

# 黑莓品种‘Chester’离体培养过程中适宜激素种类和浓度以及光照度的筛选

李海燕, 王小敏, 李维林<sup>①</sup>, 吴文龙

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

**摘要:** 以黑莓(*Rubus* spp.)品种‘Chester’带腋芽茎段为外植体,对初代培养基、不定芽增殖培养基和生根培养基中适宜的激素种类及浓度进行了筛选,并对增殖培养过程中适宜的光照度进行了研究。结果显示,在初代培养基中添加不同质量浓度的6-BA和NAA对侧芽的萌发和生长有明显的影响,其中,NAA不利于芽的萌发和生长,而添加适量的6-BA可促进芽的萌发和生长;适宜于‘Chester’茎段的初代培养基为添加了1.00 mg·L<sup>-1</sup>6-BA的MS培养基(含25 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和5.9 g·L<sup>-1</sup>琼脂,pH 5.8)。单因素实验结果显示,在‘Chester’不定芽的增殖过程中,细胞分裂素主要影响不定芽增殖,而生长素主要影响不定芽生长,以质量浓度低于1.0 mg·L<sup>-1</sup>的6-BA以及质量浓度低于0.3 mg·L<sup>-1</sup>的NAA较为适宜;经过进一步的组合筛选,确定适宜于‘Chester’不定芽增殖的培养基为添加了0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA和0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA的MS培养基(含25 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和5.9 g·L<sup>-1</sup>琼脂,pH 5.8)。在生根培养基中添加高浓度NAA易诱导不定芽基部产生愈伤组织,不利于不定芽生根,因而,‘Chester’不定芽适宜的生根培养基为添加了0.10 mg·L<sup>-1</sup>NAA的1/2MS培养基(含20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和5.9 g·L<sup>-1</sup>琼脂,pH 5.8)。在不定芽的增殖培养过程中,光照度较强有利于不定芽生长,适宜的增殖培养条件为:光照度3 000 lx、光照时间15 h·d<sup>-1</sup>、温度(25±2)℃、相对湿度约70%,此条件下不定芽的增殖系数(1.95)和平均芽长(1.44 cm)最高,芽生长状况良好。

**关键词:** 黑莓; 组织培养; 植物激素; 光照度

中图分类号: Q943.1; S663.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2010)02-0068-07

**Selection of suitable type and concentration of phytohormone, and suitable illumination intensity during *in vitro* culture of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Chester’** LI Hai-yan, WANG Xiao-min, LI Wei-lin<sup>①</sup>, WU Wen-long (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2010, 19(2): 68-74

**Abstract:** Suitable type and concentration of phytohormone in initial culture medium, proliferation and rooting culture media of adventitious bud were selected using the stem segment with an axillary bud of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Chester’ as explants, and also suitable illumination intensity during proliferation culture process was studied. The results show that in initial culture medium, different concentrations of 6-BA and NAA have significant influence on germination and growth of lateral bud, in which, NAA is unfavorable but 6-BA with an appropriate amount could promote germination and growth of bud. The initial culture medium suitable for ‘Chester’ stem segment is MS (containing 25 g·L<sup>-1</sup> sucrose and 5.9 g·L<sup>-1</sup> agar, pH 5.8) with 1.00 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA. The single factor experiment result reveals that cytokinin mainly affects on proliferation while auxin mainly affects on growth during proliferation process of adventitious bud, and the medium with 6-BA concentration below 1.0 mg·L<sup>-1</sup> and NAA concentration below 0.3 mg·L<sup>-1</sup> is more appropriate. Through a further combinative selection, it is determined that the medium suitable for proliferation of ‘Chester’ adventitious bud is MS (containing 25 g·L<sup>-1</sup> sucrose and 5.9 g·L<sup>-1</sup> agar, pH 5.8) with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The rooting medium with high concentrations of NAA may easily induce to form callus at

收稿日期: 2009-07-24

基金项目: 江苏省农业高科技项目(BG2007311); 江苏省科技基础设施建设计划项目(BM2008101)

作者简介: 李海燕(1984—),女,山西大同人,硕士研究生,主要从事植物栽培与生物技术研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: lwlcnb@mail.cnbg.net

adventitious bud base and be unfavorable for rooting, thus, the optimum medium for rooting of ‘Chester’ adventitious bud is 1/2MS (containing  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  sucrose and  $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  agar, pH 5.8) with  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA. The higher illumination intensity is beneficial to bud growth during proliferation process of adventitious bud, and suitable condition for proliferation culture is illumination intensity  $3\ 000 \text{ lx}$ , illumination time  $15 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , temperature  $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$  and relative humidity about 70%. Under such condition, the growth state of adventitious bud is better with the highest proliferation coefficient (1.95) and average bud length (1.44 cm).

**Key words:** blackberry (*Rubus* spp.); tissue culture; phytohormone; illumination intensity

黑莓(*Rubus* spp.)是多年生浆果类果树,果实营养丰富,富含糖、有机酸及多种维生素,过氧化物歧化酶(SOD)含量为水果之最,有抗衰老和提高人体免疫力等功效<sup>[1-3]</sup>。江苏省·中国科学院植物研究所于1986年开始黑莓的引种和利用研究<sup>[4-5]</sup>,已优选出数个黑莓品种并在中国南方丘陵山地推广种植,其中黑莓品种‘Chester’表现极佳,具有果实大、品质优、高产、耐旱和耐低温等优点,为当前的主栽品种<sup>[6-8]</sup>。

在黑莓生产过程中,多采用扦插和压条等传统繁殖手段,繁殖系数低且繁殖速度慢。采用组织培养技术可以在短期内获得大量生长均匀一致、品质优良的健壮苗木,因此,国内外有许多学者对黑莓不同品种的组织培养技术和条件进行了研究,并取得了一定的成果<sup>[9-13]</sup>,但黑莓品种‘Chester’的组织培养及相关研究尚未见报道。

作者在本课题组前期研究的基础上,以黑莓品种‘Chester’的茎段为外植体进行离体培养,并对培养条件及培养基中激素的配比进行了比较研究,建立了适宜于黑莓品种‘Chester’的再生体系,以期为黑莓优良品种苗木的大规模工厂化生产提供技术支持,并为进一步的研究提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为黑莓品种‘Chester’的带腋芽茎段,取自江苏省·中国科学院植物研究所苗圃。选择晴天下午,剪取1年生枝条,自来水冲洗后剪成长 $2 \sim 3 \text{ cm}$ 、带1个腋芽的茎段,在含少量洗衣粉的水溶液中浸泡5 min,然后用流水冲洗45 min后转入超净工作台,用体积分数75%乙醇浸泡45 s,无菌水冲洗3~4次,然后用质量体积分数0.1%的 $\text{HgCl}_2$ 溶液浸泡8 min,再用无菌水冲洗3~4次,用吸水纸吸干表面水分,修剪后即可用于接种。

### 1.2 方法

1.2.1 初代培养基中适宜激素浓度的筛选方法 以含 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的MS培养基(pH 5.8)为基本初代培养基,添加不同质量浓度的6-BA和NAA;其中,6-BA的质量浓度分别为0、0.50、1.00和 $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,NAA的质量浓度分别为0、0.10和 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,共10个激素组合。将经过消毒灭菌并修剪后的外植体接种到前述的10种初代培养基上,每处理接种10管,每管接种1~2个茎段,并设置3次重复。置于温度 $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 、光照时间 $15 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度 $3\ 000 \text{ lx}$ 、相对湿度约70%的条件下培养,15 d后统计萌芽率,并分别于接种后的第15天和第30天测量芽长,培养40 d后统计增殖系数。

1.2.2 不定芽增殖培养基中激素种类和添加量的单因素实验方法 增殖培养基为含 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的MS培养基(pH 5.8),其中分别添加单一的不同质量浓度的细胞分裂素(6-BA或KT)或生长素(NAA或IBA)。每种激素设定3个质量浓度,其中,6-BA和KT质量浓度分别设定为1.0、1.5和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,NAA和IBA质量浓度分别设定为0.3、0.5和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,共12种单一激素培养基。选择经过继代培养的健壮不定芽,从基部切下并分成单芽,接种到前述的12种添加单一激素的增殖培养基中,每处理接种5瓶,每瓶接种3个芽,各重复3次。于温度 $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 、光照时间 $15 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度 $3\ 000 \text{ lx}$ 、相对湿度约70%的条件下培养,接种35 d后观察芽的生长情况、测量芽长并统计增殖系数。

1.2.3 不定芽增殖培养过程中适宜光照度的筛选方法 选择经过继代培养的健壮不定芽,从基部切下并分成单芽,接种到含 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基(pH 5.8)中,置于温度 $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 、光照度分别为0、1 000、2 000、3 000和4 000 lx,光照时间 $15 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、相对湿度约70%的条件下培养。每处理接种5瓶,

每瓶接种 3 个芽,各重复 3 次。培养 30 d 后观察不定芽的生长情况、测量芽长并统计增殖系数。

1.2.4 不定芽增殖培养基中适宜激素组合的筛选方法 以含  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖和  $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂的 MS 培养基 (pH 5.8) 为基本增殖培养基,根据单因素实验结果分别添加不同质量浓度的 6-BA 和 NAA:  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,并以未添加任何激素的基本增殖培养基为对照,共 8 种增殖培养基。选择经过继代培养的健壮不定芽,从基部切下后分成单芽并接种到增殖培养基上,每处理接种 5 瓶,每瓶 3 个不定芽,各设置重复 3 次。于温度 ( $25 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ 、光照时间  $15 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度  $3000 \text{ lx}$ 、相对湿度约 70% 的条件下培养,35 d 后统计不定芽的生长和增殖情况。

1.2.5 不定芽生根培养基中适宜 NAA 浓度的筛选方法 基本生根培养基为含  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖和  $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂的 1/2MS 培养基 (pH 5.8),分别添加质量浓度为  $0.01$ 、 $0.05$ 、 $0.10$ 、 $0.50$  和  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,将经过继代培养且长势较好的芽从基部切下,分成单芽后接入生根培养基中,每处理接种 5 瓶,每瓶接种 3 个芽,各重复 3 次。于温度 ( $25 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ 、光照时间  $15 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度  $3000 \text{ lx}$ 、相对湿度约 70% 的条件下培养,30 d 后统计生根情况。

### 1.3 数据处理

萌芽率、增殖系数、平均芽长和生根率的计算公式分别为:萌芽率 = (萌发腋芽的外植体数/接种的外植体数)  $\times 100\%$ ;增殖系数 = 增殖芽总数/接种芽总数;平均芽长 = (分化芽总长/分化芽总数)  $\times 100\%$ ;生根率 = (生根芽数/接种芽总数)  $\times 100\%$ 。用 Excel 2007 软件对实验数据进行统计和差异显著性分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 黑莓品种‘Chester’茎段初代培养基中适宜激素浓度的筛选结果

黑莓品种‘Chester’带腋芽茎段接种到含不同质量浓度 6-BA 和 NAA 的初代培养基上,培养 3 d 后侧芽开始萌动,10 d 后开始展叶。

在初代培养基中添加不同质量浓度 6-BA 和 NAA 对黑莓品种‘Chester’茎段初代培养的影响见表 1。由表 1 可以看出,在未添加任何激素的初代培养基上,外植体侧芽萌动快,萌芽率较高 (96.00%),但增殖系数最低;培养至第 15 天和第 30 天时平均芽长均极显著高于其他培养基。

当培养基中 6-BA 质量浓度维持不变 ( $0.50$ 、 $1.00$  或  $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时,仅改变 NAA 的质量浓度,则随培养基中 NAA 质量浓度的提高,萌芽率显著下降;在未添加 NAA 的 4 组初代培养基上培养 15 和 30 d,黑莓品种‘Chester’带腋芽茎段的平均芽长均极显著高于添加了  $0.10$  或  $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的培养基。当培养基中 6-BA 的质量浓度均为  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,改变 NAA 的质量浓度,侧芽的增殖系数变化不显著;当培养基中 6-BA 的质量浓度均为  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,在未添加 NAA 的培养基上侧芽的增殖系数极显著高于添加了  $0.10$  或  $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的培养基;当培养基中 6-BA 的质量浓度为  $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,随培养基中 NAA 质量浓度的提高,侧芽的增殖系数极显著降低。此外,在培养过程中还观察到,在添加了  $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的 3 组培养基上萌发的芽形态异常且芽体细弱。

在未添加 NAA 的培养基中添加不同质量浓度的 6-BA,随 6-BA 质量浓度提高,‘Chester’带腋芽茎段的萌芽率和增殖系数均呈增加趋势,且增殖系数极显著增大;在 6-BA 质量浓度为  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基上培养 15 和 30 d,平均芽长均大于添加了  $0.50$  或  $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的培养基,与后者有极显著差异,培养至第 30 天时平均芽长最高可达到  $1.34 \text{ cm}$ 。在 NAA 添加量均为  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 3 组培养基中,在添加了  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的培养基上萌芽率和平均芽长均最高,显著高于添加了  $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的培养基;但在 6-BA 添加量为  $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基上增殖系数最高。在 NAA 添加量为  $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 3 组培养基中,均以添加了  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的培养基上的萌芽率和增殖系数最高,极显著高于添加  $0.50$  或  $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的培养基;且在 6-BA 添加量为  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基中培养 15 和 30 d,平均芽长最大。

综合分析结果显示,以黑莓品种‘Chester’带腋芽茎段为外植体进行侧芽的初代离体培养时,在初代培养基中添加 NAA 不利于腋芽的萌发和生长,仅需

添加适量的6-BA即可获得较好的培养效果。黑莓品种‘Chester’带腋芽茎段的适宜初代培养基为添加

了 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的MS培养基(含 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂,pH 5.8)。

表1 在6-BA和NAA质量浓度不同的初代培养基上黑莓品种‘Chester’茎段萌芽及增殖状况的比较<sup>1)</sup>

Table 1 Comparison of germination and proliferation status of stem segment of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Chester’ in initial culture medium with different concentrations of 6-BA and NAA<sup>1)</sup>

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration		萌芽率/% Germination rate	增殖系数 Proliferation coefficient	不同培养时间的平均芽长/cm Average bud length at different culture times	
6-BA	NAA			15 d	30 d
0.00	0.00	96.00aA	1.05eF	1.15aA	2.14aA
0.50	0.00	90.33aA	2.06dE	0.78cC	1.30bB
0.50	0.10	70.00bcB	2.28dDE	0.38fEF	0.81deDE
0.50	0.20	56.67dC	2.25dDE	0.47deDE	0.78deDE
1.00	0.00	93.33aA	3.17bB	0.93bB	1.34bB
1.00	0.10	76.67bB	2.17dE	0.53dD	0.84dD
1.00	0.20	73.33bcB	2.63cC	0.30gF	0.55gF
1.50	0.00	96.67aA	3.47aA	0.79cC	0.99cC
1.50	0.10	73.33bcB	2.52cCD	0.40efEF	0.73efDE
1.50	0.20	66.67cBC	1.13eF	0.43efDE	0.66fgEF

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写和大写字母分别表示在0.05和0.01水平上差异显著 Different small letters and capitals in same column indicate the significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

## 2.2 黑莓品种‘Chester’不定芽增殖培养基中适宜激素种类和添加量的筛选结果

2.2.1 细胞分裂素 在增殖培养基中添加不同质量浓度细胞分裂素(6-BA或KT)对黑莓品种‘Chester’不定芽增殖的影响见表2。由表2可以看出,在增殖培养基中添加不同的细胞分裂素主要对不定芽的增殖系数有一定的影响,其中,在添加了不同质量浓度6-BA的3组培养基上,不定芽的增殖系数均极显著高于添加了不同质量浓度KT的3组培养基( $P < 0.01$ ),表明6-BA对不定芽增殖的促进效果明显优于KT。在6-BA添加量为 $1.0$ 、 $1.5$ 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的3组培养基中,随6-BA质量浓度提高,不定芽增殖系数逐渐降低;在6-BA质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上不定芽的增殖系数最高,达到3.80,显著高于添加了6-BA的其他2组培养基( $P < 0.05$ ),说明高浓度的6-BA不利于芽的增殖;随6-BA质量浓度的提高,平均芽长逐渐减小,在6-BA添加量为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上平均芽长最大,达到1.79 cm,显著高于6-BA添加量为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基。

在KT添加量为 $1.0$ 、 $1.5$ 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的3组培养基上,黑莓品种‘Chester’不定芽的增殖系数差异不显著,平均芽长则有一定的差异,其中,在KT添加量为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上,不定芽的增殖系数最大,但平均芽长最小。总体上看,在添加了KT的培养

基中,不定芽的增殖系数显著低于添加了6-BA的培养基,且平均芽长的差异不明显。因此,在黑莓品种‘Chester’不定芽增殖培养基中添加质量浓度低于 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-BA较为适宜。

表2 不同质量浓度细胞分裂素对黑莓品种‘Chester’不定芽增殖系数和芽长的影响<sup>1)</sup>

Table 2 Effect of cytokinin with different concentrations on proliferation coefficient and length of adventitious bud of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Chester’<sup>1)</sup>

细胞分裂素 Cytokinin	增殖系数 Proliferation coefficient	平均芽长/cm Average length of bud
$1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA	3.80aA	1.79abAB
$1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA	3.30bA	1.66abcAB
$2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA	3.10bA	1.45cdAB
$1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT	1.50cB	1.87aA
$1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT	1.90cB	1.33dB
$2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT	1.65cB	1.57bcdAB

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写和大写字母分别表示在0.05和0.01水平上差异显著 Different small letters and capitals in same column indicate the significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.2.2 生长素 在增殖培养基中添加不同质量浓度生长素(NAA或IBA)对黑莓品种‘Chester’不定芽增殖的影响见表3。由表3可以看出,在增殖培养基中添加生长素主要对不定芽的芽长有一定的影响。在NAA添加量为 $0.3$ 、 $0.5$ 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的3组培养基中,随NAA质量浓度提高,芽的增殖系数和平均芽长



表 3 不同质量浓度生长素对黑莓品种‘Chester’不定芽增殖系数和芽长的影响<sup>1)</sup>

Table 3 Effect of auxin with different concentrations on proliferation coefficient and length of adventitious bud of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Chester’<sup>1)</sup>

生长素 Auxin	增殖系数 Proliferation coefficient	平均芽长/cm Average length of bud
0.3 mg · L <sup>-1</sup> NAA	1.88aA	2.63aA
0.5 mg · L <sup>-1</sup> NAA	1.63abAB	2.43aAB
1.0 mg · L <sup>-1</sup> NAA	1.45bcAB	1.41cD
0.3 mg · L <sup>-1</sup> IBA	1.25cB	2.06bBC
0.5 mg · L <sup>-1</sup> IBA	1.40bcAB	1.88bCD
1.0 mg · L <sup>-1</sup> IBA	1.30bcAB	1.86bCD

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写和大写字母分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著 Different small letters and capitals in same column indicate the significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

均逐渐减小;NAA 添加量为 0.3 mg · L<sup>-1</sup> 时,不定芽增殖系数最高,达到 1.88;在 NAA 添加量为 0.3 和 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 的培养基上不定芽的芽长显著大于 NAA 添加量为 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 的培养基,其中在 NAA 添加量为 0.3 mg · L<sup>-1</sup> 的培养基上不定芽的平均芽长最大,达到 2.63 cm,说明在增殖培养基中 NAA 添加量较高不利于不定芽的生长。在 IBA 添加量为 0.3、0.5 和 1.0

mg · L<sup>-1</sup> 的 3 组培养基中,平均芽长和增殖系数差异均不显著,且总体上小于添加了 NAA 的培养基。

综合分析后认为,在黑莓品种‘Chester’不定芽增殖培养基中添加质量浓度低于 0.3 mg · L<sup>-1</sup> 的 NAA 较为适宜。

### 2.3 黑莓品种‘Chester’不定芽增殖培养过程中适宜光照度的筛选结果

光照度对黑莓品种‘Chester’不定芽生长和增殖系数的影响见表 4。由表 4 可见,光照度为 3 000 lx 时,黑莓品种‘Chester’不定芽的平均芽长最长,达到 1.44 cm,极显著高于其他处理组;在此光照条件下,不定芽的增殖系数也最高,达到 1.95;此条件下不定芽的长势良好、粗壮,新生叶多、顶端叶大、叶色浓绿。而在黑暗条件(光照度为 0 lx)下培养,不定芽的增殖系数最低,平均芽长虽然也较高,但培养过程中出现明显的徒长现象,节间长且芽极细弱,新生叶少、顶端叶极小、叶色发黄。

综合分析后认为,较强的光照度有利于黑莓品种‘Chester’不定芽的增殖和生长,其中最佳的光照度为 3 000 lx。

表 4 光照度对黑莓品种‘Chester’不定芽增殖和生长的影响<sup>1)</sup>

Table 4 Effect of illumination intensity on proliferation and growth of adventitious bud of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Chester’<sup>1)</sup>

光照度/lx Illumination intensity	增殖系数 Proliferation coefficient	平均芽长/cm Average length of bud	长势 Growth state
0	1.55dD	1.28cB	节间伸长,苗细弱 Internode elongation, weak shoot
1 000	1.85abAB	1.06dC	叶黄绿色,苗细弱 Yellow-green leaf, weak shoot
2 000	1.65cdCD	1.07dC	叶绿色,苗长势一般 Green leaf, growth in general
3 000	1.95aA	1.44aA	叶深绿色,苗长势良好 Dark green leaf, strong shoot
4 000	1.75bcBC	1.32bB	叶深绿色,苗长势良好 Dark green leaf, strong shoot

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写和大写字母分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著 Different small letters and capitals in same column indicate the significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

### 2.4 黑莓品种‘Chester’不定芽增殖培养基中适宜激素组合的筛选结果

根据单因素实验结果,在增殖培养基中添加不同质量浓度 6-BA 和 NAA 组合,黑莓品种‘Chester’不定芽的增殖系数和平均芽长见表 5。由表 5 可见,在不添加任何激素的培养基中,黑莓品种‘Chester’不定芽的增殖系数最低(仅为 1.08),但平均芽长最大,而且在不定芽基部还可观察到有许多不定根产生;在添加 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 和 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA 的培养基中,不定芽的增殖系数最高,达到 3.74,但不定芽的平均芽长并非最大。若 6-BA 的添加量保持不变(0.3、

0.5 或 1.0 mg · L<sup>-1</sup>),则随 NAA 添加量的提高,不定芽的增殖系数极显著降低,表明排除 6-BA 的影响效应,在一定的质量浓度范围内,添加高质量浓度的 NAA 可抑制不定芽的增殖。在 NAA 添加量均为 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 的 3 组培养基中,随 6-BA 质量浓度的提高,不定芽的增殖系数极显著增加,说明排除 NAA 的影响效应,在一定的质量浓度范围内,添加高质量浓度的 6-BA 有利于不定芽的增殖。

综合分析结果显示,适宜于黑莓品种‘Chester’不定芽增殖的培养基为添加了 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 和 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA 的 MS 培养基(含 25 g · L<sup>-1</sup> 蔗糖和 5.9

g · L<sup>-1</sup>琼脂,pH 5.8)。

表5 不同质量浓度6-BA和NAA组合对黑莓品种‘Chester’不定芽增殖系数和芽长的影响<sup>1)</sup>

Table 5 Effect of 6-BA and NAA combination with different concentrations on proliferation coefficient and length of adventitious bud of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Chester’<sup>1)</sup>

质量浓度/mg · L <sup>-1</sup> Concentration		增殖系数 Proliferation coefficient	平均芽长/cm Average length of bud
6-BA	NAA		
0.0	0.0	1.08eE	1.61aA
0.3	0.1	2.78cC	1.13cC
0.3	0.2	2.07dD	1.08cCD
0.5	0.1	3.74aA	1.12cC
0.5	0.2	2.88cC	1.24bB
0.5	0.3	1.93dD	0.98dD
1.0	0.2	3.54aA	1.07cCD
1.0	0.3	3.20bB	1.08cCD

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写和大写字母分别表示在0.05和0.01水平上差异显著 Different small letters and capitals in same column indicate the significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

## 2.5 黑莓品种‘Chester’不定芽生根培养基中适宜NAA浓度的筛选结果

在生根培养基中添加不同质量浓度NAA对黑莓品种‘Chester’不定芽生根的影响见表6。由表6可以看出,当培养基中NAA的添加量为0.10 mg · L<sup>-1</sup>时,不定芽生根快,转接后第5天开始萌根且根较粗壮,芽生长健壮、基部仅有少量愈伤组织;当培养基中NAA的添加量为0.50或1.00 mg · L<sup>-1</sup>时,不定芽生根较慢,培养15 d后才开始萌根且气生根较多,苗弱小、基部愈伤化严重;而在NAA添加量较低(0.01或0.05 mg · L<sup>-1</sup>)的培养基中培养7 d,根开始萌动且根系粗壮,苗健壮、基部有极少量愈伤组织。从表6还可看出,若NAA添加量超过0.10 mg · L<sup>-1</sup>,不定芽的

表6 不同质量浓度NAA对黑莓品种‘Chester’不定芽生根的影响<sup>1)</sup>  
Table 6 Effects of NAA with different concentrations on rooting of adventitious bud of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Chester’<sup>1)</sup>

NAA 质量浓度/mg · L <sup>-1</sup> Concentration of NAA	生根率/% Rooting rate	平均根数 Average number of root	平均根长/cm Average length of root	平均株高/cm Average height of plantlet
0.01	80.00aA	2.91bB	1.90bAB	3.10bAB
0.05	60.00bB	4.68aA	1.56cB	3.47aA
0.10	80.00aA	4.42aA	2.30aA	2.95bB
0.50	40.00cC	4.16aA	0.92dC	2.24cC
1.00	46.67cC	2.71bB	0.56cC	1.99cC

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写和大写字母分别表示在0.05和0.01水平上差异显著 Different small letters and capitals in same column indicate the significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

生根率、根数、根长及株高均极显著降低,不利于芽生根和茁壮生长。以上结果说明,在生根培养基中添加适宜浓度的NAA对‘Chester’不定芽生根有促进作用。黑莓品种‘Chester’不定芽生根的适宜生根培养基为添加了0.10 mg · L<sup>-1</sup>NAA的1/2MS培养基(含20 g · L<sup>-1</sup>蔗糖和5.9 g · L<sup>-1</sup>琼脂,pH 5.8),在此培养基上生根数最多且根较为粗壮。

## 3 讨论和结论

在植物组织培养过程中,植物生长调节剂影响培养物的生长发育,并在组织培养过程中起着关键作用,激素的种类及其浓度对培养结果有重要影响<sup>[14]</sup>。蒋小满等<sup>[13]</sup>以黑莓品种‘Karvar’为实验材料,筛选出最佳初始培养基为添加1.00 mg · L<sup>-1</sup>6-BA和0.10 mg · L<sup>-1</sup>IAA的MS培养基,出芽率达93%;最佳继代增殖培养基为添加1.00 mg · L<sup>-1</sup>6-BA和0.05~0.20 mg · L<sup>-1</sup>NAA的MS培养基。胡建刚等<sup>[15]</sup>以引自美国的2个黑莓品种为实验材料,筛选出最佳继代培养基为添加0.3~0.5 mg · L<sup>-1</sup>6-BA和0.10 mg · L<sup>-1</sup>NAA的MS培养基或添加1.00 mg · L<sup>-1</sup>6-BA和0.01 mg · L<sup>-1</sup>NAA的MS培养基。孙廷等<sup>[16]</sup>以无刺树莓为材料,筛选出的最佳继代培养基为含0.5 mg · L<sup>-1</sup>6-BA和0.1 mg · L<sup>-1</sup>NAA的MS培养基。本实验在初代培养中选用了添加不同质量浓度6-BA和NAA的MS培养基,诱导黑莓品种‘Chester’带腋芽茎段的萌发,结果表明,在6-BA和NAA添加量不同的培养基上,腋芽的增殖系数和平均芽长差异显著;在初代培养基中只需添加一定量的6-BA即可满足腋芽萌发的需要,添加NAA则不利于腋芽的萌发和生长;但当6-BA添加量超过1.00 mg · L<sup>-1</sup>时,芽的形态异常且芽体较细弱,因此,以添加1.00 mg · L<sup>-1</sup>6-BA的MS培养基(含25 g · L<sup>-1</sup>蔗糖和5.9 g · L<sup>-1</sup>琼脂,pH 5.8)较为适宜,芽的萌发和生长情况最好,增殖系数达到3.17,萌芽率高于90.00%。根据单因素实验结果,在增殖培养中选用了6-BA和NAA添加量不同的8组增殖培养基对‘Chester’的不定芽进行增殖培养,结果显示,培养基中不同的激素配比对不定芽的增殖和生长有不同的影响,其中,在添加了0.5 mg · L<sup>-1</sup>6-BA和0.1 mg · L<sup>-1</sup>NAA的MS培养基(含25 g · L<sup>-1</sup>蔗糖和5.9 g · L<sup>-1</sup>琼脂,pH 5.8)中不定芽的增殖系数最高(3.74),平均芽长较长(1.12 cm),不定芽增殖

和生长的总体效果最好。

细胞分裂素主要影响芽的增殖,不同种类的细胞分裂素对芽增殖的促进效应不同。有关不同种类细胞分裂素对黑莓组培苗增殖影响的研究较多<sup>[17-20]</sup>,研究结果均表明,在促进芽增殖的过程中,6-BA 较 KT 更为有效。本实验中,不同质量浓度的 KT 对黑莓品种‘Chester’不定芽的增殖无明显的促进作用,增殖系数较小;而不同质量浓度的 6-BA 则可有效促进不定芽的增殖,增殖系数是 KT 的 2 倍。这一实验结果也印证了前人的研究结果。

在不定根形成过程中,生长素起着重要作用。在黑树莓的生根培养过程中,在添加较高浓度 NAA 的培养基中芽基部会生成较大的愈伤组织<sup>[10]</sup>。在本研究中,生根培养基中 NAA 添加量较低时‘Chester’不定芽极易生根且生根率较高,组培苗基部产生少量愈伤组织,其中,在添加  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的 1/2MS 培养基中生根效果最好,生根率达到 80.00%,平均根数达到 4.42 根;NAA 质量浓度过高时,组培苗基部产生大量愈伤组织且不易生根,生根率低,且生成的根维管束不能与茎维管束直接相连,不利于移栽成活。

在黑莓品种‘Chester’不定芽增殖培养过程中,若光照度较低(0 和  $1\ 000 \text{ lx}$ ),则芽的长势差,叶色发黄、新生叶少,甚至出现严重的徒长现象。较强的光照度可促进不定芽的增殖及茁壮生长,当光照度设定为  $3\ 000 \text{ lx}$  时,不定芽的整体长势最好,粗壮且叶色浓绿、新生叶多,有利于组培苗的生根培养。

综合上述实验结果,归纳出黑莓品种‘Chester’带腋芽茎段培养过程中各阶段的适宜培养基,其中,初代培养基为添加了  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的 MS 培养基(含  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖和  $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, pH 5.8),增殖培养基为添加了  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的 MS 培养基(含  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖和  $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, pH 5.8),生根培养基为添加了  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的 1/2MS 培养基(含  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖和  $5.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, pH 5.8)。根据实验结果,对不定芽增殖培养过程中的光照条件也进行了优化,筛选出适宜于黑莓品种‘Chester’不定芽增殖的培养条件为:光照度  $3\ 000 \text{ lx}$ 、光照时间  $15 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、温度  $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 、相对湿度约 70%。

#### 参考文献:

- [1] 曲泽洲, 孙云蔚. 果树种类论[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990: 365-368.
- [2] 张胜利. 树莓和黑莓[J]. 新疆林业, 2002(5): 40.
- [3] 吴文龙, 李维林, 闫连飞, 等. 不同品种黑莓鲜果营养成分的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(1): 58-61.
- [4] 吴文龙, 顾 姻. 新经济植物黑莓的引种[J]. 植物资源与环境, 1994, 3(3): 45-48.
- [5] 孙醉君, 顾 姻, 蔡剑华. 黑莓引种十年的回顾与展望[J]. 江苏林业科技, 1998, 25(3): 46-48, 54.
- [6] 李维林, 吴文龙, 闫连飞. 黑莓品种宝森在江苏南京的表现[J]. 中国果树, 2007(4): 19-21.
- [7] 李维林, 孙醉君, 吴文龙, 等. 江苏省黑莓区域性栽培试验[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(1): 38-42.
- [8] 吴文龙, 孙醉君, 蔡剑华. 黑莓的优良品种“赫尔”与“切斯特”及其栽培技术[J]. 中国果树, 1995(4): 16-18.
- [9] 王小敏, 吴文龙, 李海燕, 等. 黑莓外植体褐化影响因素分析及适宜培养条件筛选[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(3): 63-68.
- [10] 徐桂娟, 罗晓芳, 姚洪军. 黑树莓的组织培养与快速繁殖[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(1): 99-100.
- [11] 傅建敏, 高筱慧, 杨绍彬, 等. 美国黑莓快繁技术研究[J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 54-56.
- [12] 蒋桂华, 吴延军, 谢 鸣, 等. 树莓、黑莓组织培养及遗传转化研究进展[J]. 果树学报, 2006, 23(4): 593-598.
- [13] 蒋小满, 柏新富, 赵建萍. 黑莓的组织培养快速繁殖技术[J]. 北方园艺, 2007(10): 173-175.
- [14] 张红晓, 经剑颖. 木本植物组织培养技术研究进展[J]. 河南科技大学学报: 农学版, 2003, 23(3): 66-69.
- [15] 胡建刚, 黄巧兴, 沈秋云. 黑树莓的试管繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(5): 356.
- [16] 孙 廷, 胡如善, 杨玉珍, 等. 无刺树莓的离体培养和快速繁殖技术[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(3): 384-385.
- [17] 郎贤波. 丰满红树莓组培快繁及其生理生化特性的研究[D]. 延边: 延边大学, 2007: 15-16.
- [18] Pattnaik S K, Chand P K. Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. ilhou* Koiz. and *M. serrata* Roxb., through *in vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(7): 503-508.
- [19] Pattnaik S K, Sahoo Y, Chand P K. Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. syn. *M. acidosa* Griff. [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(11): 841-845.
- [20] Yadav U, Lal M, Jaiswal V S. Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees[J]. Scientia Horticulturae, 1990, 44(1/2): 61-67.