

## 木醋对越橘组织培养的影响

申健<sup>1,2</sup>, 杨国亭<sup>1\*</sup>, 刘德江<sup>2</sup>

(1.东北林业大学生态研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2.佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

**摘 要:** 为了满足越橘(*Vaccinium uliginosum* Linn.)适宜生长于酸性土壤的特殊需求, 解决越橘组培苗生长慢、不易生根、所用特效植物生长调节物质(如玉米素)价格昂贵等问题, 筛选越橘组织培养的适宜培养基配方, 在越橘组培苗生根及移栽培养基中添加木醋, 采用 Box-Behnken 设计探讨木醋对越橘组织培养的作用。结果表明: 木醋虽然对越橘叶片和茎段的愈伤组织形成有抑制作用, 但对茎段增殖具有促进作用, 培养基 WPM(woody plant medium) +0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L ZT 为越橘组织培养的适宜基本培养基; 木醋对越橘的茎段增殖效应显著, 木醋、玉米素和 6-BA 对越橘茎段增殖无交互作用; 试验中所选模型的显著性检验结果为极显著, 该模型与试验实际拟合良好, 可以解释 96.56% 响应值的变化; 培养基 1/2 WPM+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA+10 ml/L 木醋对越橘生根最有利, 比不添加木醋处理的生根率提高了 66%; 木醋能显著提高组培苗移栽的成活率, 木醋质量浓度为 20 mL/kg 时移栽成活率达 93.3%, 株高 8.1 cm, 且苗生长健壮, 颜色浓绿; 添加木醋可减少玉米素的使用量, 能够降低约 70% 的试剂成本, 可将木醋作为植物生长促进物质用于越橘的组织培养。

**关 键 词:** 越橘; 组织培养; 木醋

中图分类号: Q943.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)02-0160-06

## Effect of wood vinegar on tissue culture of blueberry (*Vaccinium uliginosum* Linn.)

SHEN Jian<sup>1,2</sup>, YANG Guo-ting<sup>1\*</sup>, LIU De-jiang<sup>2</sup>

(1.Center for Ecological Research, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2.Life Science College, Jiamusi University, Jiamusi, HeiLongjiang 154007, China)

**Abstract:** It is of great value to sieve suitable nutrient medium in tissue culture of blueberry for its special requirement on growing acid soil and for solving issues of slow growth, rooting difficulty, as well as high cost of using growth regulatory substance (e.g. zeatin). Box-Behnken design was adopted to explore the effect of wood vinegar on blueberry growth by adding them into rooting medium and transplanting medium in tissue culture. The results indicated that although wood vinegar had an inhibited effect on the callus formation of leaves and stem, it could accelerate propagation of stem. Woody plant medium (WPM +0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L ZT) was the best basic medium for tissue culture of blueberry. Wood vinegar had significant effects on the propagation of blueberry stem, and little interaction between zeatin and 6-BA on proliferation. The selected model was fitted well with actual test, and it could explain 96.5% of total response value. Wood vinegar (1/2 WPM+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA+10 mL/L wood vinegar) was a good medium which could increase 66% rooting rate compared with contrast group. In addition, wood vinegar could greatly increase survival rate of transplanting in that an addition of 20 mL/kg wood vinegar could improve survival rate to 93.3% with robust seedling, dense green stem and leaf, as well as the high stem which could reach 8.1 cm. The addition of wood vinegar could reduce the amount of zeatin use, for it could cut reagent cost down to 70%. Wood vinegar can be applied in blueberry tissue culture as a kind of plant growth regulator.

**Key words:** blueberry (*Vaccinium uliginosum* Linn.); tissue culture; wood vinegar

收稿日期: 2013-01-05

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(C201102); 黑龙江省教育厅项目(12531686); 佳木斯市重点科研项目(11-058)

作者简介: 申健(1979—), 女, 吉林省辉南县人, 讲师, 主要从事经济植物生理研究, mysj1234@yahoo.com.cn; \*通信作者, guotingyang@163.com

木醋具有促进植物生长、杀菌、防虫、防腐、脱臭、改良土壤环境等多种功效<sup>[1-2]</sup>。在美国、日本和韩国等国家,木醋液的综合利用已非常广泛,常用作植物生长促进剂和食品添加剂及饲料添加剂,也用于防治病虫害、堆肥和消臭等。中国在近20年才有关于木醋的研究,主要是研究其组成成分、抑菌作用和对种子萌发及植物生长的促进作用等<sup>[3-5]</sup>。近年来,世界各地大力开展具有营养和保健双重功效的小浆果生产和相应产品的研发工作,其中以越橘的发展较快。中国越橘种植区域北起黑龙江,南至云南,在10多个省份有商业化种植生产<sup>[6]</sup>。采用传统方法繁殖小浆果时,小浆果种子易出现优良性状变异和生长缓慢等问题;采用扦插方法繁殖小浆果存在繁殖系数低等缺点,所以,采用组织培养方法快速繁殖小浆果幼苗是大面积人工栽培的有效手段。目前,越橘组织培养常存在组培苗生长慢、不易生根、根系弱和所用特效植物生长调节物质(如玉米素)价格昂贵等问题<sup>[7-9]</sup>。越橘生长土壤的适宜pH为4.0~5.5,最适pH为4.3~4.8<sup>[10]</sup>。木醋的生产工艺简单,价格低廉,pH为4.0左右,其所含的有机物质可能对越橘组织培养具有促进作用。笔者研究木醋对越橘组织培养的影响,现将结果报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

木醋为硬杂木木醋液,pH 4.21,有机酸质量分数 3.06%,密度 1.014 6 g/cm<sup>3</sup>。越橘品种‘美登’为3年生植株,定植于佳木斯大学试验田。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 越橘适宜培养基的筛选

参考文献[11-14]设计4种配方培养基。

A: WPM(woody plant medium)+2.0 mg/L ZT。

B: WPM+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L ZT。

C: WPM+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L GA<sub>3</sub>。

D: WPM+ 0.05 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA。

WPM 培养基配方见表1。

表1 WPM 培养基母液配方

种类	组分	组分质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )
大量元素	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	556
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	390
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	96
微量元素	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.230
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.600
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200
	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.250
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
铁盐	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.800
	Na <sub>2</sub> -EDTA	37.300
有机物质	Nicotinic acid	0.50
	Inositol	100
	Pyridoxine HCl	0.50
	Thiamine HCl	1.00
	Glycine	2.00

于2012年6月剪取越橘新梢上的叶片和茎段,用自来水反复冲洗,于超净工作台上用70%的乙醇消毒30s,用0.1%氯化汞溶液消毒5min,用无菌水冲洗3~4次,无菌滤纸吸干后分别接种于4种培养基中<sup>[15-16]</sup>,每种培养基接种15个外植体,重复3次,以筛选出越橘组织培养的适宜培养基配方。

#### 1.2.2 木醋在越橘组织培养中的作用

采用Box-Behnken设计(表2),在筛选出的适宜培养基中添加木醋,观察越橘的增殖系数及生长情况,确定适合越橘组织培养的培养基配方。

表2 Box-Behnken 设计试验的因素与水平

因素	符号代码	范围和水平		
		-1	0	1
木醋体积分数	X <sub>1</sub>	0.0	5.0	10.0
6-BA 体积分数	X <sub>2</sub>	0.5	1.0	1.5
ZT 体积分数	X <sub>3</sub>	1.0	1.5	2.0

#### 1.2.3 木醋对越橘组培苗生根的影响

采用4种生根培养基。

CK: 1/2 WPM +1.0 mg/L NAA+ 0.5 mg/L IBA。

a: 1/2 WPM +1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA+5 mL/L 木醋。

b: 1/2 WPM +1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA+10 mL/L 木醋。

c: 1/2 WPM +1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA+15 mL/L 木醋。

将组织培养出的越橘幼枝分别接种到4种生根培养基中,观察其生根率及根生长情况。

#### 1.2.4 试管苗移栽

将生根状态理想的组培苗从培养室取出,置于室内光照下炼苗大约5d,打开瓶口3d后进行移栽。具体方法:从瓶中小心取出小苗,在20℃左右温水中浸泡10min,换水2次,将苗根部的培养基清洗干净,然后迅速移栽入塑料培养钵中。

移栽基质采用4个处理。

CK:田园土、粗沙、腐殖土的体积比为1:1:1。

I:CK+10mL/kg木醋。

II:CK+20mL/kg木醋。

III:CK+30mL/kg木醋。

移栽初期注意增大湿度并遮阴,移栽后20d调查移栽成活率,60d调查株高。

#### 1.3 数据分析

用Excel 2003处理试验数据;用Design Expert 8.0.6软件及SPSS16.0进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 越橘最适基本培养基筛选结果

经观察,接种后7d,4种培养基上茎段的腋芽均开始萌动,10d后在培养基A和B上的叶片切口处形成了浅绿色或红色质地坚硬的愈伤组织(图1,图片彩版见封三),15d后部分红色愈伤组织开始分化出苗;在15d时茎段叶腋处分化出5~6个苗,苗高约3cm,并且在基部形成了少量的愈伤组织,有的愈伤组织分化出苗(图2,图片彩版见封三),植株颜色为淡绿至深绿色。培养基C和D中的叶片没有形成愈伤组织,只有少数茎段叶腋处分化出2~3

个苗,大部分茎段叶腋处没有分化出苗,但生长快,培养后15d苗高约5cm。植株颜色为深绿色,部分叶片为红色。



图1 叶片愈伤组织

Fig.1 Callus of leaves



图2 茎段分化增殖

Fig.2 Propagation of stem

由表3可见,培养基A和B有利于越橘的组织培养,叶片愈伤组织诱导频率分别为88.9%和84.4%,茎段增殖倍数分别为6.00和5.69,而培养基C和D对叶片和茎段组织培养均无明显作用。可见,培养基A和B是越橘叶片和茎段组织培养的适宜培养基。因为培养基A和B中均使用了玉米素,考虑到玉米素价格昂贵,在Box-Behnken设计中,选择培养基B为适宜基础培养基。

表3 接种后15d叶片愈伤组织诱导及茎段增殖情况

Table 3 Callus induction of leaves and propagation of stem 15 d after inoculation

培养基	叶片外植体数/个	茎段外植体数/个	叶片愈伤组织数/个	茎段分化苗数/个	叶片诱导频率/%	茎段增殖倍数
A	45	45	40	270	88.9	6.00 a
B	45	45	38	256	84.4	5.69 a
C	45	45	0	40	0.0	0.89 b
D	45	45	0	50	0.0	1.11 b

2.2 木醋对越橘组织培养的影响

接种后 15 d，含有木醋的培养基叶片和茎段基部均没有形成愈伤组织，而不含木醋的培养基叶片及茎段基部均有愈伤组织形成，说明木醋对越橘愈伤组织的形成有抑制作用。所有培养基茎段都有不同程度的增殖。添加木醋培养基茎段的增殖系数大，且植株生长旺盛，颜色浓绿，说明木醋对越橘茎段的增殖有一定的促进作用。接种后 30 d 茎段的增殖倍数见表 4。

应用 Design expert 软件，结合表 4 试验数据，得到增殖倍数对木醋、6-BA、ZT 的二次多项式回归方程：

$$Y=21.10+1.04X_1 - 0.51X_2 - 5.43X_3+0.52X_1X_2 - 0.75X_1X_3+0.80X_2X_3+0.26X_1^2+0.61X_2^2 - 9.11X_3^2。$$

该模型的方差分析结果见表 5。

表 4 接种后 30 d 各培养基茎段的增殖倍数  
Table 4 Magnification factor of stem propagation after 30 d inoculation at different culture medium

处理编号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	增殖倍数	
				观测值	预测值
1	1	0	1	5.84	7.11
2	0	-1	1	7.42	6.88
3	0	0	0	21.61	21.10
4	1	-1	0	23.83	23.00
5	1	1	0	23.62	23.02
6	0	-1	-1	18.65	19.34
7	1	0	-1	19.42	19.47
8	-1	0	1	6.64	6.53
9	-1	1	0	19.18	19.90
10	-1	-1	0	21.41	21.96
11	0	0	0	21.84	21.10
12	0	0	0	20.23	21.10
13	0	0	0	20.45	21.10
14	0	1	1	8.22	7.46
15	-1	0	-1	17.27	15.89
16	0	1	-1	16.22	16.72
17	0	0	0	21.54	21.10

表 5 茎段增殖倍数的方差分析

Table 5 Variance analysis on magnification factor of stem propagation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	601.963 1	9	66.884 79	50.849 15	<0.000 1	极显著
X <sub>1</sub>	8.611 3	1	8.611 25	6.546 70	0.037 6	显著
X <sub>2</sub>	2.101 3	1	2.101 25	1.597 48	0.246 7	
X <sub>3</sub>	235.445 0	1	235.445 00	178.997 00	<0.000 1	极显著
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1.102 5	1	1.102 50	0.838 18	0.390 4	
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2.250 0	1	2.250 00	1.710 56	0.232 2	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	2.560 0	1	2.560 00	1.946 24	0.205 7	
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.290 1	1	0.290 13	0.220 57	0.652 9	
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1.579 6	1	1.579 61	1.200 90	0.309 4	
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	349.632 2	1	349.632 20	265.807 80	<0.000 1	极显著
残差	9.207 5	7	1.315 36			
失拟值	7.007 5	3	2.335 83	4.246 97	0.098 1	
纯误差	2.200 0	4	0.550 00			
合计	611.170 6	16				

R<sup>2</sup>=0.984 935；校正决定系数为 0.965 565。

由表 5 可知，X<sub>3</sub> 和 X<sub>3</sub><sup>2</sup> 项达到极显著水平 (P<0.000 1)，表明 ZT 对越橘的茎段增殖效应极显著；X<sub>1</sub> 在 0.05 水平上显著 (P<0.05)，表明木醋对越橘茎段的增殖效应显著；X<sub>2</sub>、X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>、X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>、X<sub>1</sub><sup>2</sup>、X<sub>2</sub><sup>2</sup> 项均无统计学意义，说明 6-BA 对越橘增殖效应不显著，各因素间无交互作用。试验所选模型的显著性检验结果为极显著 (P<0.000 1)，且失拟

值在 P=0.05 水平上无统计学意义 (P=0.098 1>0.05)。校正决定系数为 0.965 565，说明该模型与试验实际拟合良好，可以解释 96.56% 响应值的变化。可见，木醋对越橘茎段的增殖有一定的促进作用。在 17 个处理中，增殖率高的各处理中木醋的添加均能降低 ZT 的使用量，增殖率最高的组合使用 ZT 的质量浓度为 1.0 mg/L，为原使用浓度的 50%。因木醋

价格低廉,所以 ZT 使用量的减少将大大降低成本。

### 2.3 木醋对越橘组培苗生根的影响

接种到生根培养基上的茎段约 10 d 后长出根,在基部形成正常根系。根较细,部分根向上生长形成气生根。随着根系的形成而逐渐发育成健壮的小植株(图 3, 图片彩版见封三)。接种后 20 d 组培苗的生根率见表 6。



图 3 组培苗生根情况

Fig.3 Roots of tissue cultured seedling

表 6 接种后 20 d 不同培养基再生植株的生根情况

Table 6 Rooting rate and number of regeneration plant after 20 d' inoculation at different culture mediums

生根培养基	接种数/株	生根数/条	生根率/%
CK	30	15	50 b
a	30	18	60 b
b	30	25	83 a
c	30	22	73 ab

由表 6 可知:培养基 b 与 CK 和培养基 a 生根率间的差异显著,培养基 b、c 生根率间的差异无统计学意义。这说明添加木醋对生根率的提高有促进作用,培养基 b 的生根率比对照提高了 66%。

### 2.4 木醋对组培苗移栽成活率的影响

由表 7 可知 培养基 B 的成活率和株高值最大,分别达 93.3%和 8.1 cm,表明培养基 B 上的组培苗移栽后生长较好。就成活率而言,培养基 显著高于 CK,培养基 与 CK 的差异无统计学意义;3 个木醋处理相比较,培养基 显著低于培养基 、,而培养基 、 间的差异无统计学意义。就株高而言,培养基 、 均显著高于 CK,培养基 与 CK 间的差异无统计学意义;3 个木醋处理相比较,培养基 III 显著低于培养基 、,而培养基 、

间的差异无统计学意义。这表明木醋质量浓度约 20 mL/kg 对组培苗移栽后的生长有促进作用。

表 7 不同移栽培养基越橘组培苗的成活率和株高  
Table 7 Survival rate and plant height of transplanted seedlings under different treatment

移栽培养基	移栽数/株	成活数/株	成活率/%	株高/cm
CK	30	20	66.7 bc	6.3 b
	30	24	80.0 ab	7.5 a
	30	28	93.3 a	8.1 a
	30	19	63.3 c	6.6 b

## 3 结论与讨论

a. 配制培养基时,酸度是影响培养基凝固的因素之一。酸度过低不易凝固<sup>[17]</sup>。由于越橘生长对 pH 的要求较高,对越橘进行组织培养时的 pH 要比其他植物的低。本试验中采用 pH5.0。在配制培养基时,添加木醋的培养基每 500 mL 比不添加木醋的培养基 pH 变化 0.2~0.3 个单位,培养基酸度没有发生太大变化,但在调节酸度时消耗 NaOH 的量却明显增多,这可能与木醋本身的组成成分有关。pH 相同时,添加木醋培养基的凝固效果比不添加木醋的好,这有利于越橘组织培养地开展。

b. 植物激素是愈伤组织诱导的重要影响因子。试验中木醋的添加对愈伤组织的形成有抑制作用,它抑制了其他激素的作用表达,对茎段的增殖有明显的促进作用。木醋作为一种植物生长促进物质,其抑制愈伤组织形成的作用原理还有待研究。在越橘组织培养中,只能将木醋应用于茎段的增殖、组培苗生根及移栽中。

c. 本试验中组培苗生根率最高为 83%,比对照提高了 66%。添加木醋能够提高越橘组培苗的生根率,可能是木醋对植物生长的促进作用及木醋的颜色共同起作用的结果。木醋含有多种有机物质,对越橘的生根起到了促进作用。添加木醋的培养基呈黄褐色至浅黑色。这给组培苗生根创造了一个相对黑暗的环境条件,有利于组培苗生根。这一作用可能与活性炭在组培中的促进生根作用相似。

d. 不添加木醋越橘组培苗移栽成活率为 66.7%,比文献[11]的研究结果稍高。添加木醋后成活率达到 93.3%,接近于文献[13]的研究结果,但

文献[14]中是采用移栽后喷施营养液的方法来达到98%的高成活率。木醋提高越橘组培苗的移栽成活率可能与其能够提供部分有机物质及改变基质的pH有关。本试验中木醋的添加部分代替了营养液的作用。为了利用木醋的促进作用,可以考虑在移栽后隔期适当喷施一定量的木醋。

e. 按目前的市场价格,ZT 5.6元/mg。配制1L WPM空白培养基需要0.3972元,1/2 WPM(大量元素减半)需要0.3367元。按1L配制25瓶培养基,每瓶接种3个外植体计算,考虑增殖率和生根率,不考虑水电人工及仪器等其他费用,单纯从试剂成本考虑,通过添加木醋降低ZT使用量,提高增殖率及移栽成活率,生产1株越橘组培苗可节省约0.13元,即能节省约70%的试剂成本。

#### 参考文献:

- [1] Mitsuyoshi Y, Madoka N, Keko H, et al. Termiticidal activity of wood vinegar, its components and their homologues[J]. J Wood Sci, 2002, 48: 338-342.
- [2] Sung P, Chang S. Pyrolysis GC-MS analysis of tars formed during the aging of wood and bamboo crude vinegars[J]. J Wood Sci, 2010, 56: 47-52.
- [3] 王海英, 杨国亭, 周丹. 木醋液研究现状及其综合利用[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(5): 55-57.
- [4] 胡春花, 达布希拉图. 木醋液和碳醋肥对设施蔬菜土壤肥力及蔬菜产量的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 27(10): 218-223.
- [5] 杜相革, 史咏竹. 木醋液及其主要成分对土壤微生物数量影响的研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(6): 45-47.
- [6] 李亚东, 刘海广, 张志东, 等. 我国蓝莓产业现状和发展趋势[J]. 中国果树, 2008(6): 67-71.
- [7] 刘太林. 越橘组织培养研究进展综述[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(5): 37-39.
- [8] 梁晓晶, 代志国, 翟熙伦. 越橘组织培养研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2011(6): 138-142.
- [9] 张在盛, 王秀华. 越橘组织培养的相关研究[J]. 森林工程, 2011, 27(6): 23-25.
- [10] 樊基胜, 蒋光月, 陶龙. 安徽越橘适生地越橘丰产栽培技术[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(8): 4509-4511.
- [11] 张彩玲, 朱延明. 矮丛越橘再生体系的建立[J]. 农业科技通讯, 2011(9): 78-82.
- [12] 廉家盛. 越橘品种‘美登’组培快繁体系建立研究[D]. 延吉: 延边大学, 2011.
- [13] 陆锦明, 朱天华, 王彩波, 等. 越橘组织培养快速繁殖技术研究初报[J]. 上海农业科技, 2011(6): 73-74.
- [14] Samirc D. Influence of indole-3-butyric acid and propagation method on growth and development of *in vitro*- and *ex vitro*-derived low bush blueberry plants[J]. Plant Growth Regul, 2007, 51: 245-253.
- [15] 危兆安, 张乍如, 彭晓英, 等. 宽叶缙草的离体培养及不定芽发生[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(4): 395-398.
- [16] 王尚堃, 仝瑞霞, 翟宝黔, 等. 博爱八月黄柿组织培养影响因素研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(2): 176-180.
- [17] 邱广伟, 夏平, 刘卫平, 等. 影响培养基凝固程度因素的分析[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(4): 238-239.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库