

## 钟花樱组织培养中多因子正交试验研究

王贤荣, 荣冬青

(南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

**摘要:** 采用正交设计方法, 研究 6-BA、NAA、2,4-D 及外植体 4 种不同因素及其组合对钟花樱愈伤组织及丛生芽诱导率的影响。试验结果统计分析表明, 外植体是诱导愈伤组织和诱导丛生芽的最主要因素。诱导愈伤组织的最佳组合为 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D + 叶片, 其诱导率为 94.5%; 诱导丛生芽的最佳组合为 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 带芽茎段, 其诱导率为 37.5%; 增殖培养中, 以 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA 效果最好, 增殖率为 460%; 当株高在 2 cm 以上时, 转入 1/2MS + 0.8 mg·L<sup>-1</sup> IBA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 生根培养基上, 接种 30 d 后, 生根率可达 90%, 移栽成活率达 92%。

**关键词:** 钟花樱; 正交试验; 组织培养

中图分类号: S723.132

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2008)02-0169-05

### Application of orthogonal design in tissue culture of *Cerasus campanulata* (Rosaceae)

WANG Xian-rong, RONG Dong-qing

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037)

**Abstract:** Effects of 6-BA, NAA, 2,4-D and different explants on callus induction and the inducing rate of fasciculated shoots in *Cerasus campanulata* were studied. Statistic analysis indicated that the main factor which influenced callus induction and the inducing rate of fasciculated shoots was explant. The optimal medium for callus induction was MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D + Leaves, the inducing rate was 94.5%; the optimal medium for the inducing rate was MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA + stem section with bud, and the inducing rate was 37.5%. The medium of MS with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA and 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA was optimal for multiplication, and the multiplication rate was 460%. Plantlets were transplanted to the 1/2MS medium with 0.8 mg·L<sup>-1</sup> IBA and 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA for rooting, when the explants reached 2 cm, the rooting rate could reach 90% after 30 days, and the survival rate of transplant was 92%.

**Key words:** *Cerasus campanulata*; orthogonal design; tissue culture

钟花樱 (*Cerasus campanulata*) 为蔷薇科 (Rosaceae) 樱属 (*Cerasus*) 落叶小乔木。产于浙江、湖南、江西、福建、广东、广西、台湾等省(区)以及日本南部的鹿耳岛一带, 是樱属中分布较南的一个种。和其他樱属植物相比, 钟花樱花期极早, 2~3 月先于叶开放, 花瓣绯红, 颜色鲜艳, 花萼钟形, 是一种具有极高观赏价值的木本花卉<sup>[1,2]</sup>, 目前市场需求较

大。但由于分布零星, 果实成熟时鸟食严重, 难以采到扦插的枝条和播种的种子, 给繁殖带来极大的困难。在樱属植物的繁殖技术研究方面, 虽已有大量离体培养的研究, 但基本上都是在食用樱桃及其砧木树种上进行的。在观赏樱花方面, 虽有组织培养快速繁殖的研究报道<sup>[3]</sup>, 但主要从人工嫁接成活的一年生幼树上取材培养。本试验以野生种钟花樱为

收稿日期: 2007-03-19

基金项目: 江苏省高校自然科学基金(06KJB180045)资助。

作者简介: 王贤荣(1966-), 女, 博士, 副教授。E-mail: wangxianrong66@njfu.edu.cn

材料,通过嫩枝带芽茎段、叶片、叶柄在受控条件下离体培养、继代增殖,获得了无性繁殖系,经生根、炼苗、移栽等一系列环节,获得大量无菌苗。这一工作将为保护野生樱花资源,在有限资源得到永续利用方面开辟新的途径,同时为充分开发、利用我国樱属植物资源,扩大繁殖系数,应用于生产以及为今后的良种选育提供理论和试验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 外植体的选取和灭菌处理

2006年4月,于南京林业大学南大山采集钟花樱当年生半木质化枝条,分别以茎段、叶片、叶柄为材料。

枝条去叶,切成2~3 cm的小段,每段带一个腋芽,先用流水冲洗2 h,在无菌条件下,用70%的酒精消毒30 s,无菌水冲洗4次,再用0.1%的升汞消毒8 min,无菌水冲洗4次,在超净工作台接种于不

同的培养基上。叶片、叶柄升汞消毒时间分别是6 min和4 min<sup>[4-6]</sup>。

### 1.2 培养方法

将灭菌后的带芽茎段、叶片、叶柄接种于已灭菌的琼脂质量分数为0.6%、蔗糖为30 g·L<sup>-1</sup>的培养基(pH 5.6)上进行培养,30 d后观察丛生芽的诱导和出愈情况。丛生芽诱导率=未污染外植体丛生芽诱导数/未污染外植体总数×100%,出愈率=未污染外植体出愈数/未污染接种外植体总数×100%。

培养温度为(25±2)℃,日光灯照明,光强为1 500~2 000 lx,光周期为12 h·d<sup>-1</sup>。

### 1.3 诱导培养基的正交试验

以MS为基本培养基,选用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)设计进行4因素3水平的正交试验<sup>[4-6]</sup>(表1),以诱导30 d后诱导率为考察指标,根据设计,安排9组实验,每组接种20瓶,每瓶接种4个。

表1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)因子水平

Table 1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal design

因子水平 Levels of factors	因子种类 Types of factors			
	A 6-BA/mg·L <sup>-1</sup>	B NAA/mg·L <sup>-1</sup>	C 2,4-D/mg·L <sup>-1</sup>	D 外植体 Explant
1	0.5	0.1	0.0	叶片 Leaves
2	1.0	0.5	0.5	叶柄 Petiole
3	2.0	1.0	1.0	带芽茎段 Stem section with bud

### 1.4 幼芽增殖培养

以MS为基本培养基,细胞分裂素BA(0.1, 0.5, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>)与生长素NAA(0.01, 0.05, 0.1 mg·L<sup>-1</sup>)分别组成9个处理,增殖率%=增殖芽数/接种芽数×100%。

### 1.5 生根培养

以1/2MS为基本培养基,添加不同种类和不同浓度的生长素和细胞分裂素(见表5),生根培养基的蔗糖浓度为15 g·L<sup>-1</sup>。当幼芽展开叶为3~4片,株高2 cm以上时,选择叶色浓绿,生长健壮的幼芽接种到生根培养基上进行根的诱导,生根率=生根的苗数/培养的苗数×100%。

### 1.6 试管苗的移栽

将生长健壮的试管苗打开瓶盖,放置于室内炼苗5 d,在室内移栽植,将苗取出,洗净根部培养基,用0.1%的多菌灵蘸根处理,栽入塑料杯内,保持相对湿度90%左右,每隔7 d以1/10MS为营养液对小苗进行叶面施肥,两周后可观察到新叶的萌发和

根的伸长,并带有侧根的发生。16 d后苗木调查成活率,成活率%=成活苗数/移栽苗数×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 丛生芽的诱导

正交试验设计结果见表2。各因素不同,水平间的级差也不同,级差越大,表明该因素越重要<sup>[7-9]</sup>。通过对结果的级差分析(表3)可知,愈伤组织诱导率的级差差异很大,其中外植体的级差最大,为80.50,级差较小的是2,4-D和6-BA这两个因素,级差分别为22.14、17.60, NAA的级差最小为8.13。说明外植体是愈伤组织诱导成功与否的关键。

由表3可知,丛生芽诱导率的级差差异不明显,其中外植体的差异最大,为24.2。而2,4-D、6-BA、NAA这3个因素的级差均为8.33,说明这3个因素对丛生芽诱导同等重要。

由表3还可看出,叶片和叶柄均诱导出了愈伤组织,叶片诱导的愈伤组织出愈快,愈伤组织淡黄

色、数量较多、比较密集。而由叶柄诱导的出愈慢,首先是叶柄两端膨大,形成淡灰色愈伤组织,质地疏松,形成的愈伤量较少。相比之下,叶片更适于诱导愈伤组织,在 1 号、6 号、8 号相比较得出,在未添加 2,4-D 的 1 号培养基上,愈伤组织出愈较慢而且生长缓慢,出愈率较低,仅为 62.0%。在添加 2,4-D 的 6 号、8 号培养基上,愈伤组织诱导率较高分别为 94.5%、85.0%,而且愈伤组织淡黄色,结构紧密,因此,认为 6 号即  $A_2B_3C_2D_1$  组合是诱导愈伤组织的最佳组合。

带芽茎段在接种时因直接插入培养基中,因此,茎段的下端仅有极其少量的愈伤组织出现,而且在

以后的继代培养中无法利用,因此在本试验中,忽略不计。故由带芽茎段形成的愈伤组织为 0。

对比各组合,只有以带芽茎段为外植体的组合才能诱导出丛生芽,其余组合均不能诱导出丛生芽。由表 3 可看出, $A_2B_2C_1D_3$  是诱导芽的较好组合,其丛生芽诱导率为 37.5%,即  $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} +$  带芽茎段。

从本试验结果看,丛生芽诱导率均较低,可能是由植物种类、外植体的取材季节、取材部位有关。此外,在实验过程中,带芽茎段的褐化现象较严重,这也是导致芽诱导率较低的原因之一。

表 2 正交设计试验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

培养基编号 No. of mediums	因子种类 Factors				愈伤诱导率/% Rate of inducing callus	芽诱导率/% Rate of inducing shoot
	A	B	C	D		
1	0.5(1)	0.1(1)	0.0(1)	叶片(1) Leaves	62.0	0.0
2	0.5(1)	0.5(2)	0.5(2)	叶柄(2) Petiole	78.2	0.0
3	0.5(1)	1.0(3)	1.0(3)	茎段(3) Stem	0.0	12.5
4	1.0(2)	0.1(1)	1.0(3)	叶柄(2) Petiole	87.6	0.0
5	1.0(2)	0.5(2)	0.0(1)	茎段(3) Stem	0.0	37.5
6	1.0(2)	1.0(3)	0.5(2)	叶片(1) Leaves	94.5	0.0
7	2.0(3)	0.1(1)	0.5(2)	茎段(3) Stem	0.0	22.6
8	2.0(3)	0.5(2)	1.0(3)	叶片(1) Leaves	85.0	0.0
9	2.0(3)	1.0(3)	0.0(1)	叶柄(2) Petiole	44.3	0.0

表 3 不同培养基对不同外植体诱导率的级差分析

Table 3 Range analysis on percentage of induction of different explant sources

$K_j$	A	B	C	D
$K_1$	140.20 (12.50)	149.60 (22.60)	106.30 (37.50)	241.50 (0)
$K_2$	182.10 (37.50)	163.20 (37.50)	172.70 (22.60)	210.10 (0)
$K_3$	129.30 (22.60)	138.80 (12.50)	172.60 (12.50)	0 (72.60)
$X_1$	46.73 (4.17)	49.87 (7.53)	35.43 (12.50)	80.50 (0)
$X_2$	60.70 (12.50)	54.40 (12.50)	57.57 (7.53)	70.03 (0)
$X_3$	43.10 (7.53)	46.27 (4.17)	57.53 (4.17)	0 (24.2)
$R$	17.60 (8.33)	8.13 (8.33)	22.14 (8.33)	80.50 (24.2)

注:括号内的数据为丛生芽的诱导率/%。

Notice: The data in brackets represent the inducing rate of fasciculated shoot (%).

## 2.2 植物生长调节剂混合使用对幼芽增殖的影响

BA 和 NAA 组配使用对幼芽增殖的影响是以 BA 和 NAA 质量浓度为 20:1 时最佳,30 d 的增殖率可达 460% (见表 4)。而  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 与  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 组配使用比例为 1:1 时,增殖效果最差。结果表明,细胞分裂素 (BA) 与生长素 (NAA) 应达到一定的比值,才能有利于幼芽的增殖,以提高

其增殖。其他组合的丛生芽增殖率均低于 300%。

## 2.3 生根培养基对小苗生根的影响

降低无机盐的浓度常常有利于试管苗的生根,故采用 1/2 MS 培养基取得了较好的效果。用不同浓度的 IBA、NAA 及二者组合试验,结果表明,不含生长素的培养基生根率低,只有 15.0%,根系细弱且根数量少。在仅含有 IBA 的两种生根培养基上,

根系比较纤细,须根多,生根率比较低,分别为23.3%和55.0%。在仅含有NAA的培养基上,根呈白色,较粗壮,但几乎没有须根发生。因此,IBA、NAA二者组合效果较好,这时生根条数最多,平均为8条,根均长1.83 cm。根生长粗壮,根毛丰富,根呈现深黄色。在本试验中,1/2MS + 0.8 mg·L<sup>-1</sup>

IBA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA培养基中培养,接种15 d后可陆续出现白色根点,接种30 d后,长成完整植株,苗高在5~9 cm,生根率可达90%。

#### 2.4 试管苗的移栽

3种基质内苗木的移栽成活率见表6。

表4 不同培养基对钟花樱花芽增殖的影响

Table 4 Effects of different culture mediums on buds multiplication of *C. campanulata*

培养基 Culture medium	接种芽数 No. of implanting	增殖芽数 No. of multiplication	增殖率/% Multiplication rate
MS + 0.1 mg·L <sup>-1</sup> BA + 0.01 mg·L <sup>-1</sup> NAA	30	85	283
MS + 0.1 mg·L <sup>-1</sup> BA + 0.05 mg·L <sup>-1</sup> NAA	30	70	233
MS + 0.1 mg·L <sup>-1</sup> BA + 0.1 mg·L <sup>-1</sup> NAA	30	52	173
MS + 0.5 mg·L <sup>-1</sup> BA + 0.01 mg·L <sup>-1</sup> NAA	30	79	263
MS + 0.5 mg·L <sup>-1</sup> BA + 0.05 mg·L <sup>-1</sup> NAA	30	88	293
MS + 0.5 mg·L <sup>-1</sup> BA + 0.1 mg·L <sup>-1</sup> NAA	30	87	290
MS + 1.0 mg·L <sup>-1</sup> BA + 0.01 mg·L <sup>-1</sup> NAA	30	83	277
MS + 1.0 mg·L <sup>-1</sup> BA + 0.05 mg·L <sup>-1</sup> NAA	30	138	460
MS + 1.0 mg·L <sup>-1</sup> BA + 0.1 mg·L <sup>-1</sup> NAA	30	76	253

表5 不同培养基对钟花樱生根的影响

Table 5 Effects of different culture mediums on rooting of *C. campanulata*

培养基 Culture medium	接种芽数 No. of implanting	生根苗数 No. of roots	生根率/% Root rate
1/2MS	20	3	15.0
1/2MS + 0.4 mg·L <sup>-1</sup> IBA	20	7	23.3
1/2MS + 0.4 mg·L <sup>-1</sup> NAA	20	6	30.0
1/2MS + 0.8 mg·L <sup>-1</sup> IBA	20	11	55.0
1/2MS + 0.4 mg·L <sup>-1</sup> IBA + 0.2 mg·L <sup>-1</sup> NAA	20	12	60.0
1/2MS + 0.8 mg·L <sup>-1</sup> IBA + 0.2 mg·L <sup>-1</sup> NAA	20	18	90.0

表6 基质对钟花樱移栽成活率的影响

Table 6 Effects of cultivating mediums on transplant livability

基质 Cultivating medium	移栽/株 Transplanted number	成活数/株 Survived plants	成活率/% Livability
珍珠岩 Perlite	25	16	64
蛭石 Vermiculite	25	13	48
珍珠岩:蛭石 = 1:1 Perlite: Vermiculite = 1:1	25	23	92

由表6可得出试验处理中以珍珠岩:蛭石 = 1:1基质,并以1/10MS进行叶面施肥较有利于钟华樱试管苗的移栽成活,最高成活率达92%。

### 3 小结与讨论

正交设计试验法是选择最佳试验方案的有效工具,其优点在于省时省力<sup>[3-9]</sup>。本试验若对4种因素

3个水平进行全部组合试验,必须采用81个处理组合。采用正交试验,仅做9个处理组合,即筛选出了诱导愈伤和丛生芽的适宜条件,从而节省大量人力、物力、财力,很大程度上提高了组织培养工作效率与准确性。

(1)外植体的选择:本试验证实,只有带芽茎段才能诱导出丛生芽,叶片和叶柄不能诱导形成丛生

芽,因而带芽茎段是钟花樱诱导丛生芽培养的最佳外植体。同时,叶片是钟花樱诱导愈伤组织的最佳外植体。

在试验中,带芽茎段诱导丛生芽的过程中,外植体褐化死亡较严重,这也是芽诱导率较低的原因之一。王光萍等人<sup>[8]</sup>报道了福建山樱花在 MS 培养基上嫩枝褐化严重,芽的分化率低于 10%,在 1/2MS 培养基上有少量褐化,芽的分化率为 10%~30%;在 1/4MS 上,基本无褐化现象,芽的诱导率较高。因此,在初代培养中,有必要降低 MS 培养基中大量元素的量,以期降低褐化,提高丛生芽诱导率。

由于愈伤组织具有易于繁殖、生长同步、细胞组成均一、处理方便等优点。因此,通过以叶片为外植体,诱导愈伤组织,可以为离体条件下的各种生理生化研究提供良好的试材<sup>[10,11]</sup>。从理论上讲,愈伤组织可以通过器官发生途径再生出完整的植株,在愈伤组织的继代培养中,通过降低 2,4-D 的浓度,仍未诱导出丛生芽。因此,要从外植体的生理状态、不同的激素配比、培养条件、继代周期等方面做进一步的研究,以获得胚性愈伤组织,诱导出丛生芽,通过生根培养,进而获得完整植株。

(2)培养基的筛选:通过正交试验综合分析影响钟花樱愈伤组织及丛生芽诱导的影响因素,筛选出诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D + 叶片,其诱导率为 94.5%;诱导丛生芽的组合为 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 带芽茎段,其诱导率为 37.5%;增殖培养中,以 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA 效果最好,增殖率为 460%,

当株高在 2 cm 以上时,转入 1/2MS + 0.8 mg·L<sup>-1</sup> IBA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 生根培养基上,接种 30 d 后,生根率可达 90%,移栽成活率达 92%。

### 参考文献:

- [1] 俞德俊,李朝鸾. 中国植物志·38 卷[M]. 北京:科学出版社,1986:78.
- [2] 王贤荣. 国产樱属分类学研究[D]. 南京:南京林业大学,1998:75-76.
- [3] 王永清,汤浩如,邓群仙,等. 樱花离体培养芽外植体的建立[J]. 四川农业大学学报,1997,15(3):431-344.
- [4] 白雨,高山林. 半夏组织培养诱导胚状体的正交试验[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(4):16-20.
- [5] 康冰,于福科,张广军,等. 应用正交试验筛选玫瑰茎段增殖培养基[J]. 西北植物报,2003,23(4):653-655.
- [6] 宋莉英,谭净,高峰. 苦瓜愈伤组织诱导的多因子正交试验研究[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2004,29(3):462-464.
- [7] Hamama L, Baaziz M, Letouzé R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of jojoba[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2002, 65(2):109-113.
- [8] 王光萍,黄敏仁. 福建山樱花的组织培养和植株再生[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2002,26(2):73-75.
- [9] Merel L G. Hotwater treatment before tissue culture reduces initial contamination in lillum and ace[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 52(3):75-771.
- [10] 王子成,邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑橘茎尖及植株再生[J]. 园艺学报,2001,28(4):301-306.
- [11] 陈惠阳,乐素菊. 荷兰青瓜组织培养正交试验[J]. 北方园艺,2005(4):83-85.