

唐棣组织培养体系的建立与优化

何志宇, 付雪宁, 尹鹏先, 蔡靖, 姜在民

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】建立唐棣离体植株组织培养快繁体系, 并对该体系进行优化。【方法】以唐棣带腋芽的茎段为外植体获得无菌苗, 再以无菌试管苗为材料, 以 MS 为基础培养基, 采用正交试验研究 6-BA(0.5, 1.0, 1.5 mg/L)、NAA(0.02, 0.04, 0.06 mg/L)、IBA(0.05, 0.10, 0.15 mg/L) 配比对唐棣组培苗扩繁的影响, 并研究不同基本培养基(WPM, 1/4MS, 1/8MS)和 NAA(0.1, 0.3 mg/L)、IBA(0.5, 1.0 mg/L) 配比对唐棣无菌苗生根的影响; 再以已生根的试管苗为材料, 研究不同开瓶时间(12, 18, 24, 36, 48 h)、生根时间(15, 20, 25, 30 d)、基质配比(国产泥炭、国产水苔、腐殖质体积比分别为 1:1:1, 1:3:1, 1:5:1 和 1:4:2)对炼苗移栽成活率和生长状况的影响。【结果】最适合唐棣带腋芽茎段的消毒方法是体积分数 75% 酒精消毒 30 s, 再用 1 g/L HgCl₂ 消毒 8 min, 芽萌发率达到 17.3%; 最适合组培苗增殖的激素组合为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA+0.05 mg/L IBA, 增殖系数达到 6.28; 最适合无菌苗生根的培养基为 1/4MS+0.5 mg/L IBA, 生根率达到 100%; 在生根培养 25 d 后开瓶适应 24 h, 然后再进行炼苗, 最适合炼苗的基质配比为 V(国产泥炭):V(国产水苔):V(腐殖质)=1:5:1, 试管苗移栽成活率达到 70.00%。【结论】建立并优化了唐棣组织培养体系, 明显提高了无菌苗的增殖数量、生长健康指数及生根率, 并且炼苗后移栽成活率也显著提高。

[关键词] 唐棣; 组织培养; 生根培养; 炼苗移栽

[中图分类号] S792.990.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2019)05-0042-08

Establishment of the *Amelanchier sinica* regeneration system and optimization

HE Zhiyu, FU Xuening, YIN Pengxian, CAI Jing, JIANG Zaimin

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to establish and optimize a tissue culture system for *Amelanchier sinica*. In the a large number of seedlings can be bred. 【Method】 Taking *A. sinica* embryo tissue of somatic embryo callus (embryoid) as test materials, using the method of *in vitro* culture, the orthogonal experiment was used to study the influence of the proportion of 6-BA(0.5, 1.0, 1.5 mg/L), NAA(0.02, 0.04, 0.06 mg/L) and IBA(0.05, 0.10, 0.15 mg/L) on the propagation of tissue culture seedlings of *A. sinica*, and the influence of the proportion of different basic media(WPM, 1/4MS, 1/8MS), NAA(0.1, 0.3 mg/L) and IBA(0.5, 1.0 mg/L) on the sterile rooting seedlings of *A. sinica* was studied. Then the test tube seedlings of rooting were used to study the influence of different bottle opening time(12, 18, 24, 36, 48 h), rooting time(15, 20, 25, 30 d) and the proportion of matrix(the volume ratio of domestic peat, domestic water moss, and humus is 1:1:1, 1:3:1, 1:5:1, 1:4:2) on the survival rate of transplanted seedlings. 【Result】 The best disinfection method was 75% ethanol for 30 s and 1 g/L HgCl₂ for 8 min. Optimal shoot proliferation occurred on MS medium with 0.5 mg/L 6-BA and 0.02 mg/L NAA and 0.05 mg/L

[收稿日期] 2018-02-28

[基金项目] 国家林业局林业公益性行业科研专项(201204308)

[作者简介] 何志宇(1992—), 男, 内蒙古包头人, 在读硕士, 主要从事森林植物研究。E-mail: 1025586032@qq.com

[通信作者] 姜在民(1963—), 男, 山东昌邑人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物学研究。E-mail: jiangzmz@163.com

IBA. The best rooting was 1/4MS with 0.5 mg/L IBA, with rooting rating of 100%. The optimal matrix ratio was $V(\text{humus}) : V(\text{sphagna}) : V(\text{peat}) = 1 : 5 : 1$, watered three times a day with a diminishing cycle of 10 days, after opening a bottle of 24 hours, rooting culture lasts 44 days and the survival rate was 70.00% after 30 days. 【Conclusion】 The established and optimized tissue culture system for *A. sinica* improved reproduction rate and the survival rate of transplanting of tissue cultured seedlings increased obviously.

Key words: *Amelanchier sinica*; tissue culture; rooting culture; hardening-seedling

唐棣(*Amelanchier sinica*)为蔷薇科苹果亚科唐棣属落叶小乔木,是我国仅产的 2 种唐棣属植物之一^[1-2]。唐棣叶片卵形或披针形,总状花序,花穗下垂,花瓣白色具芳香气味,花期 4—5 月份,具有良好的观赏价值;其果实近球形或扁圆形,果期 8—9 月份^[3],果实含钙量非常高,并且含有多种维生素、微量元素与糖脂蛋白,因此还具有较高的经济价值。

由于唐棣属植物具有非常高的观赏价值,且果实具有较高的营养价值与经济价值,因此国内外学者均对唐棣属植物进行过一些研究,如 Magdalena 等^[4]对加拿大桤叶唐棣(*Amelanchier canadensis*)果实的抗氧化性进行了研究,Pruski 等^[5]、Baldwin 等^[6]、杜保国^[7]、林宝山^[8]对桤叶唐棣(*Amelanchier alni folia*)的组织培养方法有过一定研究。唐棣属植物在我国仅有 2 个种,分别是唐棣(*Amelanchier sinica*)和东亚唐棣(*Amelanchier asiatica*)^[9],尹鹏先等^[10]、何志宇等^[11]对东亚唐棣组织培养体系的建立进行了研究,且该种已经成功引种至低海拔地区,并用作校园绿化树种。而有关唐棣组织培养体系的研究在国内外尚未见相关报道,仅有高崇辉等^[12]对唐棣的愈伤组织生长进行过相关研究,但该种目前仍处于野生状态而未被开发利用^[13]。鉴于唐棣种子繁殖较为困难,而采用扦插繁殖时又存在难生根、不易成活等问题,因此本研究拟对唐棣的组织培养体系进行建立与优化,以期对唐棣的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为 2013 年 5 月初采自陕西太白山桃川镇的唐棣当年生带芽茎段。

1.2 方法

1.2.1 无菌外植体的获得 选取生长健壮、腋芽饱满、无病虫害的唐棣枝条,去除茎段上的叶片,用小毛刷刷洗干净,剪成长度 4 cm 左右的带芽茎段,留下叶柄基部 5 mm,放入大烧杯中,烧杯顶部用纱布包裹,置于自来水下冲洗 2~3 h。然后在超净工作台上先用体积分数 75% 的酒精消毒 30 s,接着用无

菌水冲洗 3~4 次,再分别用 1 g/L HgCl_2 消毒 4, 6, 8, 10, 12 min, 用无菌水冲洗 3~4 次,消毒过程中要轻微摇晃。在接种初期的 10 d 内若发现有褐化的带芽茎段,应立即在无菌操作台用已消毒过的工具将茎段转移至瓶内其他地方,10 d 后统计污染率。

1.2.2 芽的诱导萌发 取消毒好的芽,用消毒滤纸吸干其表面的水分,迅速接种于 $\text{MS} + 3.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg/L NAA} + 30 \text{ g/L 蔗糖} + 7 \text{ g/L 琼脂}$ 的培养基上,在芽的萌发过程中,要每隔一段时间观察 1 次,不断切去茎段基部褐化的部位,待芽萌发到 3 cm 左右高时,将其转接到同一培养基中继续增殖,以获得更多数量的无菌组培苗用于后续试验。

1.2.3 组培苗的增殖培养 选取生长状况较为相近的组培苗进行增殖培养,探究不同激素及其质量浓度组合对组培苗增殖的影响。本试验以 MS 为基本培养基,采用 3 因素 3 水平正交试验设计,6-BA 设置 0.5, 1.0 和 1.5 mg/L 3 个水平, NAA 设置 0.02, 0.04 和 0.06 mg/L 3 个水平, IBA 设置 0.05, 0.10 和 0.15 mg/L 3 个水平。共设置 9 种激素组合,每种组合接种 15 瓶,每瓶 2 株。40 d 后统计增殖与生长状况,以探究 6-BA、NAA、IBA 3 种激素及其不同质量浓度组合对组培苗增殖的影响。

1.2.4 无菌苗的生根培养 选取增殖培养所得生长健壮的高度 3 cm 以上的无菌苗为材料进行试验,探究不同基本培养基和激素及其质量浓度对比对无菌苗生根的影响。分别以 WPM、1/4MS、1/8MS 为基本培养基,再分别添加 0.1, 0.3 mg/L NAA, 或 0.5, 1.0 mg/L IBA, 共 12 个处理,每个处理接种 15 瓶,每瓶 2 株。记录最先长出愈伤组织和最先生根所需时间,并统计生根数及根系健康指数,以选择适宜生根的培养基类型。

1.2.5 试管苗的炼苗移栽 (1) 开瓶时间对试管苗移栽成活率及生长状况的影响。在试管苗移栽至温室之前,需将无菌培养间的试管苗开瓶以提前适应外界环境,不同开瓶适应时间对试管苗成活率及其生长状况有不同的影响。将已生根的唐棣无菌试管苗分别开瓶 12, 18, 24, 36, 48 h 后,再移栽至相同配

比的基质中进行炼苗,试管苗生根时间为 30 d。

(2)基质配比对试管苗移栽成活率及生长状况的影响。以国产泥炭、国产水苔、腐殖质体积比分别为 1:1:1,1:3:1,1:5:1 和 1:4:2 的基质作为炼苗移栽基质,对生根 30 d 后生长健壮的试管苗进行炼苗移栽试验。

(3)试管苗生根时间对移栽成活率及生长状况的影响。不同的生根时间会影响根条数、根长度和须根数量。对 4 组生根时间不同的试管苗进行炼苗移栽试验,生根时间分别为 15,20,25 和 30 d。移栽炼苗在国产泥炭、国产水苔、腐殖质体积比为 1:5:1 的基质中进行。

以上各项炼苗试验期间湿度和温度的控制方法为:每天喷水 3~6 次,保持小环境相对湿度在 90% 以上,每隔 10 d 相对湿度递减 10%~15%,白天与夜间的温度控制在 19~25 ℃。每组试验 60 株幼苗,30 d 后统计成活率及生长状况。

1.3 统计分析方法

1.3.1 增殖生长状况统计 将增殖生长状况划分为 3 个级别,分别以数字“3”、“2”、“1”表示。其中“3”表示组培苗生长健壮,茎干粗壮,叶片大且鲜绿,无黄叶及玻璃化现象;“2”表示生长较为健壮,黄叶较少,无玻璃化现象;“1”表示生长一般,叶片小而卷曲,存在部分黄叶,茎干稍细弱。

增殖系数=增殖株数/接种株数;
健康指数=组培苗生长状况值之和/接种株数。

表 1 HgCl₂ 消毒时间对唐棣茎段无菌体系建立的影响

Table 1 The effect of HgCl₂ sterilization time on the establishment of sterile system of stem segment

试验号 Test number	HgCl ₂ 处理时间/min The processing time of HgCl ₂	接种数 Number of vaccination	污染率/% Pollution rate	褐化率/% Browning rate	萌发率/% Germination rate
1	4	30	90.5	0	9.5
2	6	30	89.8	3.1	7.1
3	8	30	76.8	5.9	17.3
4	10	30	81.3	6.2	12.5
5	12	30	55.2	42.1	2.8

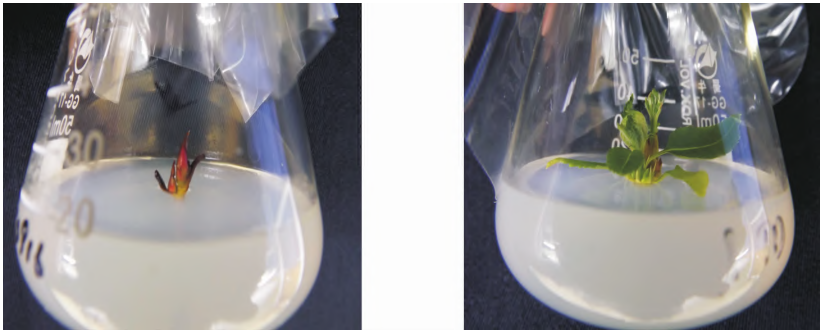


图 1 唐棣茎段外植体的腋芽

Fig. 1 Stem segment explants germinated axillary buds

1.3.2 生根生长状况统计 将生根生长状况划分为 3 个级别,分别以数字“3”、“2”、“1”表示。其中“3”表示根长度、粗细适中,不易断裂,有大量须根;“2”表示根较为粗壮且较长,易断裂,有少量须根;“1”表示根较为细弱且较短,无须根。

生根率=(已生根株数/接种株数)×100%;
健康指数=组培苗根系生长状况值之和/接种株数。

各指标差异性用 SPSS 17.0 软件进行分析,采用单因素方差分析(ANOVA)方法,以 $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 HgCl₂ 消毒时间对唐棣无菌外植体获得的影响

高污染率、低萌发率和高褐化死亡率是唐棣无菌体系建立的重要限制因素,所以正确的消毒方法对唐棣无菌体系的建立有至关重要的作用。由表 1 可以看出,HgCl₂ 消毒时间过长或过短均不利于唐棣无菌外植体的获得,时间过长污染率虽较低,但对植物组织的伤害过大,褐化死亡率较高;时间过短则污染率较高。综合考虑认为,唐棣带腋芽茎段最适合的消毒方法为:先用体积分数 75% 的酒精消毒 30 s,再用 1 g/L HgCl₂ 消毒 8 min。图 1 为由消毒后的唐棣茎段萌发的腋芽。

2.2 激素及其质量浓度组合对唐棣组培苗增殖的影响

将唐棣组培苗接种到含有不同激素及其质量浓度组合的培养基中,培养 15 d 左右后,组培苗的基

部切口处便开始分化出愈伤组织。对不同激素及其质量浓度组合条件下唐棣组培苗增殖状况的统计结果见表 2。

表 2 不同激素及其质量浓度组合对唐棣组培苗增殖的影响

Table 2 Effects of different hormones and their mass concentration on the proliferation of *Amelanchier sinica* tissue culture seedlings

试验号 Test number	激素质量浓度/(mg·L ⁻¹) Mass concentration of hormone			接种组培苗数 Number of inoculated groups	增殖系数 Reproduction rate	健康指数 Survival rate of transplanting	增殖苗生长状况 Growth conditions
	6-BA	NAA	IBA				
1	0.5	0.02	0.05	30	6.28	2.80±0.48	增殖数目多,苗较高,茎粗壮 The number of proliferation is more, the seedling is taller, the stem is strong
2	0.5	0.04	0.10	30	5.56	2.76±0.50	增殖数目多,苗较高,茎较粗壮 The number of proliferation is higher, the seedling is higher, the stem is stronger
3	0.5	0.06	0.15	30	5.20	1.50±0.23	增殖较多,茎较细 More proliferation and thinner stems
4	1.0	0.02	0.10	30	3.66	1.50±0.54	生长较好,增殖数目多,茎较细 The growth is good, the proliferation number is much, the stem is finer
5	1.0	0.04	0.15	30	2.54	1.91±0.30	生长较好,茎较细 The growth is better, the stem is finer
6	1.0	0.06	0.05	30	3.50	1.30±0.45	接种苗茎较细弱 The stems of grafted seedlings were slender
7	1.5	0.02	0.15	30	4.23	1.30±0.50	增殖较多,茎较细,叶片较小 More proliferation, smaller stems and smaller leaves
8	1.5	0.04	0.05	30	4.00	2.23±0.66	茎较粗壮 Stem brawnier
9	1.5	0.06	0.10	30	3.95	2.34±0.65	增殖数目较多,茎较高 The number of proliferation was higher and the stem was higher
T ₁	17.04	14.17	13.78				
T ₂	9.70	12.10	13.17				
T ₃	12.18	12.65	11.97				
R	7.34	2.07	1.81				

注:表中健康指数为“平均值±标准差”; $T_i(i=1,2,3)$ 表示同一激素相同质量浓度下增殖系数的总和; R 为最大值与最小值的水平间距。
Note: The health index in the table is “mean±standard deviation”; $T_i(i=1,2,3)$ represents the sum of the multiplication factor at the same hormone concentration; R is the maximum minimum horizontal spacing.

由表 2 可以看出,6-BA 质量浓度对唐棣增殖生长的影响最为显著,其中 6-BA 质量浓度为 0.5 mg/L 时增殖生长效果最好,增殖系数最高达 6.28,平均为 5.68,较质量浓度为 1.0 mg/L 时的平均增殖系数高出 75.9%,较质量浓度为 1.5 mg/L 时的平均增殖系数高出 39.9%。从健康指数来看,处理 1 所得到的组培苗健康指数最高,达到了 2.80,较处理 6 和处理 7 高出 115% 以上。根据 3 个因素极差的大小,可以得出对增殖系数大小产生效应的主次顺序依次为 6-BA、NAA 和 IBA。极差分析表明,增殖培养基的最佳组合为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA+0.05 mg/L IBA+35 g/L 蔗糖+7.5 g/L 琼脂。

图 2 显示,在上述激素组合条件下,通过增殖培养所获得的无菌组培苗数目较多,生长健壮,茎干粗

壮,叶片大而鲜绿,无黄叶及玻璃化现象。



图 2 经增殖培养的唐棣组培苗

Fig. 2 Tissue culture seedlings after proliferation

2.3 基本培养基与不同质量浓度激素组合对唐棣生根的影响

由表 3 中各处理的平均生根数和平均生根率可以看出,以 1/4MS 为基本培养基时整体生根状况较好,平均生根率为 92.75%,较 1/8MS 培养基平均生根率高 3.34%,较 WPM 培养基平均生根率高 39.47%。从单激素添加效果来看,单独加入 0.5

mg/L IBA 对唐棣无菌苗生根的效果最好,30 d 平均生根数达到 4.52 条,健康指数最高达到 2.96(图 3);平均生根数较单独加入 0.3 mg/L NAA 多出 83.0%,较单独加入 0.1 mg/L NAA 多出 55.9%,较单独加入 1.0 mg/L IBA 多出 16.8%。综合分析认为,唐棣最佳生根培养基为 1/4MS 培养基+0.5 mg/L IBA。

表 3 不同基本培养基与不同质量浓度激素组合对唐棣无菌苗生根的影响

Table 3 Effects of different basic media and different mass concentrations of hormones on the rooting of seedlings						
试验号 Test number	基本培养基 Basic medium	激素质量浓度/(mg·L ⁻¹) Mass concentration of hormone		平均生根率/% Mean rooting rate	平均生根数 Mean rooting number	健康指数 Health index
		NAA	IBA			
1	WPM	0.1	0	60	1.83	1.03±0.32
2		0.3	0	50	1.16	0.76±0.25
3		0	0.5	70	2.90	0.16±0.41
4		0	1.0	86	3.70	1.90±0.36
5	1/4MS	0.1	0	90	3.40	2.30±0.52
6		0.3	0	85	3.40	1.96±0.23
7		0	0.5	100	5.66	2.96±0.34
8		0	1.0	96	4.00	1.92±0.21
9	1/8MS	0.1	0	96	3.36	2.30±0.33
10		0.3	0	73	2.85	1.70±0.46
11		0	0.5	100	5.00	2.80±0.35
12		0	1.0	90	3.93	1.76±0.50

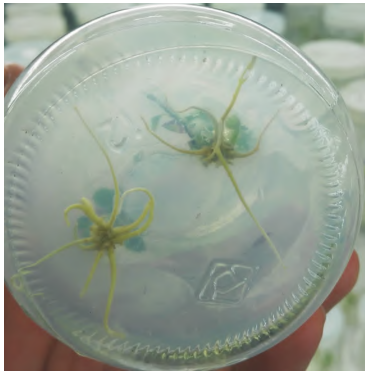


图 3 生根的唐棣无菌苗

Fig. 3 Seedlings cultured in rooting medium

表 4 开瓶时间对唐棣试管苗移栽成活率及生长状况的影响

Table 4 Effect of different time of opening bottles on survival rate of transplanting and growth condition					
开瓶时间/h Open a bottle of time	30 d 成活率/% Survival rate of 30 days	生长状况 Growth	开瓶时间/h Open a bottle of time	30 d 成活率/% Survival rate of 30 days	生长状况 Growth
12	43.20 c	一般 General	36	65.10 b	良好 Good
18	60.60 b	良好 Good	48	40.90 c	一般 General
24	75.30 a	较好 Better			

注:同列数据后标不同字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note: Different lowercase letters in each column indicate significant difference among the treatments ($P<0.05$). The same below.

2.4.2 生根时间对试管苗移栽成活率及生长状况的影响 由表 5 可知,生根时间为 25 d 的唐棣试管苗炼苗移栽成活率较高,苗木生长状况也较好。组培苗生根时间过长,苗木根系发育不完全,缺少必要的须根,根系数量也较少,不能很好地吸收养分,不

2.4 唐棣试管苗的炼苗移栽

2.4.1 开瓶时间对唐棣试管苗移栽成活率及生长状况的影响 试管苗移栽至基质中进行炼苗培养之前,需将瓶盖打开提前适应外界环境,开瓶时间的长短对于炼苗培养的成活率有较大影响。由表 4 可以看出,随着开瓶时间的增加,炼苗成活率呈现先升后降的趋势。这是因为开瓶时间较短时,无菌苗不能充分适应外界环境;开瓶时间过长,则会使试管苗失水过多。综上可知,开瓶时间 24 h 后将试管苗移栽至炼苗基质中易于成活,成活率可达 75.30%,且生长状况较好。

能为苗木的生长提供足够的营养,导致苗木在炼苗移栽过程中逐渐死去。组培苗生根时间过长,虽然苗木根系发育比较完善,但是根系过长,在移栽过程中易造成伤根,并且移栽在穴盘中时根系不能完全舒展,进而影响根系正常吸收功能的发挥,从而降低

炼苗移栽的成活率。

表 5 不同生根时间唐棣试管苗的根系生长状况

Table 5 Different rooting time can influence the indicators of roots

生根时间/d Root time	根条数 Root article number	根长/cm Root length	须根数量状况 Root quantity status	生根时间/d Root time	根条数 Root article number	根长/cm Root length	须根数量状况 Root quantity status
15	<3	<1.5	无 No	25	4~7	2.0~3.5	较多 More
20	3~5	1.5~2.0	少量或无 Little or no	30	4~7	3.5~5.0	较多 More

表 6 生根时间对唐棣试管苗移栽成活率及生长状况的影响

Table 6 Effect of different rootage duration on survival rate of transplanting and growth conditions

生根时间/d Rooting time	30 d 成活率/% Survival rate of 30 days	生长状况 Growth condition	生根时间/d Rooting time	30 d 成活率/% Survival rate of 30 days	生长状况 Growth condition
15	39.3 c	一般 General	25	60.0 a	较好 Better
20	43.3 c	良好 Good	30	50.0 b	良好 Good

2.4.3 基质配比对试管苗移栽成活率及生长状况的影响 当试管苗根长至 2~3 cm 时,开瓶适应 24 h,然后用镊子将试管苗夹出,用清水洗去基部残留的培养基,然后移栽到装有混合基质的育苗盘中炼苗。由表 7 可知,在国产泥炭、国产水苔和腐殖质体

积比为 1 : 5 : 1 的基质中,唐棣试管苗移栽成活率最高,可达 70.00%,且生长状况较好(图 4~7)。由表 7 还可以看出,国产泥炭的比例不宜过高,否则基质的透气性、排水性较差,容易造成苗木根系缺氧,导致根系腐烂。

表 7 不同移栽基质组合对唐棣试管苗移栽成活率的影响

Table 7 The effect of different medium on survival rates of plantlets after transplanting

试验号 Test number	V(国产泥炭) : V(国产水苔) : V(腐殖质) V(Domestic peat) : V(domestic water moss) : V(humus)	30 d 成活率/% Survival rate of 30 days	生长状况 Growth condition
1	1 : 1 : 1	36.50 c	一般 General
2	1 : 3 : 1	46.30 b	良好 Good
3	1 : 5 : 1	70.00 a	较好 Better
4	1 : 4 : 2	56.20 b	一般 General

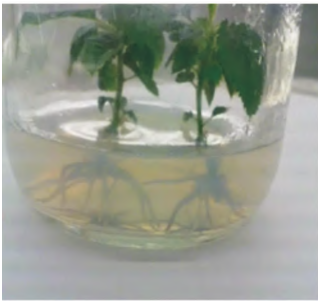


图 4 完整的唐棣无菌组培苗

Fig. 4 Complete sterile tissue culture seedlings

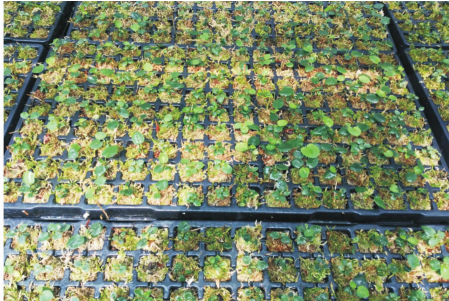


图 5 炼苗 20 d 的唐棣幼苗

Fig. 5 Seedling growth in 20 days



图 6 炼苗 2 个月的唐棣幼苗

Fig. 6 Seedling growth in 2 months



图 7 炼苗 6 个月的唐棣幼苗

Fig. 7 Seedling growth in 6 months

3 讨论与结论

对唐棣组织培养体系的建立和优化,相比于尹鹏先等^[10]、何志宇等^[11]对东亚唐棣组织培养体系的建立更为困难,因为东亚唐棣已经从野外被引种驯化移栽于低海拔地区,并用于校园绿化,所以无菌体系建立较为容易,生根培养以及炼苗移栽过程中成活率也较高,但唐棣目前仍处于野生状态,其无菌体系建立较为困难,增殖、生根培养以及炼苗移栽过程中成活率也较低,组织培养体系的建立难度相对较大。

在本试验过程中发现,未萌发的芽消毒较为困难,污染率较高,这是由于未萌发的芽鳞片层层包裹,内部包含一些细菌与微生物,从而导致消毒效果不理想,这也是组织培养污染的主要来源^[14]。同时,外植体的选择对于组织培养也至关重要,在材料的选取上不仅要考虑采取的部位,还要注意采取时间^[15]。本试验采取了芽饱满且无病虫害的唐棣当年生带芽茎段,而且选取带顶芽的茎段作为外植体,顶芽的衰老及其细胞的程序性死亡使得植株的顶端优势受到抑制,激素随之分配给侧芽,促进了侧芽的萌发与生长^[16-18],使得萌发率较高,这与尹鹏先等^[10]的研究结论一致。

继代增殖培养是组织培养的关键,找到适宜的增殖培养基配方,才能达到组培快速繁殖的目的^[19]。不同外源激素及其质量浓度的配比会对试验结果造成很大影响,而且各因素之间的搭配效果是否适合等,一直是组织培养研究者所关注的问题^[20]。本试验采取了3因素3水平正交试验,减少了试验次数和并避免了繁杂的试验分析方法,提高了试验结果的准确性,并且达到了提高增殖苗生长状况的目的,与只加入6-BA与IBA 2种激素相比,增殖系数与健康指数有大幅度提升。在腋芽继代增殖过程中,6-BA和IBA组合是最常用的方法^[21],但是随着继代次数的增加,组培苗会出现生长衰退的现象,需要进行复壮培养。而根据本试验结果可知,在加入6-BA与IBA的培养基中再附加NAA之后,到目前为止,在已经进行的8~12次继代培养过程中并未出现生长衰退现象,不需要进行复壮培养,这与何志宇等^[11]对东亚唐棣的研究结果相似。

在组织培养过程中,降低无机盐的用量有利于组培苗的生根,组培苗的生根培养基多数情况只选用生长素IBA或NAA^[22]。生根培养基中加入NAA会使得根系较为粗壮,但是在炼苗移栽过程中

根系较为脆弱、易断裂,而加入IBA可使根系粗细适中,炼苗移栽成活率较高。生根基本培养基多数选择1/4MS与1/8MS,这是因为随着大量元素的减少,植物体需要更多的根系吸收养分,从而提高了生根率;也可能是由于 NH_4NO_3 质量浓度逐渐降低,减弱了其对植物生根的抑制作用^[23-24],有利于提高生根率。生根培养对于试管苗炼苗成活有非常大的影响,本试验通过优化生根培养的基本培养基以及激素种类与其质量浓度,最终使唐棣在生根培养25 d后生根率达到100%,并且根长度、粗细适中有须根,组培苗叶片由浅绿色变成深绿色,表明根系具备吸收营养的功能,可以进行下一步的炼苗移栽培养。

提高生根试管苗炼苗成活率是快繁技术能否大量应用于生产、是否有效益的关键。试管苗一般在高湿、弱光、恒温下异养培养,由于此时根毛很少,并且叶片无保护组织或不发达,易于失水萎蔫,因此需打开瓶口炼苗驯化,然后再出瓶移栽。移栽初期对于生长环境的要求非常高,必须保持高湿、弱光、适当通气和适宜的温度^[25],后期逐渐降低湿度并增加光照强度,最终才可以从温室移栽至外界环境中。本试验采用国产泥炭、国产水苔和腐殖质体积比为1:5:1的育苗基质,其中的国产泥炭、国产水苔具有很强的吸水性和保水性,可防止由于根部水分过多而造成的烂根现象,腐殖质中含有丰富的营养物质,可为幼苗的生长提供必需的营养元素。

通过试验,本研究最终建立并优化了唐棣组织培养体系。结果表明,最适合唐棣带腋芽茎段的消毒方法是体积分数75%酒精消毒30 s,再用1 g/L HgCl_2 消毒8 min;最适合组培苗增殖的激素组合为MS+0.5 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA+0.05 mg/L IBA,最适合无菌苗生根的培养基为1/4MS+0.5 mg/L IBA;在生根培养25 d后开瓶适应24 h,然后再进行炼苗,最适合炼苗的基质配比为V(国产泥炭):V(国产水苔):V(腐殖质)=1:5:1。该培养体系可以明显提高唐棣无菌苗的增殖数量、生长健康指数及生根率,并且炼苗移栽成活率也显著提高。

【参考文献】

- [1] 姚德生,姚 颖. 唐棣育苗技术 [J]. 林业实用技术, 2011(2): 29-30.
Yao D S, Yao Y. The seedling technique of *Amelanchier sinica* [J]. Forest Science and Technology, 2011(2): 29-30.
- [2] 龙 韬. 我国观赏植物资源研究现状及发展趋势 [J]. 北京农

- 业,2011(18):53-55.
- Long T. Ornamental plant resources in China research and development trends [J]. Beijing Agriculture,2011(18):53-55.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 36 卷 [M]. 北京:科学出版社,1974:403.
- Editorial Board of Chinese Flora. Flora of China: Volume 36 [M]. Beijing: Science Press,1974:403.
- [4] Magdalena M, Ryszard M. Effect of processing and storage on the antioxidant activity of frozen and pasteurized shadblow serviceberry (*Amelanchier canadensis*) [J]. International Journal of Food Properties,2012,6(13):1225-1233.
- [5] Pruski K, Nowak J, Grainger G. Mirpropagation of four cultivars of saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1990,21(2):103-109.
- [6] Baldwin B D, Bandara M S, Tanino K K. Bud scale maturation in saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) plantlets following in vitro hormonal treatment [J]. Acta Horticulture, 2000,520:203-208.
- [7] 杜保国. 桤叶唐棣的组织培养和再生系统的建立 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2005.
- Du B G. Tissue culture and regeneration system establishment of *Amelanchier alnifolia* Nutt. [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University,2005.
- [8] 林宝山. 尼尔森唐棣的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯,2002(6):589.
- Lin B S. Tissue culture and rapid propagation of Nelson saskatoon [J]. Plant Physiology Communications,2002(6):589.
- [9] 郑万钧. 中国树木志:第 2 卷 [M]. 北京:中国林业出版社,1985:1057.
- Zheng W J. The trees will Chinese: Volume 2 [M]. Beijing: China Forestry Publishing House,1985:1057.
- [10] 尹鹏先,蔡靖,李厚华,等. 东亚唐棣组织培养体系 [J]. 东北林业大学学报,2015,43(1):54-56.
- Yin P X, Cai J, Li H H, et al. Tissue culture system of *Amelanchier asiatica* [J]. Journal of Northeast Forestry University,2015,43(1):54-56.
- [11] 何志宇,尹鹏先,程林林,等. 东亚唐棣增殖培养条件的优化 [J]. 西北林学院学报,2016,31(1):126-129.
- He Z Y, Yin P X, Cheng L L, et al. Optimization on shoot proliferation culture media of *Amelanchier asiatica* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(1):126-129.
- [12] 高崇辉,吉文丽,张小波,等. 唐棣和鞘柄木的组培及消毒技术研究 [J]. 西北林学院学报,2005,20(2):107-108.
- Gao C H, Ji W L, Zhang X B, et al. Studies on tissue culture and sterilization of *Amelanchier sinica* and *Torreellia angulata* var *intermedia* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2005,20(2):107-108.
- [13] 张佳平,丁彦芬. 中国野生观赏植物资源调查、评价及园林应用研究进展 [J]. 中国野生植物资源,2012,31(6):18-23,31.
- Zhang J P, Ding Y F. Research on the investigation, evaluation and application of wild ornamental plants in China [J]. Chinese Wild Plant Resources,2012,31(6):18-23,31.
- [14] 胡凯,张立军,白雪梅,等. 植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒 [J]. 安徽农业科学,2007,35(3):680-681.
- Hu K, Zhang L J, Bai X M, et al. Analysis of the cause of contamination and explant sterilization in plant tissue culture [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2007,35(3):680-681.
- [15] 袁柳祥. 绣线梅组织培养技术研究及遗传多样性分析 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2016.
- Yuan L X. Study on tissue culture and genetic diversity of *Neillia thyrsiflora* [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University,2006.
- [16] Beck E, Scheibe R. Senescence and ageing in plants and cyanobacteria [J]. Physiologia Plantarum,2003,119(1):1-4.
- [17] Xu W J, Kalima-N K M, Cui K N. Programmed cell death during terminal bud senescence in a sympodial branching tree, *Eucommia ulmoides* [J]. Progress in Nature Science,2004,14(8):694-699.
- [18] Wang D Y, Hu S, Li Q, et al. Photoperiod control of apical bud and leaf senescence in pumpkin (*Cucurbita pepo*) stain 185 [J]. Acta Bot Sin,2002,44(1):55-62.
- [19] 李秋玲,李青,刘燕,等. 春石斛继代培养主要影响因素 [J]. 东北林业大学学报,2014,42(7):69-73.
- Li Q L, Li Q, Liu Y, et al. Main influence factors of dendrobium nobile subculture [J]. Journal of Northeast Forestry University,2014,42(7):69-73.
- [20] 包振华,郭军战,周玮,等. 枸杞组织培养再生体系优化 [J]. 西北林学院学报,2010,25(5):73-76.
- Bao Z H, Guo J Z, Zhou W, et al. Optimization of tissue culture regeneration system of *Lycium barbarum* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2010,25(5):73-76.
- [21] Al Malki A A H S, Elmeir K M S. Influence of auxin and cytokinin on *in vitro* multiplication of *Ficus anastasia* [J]. Afr J Biotechnol,2010,5:635-639.
- [22] 刘忠荣,陈屏昭. 植物组织培养技术在观赏植物中的应用 [J]. 昭通师范高等专科学校学报,2003,25(5):41-43,46.
- Liu Z R, Chen P Z. The application of plant tissue culture technology on the ornamental plants [J]. Journal of Zhaotong Teacher's College,2003,25(5):41-43,46.
- [23] Druart P. Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. compact Spartan [J]. Biologia Plantarum,1997,39(1):67-77.
- [24] 燕丽萍,夏阳,毛秀红,等. 邓恩桉的组织培养 [J]. 林业科学,2011,47(5):157-161.
- Yan L P, Xia Y, Mao X H, et al. Tissue culture of *Eucalyptus dunni* [J]. Scientia Silvae Sinicae,2011,47(5):157-161.
- [25] 吴雅琼,刘婧,汪贵斌,等. 美国红枫的组织培养与快繁技术 [J]. 北方园艺,2016(20):97-102.
- Wu Y Q, Liu J, Wang G B et al. Tissue culture and rapid propagation of *Acer rubrum* [J]. Northern Horticulture,2016(20):97-102.