

文章编号: 1674-7054(2018)03-0333-06

白妙樱的组织培养和快速繁殖

陆 露 蒋细旺

(江汉大学 生命科学院 武汉 430056)

摘 要: 以樱花品种白妙樱带芽茎段为材料,进行组织培养和快繁技术研究。结果表明:较适宜的启动培养基配方为:MS+6-BA(6-苄氨基嘌呤) $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA(萘乙酸) $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。增殖阶段先在MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA₃(赤霉素) $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中继代增殖15 d左右再转入MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸) $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中,增殖效果较好,增殖系数高达4.2。生根培养基较适宜的配方为:1/2MS+NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,生根率为93.63%。生根苗移栽至 $V_{\text{珍珠岩}}:V_{\text{泥炭土}}:V_{\text{蛭石}} = 1:1:1$ 的基质中培养,室外炼苗30 d后,成活率达80%。

关键词: 白妙樱;组织培养;快速繁殖;植物生长调节剂

中图分类号: S 685.99; Q 943.1

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2018.03.010

白妙樱(*Cerasus serrulata* var. *lannesiana* 'Sirotae')是重瓣晚樱中较稀有的开白色花的芳香樱花品种^[1]。原产北半球温带环喜马拉雅山地区,现主要在日本、中国等国家生长^[2];花期4月中旬,适宜温带、亚热带地区种植^[3]。白妙樱为极具代表性的芳香樱花,花蕾淡粉红色,开花纯白色,纯洁高雅,半重瓣,轻盈中不失厚重,不易结实,成枝力弱,但观赏价值高^[4]。目前,关于不同品种的樱花组织培养研究较多^[5-11],但关于白妙樱种植分布及栽培方面以及组织培养快繁殖技术方面的研究均较少。对白妙樱组织培养快速繁殖的研究不仅可以提高快速繁殖效率,而且还可为后续关于白妙樱的深度研究提供便利。

1 材料与方法

1.1 试验材料 2017年3月于武汉法雅园林集团有限公司樱园苗圃基地,采集生长健壮、无病虫害的1 a生白妙樱嫩枝。

1.2 外植体消毒与启动培养 将白妙樱枝条洗净,剪成2~3 cm带腋芽小茎段,流水下冲洗0.5 h,于超净工作台上用70%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗3遍,再用0.1% (m/V)升汞溶液分别浸泡消毒8、10、12 min,浸泡消毒后用无菌水冲洗5遍。以本实验室前期研究的关于日本晚樱‘醉红’组培快繁为基础^[12],将灭菌消毒后的外植体带芽茎段用滤纸吸干后转入MS+6-BA(6-苄氨基嘌呤) $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA(萘乙酸) $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中诱导腋芽萌发。不同消毒时间的外植体分别接种于50个培养皿中,每培养基中接种1个外植体,重复3次。30 d后统计污染率、死亡率和无菌活体率。

污染率 = 污染外植体数 / 接种外植体数 × 100 %;

死亡率 = 死亡外植体数 / 接种外植体数 × 100 %;

无菌活体率 = 存活无菌外植体 / 接种外植体数 × 100 %;

收稿日期: 2018-02-01

修回日期: 2018-07-03

基金项目: 江汉大学武汉研究院开放性课题 JHUNWYY2015110; 武汉花卉(菊花)工程技术研究中心项目(2013021005010466); 2016年武汉市质量技术监督局项目“名优樱花组织培养快速繁殖技术规程”(武质技监局【2016】10号)

作者简介: 陆露(1992-),女,江汉大学生命科学院2015级硕士研究生. E-mail: 691983509@qq.com

通信作者: 蒋细旺(1964-),男,博士,教授. 研究方向: 观赏园艺学. E-mail: xiwangjiang@163.com

萌芽率 = 萌芽数 / 接种数 $\times 100$ 。

1.3 增殖培养 选用 MS 作为基本培养基,将萌发的芽接种到增殖培养基($Z_0 - Z_{10}$)中(表 1),探究 6-BA ($0.5, 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、NAA ($0.1, 0.2, 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、2,4-D ($2, 4$ -二氯苯氧乙酸 $0.1, 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)以及 GA₃ (赤霉素 $0.2, 0.5, 10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对白妙樱增殖的影响。共 1 组对照,10 个处理,每处理重复 3 次,每瓶接种 4 个小芽。4 周后统计并记录各种处理的增殖系数(每外植体形成 0.5 cm 以上次生小芽的个数)。

增殖系数 = 增殖芽数 / 接种芽数。

1.4 生根培养 增殖培养继代 3 次之后,选取株高 2 cm 及以上的增殖芽接种到生根培养基($S_0 \sim S_6$)中(表 1)。以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度生长素诱导生根。每个处理接种 10 个芽,重复 3 次,4 周后统计并记录生根率及平均根数。

生根率 = 生根苗数 / 接种苗数 $\times 100$ 。

表 1 增殖培养及生根培养的培养基配方

Tab. 1 Cultural medium for proliferation and rooting

/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

增殖培养基 Proliferation medium	6-BA	NAA	2,4-D	GA ₃	生根培养基 Rooting medium	IBA	NAA
Z ₀	0.0	0.0	0.0	0.0	S ₀	0.0	0.0
Z ₁	0.5	0.5			S ₁	0.5	
Z ₂	1.0	0.5			S ₂	1.0	
Z ₃	1.0	0.1			S ₃		0.5
Z ₄	1.0	0.2			S ₄		1.0
Z ₅	1.0		0.1		S ₅	0.5	0.5
Z ₆	1.0		0.2		S ₆	1.0	1.0
Z ₇	1.0	0.1		2.0			
Z ₈	1.0	0.2		2.0			
Z ₉	1.0	0.1		5.0			
Z ₁₀	1.0	0.2		10.0			

注:增殖培养基以 MS 作为基本培养基添加不同浓度的植物生长物质;生根培养基以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的植物生长物质

Note: MS was used as the basic medium for the proliferation medium which contains different concentrations of plant hormones; 1/2 MS was used as the basic medium for the rooting medium which contains different concentrations of plant hormones

1.5 炼苗与移栽 生根培养 30 d 左右进行炼苗。先在培养室内解开封口膜,于培养室中炼苗 4~5 d,再转移到自然环境下炼苗 2 d 后进行移栽。移栽前一天以 $V_{\text{珍珠岩}}:V_{\text{泥炭土}}:V_{\text{蛭石}} = 1:1:1$ 的比例配好基质。移栽时将试管苗取出,洗净培养基,植入事先调配好的基质中,室温保持在 25℃ 左右。每 2 d 用 1/4MS 大量元素喷洒叶面^[12]。1 周后将其移栽至室外,30 d 后统计成活率。

1.6 培养条件 启动培养阶段试验容器采用直径 90 mm 圆形玻璃培养皿,每培养皿约 30 mL 培养基。所有接种苗均放入恒温培养箱中,温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照 1 500~2 000 lx,光照周期 16 h $\cdot$ d⁻¹。增殖培养和生根培养均先置培养箱中培养至组培苗无污染且正常生长后再转入组培室中进行培养,且试验容器均使用 100 mL 锥形瓶,每瓶约含 40 mL 培养基。所有培养基中均添加琼脂 $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 5.8~6.0。所有培养基均用蒸汽高压灭菌锅 121℃ 灭菌 20 min^[12]。

1.7 数据处理与统计 试验所有数据均用 Excel 2003 和 SPSS 22.0 处理。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒与启动培养 不同消毒时间对白妙樱外植体消毒效果的结果见表 2。由表 2 可知,用 0.1%

升汞溶液处理外植体 10 min 外植体污染率较低 ,为 19.3% ,与 8 min 消毒时间处理的结果差异显著 ,与 12 min 消毒时间处理的结果差异不显著;死亡率为 24.0% ,显著低于 8 ,12 min 消毒时间处理的结果;无菌苗成活率为 76.0% ,显著高于 8 ,12 min 消毒时间处理的结果 ,故 10 min 为最适消毒时间。白妙樱启动培养的生长状况见图 1 - a。

表 2 不同消毒时间对白妙樱外植体消毒效果的影响
Tab.2 Effect of disinfection time on the explants

消毒时间 /min Disinfection time	接种外植体数 /个 Number of explants inoculated	污染率 /% Pollution rate	死亡率 /% Death rate	无菌苗成活率 /% Survival rate of aseptic plantss
8	50	38.7 ± 2.4a	73.3 ± 1.8a	26.7 ± 1.8c
10	50	19.3 ± 1.3b	24.0 ± 3.1c	76.0 ± 3.1a
12	50	16.0 ± 2.3b	42.0 ± 2.3b	58.0 ± 2.3b

注: 表中同列数据后标注的小写英文字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)
Note: The lower case English letters after the same column of data in the table show significant differences between the treatments ($P < 0.05$)

2.2 增殖培养 外植体接种 2 周左右开始形成丛生芽 ,4 周后统计增殖系数 ,结果见表 3。由表 3 可知 ,编号 Z_9 培养基可有效促进增殖 ,且芽生长最快 ,增殖系数最高 ,但增殖 20 d 左右出现叶片玻璃化现象 ,且长势不佳 ,不利于后期继代及生根。而编号 Z_6 培养基增值效果不及 Z_9 培养基 ,但其增殖系数亦较高 ,芽生长正常 ,无玻璃化现象; 经过数次实验调整 ,筛选出最佳的增殖方法为: 先于 Z_9 (MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + GA₃ 5.0 mg · L⁻¹) 培养基中增殖 15 d 左右再转入 Z_6 (MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + 2-4-D 0.2 mg · L⁻¹) 培养基中 ,既能保证较高增殖系数 ,亦可有效抑制叶片玻璃化。白妙樱增殖培养的生长状况见图 1 - b。

表 3 白妙樱增殖培养试验结果
Tab.3 Shoot proliferation of Cerasus serrulata Sirotae

编号 Numbers	增殖系数 Multiplication factors	丛生芽生长状态 Growth state from buds
Z_0	0e	芽几乎无生长迹象 ,后期褐化死亡
Z_1	1.8 ± 0.37d	芽生长慢 ,丛生芽少 ,基部易形成愈伤
Z_2	2.6 ± 0.40bcd	芽生长较慢 ,丛生芽较少 ,基部易形成愈伤
Z_3	2.4 ± 0.24cd	芽生长较慢 ,丛生芽较少
Z_4	2.2 ± 0.20cd	芽生长较慢 ,丛生芽较少 ,部分出现玻璃化
Z_5	3.2 ± 0.37abc	芽生长较快 ,丛生芽较多 ,少数出现玻璃化
Z_6	4.0 ± 0.32a	芽生长快 ,丛生芽多
Z_7	3.2 ± 0.37abc	芽生长较快 ,丛生芽多 ,少量玻璃化
Z_8	3.6 ± 0.40ab	芽生长较快 ,丛生芽较多 ,少量玻璃化
Z_9	4.2 ± 0.20a	芽生长快 ,丛生芽多 ,后期少量玻璃化
Z_{10}	3.2 ± 0.37abc	芽生长较快 ,丛生芽多 ,少量玻璃化

注: 表中同列数据后标注的小写英文字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)
Note: The lower case English letters marked after the same column of data in the table show significant differences between the processes($P < 0.05$)

表 4 白妙樱生根诱导试验结果

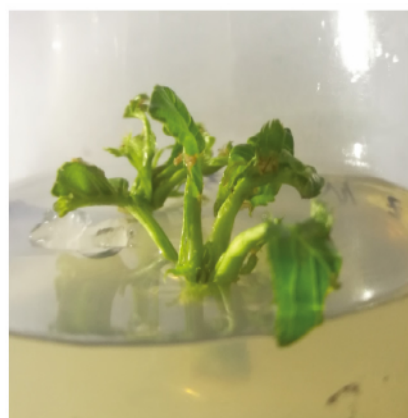
Tab. 4 Rooting induction test of *Cerasus serrulata* Sirotae

编号 Numbers	生根率 Rooting rates / %	平均根数 Average number of roots	根的生长状态 Growth state of roots
S ₀	31.23 ± 2.70d	3.67 ± 0.19a	细弱 无根毛
S ₁	78.17 ± 2.78bc	2.88 ± 0.14bc	粗壮 根毛较少
S ₂	76.77 ± 3.33bc	3.00 ± 0.72bc	细壮 根毛较少
S ₃	93.63 ± 3.19a	3.25 ± 0.13b	较粗壮 根毛多
S ₄	84.53 ± 2.73ab	2.96 ± 0.11bc	粗壮 根毛较少
S ₅	72.10 ± 4.74c	2.81 ± 0.13c	粗壮 根毛少
S ₆	67.57 ± 3.86c	3.29 ± 0.84ab	细壮 根毛少

注: 表中同列数据后标注的小写英文字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The lower case English letters marked after the same column of data in the table show significant differences between the processes ($P < 0.05$)

2.3 生根培养 从增殖继代培养的白妙樱中选取株高 2 cm 以上、长势较好的苗进行生根诱导。诱导结果(表 4)可见,以 1/2MS 作为基本培养基可以有效的诱导白妙樱生根,当不添加其他植物激素(S₀)时,生根率较低,根较细弱,无根毛,根的生长状态不佳,且部分最后基部形成愈伤组织而不再生长;同时添加少量 IBA 及 NAA(S₅ S₆),生根效果有提高,但效果不明显,植株长势不佳,之后叶片变硬,不再长高;S₃ S₄ 均能有效诱导生根,叶片大且浓绿,长势较好,根较壮,根毛较多,说明单独添加适量 NAA 可有效促进生根,单独添加 IBA 也可提高生根率,但效果均没有 NAA 显著。经统计分析可知 S₃(1/2MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹)为最适生根培养基,生根率可达 93.63%。白妙樱增殖培养的生长状况见图 1 - c。



a. 白妙樱的启动培养



b. 白妙樱的增殖培养



c. 白妙樱的生根培养



d. 白妙樱移栽前的生根苗

图 1 白妙樱组织培养苗的生长状况

Fig. 1 Tissue culture and rapid propagation of *Cerasus serrulata* Sirotae

2.4 炼苗与移栽 生根培养30 d后,生根苗(图1-d)根长基本长至3~4 cm左右时进行炼苗。解开封口膜后在组培室培养4~5 d后转入自然环境下炼苗2 d。移栽30 d后统计,白妙樱成活率达80%。

3 讨 论

实验结果表明,白妙樱外植体使用0.1%升汞溶液消毒10 min消毒效果较好。较适宜的增殖方法为,先在MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA₃ $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中继代增殖15 d左右再转入MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中,增殖效果较好,且诱导出的丛生芽均长势较好,并能顺利诱导生根。较适宜的生根培养基为1/2MS+NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,生根率高达93.63%。

外植体的消毒时间对植物成活率和萌芽率有较大影响。0.1%升汞的消毒时间过短会导致大面积污染,时间过长会导致褐化死亡,合理控制消毒时间,加入适量活性炭可有效降低污染率,提高腋芽萌发率^[13-14]。

增殖阶段前期,植株增殖效果不佳,植株矮小,且基部易形成愈伤,影响丛生芽的形成。李艳敏^[15]等研究赤霉素(GA₃)对樱花组培中的作用中发现,适宜浓度的GA₃处理对组培苗的苗高有一定的促进作用,但浓度过大时,易造成叶片畸形及茎尖伤害,亦会抑制生根。在本实验中的Z₉和Z₁₀培养基,可发现当GA₃浓度过高时反而抑制植株增殖,这与李艳敏等的研究结果一致。故增殖前期合理添加低浓度的GA₃(不宜超过 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)可有效改善植株矮小的情况,植株恢复到正常株高后再转入不添加GA₃的增殖培养基中,增殖效果对后期生根效果有一定影响。

白妙樱生根阶段,若直接将不添加GA₃的增殖苗进行生根诱导,一段时间后基部形成愈伤,叶片变硬,生根效果不佳。故选用先经GA₃处理后再继代数次的株高正常的增殖苗进行生根诱导,诱导前期将其放入恒温培养箱中,待生根稳定后再转入组培室中,可形成稳定的生根体系。生根培养基中单独使用NAA可有效诱导生根,且生根率较高,根系发达且稳定。IBA效果次之。同时使用NAA和IBA没有单独使用NAA的生根效果好。说明高浓度的生长素或生长素组合反而不利于生根。

参考文献:

- [1] 王贤荣. 中国樱花品种图志[M]. 北京: 科技出版社, 2014.
- [2] Li C L, Bruce B. *Cerasus* [M]//Wu Z Y, Raven P H. *Flora of China*. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2003: 404-420.
- [3] 严春风, 徐梁, 赵绮, 等. 樱属景观植物资源分类研究[J]. 浙江林业科技, 2017, 37(1): 20-25.
- [4] 蒋细旺. 武汉樱花栽培历史和特点[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2014, 42(5): 74-79.
- [5] 史港影, 南程慧, 伊贤贵, 等. 雪落樱再生体系的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(S1): 20-24.
- [6] 王红梅, 李园莉, 李洪光, 等. 垂枝樱花组培技术研究[J]. 黑龙江农业科学, 2016(9): 1-6.
- [7] 罗桂杰, 金倩, 陈芬. 樱花新品种白玉吉野组培快繁技术研究[J]. 江西农业学报, 2017, 29(7): 44-47.
- [8] Geert-Jan De Klerk. Rooting of microcuttings: theory and practice[J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2002, 38(5): 415-422.
- [9] Kris Pruski, Tess Astatkie, Jerzy Nowak. Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking cherry (*Prunus tomentosa*) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 82(2): 207-211.
- [10] 李晓玲, 卢绪志, 边震, 等. 山樱花组培快繁技术研究[J]. 林业科技, 2014, 39(5): 1-3.
- [11] 王玉珍, 徐进, 罗景兰, 等. 草樱花组培快繁技术的研究[J]. 山东农业科学, 2004(6): 6-8.
- [12] 张灵灵, 蒋细旺. 2个日本晚樱品种组织培养和快繁技术研究[J]. 西南林业大学学报, 2015, 35(4): 27-32.
- [13] 王小军. 红树莓组培快繁体系与试管苗褐化控制技术研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2015.
- [14] 李萍, 成仿云, 张颖星. 防褐剂对牡丹组培褐化发生、组培苗生长和增殖的作用[J]. 北京林业大学学报, 2008(2): 71-76.
- [15] 李艳敏. 赤霉素对樱花组培苗壮苗及生根的影响[C]. //中国园艺学会. 中国园艺学会2012年学术年会论文摘要集. 北京: 中国园艺学会, 2012.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Cerasus serrulata* var. *lannesiana* ‘Sirotae’

LU Lu ,JIANG Xiwang

(College of Life Science ,Jiangnan University ,Wuhan ,Hubei 430056 ,China)

Abstract: The stem of *Cerasus serrulata* var. *lannesiana* ‘Sirotae’ with buds were used as explants ,sterilized and cultured on mediums with various combinations and concentrations of plant growth regulators for rapid propagation. The explants were cultured in a medium of MS +6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ to induce shoots. The shoots were then subcultured in the medium of MS +6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + GA₃ 5.0 mg · L⁻¹ and then transferred onto the medium of MS +6-BA 1.0mg/L + 2 4-D 0.2mg · L⁻¹ for proliferation. The proliferation coefficient was 4.2 under these mediums. The plantlets were cultured on a rooting medium of 1/2MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹ , and the rooting rate was 93.63% . The rooted plantlets were transplanted in the substrate which was composed of perlite ,peat and vermiculite at a ratio of 1:1:1 , and their survival rate was up to 80% after they hardened off outdoor for 30 d.

Keywords: *Cerasus serrulata* var. *lannesiana* ‘Sirotae’ ; tissue culture; rapid propagation; phytohormone

(责任编辑: 叶 静)

(上接第 271 页)

Effects of Pleocidin and Spinetoram on the Development of Zebrafish Embryos

KONG Weihao ,GAO Weishan ,FAN Yongmei

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry ,Hainan University ,Haikou ,Hainan 570100 ,China)

Abstract: Zebrafish (*Danio rerio* AB) was treated with pleocidin and spinetoram at different concentrations (120 ,151 ,190 ,240 ,302 ,380 ,480 mg · L⁻¹ for pleocidin , and 0.6 ,1.8 ,5.45 ,16.4 and 49.4 mg · L⁻¹ for spinetoram) to observe the effect of the two chemicals on the embryo development of zebrafish. The test followed strictly the OECD guidelines for testing of fish embryo acute toxicity (FET) . The results showed that the median lethal concentration (*LC*₅₀) for zebrafish embryos exposed to pleocidin after 96 h of fertilization was 242.27 mg · L⁻¹ , and 9.713 mg · L⁻¹ when exposed to spinetoram. Pleocidin and spinetoram had no dosage-response relationships in the frequency of spontaneous movement in 1 min after 24 h of fertilization , the frequency of heart beat in 20 s after 48 h of fertilization , and the body length after 96 h of pollination. Pleocidin and spinetoram showed a dosage-response relationship in the frequency of spinal curvature after 72 h of fertilization. These two chemicals were all low in toxicity , and in high concentrations , pleocidin is more friendly to Zebrafish than spinetoram.

Keywords: pleocidin; spinetoram; zebrafish; embryonic development; toxicity

(责任编辑: 叶 静)