

扁桃茎段增殖培养基的筛选

姜 喜, 陈 加 利, 肖 巍, 刘 建 亮, 马 其, 王 琳

(塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以“莎车 14 号”、“莎车大 3 号”2 个扁桃品种的茎段为试材, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 研究了适合“莎车 14 号”、“莎车大 3 号”茎段增殖的培养基。结果表明: 外植体灭菌以 70% 乙醇消毒 8 s+2% 和 4% 次氯酸钠消毒 10 min 效果良好, 茎段平均成活率为 95%。扁桃“莎车大 3 号”的最优增殖培养基配比为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L, 增殖系数 4.63; 扁桃“莎车 14 号”的最优增殖培养基配比为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L, 增殖系数 4.20。

关键词:扁桃茎段; 增殖培养基; 正交实验

中图分类号:S 662.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)22-0111-03

扁桃(*Amygdalus communis* L.) 属蔷薇科李亚科桃属扁桃亚属落叶乔木, 又名巴旦杏。其果仁营养价值很高, 必需氨基酸综合评价高于海参、面粉和核桃仁, 且具有较高的含油量和不饱和脂肪酸含量, 容易消化, 对气管炎、高血压、神经衰弱、肺炎、糖尿病等都有一定疗效, 是新疆维吾尔人民最珍视的干果^[1-2]。扁桃虽然用途广泛, 具有相当可观的经济价值, 但在我国扁桃主要种植于新疆天山以南的阿克苏、喀什、和田等地, 年产量不足 300 t, 每年需进口美国生产的扁桃仁约 6 000 t^[3]。目前扁桃主要是通过实生和嫁接繁殖, 繁殖系数低, 生长速度慢, 遗传不稳定, 很难满足市场需求, 而利用组织培养的方法可以提高扁桃繁殖系数, 缩短繁殖时间, 并且可以保持品种的优良特性^[4]。国内有关扁桃离体快速繁殖的研究报道起步较晚, 陈芳等^[5]、陈子萱等^[6]、杨宁等^[7]引进美国扁桃品种进行组培快繁研究, 得出不同扁桃品种其增殖、生根培养基不一样, 李康等^[8]、姜俊卿等^[9]、高疆生等^[10]虽对新疆扁桃进行了初步研究, 但并没有形成大规模扁桃组培生产, 新疆南疆“莎车 14 号”、“莎车大 3 号”扁桃组织培养和快速繁殖技术尚不完善。该研究以“莎车 14 号”、“莎车大 3 号”2 个扁桃品种为试材, 采用正交实验的方法对其增殖培养基中 6-BA 含量、GA₃ 含量、IAA 含量进行了筛选, 旨在找出最佳激素含

量组合的培养基, 为扁桃生产和遗传研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“莎车 14 号”和“莎车大 3 号”扁桃 1 a 生枝条取自塔里木大学园艺试验站内。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的获得与灭菌 试验于 2012 年在塔里木大学农科楼组培室进行。将取回的 1 a 生枝条剪去叶片, 用自来水冲洗干净, 取下带腋芽的茎段 2~3 cm 及顶芽, 倒入吐温用流水冲洗 30 min 左右, 然后置于超净工作台下, 用 70% 酒精灭菌 4、8、12 s, 再用 2%、4%、6% 的次氯酸钠消毒处理 10 min, 无菌水冲洗 3 遍后, 接入诱导培养基上, 即 MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.3 mg/L。10 d 后统计污染率, 40 d 没有恢复生长计为死亡, 统计成活率。

1.2.2 茎段增殖培养基的配制 采用 MS 培养基, 附加不同浓度的 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、赤霉素(GA₃)和吲哚乙酸(IAA), 按 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表形成不同配方的培养基。该试验以 6-BA、GA₃ 和 IAA 为 3 个变化因素, 6-BA 分别采用 1.0、1.5、2.0 mg/L 3 个水平, GA₃ 分别采用 0、0.1、0.2 mg/L 3 个水平, IAA 分别采用 0.1、0.2、0.3 mg/L 3 个水平。正交表和 9 种培养基的配比如表 1。每组接种 5 瓶, 每瓶接种 3 个, 每组重复 3 次, 连续继代并调查增殖率, 选择最佳的增殖培养基。

表 1 扁桃茎段增殖培养基正交配比试验

水平	因素		
	A(6-BA)/mg · L ⁻¹	B(GA ₃)/mg · L ⁻¹	C(IAA)/mg · L ⁻¹
1	1.0	0	0.1
2	1.5	0.1	0.2
3	2.0	0.2	0.3

第一作者简介:姜喜(1981-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为果树栽培生理。E-mail:837861277@qq.com.

责任作者:王琳(1969-), 女, 硕士, 副教授, 现主要从事林学和园林教学与科研等工作。E-mail:1531956730@qq.com.

基金项目:塔里木大学校长基金资助项目(TDZKSSZD201202); 国家级大学生创新创业训练计划资助项目(TDGCX201214); 塔里木大学校长基金资助项目(TDZKSS201216)。

收稿日期:2013-06-17

1.2.3 培养的环境条件及培养基消毒 采用透明玻璃三角瓶培养,每瓶含培养基大约 50 mL。以 MS 为基本培养基,附加 30 g/L 的蔗糖,7.0 g/L 的琼脂,pH 调至 5.8,添加不同种类、不同浓度的植物生长调节剂,温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$,光照强度为 1 200~2 000 lx,每日光照 16 h,8 h 黑暗。培养基和接种所需各种器皿均放入高压锅内消毒灭菌,自然冷却后取出放入接种室备用。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对外植体成活率的影响

外植体的灭菌是整个培养过程中一个至关重要的环节。由表 2 可以看出,灭菌时间不同,扁桃成活率也存在差异。当酒精时间增大到 8 s 和 12 s 时接种的茎段没有污染,随着处理时间的延长污染率降低;当酒精消毒时间达 12 s 时,由于茎段比较嫩,伤害程度严重,恢复生长慢,造成成活率仅为 40%左右;总的来看当酒精处理时间为 8 s,次氯酸钠浓度为 2%和 4%时,苗的成活率较高,污染率相对较低,恢复生长的时间较快,数量较多,成活率比较理想,平均为 95.00%。

表 2 灭菌时间对外植体发芽情况的影响

酒精消毒 时间/s	次氯酸钠 浓度/%	接种数	成活数	成活率 /%	污染数	污染率 /%
4	2	30	24	80.00	1	3.33
4	4	30	26	86.67	1	3.33
4	6	30	23	76.67	0	0
8	2	30	29	96.67	0	0
8	4	30	28	93.33	0	0
8	6	30	25	83.33	0	0
12	2	30	14	46.67	0	0
12	4	30	14	46.67	0	0
12	6	30	12	40.00	0	0

2.2 不同激素水平对扁桃茎段增殖培养的影响

由表 3、4 可知,从极差上看,其值越大,表示该因素越重要,对试验的影响也最大。试验中扁桃“莎车大 3 号”的 3 个因素 R 值大小次序为 $A>B>C$;所以 6-BA 对“莎车大 3 号”茎段增殖的影响最大,而 GA_3 和 IAA 次之;6-BA 因素中以 1.0 mg/L 处理对“莎车大 3 号”茎段增殖效果最大, GA_3 为 0 mg/L,IAA 为 0.2 mg/L 的处理对“莎车大 3 号”的茎段增殖效果最好。因此“莎车大 3 号”的最优组合是 $A_1B_1C_2$,即 6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L。但从试验来看,最好的组合应是 $A_1B_1C_1$,即 6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L 组合的增殖率最高,增殖系数为 4.63。

扁桃“莎车 14 号”的 3 个因素 R 值大小分别次序为 $A>C>B$,即 6-BA>IAA> GA_3 ;所以 6-BA 对“莎车 14 号”茎段增殖的影响最重要,而 IAA 和 GA_3 顺序次之;6-BA 因素中以 1.0 mg/L 处理对“莎车 14 号”茎段增殖效果最大, GA_3 为 0.1 mg/L,IAA 为 0.3 mg/L 的处理对“莎车 14 号”的茎段增殖效果最好。因此“莎车 14

号”的最优组合是 $A_1B_2C_3$,即 6-BA 1.0 mg/L+ GA_3 0.1 mg/L+IAA 0.3 mg/L。但从试验来看,最好的组合应是 $A_1B_2C_2$,即 6-BA 1.0 mg/L+ GA_3 0.1 mg/L+IAA 0.2 mg/L 组合的增殖率最高,增殖系数为 4.20。

表 3 不同激素对比对增殖芽的影响

试验号	A(6-BA)	B(GA_3)	C(IAA)	接种数	成活数	增殖系数	
						“莎车大 3 号”	“莎车 14 号”
1	1	1	1	15	15	4.63	1.00
2	1	2	2	15	12	3.85	4.20
3	1	3	3	15	13	0	1.33
4	2	1	2	15	15	1.01	0.11
5	2	2	3	15	15	0	0
6	2	3	1	15	15	0	3.25
7	3	1	3	15	8	0	3.76
8	3	2	1	15	15	2.75	0
9	3	3	2	15	14	0	1.20

表 4 不同增殖培养基增殖系数极差分析

K_{ij}	“莎车大 3 号”			“莎车 14 号”		
	A(6-BA) /mg·L ⁻¹	B(GA_3) /mg·L ⁻¹	C(IAA) /mg·L ⁻¹	A(6-BA) /mg·L ⁻¹	B(GA_3) /mg·L ⁻¹	C(IAA) /mg·L ⁻¹
K_1	8.480	7.380	5.640	6.530	4.250	4.870
K_2	1.010	4.860	6.600	3.360	5.510	4.200
K_3	2.750	0	0	4.960	5.090	5.780
k_1	2.827	2.460	1.880	2.177	1.417	1.623
k_2	0.337	1.620	2.200	1.120	1.837	1.400
k_3	0.917	0	0	1.653	1.697	1.927
R	2.490	2.460	2.200	1.057	0.420	0.527

注: $K_1\sim K_3$ 为各因素每一水平之和; $k_1\sim k_3$ 为各因素每一水平均值;R 为最大与最小水平间距。

因此从表 3、4 可知,在这 3 个因素中,“莎车大 3 号”和“莎车 14 号”扁桃茎段增殖最重要的因素是 6-BA,最适宜的浓度是 1.0 mg/L,适当地加入 IAA 和 GA_3 均可提高嫩茎的增殖倍率。

3 结论与讨论

正确的消毒方式对扁桃组培起着至关重要的作用。扁桃一般消毒方式均采用 0.1%升汞消毒 7~8 min 后用无菌水冲洗 2~3 次,姜俊卿等^[9]认为田间萌发的 1 a 生嫩芽用升汞消毒处理 15 min,嫩芽也能保持较高的成活率。用升汞处理虽容易,但升汞有毒,在市场上不易买到,废液不易处理,若不及时回收易造成环境污染,如操作不当,对人也有危害。为此很多试验都已改用其它消毒剂来代替升汞,并进行研究。Fouad 等^[11]研究发现,采用 0.5%次氯酸钠比用 10%次氯酸钙或 0.2%升汞处理芽的成活率高。Hammerschlag^[12]研究认为用 0.5%次氯酸钠加 0.01%吐温消毒 15~20 min,再用 100 mg/L 青链霉素处理 15 min 污染最轻,为此该试验改用次氯酸钠进行灭菌,最终发现 2%和 4%次氯酸钠消毒 10 min 效果较好,污染率较低。

扁桃“莎车大 3 号”与“莎车 14 号”在增殖培养试验时发现,取材时间对扁桃外植体芽的诱导有影响。试验

中用同样的培养基在 10 月份至翌年 1 月初取的扁桃茎段诱导芽时间较长,生长缓慢,扁桃的离体培养条件下芽休眠期和萌动期与自然条件下十分相似,这与 Altman 等^[13]的研究结果一致。陈芳等^[5]认为在扁桃组织培养中,扁桃取材部位、茎段的长短也对扁桃的增殖有影响,试验中仅仅只注意取 1.5~2 cm 长的茎段,忽略了取样部位,这可能是芽的增殖效果不好的一个原因,取枝条顶部、中部及基部的具体哪种茎段适合培养基增殖还有待研究。

在筛选增殖培养基时,细胞分裂素与生长素的比例是影响繁殖系数和不定芽质量的主要因素,通过正交实验,有利于减少试验次数,节约经费。该试验结果表明,6-BA 是影响扁桃嫩茎增殖率的主要因子,这与刘进平等^[14]、陈子萱等^[6]的研究结果一致,IAA 与 GA₃ 的用量对增殖率的影响也有显著作用。在扁桃茎段增殖的正交实验中,扁桃“莎车大 3 号”在 3、5、6、7、9 号培养基上基部都形成了大量的愈伤组织,但是没有不定芽生成;而在 1 号增殖培养基上增殖效果最好,增殖系数最高,可达 4.63,增殖的苗高、壮、叶片浓绿;“莎车 14 号”在 5、8 号培养基上基部都形成了大量的愈伤组织,但是没有不定芽生成。当 6-BA 的浓度与 GA₃ 的浓度同时增高并不利于茎段芽的增殖,反倒促进愈伤组织形成,可能因为培养基中生长素与细胞分裂素的含量与外植体自身内源激素综合,二者的比例有利于愈伤组织的形成,这与 Christine 等^[15]的研究类似。经过试验可以看出,不同品种培养基的激素配方不一样对扁桃茎段增殖效果也不一样,适宜的 6-BA、IAA 与 GA₃ 这 3 种激素的配比对扁桃“莎车大 3 号”和“莎车 14 号”的增殖效果很大。扁桃“莎车大 3 号”的增殖最优培养基配比为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L;扁桃“莎车 14 号”的增殖最

优培养基配比为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L。

参考文献

- [1] 姬玉英,侯予红.巴旦杏及其生产现状简介[J].新疆林业,2001(4):36-48.
- [2] 兰彦平,吐拉克孜,郭文英,等.巴旦杏的研究现状及开发利用前景[J].林业科学研究,2004,17(5):674-679.
- [3] 武彦霞,王占和,何勇,等.我国扁桃的生产现状及发展前景[J].山西农业科学,2005,33(2):20-22.
- [4] 钟晓红,戴思慧,马定渭.核果类果树茎尖培养研究进展[J].果树学报,2003,20(5):388-392.
- [5] 陈芳,马显达,陆斌.扁桃茎尖组织培养的研究[J].云南林业科技,2000(6):24-28.
- [6] 陈子萱,曹孜义,田福平.扁桃砧木 Nemaguard 和 Lovell 的组培快繁[J].甘肃农业大学学报,2004,39(5):524-528.
- [7] 杨宁,李胜,张永军,等.扁桃砧木试管苗的生根及移栽[J].甘肃农业大学学报,2005,40(2):161-166.
- [8] 李康,陈聚衡.扁桃组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,1990,7(6):46.
- [9] 姜俊卿,冯建荣,张大海,等.正交设计南疆扁桃品种芽组培离体增殖研究[J].新疆农业科学,2010,47(8):1497-1500.
- [10] 高疆生,张卫芳,段黄金.建立巴旦杏试管苗无性系研究[J].山西果树,2001,4(1):4-6.
- [11] Fouad M M, Goraa A H, Abd El Zaher M H, et al. Factors influencing *in vitro* establishment and multiplication stages of peach[J]. Acta Horticulture, 1995, 409:191-196.
- [12] Hammerschlag F A. Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*[J]. Hort Science, 1982, 17(1):85-86.
- [13] Altman A, Goren R. Growth and dormancy cycles in citrus bud cultures and their hormonal control[J]. Physiol Plant, 1974(30):240-245.
- [14] 刘进平,曹孜义,李唯,等.5 个美国扁桃品种的微繁殖[J].北方果树,2003(3):1-3.
- [15] Christine H, Vendrig J C, Onckelen H V. The accumulation and metabolism on plant growth regulators during or gamogenesis in cultures of thin cell layers of Nicotiana tabacum[J]. Physiol Plant, 1991, 83:578-580.

Screening of the Multiplying Medium of Almond Stem

JIANG Xi, CHEN Jia-li, XIAO Wei, LIU Jian-liang, MA Qi, WANG Lin

(College of Plant Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: Selecting almond cultivars ‘Shacheda3’, ‘Shache14’ stem as materials, the ideal multiplying medium of them were screened through the orthogonal test of L₉(3⁴). The results showed that stems disinfection effect treated by 2%~4% NaClO for 10 min, after 70% ethanol for 8 seconds was the best, and the average survival rate could reach 95%. The optimum medium of multiplication for ‘Shacheda3’ was MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L, and the multiplication rate was 4.63; the optimum medium of multiplication for ‘Shache 14’ was MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L, and the multiplication rate was 4.20.

Key words: almond stem; multiplying medium; orthogonal experiment