

新疆野生巴旦杏的组织培养和植株再生

曾 斌¹, 罗淑萍², 李 疆¹

(1. 新疆农业大学 园艺学院, 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农业大学 农学院, 乌鲁木齐 830052)

摘 要: 本研究以生长在新疆北部塔城地区裕民县巴尔鲁克山的野生巴旦杏树当年结的种子为试材, 采用赤霉素 24 h 处理打破休眠, 之后使用常规法消毒后接种于诱导培养基上。生长约一个月后, 将由试管中种子培养长成的植株剪切成长约 1 cm 的单芽茎段, 接入增殖培养基增殖培养。野巴旦杏行实生及根茎繁殖, 在离体繁殖条件下很难生根, 本实验采用 100 mg/L IBA 进行浸渍处理 60 min 后, 再接入 1/2 MS 培养基中培养, 初期暗处理 2 周后置于白炽光下培养生根率可达 100%。而后生根的试管苗在珍珠岩基质中培养, 进行有效的移栽驯化管理, 获得了较理想的移栽成活率。成功地进行了野巴旦杏离体组织培养及植株再生。

关键词: 野生巴旦杏; 植物组织培养; 生根; 黑暗处理

中图分类号: S604

文献标识码: A

Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Amygdalus ledebouriana* Schleche in Xinjiang

ZENG Bin¹, LUO Shu-pin², LI Jiang¹

(1. College of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, 830052; 2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, 830052)

Abstract: The seeds of *Amygdalus ledebouriana* Schleche growing in the low region of Baerluk mountains of Tacheng district in Xinjiang were used as the experimental materials. The gibberellin was used to be treated with breaking dormancy for 24 h. After sanitizing planting in primary medium, one month later, single bud was cultured in elongation medium. twenty days later, 100% of rooting percentage was obtained with 100 mg/L IBA dipped in 60 min, initial dark was incubated for 2 weeks and continuously was developed to take root in room. Improvement in rooting percentage was obtained. Transplant in the same time to reduce humidity gradually, in this way the survival rate was higher.

Key words: *Amygdalus ledebouriana* Schleche; plant tissue culture; rooting; dark treatment

新疆野巴旦杏 (*Amygdalus ledebouriana* Schleche) 属蔷薇科 (Rosaceae), 李亚科 (Prunoideae), 扁桃属 (*Amygdalus*), 也称为矮扁桃, 在我国主要分布于中哈边境新疆塔城地区裕民县境内巴尔鲁克山的山地草原上, 成片集中分布, 海拔高度 900~1 200 m。在阿勒泰地区的布尔津和哈巴河境内也发现有生长。

巴旦杏原始树种是一种十分珍贵而古老的树种, 属新生代第三纪孑遗的物种, 在当今世界上已十分稀少, 被誉为“活化石”。而新疆塔城地区裕民县约 400 hm² 的野生巴旦杏林自然保护区, 是目前最大的野生巴旦杏生长区。是各国科学家研究野巴旦杏及有关植物演变史的重要科研基地^[1-3]。

野巴旦杏离体组织培养研究作为一个基础技术

收稿日期: 2006-9-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30460115); 新疆教育厅高校科研计划重点项目资助(XJEDU2006126)

通讯作者: 李疆, E-mail: lijiaojx@163.com

平台有很强的实际价值。其深入研究将对野巴旦杏繁殖生物学以及今后繁殖具有特殊有益于遗传性状的个体,进而将野生种中的抗性基因引入培养中的细胞或原生质体,并在整体植株中表达,进一步开发和利用,改良现有巴旦杏品种等方面均有深远意义。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

取自新疆北部塔城地区裕民县巴尔鲁克山区野生巴旦杏林自然保护区的成株树当年结的种子为试材。将种子机械破壳,小心不要伤及种仁。

1.2 无菌材料体系的建立

1.2.1 打破种子休眠

用 50, 100, 200, 300, 400 mg/kg 的赤霉素在 25℃, 3 000 lx 条件下,浸泡 24 h, 得出最适处理。

1.2.2 材料的消毒

处理后的种子移至超净工作台,小心剥去种皮。在 70% 的酒精液内消毒 15 s,再用 0.1% 的升汞加 4 mg/L 吐温 80 浸润液的混合液进行表面消毒,时间为 1 min。进行表面消毒时,因种子已剥去种皮,材料很嫩,这时操作速度一定要迅速,要不断振荡,使材料与消毒溶液充分接触。消毒后用无菌水冲洗 2 次,将野巴旦杏种仁平接入诱导培养基上培养。

1.2.3 无菌材料的启动和萌发

诱导野巴旦杏种子所用的培养基是以 MS 为基本培养基,BA 为 0.4 mg/L。所有培养基在诱导、增殖、壮苗培养时均附加蔗糖 25 g/L。各阶段培养基中琼脂均为 6 g/L,pH 值在灭菌消毒前调至 5.8,培养温度(25±2)℃,光照强度 3 000~3 500 lx,每天光照 14~16 h。而在生根培养时为蔗糖 15 g/L。

1.3 增殖培养

1.3.1 增殖培养中不同 BA 浓度梯度配比筛选

以 MS 为基本培养基,在不同的 BA(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 mg/L)浓度梯度水平下试验 BA 对受试材料的增殖效果。每瓶接种 3 个嫩茎,每梯度接 20 瓶。在(25±2)℃,光照强度 3 000~3 500 lx,每天光照 14~16 h 条件下培养,30 d 后观察统计嫩茎平均的增殖倍数。

1.3.2 增殖培养中不同 IBA 浓度梯度配比筛选

BA 对试管苗的分化和生长都有明显的影响,然而,苗生长的高度与 IBA 与 BA 的配比有关,在上一步实验的基础上,以 MS+BA0.6 mg/L 为对照,试验附加不同 IBA(0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06 mg/L)浓度下的嫩茎增殖情况。其它条

件同上。

1.4 壮苗培养

本实验在此阶段采用一组较低浓度的 BA(0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg/L)对野巴旦杏增殖的材料进行壮苗培养。取继代增殖 3 代以上的丛生芽为材料进行壮苗培养,30 d 后针对壮苗后的株高、枝粗、叶数、叶长、叶宽和叶间距等指标采用定性观察分析壮苗效果。确定壮苗培养适合的 BA 浓度。其他培养条件同上。

1.5 生根培养

生根培养材料都是经壮苗培养后整齐并健壮的嫩茎。

采用常用的生根基本培养基 1/2MS,附加不同组合的生长素或生长素和 BA,观察新疆野巴旦杏材料的生根效果。

A1:1/2MS+0.20 mg/L IBA+1.50 mg/L IAA

A2:1/2MS+0.60 mg/L IBA+1.00 mg/L IAA

A3:1/2MS+0.80 mg/L IBA+0.80 mg/L IAA

A4:1/2MS+1.00 mg/L IBA+0.50 mg/L IAA

A5:1/2MS+2.00 mg/L IBA

A6:1/2MS+0.04 mg/L BA+1.00 mg/L IBA

A7:1/2MS+0.04 mg/L BA+1.50 mg/L IAA

试验分两组处理,第一组是在光强为 3 000~3 500 lx 白炽灯管作光源的连续光照中进行培养,温度为(25±2)℃,以上培养基中分别接种 20 瓶,每瓶中接 3 个嫩茎,第二组是在黑暗条件下培养 2 周,然后置于散射光下培养,其它条件同上,30 d 后进行观察统计生根率、平均根数/株、平均根长等指标。

使用高浓度 IBA 100 mg/L 溶液浸渍处理嫩茎基部,观察不同浸渍时间对新疆野巴旦杏材料的生根效果。

选取整齐一致的新疆野巴旦杏材料经过壮苗培养后的嫩茎,约长 3~5 cm,在 100 mg/L IBA 溶液中分别浸渍 15, 30, 60, 120 min,每种浸渍时间均处理 50 株嫩茎。而后接种在 1/2MS 培养基中,分别在以白炽灯管为光源,光强为 3 000~3 500 lx 的连续光照下和在黑暗中培养 2 周再置于 3 000~3 500 lx 光强下培养,温度均为(25±2)℃。其他条件及观察方法同上。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的赤霉素 GA₃ 对野巴旦杏种子休眠的打破

从表 1 可见,300 mg/kg 浓度的 GA₃ 处理过后

的种子进行消毒之后,接入诱导培养基中的出苗率最高,为 92%。这一浓度短时间解除野巴旦杏种子休眠很理想。

表 1 不同浓度的 GA₃ 对野巴旦杏种子休眠打破的影响
Table 1 Influence of different GA₃ concentration on breaking seed dormancy

浓度 (mg/kg)	处理种子数 (粒)	诱导出苗数 (个)	出苗率 (%)
50	50	0	0
100	50	12	24
200	50	31	62
300	50	46	92
400	50	39	78

2.2 增殖培养中不同 BA 浓度梯度配比对野巴旦杏嫩茎的增殖效果

一般来说,最优化的增殖体系不但要有较高的嫩茎增殖率,而且还要有健壮形态、颜色及方便于转接所需要的枝高。

针对受试材料,在 MS 培养基中加入不同浓度的 BA,在 0.6 mg/L 时,平均嫩茎增殖率达 3.55,其它几个处理都不理想(图 1)。

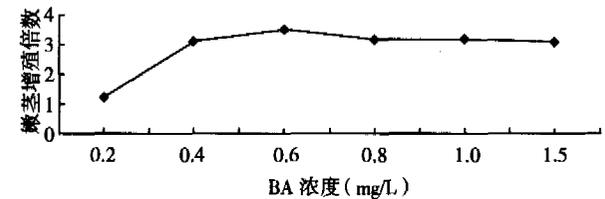


图 1 不同浓度的 BA 对新疆野巴旦杏增殖的影响
Fig. 1 Influence of different BA concentration on *Amygdalus ledebouriana* Schlecht

2.3 增殖培养中不同 IBA 对受试材料的增殖效果

针对新疆野巴旦杏受试材料,以 MS + BA 0.60 mg/L 为对照,在 MS + BA 0.60 mg/L 的基础上加入不同浓度的 IBA,对受试材料嫩茎的分化和生长发育有明显的影 响。在对照 MS + BA 0.60 mg/L 上附加 IBA 0.02 mg/L 时,嫩茎平均增殖倍数及平均苗高度均为最佳,分别达到 4.65 倍及 4.5 cm 高。同时据观察嫩茎粗度的增加以及叶间距的增大都是很明显的。增殖效应很好(图 2)。

2.4 壮苗培养

在许多植物的微繁殖中,伸长培养是同生根培养阶段结合在一起的,也有的是同增殖及生根阶段结合在一起的。据经验,由于巴旦杏的增殖培养后形成的微型枝芽在培养后期的阶段中单个嫩茎不便于操作,不够健壮的枝芽在生根培养反应也极差,比

如生根率低及根数也较少。而且直接影响到以后的移栽成活率。在一些难以生根的果树微繁殖中,在加有较高浓度的细胞分裂素的增殖阶段后紧接着进行一个低浓度细胞分裂素的壮苗阶段可以改变植物体内内源激素水平的平衡,从而有利于以后的生根^[4,5]。

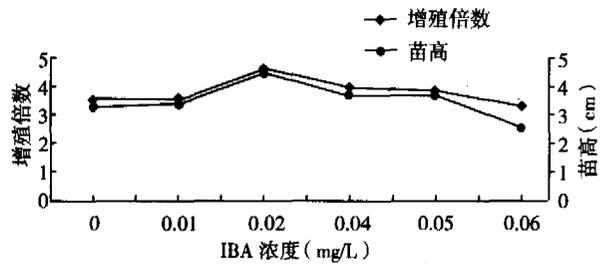


图 2 不同浓度的 IBA 对新疆野巴旦杏增殖的影响
Fig. 2 Influence of different IBA concentration on *Amygdalus ledebouriana* Schlecht

壮苗培养后的植株嫩茎应尽可能地具有较大的茎高和茎粗,最多的叶数,合适的叶间距以及较大的叶长和叶宽,在本实验中,培养 30 d 后通过定性对比观察分析,发现新疆野巴旦杏受试材料在 MS + BA 0.10 mg/L 培养基中培养,经对比观察,在茎高、茎粗、叶色、叶数、叶间距、叶长和叶宽等形态特征等指标方面综合评价都优,壮苗效果良好(图 3~5)。



图 3 壮苗情况 1
Fig. 3 Elongating seedling 1



图 4 壮苗情况 2
Fig. 4 Elongating seedling 2



图5 弱苗情况

Fig. 5 Weaking seedling

2.5 生根培养

2.5.1 培养基中附加不同组合的生长素或生长素和 BA 对新疆野巴旦杏的生根效果

全光照条件下,所有的实验处理生根效果都很差,基本都没有生根。而预先在黑暗条件下培养,有4种生长调节物质组合能生根,生根率最高为1/2MS+BA0.04 mg/L+IBA1.0 mg/L组合,生根率仅为70%(表2)。

表2 预先暗培养条件下,不同组合的生长素或生长素和 BA 对新疆野巴旦杏的生根效果

Table 2 Effects of different combinations of auxins, or auxins and BA on rooting of *Amygdalus ledebouriana* Schlecht

激素组合(mg/L)			生根数	生根率	平均根数	根长
BA	IBA	IAA	(条)	(%)	(条/株)	(cm)
0.04		1.5	6	10	1.0	1.0
0.04	1.0		42	70	3.0	1.9
	0.2	1.5	0			
	0.6	1.0	0			
	0.8	0.8	30	50	2.0	1.3
	1.0	0.6	36	60	2.7	1.8
	2.0	0	0			

据常永健等人对苹果茎尖培养中植物激素与不定根形成关系研究,在一定 IBA 浓度范围内,随外源 IBA 浓度的增加,内源 IAA 含量会增加,ABA 含量减少,IBA 浓度超一定浓度时,内源的 IAA 含量反而会有所下降,ABA 含量会增加,而内源 IAA 浓度同生根能力呈现相关^[6]。在本次实验中 IBA 浓度在 0.8~1.0 mg/L 范围内有一定生根现象。

2.5.2 100 mg/L IBA 溶液浸渍处理嫩茎基部,浸渍时间对新疆野巴旦杏材料的生根效果

由表3可知,在100 mg/L IBA 溶液中浸渍不同时间处理后的嫩茎,在连续的全光照下均未生根,

而在黑暗中培养2周而后再于连续光照下培养均有较高的生根率,有些达到100%的生根率,效果很好,从生根率、每嫩茎生根数、根长及平均每株根数等综合考虑来看,其中浸渍60 min的情况最佳。

表3 预先暗培养条件下,100 mg/L IBA 溶液浸渍处理嫩茎基部,不同浸渍时间对新疆野巴旦杏材料的生根效果

Table 3 Effect of time of dip in 100 mg/L IBA and light or dark treatment on shoot rooting

浸渍时间 (min)	生根数 (条)	生根率 (%)	平均根数 (条/株)	根长 (cm)
15	35	70	2.36	1.78
30	45	90	4.55	1.90
60	50	100	6.00	2.68
120	50	100	2.65	1.89

3 移栽驯化

对受试材料的试管苗进行增殖、壮苗及生根后,取健壮的苗,先进行闭瓶强光炼苗(20 000~30 000 lx自然光下)10 d左右,之后逐渐揭开封口膜,试管苗出瓶。出瓶后即可进行瓶外珍珠岩基质移栽。移栽前注意对珍珠岩基质进行消毒处理,在珍珠岩苗钵中,将MS营养液配制成原液浓度的1/4倍营养液浇灌移栽苗,移植中保持温度为20~25℃,相对湿度大于80%的条件下,成活率均可达90%左右。

4 讨论

用野生巴旦杏种子做外植体进行试验时,种皮的去除是种子萌发较关键因素之一。试验结果表明,去除种皮的种子比带种皮的种子萌发率高很多。主要原因是由于带种皮的种子在组织培养中易发生污染,并且褐变现象较明显。赤霉素浸泡后去除种皮,再接入培养基中培养成活率则明显提高^[7]。

在难以生根的果树微繁殖中,常采用一个壮苗培养的过渡过程。Rugini E, D C Verma 在巴旦杏品种壮苗培养过程中,使用0.20 mg/L BA,同时省去了NAA^[5],效果较好;而李康、陈聚恒在对新疆本地的品种如双仁软壳、小软壳、小薄壳、双果、大巴旦等进行微繁殖时,采用0.10 mg/L BA^[4]。本实验针对新疆野巴旦杏增殖材料发现在MS+0.10 mg/L BA 培养基中壮苗效果很好。在此阶段多数资料包括本实验均以定性观察分析结果,如何

确定一种合适的定量测定相关指标的方法还有待于进一步的研究。

生根过程是受许多因子影响的复杂的生理生化过程,这些因子包括遗传因子、生长调节剂、酚类化合物、光周期、光强和光质等,特别在生根培养的前几周,黑暗对许多木本树种刺激生根是必要的。Barghchi M and PG Alderson 实验表明,在 IBA 的条件下,将阿月浑子的嫩茎外植体预先在黑暗中培养 7 d 可以提高生根率^[8]。Zimmerman RH and Fordham I 也表明,在根发端阶段不采用通常的 16 h:8 h 光照培养,而是采用连续黑暗培养,有利于过氧化物酶活性的变化,同时诱导出较高比例的生

根植株^[9]。在本实验中采用前期适当的全黑暗处理进行生根,效果较好。

野生巴旦杏常规行实生及根茎繁殖,在离体繁殖条件下非常难生根,李康等利用 100 mg/L IBA 溶液浸渍处理新疆巴旦杏地方品种的嫩茎,15 min 即可使生根率接 100%,每株生根数为 4~5 条^[4]。本实验利用高浓度 IBA 浸渍处理后再接入 1/2MS 培养基中培养,对新疆野巴旦杏增殖材料的生根效果也很好。分析这可能是高浓度生长素 IBA 短时处理,积累量恰好足以在生根阶段很好的促使生根。这种方法在许多很难生根的木本果树上效果均不错。

参考文献:

- [1] 朱京琳. 新疆巴旦杏[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,1984:11-13.
- [2] 郭仲军,李行斌,汪志军. 新疆野巴旦杏[J],中国野生植物资源,2002,(1):21.
- [3] 李疆,曾斌,罗淑萍,等. 我国野扁桃资源的保护及引种繁育[J],新疆农业科学,2006,43(1):61-62.
- [4] 李康,陈聚恒. 扁桃组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,1990,(6):46.
- [5] Rugini E, D C Verma. Micropropagation of a difficult to propagate almond(*Prunus amygdalus*, Batsch) cultivar[J]. Plant Sci. Lett., 1983, 28: 273-281.
- [6] 常永健,陈四维,马宝昆,等. 苹果茎尖培养中植物激素与不定根形成关系的研究[J]. 河北农业大学学报,1991,14(4):1-5.
- [7] 曾斌,郑华云. 巴旦杏砧木组织培养及植株再生[J]. 经济林研究,2005,23(2):21-23.
- [8] Barghchi M, P G Alderson. In vitro propagation of *Pistacia* veral species[J]. Acta Hort. , 1983, 131: 49-60.
- [9] Zimmerman R H, Fordham I. Simplified method for rooting apple cultivars in vitro[J]. J. Am. Soc. Hortic. Sci, 1985, 110: 34-38.