

山杏组培繁殖技术研究

郑可¹, 董胜君¹, 田明芳², 刘明国¹, 吴月亮¹, 安成亮¹

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 阜新蒙古族自治县林业科技示范中心, 辽宁 阜新 123000)

摘要:以山杏为试材,研究了外植体的消毒、基本培养基筛选、外植体的种类及不同浓度配比的激素对外植体各阶段生长的影响。结果表明:采用 1.0 g/L 的 HgCl_2 消毒 3 min 灭菌效果最好;以改良 $\text{MS}[\text{C}(\text{NH}_4^+):\text{C}(\text{NO}_3^-)=0.16]$ 为基本培养基,组培苗分化和生长效果较好;最适外植体为茎尖;初代培养最适的激素配比为 1.0 mg/L 的 6-BA 和 0.05 mg/L 的 NAA;继代培养最适的激素配比为 0.5 mg/L 的 6-BA 和 0.1 mg/L 的 NAA。

关键词:山杏;组培;繁殖技术

中图分类号:S 662.204⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0115-04

山杏(*Prunus sibirica*)属蔷薇科李属杏亚属落叶灌木或乔木。山杏是亚洲特有的生态经济型树种,其生态

特性为喜光,耐寒性强,耐干旱瘠薄^[1],是丘陵山区阳坡、半阳坡造林绿化的先锋树种;而且具有优良的水土保持和防风固沙功能,成为我国三北地区水土保持、防风固沙和小流域综合治理等生态建设工程的主要造林树种;山杏同时具有很高的经济价值,主要体现在杏仁、花、树皮、叶、核壳和杏肉等方面;山杏的树形优美,春季先叶开花,花色迷人,也是较好的园林绿化树种。因此,研究山杏的组培技术,为山杏的繁殖提供快速有效的方法,能使山杏在经济、生态、优良品系的保持上发挥重要

第一作者简介:郑可(1987-),女,硕士,现主要从事森林培育等方面的研究工作。E-mail:zhengke19870430@163.com.

责任作者:董胜君(1974-),男,博士,副教授,现主要从事森林培育及种子与苗木培育等研究工作。E-mail:dsj928@163.com.

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(201004034);中央财政林业科技推广示范资金资助项目([2010]02)。

收稿日期:2012-10-22

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996:1725.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:4174-4178.
- [3] 丁向阳. 枳椇种质资源及利用[J]. 经济林研究,2005,23(3):85-88.
- [4] 孙骏威,陈珍,李素芳,等. 枳椇的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2010,46(7):739-740.
- [5] 徐涌,孙骏威,陈珍. 不同植物生长调节物质处理对吴茱萸组织培养

的影响[J]. 浙江农林大学学报,2011,28(3):500-504.

[6] 董倩,李凤玉. 驱蚊草组织培养及其再生体系的建立与优化[J]. 福建师范大学学报(自然科学版),2006,22(1):72-76.

[7] 柯善强,傅俊,桂耀林,等. 裂叶悬钩子器官发生的细胞组织学观察[J]. 植物学报,1989,31(11):889-891.

[8] 刘卫平,孙骏威,李素芳. 蓬蘽的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2009,45(10):1013-1014.

[9] 康大力,张洪利,莫小路,等. TDZ 对喜树愈伤组织生长及色素积累的影响[J]. 生物技术,2012,22(1):83-85.

Study on Optimum for Regeneration System of Leaves in *Hovenia acerba*

SUN Ye-fang¹, ZHENG Qi¹, SUN Jun-wei², CHEN Zhen³, ZHOU Dan²

(1. Shaoxing Academy of Agriculture Sciences, Shaoxing, Zhejiang 312003; 2. Department of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang 310018; 3. School of Life Sciences, Taizhou University, Taizhou, Zhejiang 318000)

Abstract: A regeneration protocol for *Hovenia acerba* were set up via organogenesis from callus derived from leaf disc of regeneration *Hovenia acerba* plants *in vitro*. The results showed that the best explants were mature leaves with dark green color, and the best placement way of explants was face-up; the most appropriate medium for the induction of callus and adventitious buds was 1/2MS + BA 2.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L, with the induction rate more than 85% and proliferation rate more than 6.0; the most appropriate medium for the rooting was 1/4MS + NAA 0.1 mg/L, with addition of 2% sucrose, in which the rooting rate exceeded 95%.

Key words: *Hovenia acerba*; plant growth regulator; leaf disc of regeneration plants; adventitious buds induction; rooting induction

作用。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

分别选取沈阳农业大学校园内 25 a 生的山杏当年生枝条的茎尖、茎段和叶片及阜新市阜蒙县大巴沟山上的 10 a 生山杏的当年生枝的茎尖为外植体材料。

1.2 试验方法

1.2.1 初代培养 外植体灭菌时间的筛选:将采取的外植体用自来水冲洗干净,再用灭菌滤纸吸干水分,将其放入 75% 的酒精中浸泡 30 s,无菌水冲洗 3~5 次,用 1.0 g/L HgCl_2 进行灭菌处理。并不停的搅拌,使消毒更加彻底,最后用无菌水冲洗 5~7 次。将处理过的材料浸泡在无菌水中待用。分别设 1、3、5 min 3 个时间升汞消毒处理。以茎段为外植体,每个处理 10 瓶,每瓶接 2 个外植体,3 次重复,10 d 后统计存活率和污染率。基本培养基的筛选:分别以 MS、改良 MS $[\text{C}(\text{NH}_4^+):\text{C}(\text{NO}_3^-)=0.16]$ 、WPM 为基本培养基,其中均附加 1.0 mg/L 6-BA、0.05 mg/L NAA,蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L。以茎尖为外植体,每处理培养 10 瓶,每瓶接种 1 个外植体,每个处理重复 3 次。观察外植体的成活率、萌发率、分化率和生长情况。激素筛选:以选定培养基为基本培养基,以茎尖为外植体,以 6-BA 0.0、0.5、1.0、2.0 mg/L 和 NAA 0.00、0.05、0.10、0.15 mg/L 为试验水平,采取完全随机区组试验设计,设计 16 个处理,每个处理培养 10 瓶,每瓶接种 1 个外植体,每个处理重复 3 次。其中均附加蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L。观察在不同浓度和不同激素的作用下,丛生芽诱导率和生长情况。外植体筛选:以选定的培养基为基本培养基,添加选定的激素浓度,其中均附加蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L。分别用山杏的茎尖、茎段、叶片为外植体,接种到培养基上。每处理培养 10 瓶,每瓶接种 1 个外植体,每处理重复 3 次。观察不同外植体的芽启动时间、分化率和生长情况。

1.2.2 继代培养 初代培养后,选取生长健壮,无染菌的幼苗,进行继代培养的激素浓度的初步筛选,以 6-BA 0.5、1.0 mg/L 和 NAA 0.05、0.10 mg/L 交叉配比为 4 个试验水平,以初代培养中选定的培养基为基本培养基,其中均附加蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L。每处理培养 10 瓶,每瓶接种 1 个外植体,每个处理重复 3 次。观察丛生芽诱导率和生长情况。

1.2.3 培养条件 培养室温度为 24~25℃,光照强度为 2 000~3 000 lx,光照时间为 16 h/d,空气相对湿度为 40%~70%,以上培养基的 pH 均为 5.6~5.8。

1.3 数据分析

数据分析均采用 Excel 和 Spss 软件进行处理和分

析。生长情况的评价标准分为 3 个等级:第 1 个等级为组培苗细弱,生长缓慢,叶色发黄(+);第 2 个等级为组培苗长势一般,叶色浅绿(++);第 3 个等级为组培苗健壮,生长较快,叶色浓绿(+++)。

2 结果与分 析

2.1 不同激素浓度对初代培养中组培苗的影响

2.1.1 灭菌时间对外植体灭菌效果的影响 对山杏茎段采用 3 种升汞灭菌时间处理。由表 1 可知,当用 1.0 g/L HgCl_2 消毒 1 min 时,10 d 后茎段的死亡率最低,但污染率最高;消毒 5 min 时,10 d 茎段的死亡率最高,污染率却最低;而消毒 3 min 时,茎段的污染率和死亡率都控制在较低的水平,成活率可达 81.7%,而且外植体在培养基上生长良好。因此用 1.0 g/L HgCl_2 消毒 3 min 为最佳的消毒时间。

表 1 消毒时间对外植体灭菌效果的影响

Table 1 Effect of disinfection time on the explants sterilizing effect

消毒时间 Processing time/min	外植体数 Explants number /个	死亡率 Mortality rate /%	污染率 Contamination rate /%	成活率 Survival rate /%
1	60	3.3±0.26c	43.3±1.25a	53.4±1.25c
3	60	8.3±0.46b	10.0±0.70b	81.7±1.11a
5	60	26.7±1.31a	3.3±0.36c	70.0±1.14b

注:表中数据为 3 次重复的均值±标准差;LSD 多重比较,表中同列中不同字母表示 $\alpha=0.05$ 显著水平,下同。

Note:Data in the table is the mean of three repetitions±standard deviation;LSD multiple comparisons,different letters in the same column in the table represent $\alpha=0.05$ significant level,the same below.

表 2 培养基对外植体分化和生长情况的影响

Table 2 Effect of division and growth condition of explants in medium

培养基 Medium	成活率 Survival rate/%	萌发率 Germination rate/%	分化率 Division rate /%	平均丛生芽数 Average number of multiple shoots/个	生长情况 Growth condition
WPM	50.0±2.98c	10.0±1.93c	0.0±0.00c	0.0±0.00c	+
MS	63.3±2.95b	16.7±2.41b	6.7±1.31b	1.3±0.36b	++
改良 MS	70.0±1.51a	60.0±2.10a	50.0±3.80a	2.5±0.66a	+++

2.1.2 基本培养基对外植体生长的影响 表 2 结果表明,在 WPM 培养基上外植体没有分化的现象,而且生长状态较差;而在 MS 和改良 MS 培养基上,外植体都有分化的现象,但是 MS 培养基上分化的丛生芽较少而且生长状态一般,而改良 MS 培养基上外植体生长健壮,丛生芽较多而且有高生长趋势。所以山杏的适宜基本培养基为改良 MS 培养基。

2.1.3 激素浓度对外植体生长的影响 6-BA 和 NAA 的 2 因素 4 水平的完全随机区组试验结果见表 3。当 NAA 的浓度为 0 mg/L 时,随着 6-BA 的浓度增加丛生芽的诱导率不断增加。其中 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 和 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L 的培养基中外植体生长的都很好,叶色深绿而且健壮,但是

6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的培养基中外植体的丛生芽诱导率更高些,而且 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L 的组培苗有些出现了玻璃化现象,因此 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的激素配比更适宜山杏的丛生芽的诱导和组培苗的生长。在最适激素浓度培养基上,5 d 茎尖开始在原有的基础上生长变大(图 1-1);15 d 基部开始长愈伤组织,有些叶腋处长出芽并生长变大

(图 1-2);22 d 后基部的愈伤组织分化出丛生芽,有些叶腋也长出了丛生芽(图 1-3);30 d 开始有些丛生芽开始往高生长并且继续分化(图 1-4)。对试验结果进行双因素方差分析。由表 4 可知,4,6-BA 和 NAA 对山杏的丛生芽诱导率极显著,6-BA×NAA 的交互作用对山杏的丛生芽诱导率也极显著,显著水平达到了 0.000。

表 3 不同激素浓度对外植体诱导率和生长情况的影响

Table 3 Effect of induction rate and growth condition of explants in different hormone concentrations

处理 Treatment	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	外植体数 Explants number/个	产生丛生芽外植体数 Explants number of producing multiple shoots/个	丛生芽诱导率 Induction rate multiple shoots/ %	平均丛生芽数 Average number of multiple shoots/个	生长情况 Growth condition
1	0.0	0.00	30	0	0.0±0.00j	0.0±0.00c	+
2	0.5	0.00	30	3	10.0±0.72i	1.0±0.30b	+
3	1.0	0.00	30	5	16.7±1.65g	1.0±0.26b	++
4	2.0	0.00	30	6	20.0±1.32f	1.0±0.62b	++
5	0.0	0.05	30	0	0.0±0.00j	0.0±0.00c	+
6	0.0	0.10	30	0	0.0±0.00j	0.0±0.00c	+
7	0.0	0.15	30	0	0.0±0.00j	0.0±0.00c	+
8	0.5	0.05	30	3	10.0±0.96i	1.0±0.62b	++
9	0.5	0.10	30	4	13.3±1.14h	1.0±0.26b	++
10	0.5	0.15	30	0	0.0±0.00j	0.0±0.00c	+
11	1.0	0.05	30	15	50.0±1.00a	2.5±0.66a	+++
12	1.0	0.10	30	10	33.3±0.30c	1.7±0.62a	++
13	1.0	0.15	30	6	20.0±0.98f	1.8±0.44a	++
14	2.0	0.05	30	9	30.0±0.30	1.9±0.40a	++
15	2.0	0.10	30	12	40.0±0.36b	2.1±0.36a	+++
16	2.0	0.15	30	8	26.7±0.53e	1.8±0.46a	++

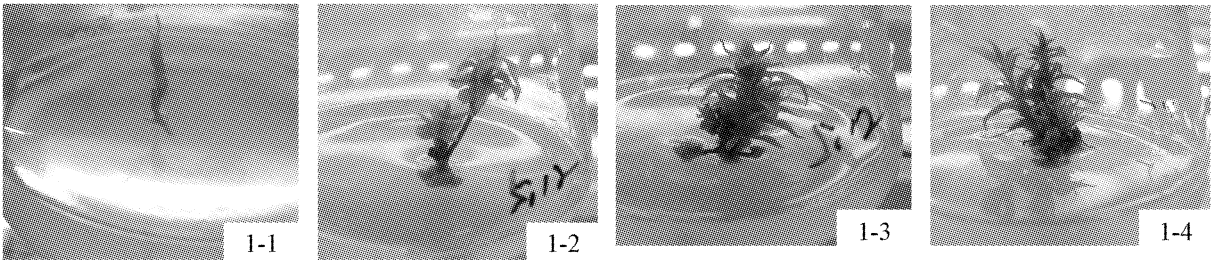


图 1 改良 MS 中山杏组培苗不同天数生长情况

Fig. 1 Growth condition of tissue culture seedling of *Prunus sibirica* in improved MS medium in different days

表 4 方差分析结果

Table 4 Results of analysis of variance

变异来源 Source of variation	自由度 Degrees of freedom	F 值 F value	显著水平 Significant level
6-BA	3	4 459.215	0.000
NAA	3	710.160	0.000
6-BA×NAA	9	306.219	0.000

2.1.4 外植体筛选结果 分别选用山杏的茎尖、茎段、叶片为外植体进行组培试验,由表 5 可知,茎尖分化产生丛生芽的时间是第 22 天,最快;叶片是 32 d;茎段需要 45 d,最慢。而且茎尖的分化率最高达到 50%,茎段分化

率最低只有 3.3%。而且以茎尖为外植体的组培苗生长健壮,分化的丛生芽较多,丛生芽容易向高生长。因此茎尖为山杏的最适外植体材料。这 3 类外植体产生丛生芽的状况分别不同。茎尖是先生长变大,并且基部开始长愈伤组织,然后由基部愈伤组织和叶腋处分化出丛生芽;茎段是叶腋处芽先突破芽鳞,开始生长变大,然后分化出丛生芽,或者长大后的腋芽转接到其它培养基然后分化出丛生芽;叶片首先生成愈伤组织,然后在愈伤组织上分化出丛生芽,但是产生的丛生芽叶色淡绿发黄,生长较慢。

表 5 外植体筛选结果

Table 5 Result of selecting explants

外植体种类 Explants type	芽启动时间 Bud start up time/d	分化率 Division rate/%	生长情况 Growth condition
茎尖	22	50.0±3.80a	+++
茎段	45	3.30±0.57c	+
叶片	32	10.0±1.47b	++

2.2 不同的激素浓度对继代培养中组培苗的影响

从初代培养基上选取生长健壮、无染菌的组培苗,其上的丛生芽分成单芽,将所得的单芽接种到 4 种不同

表 6

继代培养激素浓度筛选结果

Table 6

Results of selecting hormone concentrations in subculture

处理 Treatment	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	外植体数 Explants number/个	产生丛生芽外植体数 Explants number of producing multiple shoots/个	丛生芽诱导率 Induction rate multiple shoots/%	平均丛生芽数 Average number of multiple shoots/个	生长情况 Growth condition
1	1.0	0.05	40	18	45.0±0.89c	2.7±0.36b	++
2	1.0	0.10	40	17	42.5±2.35c	2.6±0.44b	+
3	0.5	0.05	44	23	52.2±1.90b	2.8±0.26b	++
4	0.5	0.10	38	25	68.8±3.03a	3.9±0.62a	+++

3 结论与讨论

在山杏外植体灭菌筛选试验中,升汞的消毒时间设置为 3 min 最佳。另外取材季节以材料积累了较丰富的营养和内源激素为佳,此时外植体抵抗病菌的能力强,一般情况下,大多在材料休眠末期或萌动前期取材最为有利^[2]。在马琳等^[3]的锯叶斑克木的外植体消毒试验中可知,夏季气温较高,各类菌的活跃程度较高,污染率也高。该试验以春季 4~5 月份最佳,污染率极低。该试验的基本培养基筛选设置了 3 个培养基,分别是 WPM、MS 和改良 MS[C(NH₄⁺):C(NO₃⁻)=0.16]培养基。该试验结果表明,最适培养基为改良 MS 培养基,在改良 MS 培养基上外植体分化效果最好,而且生长健壮,这与齐高强^[4]的试验结果一致。在激素浓度筛选中,得到最利于外植体诱导丛生芽和生长的激素浓度为 1.0 mg/L 的 6-BA 和 0.05 mg/L 的 NAA。茎尖是山杏的最适外植体,丛生芽诱导效果比较好,而且丛生芽容易向高生长。这可能由于不同外植体的内源激素水平不同所导致的。而且茎

浓度配比的继代培养基上,30 d 后所得结果见表 6。表 6 结果表明,大部分单芽都产生了新的丛生芽,而且都有不同程度的生长。继代培养采用原有的初代培养基中添加 1.0 mg/L 的 6-BA 的 2 种激素配比诱导丛生芽的效果都比较差,而降低了 6-BA 浓度的培养基诱导丛生芽的效果比初代时候要好,当激素浓度为 0.5 mg/L 6-BA,0.10 mg/L NAA 时,继代培养中丛生芽的诱导效果最好,诱导率可达到 68.8%,而且生长情况最好。

尖相对于茎段和叶片来说可能未高度分化,组织代谢旺盛,再生能力强。在继代培养中,筛选出的最适浓度配比是 0.5 mg/L 6-BA,0.10 mg/L NAA,该浓度下外植体的丛生芽诱导率明显高于初代,而且生长较健壮。但一般情况下继代培养中 6-BA 和 NAA 的浓度相对降低会有利于组培苗的生长,这与该试验结果有所不同,这可能由于继代培养的激素筛选要考虑外植体的继代次数和外植体的激素积累等情况。在接下来的试验中,课题组将对继代培养的激素配比筛选进行进一步的研究。

参考文献

- [1] 张天麟. 园林树木 1200 种[M]. 北京:中国建筑工业出版社,2004:232.
- [2] 陈耀锋. 植物组培与细胞培养[M]. 北京:中国农业出版社,2007:124.
- [3] 马琳,何丽娜,姜岩,等. 锯叶斑克木外植体的选择及消毒方法的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2011,31(12):134-137.
- [4] 齐高强,赵忠,张存旭,等. 大扁杏组培基本培养基与培养条件的优化研究[J]. 西北农林科技大学学报,2006,34(3):115-118.

Study on Tissue Culture Proportion Technology of *Prunus sibirica*

ZHENG Ke¹, DONG Sheng-jun¹, TIAN Ming-fang², LIU Ming-guo¹, WU Yue-liang¹, AN Cheng-liang¹

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Fuxin Mongolian Autonomous County Forestry Science and Technology Demonstration Center, Fuxin, Liaoning 123000)

Abstract: The *Prunus sibirica* was used as material, the kind of basic medium, the kind of explants and the different proportions of hormones impact the growth condition of explants in the various stages of tissue culture were studied. The results showed that the best sterilization effect was used HgCl₂ 1 g/L as disinfectants to disinfect 3 min; the division and growth condition of explants was better in improved MS[C(NH₄⁺):C(NO₃⁻)=0.16] medium; the most suitable explants was shoot tips; the most suitable proportions of hormones was 6-BA 1.0 mg/L and NAA 0.05 mg/L in primary culture; the most suitable proportions of hormones was 6-BA 0.5 mg/L and NAA 0.1 mg/L in subculture.

Key words: *Prunus sibirica*; tissue culture; proportion technology