

花楸腋芽增殖途径快繁技术研究

郭艳茹¹ 詹亚光^{2*} 纪丽丽³

(1. 运城学院生命科学系, 运城 044000)

(2. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

(3. 黑龙江林业职业技术学院, 牡丹江 157011)

摘 要 选用花楸茎节为外植体进行组培腋芽增殖途径研究, 结果表明: 利于花楸生长的最适宜基本培养基为 MS 培养基; 芽诱导培养基为 $1/2MS + 6-BA\ 2.5\ mg \cdot L^{-1} + 2.4-D\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$; 增殖培养基为 $MS + 6-BA(1.600 \sim 2.100)\ mg \cdot L^{-1} + NAA(0.140 \sim 0.230)\ mg \cdot L^{-1}$, 平均繁殖系数达到 13 倍以上; 继代壮苗培养的最佳培养基为 $MS + 6-BA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1} + IBA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1}$; 在 $1/2MS + IBA\ 0.3\ mg \cdot L^{-1}$ 培养基上, 平均生根数为 5.96, 生根率达 90.20%。将生根后的组培苗移栽至腐殖土: 泥炭土: 河沙 (比例为 3:2:1) 的基质中, 成活率达 95.55%。

关键词 花楸腋芽; 组织培养; 快速繁殖

The Rapid Propagation Technology of *Sorbus pohuashanensis* by Axillary Bud Regeneration Way

GUO Yan-Ru¹ ZHAN Ya-Guang^{2*} JI Li-Li³

(1. Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng 044000)

(2. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

(3. Heilongjiang Forestry Vocation-Technical College, Mudanjiang 157011)

Abstract In order to study the rapid propagation technology for *Sorbus pohuashanensis* stem segments with axillary buds were chosen as explants. The results showed that the best basic media was MS; axillary buds were induced successfully on MS basal media supplemented with 6-BA ($2.5\ mg \cdot L^{-1}$) and 2.4-D ($0.5\ mg \cdot L^{-1}$); the optimum medium for bud proliferation was $MS + 6-BA(1.600 \sim 2.100)\ mg \cdot L^{-1} + NAA(0.140 \sim 0.230)\ mg \cdot L^{-1}$, 13 shoots per explant could be obtained at average; the shoots grew strongly on $MS + 6-BA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1} + IBA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1}$; And $1/2MS + IBA\ 0.3\ mg \cdot L^{-1}$ was the best medium for shoot rooting, with the rooting rate at 90.20%, and the average root number of 5.96; Plantlets survival rate reached 95.55% when transplanted on the mixture (humus 3: peat soil 2: sand 1).

Key words *Sorbus pohuashanensis* axillary bud; tissue culture; rapid propagation

花楸 (*Sorbus pohuashanensis* Hedl.) 属蔷薇科、苹果亚科、花楸属植物, 落叶小乔木, 树形丰满优美, 是具有很高开发价值的树种^[1]。其成苗春季树满银花, 夏季羽叶秀丽, 秋季叶如枫叶, 金黄至桔红色果实挂满枝头, 冬季宿存果实更加红艳, 是我

国北方珍贵野生观花、观叶、观果的绿化树种。且其抗烟、抗污染、抗病虫能力较强, 对有害气体的污染有较强的抗性 (SO_2 、 SO_3 、 CO_2 等)。自然条件下散落的花楸种子大多不能正常发芽, 而且利用花楸种子进行育苗存在耗时长、成型慢、采种母树不足

基金项目: 大庆地区抗旱耐盐绿化树种资源的选择、引种及产业化繁殖技术研究 (大庆市科学技术计划项目)

第一作者简介: 郭艳茹 (1980—), 女, 助教, 主要从事植物学研究。

* 通讯作者: E-mail: yaguangzhan@126.com

收稿日期: 2006-08-31

且种子收集困难等问题。基于国内外研究的现状,尚无经叶腋增殖途径繁殖花楸的报道。本文以花楸带腋芽茎段为外植体,经叶腋增殖途径利用组织培养技术来快速繁殖和培育花楸苗木,从而弥补传统育苗的不足,不受季节、时间等影响,可大大提高繁殖系数和工作效率;且进一步研究了花楸组织培养过程中最适宜的激素种类、浓度配比和最基本的培养基,建立高效的叶腋增殖快繁技术,并对其组培系统增殖环节进行优化,为今后花楸快速繁殖的工厂化育苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为东北林业大学林木遗传育种试验基地内的花楸2年生幼树当年萌生新枝茎节。

1.2 试验方法

1.2.1 材料接种 剪取花楸当年萌生新枝,切成带腋芽茎段,依次进行自来水冲洗2 h,抽真空处理20 min,70%的乙醇浸30 s,3%的NaClO消毒10 min,无菌水冲洗5~6次后,用消毒滤纸吸干表面水分,接入诱导培养基 $1/2MS + 6-BA\ 2.5\ mg \cdot L^{-1} + 2.4-D\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$ ^[3]中,培养约15 d左右,在叶腋处出现茎的增粗膨大,表面出现许多芽原基,21 d以后逐渐形成丛生芽。

1.2.2 增殖培养 待叶腋新生侧芽长至2~3 cm,切下接入增殖培养基中进行培养。增殖基本培养基选用 MS ^[3]、 WPM ^[3]、 NT ^[3]、 IS ^[4],添加 $6-BA\ 2\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1}$ 。每种培养基接种30个外植体(表1),28 d后,比较不同基本培养基中植株的增殖芽数、不定芽长度、芽伸长情况、叶片状态和植株长势。在选出基本培养基的基础上,采用MINITAB软件进行二次回归通用旋转组合设计^[5],可将6-BA(在预实验基础上确定临界值分别

为 $1.0\ mg \cdot L^{-1}$ 和 $3.0\ mg \cdot L^{-1}$)和NAA(在预实验基础上确定临界值分别为 $0.1\ mg \cdot L^{-1}$ 和 $0.3\ mg \cdot L^{-1}$)组成13种不同培养基,每处理接种30个外植体,进行生长调节物质组合的优化,设计方案见表2,28 d统计不同处理单株外植体的平均增殖芽数。

1.2.3 壮苗培养 通过分化得到的花楸丛生芽数量多但比较细弱,不够健壮,生根困难而且成活率低,需通过壮苗来改善芽生长状况。将增殖培养后的丛生芽切成单芽,接种于壮苗培养基中进行培养,每个处理接种30个外植体,壮苗培养的基本培养基及激素组合设计方案见表4。

1.2.4 生根培养 将长于2 cm的健壮嫩枝切下,转入生根培养基中,进行生根培养。培养基分别为 $1/2MS + NAA(0.2, 0.3, 0.6)\ mg \cdot L^{-1}$ 和 $1/2MS + IBA(0.2, 0.3, 0.6)\ mg \cdot L^{-1}$ (见表5)。

1.2.5 炼苗与移栽 生根培养21 d后将培养瓶移至温度 $(23 \pm 2)^{\circ}C$ 、光照强度 $0.4 \sim 0.5\ mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 、湿度85%以上的温室内开瓶炼苗2~3 d。移栽时洗净根部培养基,移栽至装有通过高压灭菌处理过的基质(腐殖土:泥炭土:河沙=3:2:1)的小营养钵内。移栽后每天喷雾状水4~5次,并用同样大小的空营养钵覆盖,并留有缝隙以利于空气流通。约7 d后将覆盖营养钵去除,增加光照强度,20 d左右移栽苗有新根生出时可逐渐减少喷水次数,使小苗适应自然条件。在移栽第21 d时统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 增殖培养

2.1.1 增殖基本培养基的选择

将嫩芽接种于如下(表1)培养基中,比较基本培养基的效果。

表1 不同基本培养基对分化芽生长的影响

Table 1 Effect of different basic media on adventitious bud growth

培养基 Medium	增殖芽数 Propagation buds	不定芽长度 Length of buds (cm)	芽伸长情况 Elongation status of buds	叶片状态 Leaf status	植株长势 Developing status
IS + 6-BA0.2 + NAA0.2	3~6	0.5~1.0	稍伸长 Little elongation	小且黄 Small and yellow	矮小且生长缓慢 Small and grew slowly
NT + 6-BA0.2 + NAA0.2	6~8	0.5~1.0	稍伸长 Little elongation	小卷曲 Small and crimp	较健壮 Stronger
WPM + 6-BA0.2 + NAA0.2	≤3	≤0.5	不伸长 No elongation	小且黄 Small and yellow	矮小 Short
MS + 6-BA0.2 + NAA0.2	≥10	1.0~3.0	伸长 Elongation	大翠绿 Big and green	健壮,较高大 Strong and tall

在 MS 中植株生长健壮,叶大翠绿,生长迅速,增殖芽数 ≥ 10 个且多伸长,生长状况最好;IS 中植株矮小,生长缓慢,叶小且黄,增殖芽数 3~6 个且不定芽长度在 0.5~1.0 cm 之间;在 NT 中植株较健壮,叶小卷曲,增殖芽数 6~8 个但长度较短;在 WPM 中生长的植株矮小,叶小且黄,增殖芽数 ≤ 3 个,不定芽长度 ≤ 0.5 cm。在增殖培养阶段,获得最高增殖芽数是主要目的,所以选用 MS 为花楸基本培养基,且在此培养基中一次继代(28 d)新芽长度均在 1.0 cm 以上。

2.1.2 不同激素组合对增殖的影响

将芽接种在由 MINITAB 软件设计的含不同激素组合的培养基上,结果发现增殖培养中所含有的各种激素组合处理都能使单芽增殖为芽丛,诱导率为 100%。不同激素组合处理对不定芽增殖能力的影响见表 2。

表 2 不同激素组合对增殖芽数的影响
Table 2 Effect of different hormones on multiplication

序号 No.	培养基 Medium	6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	增殖芽数/单株 Axillary buds (single)
1	MS	2.000	0.200	11.53
2	MS	3.000	0.100	9.97
3	MS	1.000	0.100	10.21
4	MS	2.000	0.200	11.75
5	MS	0.586	0.200	9.63
6	MS	2.000	0.200	12.79
7	MS	1.000	0.300	11.63
8	MS	2.000	0.341	10.20
9	MS	2.000	0.200	13.60
10	MS	2.000	0.200	10.33
11	MS	3.414	0.200	8.85
12	MS	2.000	0.059	11.17
13	MS	3.000	0.300	9.83

花楸腋芽的增殖主要受细胞分裂素 BA 与生长素 NAA 相对浓度的影响。利用 MINITAB 软件进行方差分析结果表明,所设计的 6-BA、NAA 及 6-BA 与 NAA 组合的浓度处理对单株增殖芽数的作用差异不显著(表 3),这说明试验所设计的激素(组合)浓度范围均在高效不定芽诱导的有效区间,这可能与经预试验后确定的两种激素临界值有关。

为了进一步确定不定芽最大增殖数目的激素组合最适范围,利用 MINITAB 软件进一步对结果进行分析并结合试验实践结果,从中选出平均繁殖系数大于 13 的激素组合范围为 6-BA ($1.600 \sim 2.100$) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA ($0.140 \sim 0.230$) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (见图 1,2)。

表 3 激素处理对增殖芽数(/单株)影响的方差分析

Table 3 Variance analysis of effect of hormones on multiplication (single)					
	自由度 SS	平方和 DF	均方 MS	F 值 F	显著水平 Notable distinguish
6-BA	2	0.846 8	0.423 4	0.24	0.789
NAA	2	8.823 1	4.411 5	2.55	0.147
6-BA $\times$ NAA	1	0.372 1	0.372 1	0.22	0.657
误差 Enor	7	12.111 3	1.730 2	1.730 2	—
总变异 Sum	12	22.153 3	—	—	—

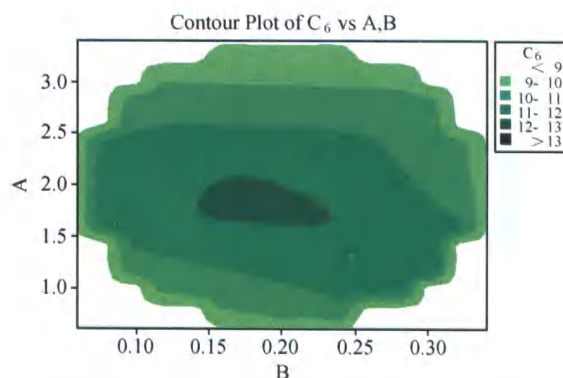


图 1 不同激素组合范围对芽增殖数目的影响

A:6-BA; B: NAA; C₆: 每单株芽增殖平均数

Fig. 1 Effect of different hormones scale on multiplication

A:6-BA; B: NAA; C₆: Average multiplication of single

2.2 壮苗培养基的选择

壮苗环节目的是促进芽伸长展叶,快速生长,抑制侧芽分化,是获得高质量健壮组培苗的关键。将增殖培养后的丛生芽切成单芽,接种于下列设计的壮苗培养基上(表 4)。

附加 6-BA 时,当 6-BA 的浓度 ≥ 0.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,叶腋处有侧芽分化;当 6-BA 的浓度在 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,无分化发生,且植株生长健壮,在组合 6~14 间进行多重比较结果表明:壮苗后平均苗高存在不同生长调节物质组合间的显著差异;组合 9~14 为利用生根培养基进行壮苗,在不添加 6-BA,而只添加 NAA 或 IBA 时,无根苗生根且生长健壮,但生根期间茎端生长相对受阻。从试验结果中,选出的最佳壮苗培养基为 MS + 6-BA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在此培养基中植株无分化现象发生,仅保持旺盛生长,无根苗叶大,叶色翠绿,茎粗,平均株高 3.5 cm 以上(见图 2)。

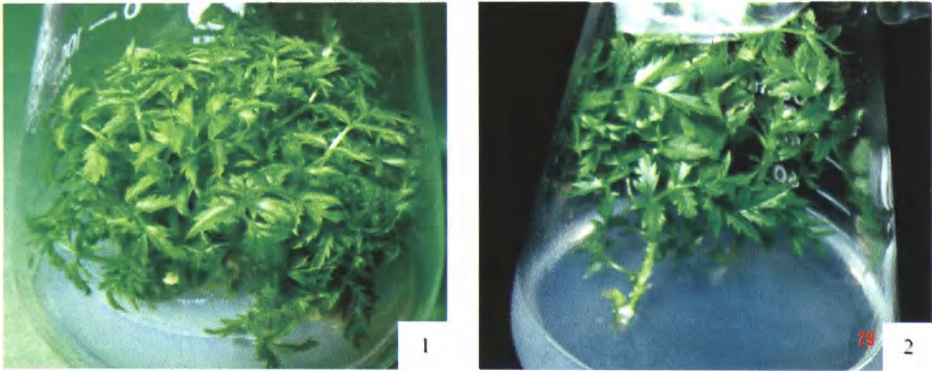


图2 腋芽增殖阶段及壮苗阶段照片 1. 增殖阶段;2. 壮苗阶段
Fig.2 Photos of axillary shoots proliferation and strong seedlings 1. Axillary shoots proliferation;2. Strong seedings

表4 不同壮苗培养基中苗生长状况形态描述及多重比较

Table 4 Descriptive of seeding on different medium for strong seeding and Duncan's Multiple Test

培养基 Medium	接种前平均株高 (cm) Mean height before inoculation	壮苗后平均株高 (cm) Mean height after culture	侧芽分化情况 Status of buds differentiation	叶片状态 Status of leaf
MS + 6-BA1.0 + NAA0.3	1.0	2.0	Yes	无黄叶;较大 No yellow leaf, bigger
MS + 6-BA0.5 + NAA0.3	1.0	2.5	Yes	无黄叶;较大 No yellow leaf, bigger
MS + 6-BA0.4 + NAA0.2	1.0	2.0	Yes	1/3 有枯叶;叶大 1/3 have filemot leaf, big
MS + 6-BA0.4 + NAA0.3	1.0	1.8	Yes	1/3 有枯叶;叶小 1/3 have filemot leaf, small
MS + 6-BA0.4 + NAA0.6	1.0	1.5	Yes	1/3 有枯叶;叶小 1/3 have filemot leaf, small
MS + 6-BA0.2 + IBA0.2	1.0	3.5c	No	叶翠绿;叶大 green, big
MS + 6-BA0.2 + IBA0.3	1.0	2.5b	No	叶翠绿;较大 green, bigger
MS + 6-BA0.2 + IBA0.6	1.0	2.0a	No	叶黄绿;较大 yellow and green, big
1/2MS + NAA0.2	1.0	2.5b	No	无枯叶;叶大 No filemot leaf, big
1/2MS + NAA0.3	1.0	2.5b	No	有枯叶;较大 have filemot leaf, bigger
1/2MS + NAA0.6	1.0	2.0a	No	叶较绿;较大 greener, bigger
1/2MS + IBA0.2	1.0	2.5b	No	无枯叶;较大 no filemot leaf, bigger
1/2MS + IBA0.3	1.0	2.5b	No	有枯叶;较大 have filemot leaf, bigger
1/2MS + IBA0.6	1.0	2.0a	No	有枯叶;较大 have filemot leaf, bigger

2.3 生根培养基的优化选择

以1/2MS添加不同浓度的IBA和NAA作为生根培养基。当侧芽长到1.5~2.0 cm即进行生根培养。7 d后,芽基部出现根原基突起,逐渐长出白色新根,21 d后统计生根试验结果(见表5)。

生根培养基选用1/2MS为基本培养基,蔗糖均为20 g·L⁻¹,附加不同浓度NAA和IBA,四周后统计结果。结果(表5)表明,不同处理间在生根率和平均生根数两方面均存在显著差异,适宜浓度

的IBA和NAA均有利于生根,花楸的平均生根数、生根率在IBA浓度为0.3 mg·L⁻¹时达到最高,分别为5.96条/单株、90.20%。同时发现在同一浓度下,添加IBA比添加NAA的平均生根数和生根率都高,在NAA浓度为0.3 mg·L⁻¹时,花楸的平均生根数及生根率分别为4.67条/单株、60.00%。生长素的种类和浓度对生根率、平均生根数有明显的影响,生长素IBA对花楸的生根效果好,最适宜的生根培养基是1/2MS + IBA 0.2 mg·L⁻¹。

表5 不同培养基的生根数、生根率及多重比较
Table 5 The rooting number and rooting rate on different medium and Duncan's Multiple Test

序号 No.	培养基 Medium	平均生根数 Average number of roots	生根率 Rooting rate
1	1/2MS + NAA0.2	4.86b	46.70% c
2	1/2MS + NAA0.3	4.67b	60.00% b
3	1/2MS + NAA0.6	1.80d	16.70% d
4	1/2MS + IBA0.2	5.88a	83.30% a
5	1/2MS + IBA0.3	5.96a	90.20% a
6	1/2MS + IBA0.6	2.38c	43.30% c

2.4 炼苗与移栽

以腐殖土:泥炭土:河沙(3:2:1)为基质,进行移栽,移栽成活率达95.55%以上。但需要注意的是花楸幼苗喜凉爽、忌高温,一般情况下,在气温较高的6、7月份,幼苗死亡率较高,移植季节最好在凉爽的春季或初夏,此结果与于春江等人的试验结果相一致^[6]。

3 讨论

(1)花楸茎段表面生有表皮毛,灭菌困难。要采用特殊的浸润处理,且要严格掌握消毒时间。可在消毒前用抽真空处理,去除茎段表面的气泡,以利于消毒液与茎段表面的充分接触,此外,还要在消毒液中添加吐温-20,也是为了达到同样的目的。消毒时间不能过短,否则污染率过高,而消毒时间过长则会伤害植物组织,造成组织坏死。

(2)不同植物有不同的生物学特性,对营养的要求也不同。木本植物组培中应用最广泛的是MS培养基,它的无机盐含量较高,微量元素种类较全,浓度较高。在本试验中,筛选出的适合花楸腋芽分化增殖的基本培养基为MS培养基,和前人得出的结果一致^[7],这说明较高的盐浓度有利于花楸腋芽的分化增殖、壮苗。和绝大多数植物一样,降低无机盐的浓度有利于花楸的生根。

(3)由于花楸不定芽增殖能力旺盛,形成的丛生芽叶小且茎脆而嫩,达不到直接生根和移栽的要求。壮苗培养在得到健壮单株过程中起到了关键

性的作用。花楸丛生芽的壮苗主要受激素浓度和比例的影响,在 $6\text{-BA} \geq 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,无论生长素(NAA、IBA)浓度高低,植株分化率均呈上升趋势,当同时添加的NAA、IBA $> 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,植株矮小、叶黄,因此壮苗培养应保持较低的生长素浓度。本研究选出的最佳壮苗培养基是MS + $6\text{-BA} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,6-BA与IBA的比值为1。而在仅添加生长素的生根培养基进行壮苗,会阻碍苗端生长,使壮苗时间延长。

此外,壮苗培养还可以解决以下问题:(1)高浓度的6-BA施用后的后效作用。由于增殖培养过程中添加了高浓度的6-BA,产生的后效作用仍然能促进芽分化增殖,但抑制了芽的伸长生长^[8],并导致生根缓慢,育苗周期延长,通过在壮苗培养过程中降低6-BA的浓度,并适当添加适量的生长素可以克服以上不足。(2)克服组培苗玻璃化现象^[9]。组培苗的大量增殖使得不定枝长势纤细,且较容易出现增殖芽的玻璃化现象,通过壮苗培养可使不定枝生长健壮,有利于在移栽过程中提高移栽成活率。

参 考 文 献

1. 周以良,董世林,聂绍荃. 黑龙江树木志[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1986:334-335.
2. 王志,王淑华,李鑫,等. 黑果腺肋花楸的组织培养繁殖[J]. 北方果树,2002(1):10-11.
3. 孙敬三,桂耀林. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京:科学出版社,1995:403-423.
4. Sato T, Ide Y, Saito A. Tissue culture technology in rapid clonal Propagation of Japanese White birch[J]. J Jpn For Soc,1986(68):343-346.
5. 袁志发,周静芋. 实验设计与分析[M]. 北京:高等教育出版社,2000:366-372.
6. 于春江,丁长廷,李殿波,等. 绿化树木花楸及其栽培技术[J]. 中国林副特产,1998(2):21-22.
7. 杜保国,杨途熙,魏安智,等. 桤叶唐棣组织培养研究[J]. 西北植物学报,2005,25(2):400-404.
8. 王冬梅,黄学林,黄上志. 细胞分裂素类物质在组织培养中的作用机理[J]. 植物生理学报,1996,32(5):373-377.
9. 周莉娟,姜秀勇. 影响香石竹组培苗玻璃化的若干原因[J]. 福建农业学报,1999,14:102-106.