量/ g
	A	B	C	D					
1	1	1	1	1	88.3	16.9	4.07	3.05	0.225
2	1	2	2	2	80.0	12.8	2.33	1.94	0.222
3	1	3	3	3	74.2	12.4	2.80	2.27	0.217
4	2	1	2	3	90.7	11.4	5.97	3.05	0.148
5	2	2	3	1	79.5	16.9	3.90	2.87	0.144
6	2	3	1	2	80.6	13.3	3.48	2.15	0.184
7	3	1	3	2	51.7	4.3	4.55	2.24	0.133
8	3	2	1	3	100.0	19.0	4.42	3.24	0.272
9	3	3	2	1	86.3	15.6	3.96	2.88	0.225

2.2 不同处理因素对生根数的影响

在生根数方面,表 3 方差分析结果表明,各处理因素 F 比值由大到小顺序为生长调节剂的质量浓度、处理时间、基质及生长调节剂种类。生长调节剂的种类对幼苗生根数影响不显著($P>0.05$),其他因素对生根数的影响均达到显著水平($P<0.05$)。

多重比较结果(见表 4)表明,不同质量浓度生长调节剂处理,500 mg/L 处理的生根数最大,显著高于 200 mg/L 处理($P<0.05$),而与 1 000 mg/L 之间差异不显著($P>0.05$);5 s 和 1 min 处理水平生根数较大,与 1 h 处理的差异达显著水平($P<0.05$);不同基质中,蛭石处理生根数最小,显著低于泥炭和珍珠岩($P<0.05$)。

表 3 正交试验方差分析

	变异来源 (DF)	平方和 (SS)	自由度 (f)	均方 (MS)	均方比 (F)	Sig.
生根率	生长调节剂	84.547	2	42.274	0.652	0.534
	质量浓度	1 665.883	2	832.942	12.847	0.000
	时间	2 284.721	2	1 142.360	17.619	0.000
	基质	2 771.546	2	1 385.773	21.373	0.000
	误差	1 037.395	16	64.837		
生根数	生长调节剂	5.872	2	2.936	0.310	0.738
	质量浓度	136.525	2	68.262	7.201	0.006
	时间	121.867	2	60.934	6.428	0.009
	基质	102.665	2	51.332	5.415	0.016
	误差	151.673	16	9.480		
最长根长	生长调节剂	10.437	2	5.219	15.698	0.000
	质量浓度	2.643	2	1.322	3.976	0.040
	时间	0.541	2	0.270	0.813	0.461
	基质	4.077	2	2.038	6.132	0.011
	误差	6.031	16	0.377		
株高	生长调节剂	0.660	2	0.330	7.483	0.005
	质量浓度	0.039	2	0.020	0.444	0.649
	时间	0.570	2	0.285	6.466	0.009
	基质	1.846	2	0.923	20.934	0.000
	误差	0.705	16	0.044		
单株鲜质量	生长调节剂	0.020	2	0.010	6.355	0.009
	质量浓度	0.014	2	0.007	4.361	0.031
	时间	0.018	2	0.009	5.545	0.015
	基质	0.010	2	0.005	3.157	0.070
	误差	0.025	16	0.002		

2.3 不同处理因素对根长的影响

在根长方面,表 3 结果表明,各处理因素 F 比值由大到小顺序生长调节剂种类、基质、质量浓度、处理时间。其中,生长调节剂种类、基质、质量浓度对根长影响显著($P<0.05$)。

由表 4 可知,IBA 和 ABT 处理根长显著高于 NAA($P<0.05$),但 2 者间差异不显著($P>0.05$);不同质量浓度生长调节剂处理,200 mg/L 处理根长最大,显著高于其他 2 个水平($P<0.05$);不同基质中,珍珠岩处理根长最大,分别比泥炭和蛭石提高了 10.6% 和 27.3%。

表 4 不同因素处理下生根性状及多重比较

因素	水平	生根率/ %	生根数/ 条	最长根长/ cm	株高/ cm	单株鲜 质量/ g
生长 调节剂 种类	A1	80.9 a	14.0 a	3.069 b	2.42 b	0.222 a
	A2	83.6 a	13.8 a	4.452 a	2.69 a	0.159 b
	A3	79.3 a	13.0 a	4.312 a	2.79 a	0.210 a
生长 调节剂 质量 浓度	B1	76.9 b	10.9 b	4.867 a	2.78 a	0.169 b
	B2	86.5 a	16.2 a	3.550 b	2.69 a	0.212 a
	B3	80.4 b	13.8 a b	3.417 b	2.44 a	0.209 a
处理 时间	C1	89.7 a	16.4 a	3.992 a	2.81 a	0.227 a
	C2	74.1 b	15.0 a	4.286 a	2.67 a	0.168 b
	C3	80.0 b	9.5 b	3.556 a	2.41 b	0.195 ab
基质	D1	84.7 a	16.3 a	3.979 a b	2.93 a	0.198 a
	D2	70.7 b	10.1 b	3.456 b	2.11 b	0.180 a
	D3	88.3 a	14.3 a	4.399 a	2.85 a	0.213 a

同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著

2.4 不同处理因素对株高的影响

在株高方面,各处理因素 F 比值由大到小顺序为基质、生长调节剂种类、处理时间、质量浓度。除生长调节剂质量浓度,其他 3 个因素对株高影响均达到显著水平($P<0.05$)(见表 3)。

经多重分析(见表 4)可知,ABT 处理根长值最大,且显著高于 NAA 处理($P<0.05$),但与 IBA 处理差异不显著;不同生长调节剂处理时间,5 s 和 1 min 处理幼苗株高较大,显著高于 1 h 处理($P<0.05$);不同基质中,泥炭处理株高最大,显著高于蛭石($P<0.05$),但与珍珠岩之间差异不显著($P>0.05$)。

2.5 不同处理因素对植株鲜质量的影响

在鲜质量方面,由表 3 可知,各处理因素 F 比值由大到小顺序为生长调节剂种类、处理时间、质

量浓度、基质。生长调节剂种类、处理时间和质量浓度均显著影响植株质量($P<0.05$),基质对植株鲜质量影响不显著($P>0.05$)。

不同生长调节剂处理,NAA 和 ABT 处理后幼苗鲜质量较大,显著高于 IBA ($P<0.05$);不同质量浓度处理中,200 mg/L 处理的鲜质量最小,显著低于其他 2 个水平($P<0.05$);激素处理为 5 s 时,幼苗鲜质量最大,显著高于 1 min 处理,但与 1 h 处理差异不显著($P>0.05$)。

表 5 不同处理隶属函数值						
处理	生根率	生根数	最长根长	株高	单株鲜质量	综合隶属函数值
1	0.759	0.853	0.478	0.852	0.663	3.605
2	0.587	0.580	0.000	0.000	0.641	1.808
3	0.466	0.550	0.130	0.251	0.607	2.004
4	0.807	0.479	1.000	0.852	0.109	3.247
5	0.576	0.853	0.431	0.715	0.075	2.65
6	0.599	0.608	0.317	0.163	0.369	2.056
7	0.000	0.000	0.610	0.229	0.000	0.839
8	1.000	1.000	0.573	1.000	1.000	4.573
9	0.716	0.765	0.448	0.722	0.663	3.314

2.6 生根效果的综合评价

由表 5 可以看出,各处理综合隶属函数值排序为处理 8>处理 1>处理 9>处理 4>处理 5>处理 6>处理 3>处理 2>处理 7。由此可知,处理 8 的综合效果最好。依据每个处理的平均值 P 进行极差分析(见表 6),极差 R 值大小为基质类型(1.710)>处理时间(1.580)>调节剂质量浓度(0.550)>调节剂种类(0.445),说明基质类型对乌饭树瓶外生根效果影响最大,调节剂处理时间次之,第 3 是质量浓度,调节剂种类影响最小。较佳方案是 A3B2C1D3,即处理 8,调节剂种类为 ABT1 号,质量浓度为 500 mg/L,处理时间为 5 s,基质为珍珠岩,此时乌饭树生根率为 100.0%,生根数 19.0,最长根长 4.42 cm,株高 3.24 cm,鲜质量 0.272 g(见表 2)。

3 结论与讨论

通过瓶外生根技术,乌饭树组织培养茎段的生根率可达 100%,远超过嫩枝扦插^[3-4],其关键原因是瓶外生根使用的插穗供体为经过组织培养返幼复壮的丛芽,具有更强发根能力^[12]。植物生长调节剂有利于根原基的诱导及养分的调配,从而促进不

表 6 综合隶属函数值极差分析				
因素	A	B	C	D
K_{j1}	7.400	7.690	10.235	9.570
K_{j2}	7.955	9.030	8.370	4.700
K_{j3}	8.725	7.375	5.495	9.825
k_{j1}	2.465	2.565	3.410	3.190
k_{j2}	2.650	3.010	2.790	1.565
k_{j3}	2.910	2.460	1.830	3.275
R_j	0.445	0.550	1.580	1.710
优方案	A3	B2	C1	D3
K_j 为同一因素不同水平 P 值之和。 k_j 为同一因素不同水平 P 值的平均值, R_j 为极差				

定根形成^[13]。本试验中发现,所用的 3 种植物生长调节剂处理之间对生根率、根数的影响差异均不显著,这与紫斑牡丹^[14]的研究结果类似,但与欧洲云杉^[13]、崖柏^[15]、永福石栎^[16]研究得到的结果不一致,这说明不同生长调节剂对不同植物或同一植物不同类型插穗生根的影响不同。插穗的生根除与生长调节剂种类有关,还受生长调节剂质量浓度和处理时间的影响。在一定范围内,生长调节剂质量浓度越高,处理时间越长,生根效果越好,但生长调节剂质量浓度过高和处理时间过长则抑制生根^[17]。本研究发现,短时间生长调节剂处理最利于组织培养苗瓶外生根,随着处理时间增加生根效果显著下降,且最佳生长调节剂质量浓度和处理时间均低于乌饭树嫩枝扦插试验结果^[3],这可能是由于组织培养苗继代过多,体内生长调节剂积累^[18-19],从而导致组织培养苗生根较嫩枝对生长调节剂更为敏感。

扦插基质的选择不仅取决于植物的生物学特性,还必须满足生根期间切口呼吸作用对氧气、水分及养分供给的需求^[20]。生根率方差分析(见表 3)结果表明,基质类型对组织培养苗诱导不定根起主导作用。蛭石通透性较泥炭和珍珠岩差,本试验中发现,在蛭石处理生根率及生根数均显著低于泥炭和珍珠岩,说明乌饭树瓶外生根对基质通透性要求较高。珍珠岩保水、通气性好,有利于乌饭树组织培养苗生根及发育,但 pH 较高,且其养分少^[21],在促进植株生长方面,与其他基质差异不显著(见表 4)。与乌饭树嫩枝扦插基质试验结果^[4]不相同,泥炭对组织培养苗生根和根系生长的影响与珍珠岩差异均不显著,这可能是由于泥炭虽具有较好的保温、保肥效果,且偏酸性,但容易引起幼嫩组织培

养苗及根系霉烂^[22]。因此,从大规模生产的角度分析,珍珠岩廉价易得^[4],更适合作为乌饭树规模化生产的材料。

综上,综合考虑生根效果(见表6),乌饭树组织培养苗瓶外生根最佳方案是 A3B2C1D3,即生长调节剂种类为 ABT 1 号,质量浓度为 500 mg/L,处理时间为 5 s,基质为珍珠岩。生根是一个复杂的生理生化过程,今后应继续探讨温度、湿度和光照等对瓶外生根的影响,寻求更佳的外界环境条件;并以此为基础,加强生根机理研究,为乌饭树扩繁提供技术支持。

参考文献:

- [1] WANG L, ZHANG Y, XU M, et al. Anti-diabetic activity of *Vaccinium bracteatum* Thunb. leaves' polysaccharide in STZ-induced diabetic mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 61:317-321.
- [2] LEE S, JUNG E S, DO S G, et al. Correlation between species-specific metabolite profiles and bioactivities of blueberries (*Vaccinium* spp.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(9):2126-2133.
- [3] 陈庆生, 周 鹏, 张 敏, 等. 激素和插穗处理对乌饭树扦插生根的影响[J]. 东北林业大学学报, 2016(4):41-43.
- [4] 周 鹏, 陈庆生, 张 敏, 等. 不同基质对乌饭树嫩枝扦插的影响[J]. 江苏林业科技, 2016, 43(2):17-19.
- [5] 黄卓忠, 严华兵, 苏国秀. 罗汉果试管苗瓶外生根研究[J]. 西南农业学报, 2007, 20(4):864-866.
- [6] 谢远程. 乌饭树(*Vaccinium bracteatum*)生态学特性及其无性繁殖技术研究[D]. 南京:南京林业大学, 2005.
- [7] 王 蓉, 顾建新, 何 梅. 葡萄组培苗瓶外生根技术研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(11):75-75.
- [8] 施 琼, 胡 峰, 黄烈健. 马大杂种相思瓶内和瓶外生根技术研究[J]. 植物研究, 2015, 35(6):891-897.
- [9] 高方可, 李建勋, 吴荣哲. 黑果腺肋花楸组培苗瓶外生根技术研究[J]. 延边大学农学学报, 2015, 37(3):208-211.
- [10] DEBERGH P C, MAENE L J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture[J]. Scientia Horticulturae, 1981, 14(4):335-345.
- [11] 杨璧嘉, 吴玉兰, 保智娟, 等. 粗齿铁线莲扦插繁殖条件初探[J]. 湖北农业科学, 2014(7):1579-1582.
- [12] 张世红, 李坤霞, 朱淑新, 等. 毛白杨成熟效应与组培幼化[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(4):83-86.
- [13] 胡勤鸿, 欧阳芳群, 贾子瑞, 等. 欧洲云杉扦插生根影响因子研究与生根力优良单株选择[J]. 林业科学, 2014, 50(2):42-49.
- [14] 刘文兰, 唐 红, 张 亮, 等. 甘肃紫斑牡丹茎扦插繁殖技术初探[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(11):19-22.
- [15] 金江群, 郭泉水, 朱 莉, 等. 中国特有濒危植物崖柏扦插繁殖研究[J]. 林业科学研究, 2013, 26(1):94-100.
- [16] 陈惠敏. 珍稀濒危树种永福石栎的扦插研究[J]. 种子, 2014, 33(2):118-120.
- [17] 孙敬爽, 郑红娟, 贾桂霞, 等. 不同基质、生长调节剂、插穗规格和代谢调节剂对‘蓝星’扦插生根的影响[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(1):67-73.
- [18] 师校欣, 杜国强, 王 晨, 等. 苹果离体新梢外植体继代培养次数对其再生的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(3):561-564.
- [19] 侯竞薇, 郭素娟, 王桂云. 继代培养对燕山红栗组培微枝不定根生根生理的影响(英文)[J]. Journal of Forestry Research, 2010, 21(2):155-160.
- [20] 王小敏, 彭大庆, 吴文龙, 等. 扦插基质和生根剂处理对滨梅嫩枝扦插生根的影响[J]. 西北林学院学报, 2014, 29(4):114-118.
- [21] 刘肖肖, 董元华, 刘同电, 等. 不同基质和生根剂对彩桂扦插繁殖的影响[J]. 中国农学通报, 2013, 29(31):58-63.
- [22] 王小敏, 彭大庆, 吴文龙, 等. 扦插基质和生根剂处理对滨梅嫩枝扦插生根的影响[J]. 西北林学院学报, 2014, 29(4):114-118.