

技术开发

次,叶面肥和防病虫害的农药可以拌成混合液,叶面肥用0.1%尿素,农药用多菌灵或炭疽福美,防治炭疽病和根腐病,一举两得。同时及时拔除病株烧毁。

3.3.4 炼苗

扦插后25~30 d,生根率达90%时,开始炼苗,先揭开小拱棚两头的薄膜,2 d后将薄膜全部去除;外遮阳网开始炼苗时先揭去1层,当新梢90%时揭去全部外遮阳网,进行全光照炼苗。

3.3.5 苗期管理

从炼苗开始到成苗需3个月的苗期管理,见干浇湿,进行水分管理;每10天浇1次液肥,用0.2%尿素浇施;每隔10天喷1次多菌灵和炭疽福美混合液;进行全光照管理。

3.3.6 商品苗定位

穴盘苗,新梢长度5 cm以上,新梢基部直径0.2 cm以上,根系发达,植株健壮,无病虫害,供货时间从扦插至出苗4个月,成品率90%。

致谢:承蒙浙江林学院许绍远教授审阅,谨致谢忱。

参考文献

- [1]包志毅.世界园林乔灌木[M].北京:中国林业出版社,2004.
- [2]楼炉煊.观赏树木学[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [3]沈国舫.森林苗木培育学[M].北京:中国林业出版社,2002.
- [4]顾永华,杨军,何云,等.秤锤树扦插繁殖技术[J].林业科技开发,2007,21(1):34-36.
- [5]刘仁林,欧斌,黄小春,等.野生园林树种原色图谱与繁育技术[M].沈阳:辽宁大学出版社,2003.

(责任编辑 吴祝华)

垂枝早樱‘红枝垂’组培快繁试验

荣冬青,王贤荣*

(南京林业大学森林资源与环境学院,南京 210037)

摘要:以垂枝早樱‘红枝垂’的带芽茎段为外植体,接种到MS+1.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA培养基上,芽的诱导率最高,为80%。采用正交设计方法,研究了BA、NAA、蔗糖3种不同因素及其组合对‘红枝垂’芽增殖系数的影响,结果表明:细胞分裂素BA是幼芽增殖的最主要因素。芽增殖的最佳组合为 $A_2B_3C_2$ 即MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA+35 g/L蔗糖,其增殖系数为4.15。当株高在2~3 cm时,转入 $1/2MS+1.0$ mg/L NAA+1.0 mg/L IBA生根培养基上,接种25 d后,生根率可达95%;经过5~7 d的开瓶炼苗,以沙:珍珠岩:蛭石=1:1:1为移栽基质,20 d后调查,其移栽成活率达84%。

关键词:‘红枝垂’;快繁;组织培养;正交试验

A Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Cerasus subhirtella* var. *pendula* ‘Rosea’ // RONG Dong-qing, WANG Xian-rong

Abstract: The stem sections with bud of *Cerasus subhirtella* var. *pendula* ‘Rosea’ were selected as explants and were inoculated medium of MS 1.0 mg/L N^6 -benzyladenine (BA) and 0.1 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA), the highest shoot induction rate was 80%. The orthogonal experiment design was used to study the effects of BA, NAA and sucrose on shoot proliferation coefficient of the *C. subhirtella* var. *pendula* ‘Rosea’. The results indicated that BA was the main factor influencing the shoot proliferation. The optimal medium for reproduction of the bud was $A_2B_3C_2$ treatment, namely, MS with 0.5 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA + 35 g/L sucrose, and the proliferation coefficient was 4.15. The rooting rate could reach 95% when the explants of 2~3 cm were transplanted in the $1/2$ MS medium with 1.0 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) and 1.0 mg/L NAA for 25 days. After hardening seedling for 5~7 d, the survival rate of plantlets reached 84% in the transplant substrate of sand, perlite and vermiculite (1:1:1) for 20 days.

Key words: *Cerasus subhirtella* var. *pendula* ‘Rosea’; Rapid propagation; Tissue culture; Orthogonal Design

Author's address: College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, 210037, Nanjing, China

收稿日期:2007-12-15

修回日期:2007-04-15

基金项目:江苏省高校自然科学基金“早樱种系分类学研究”(编号:06KJB180045)。

第一作者简介:荣冬青(1979-),女,硕士生,研究方向为资源植物。

通讯作者:王贤荣,女,副教授,博士。

垂枝早樱‘红枝垂’(*Cerasus subhirtella* var. *pendula* ‘Rosea’)隶属于蔷薇科樱属(*Cerasus*),是早樱种系下的著名品种^[1,2],引自日本。其枝条如垂柳般下垂,树形美观,花期在早春2~3月,花先叶开放,伞

形花序,萼筒形状奇特,颜色粉红至深粉红色,轻柔高洁;满树盛开时,景色蔚为壮观,具有较高的吸引力和观赏价值,南京玄武湖和梅花山有栽培。

目前在樱属植物繁殖技术研究方面,已有大量离体培养研究,在垂枝樱花类植物中,徐兆波等对从日本引进的垂枝樱花生发育特性进行了试验观察,研究了其常规繁殖的砧穗组合和其抗寒砧木组织培养的条件^[3],但对‘红枝垂’的繁殖技术还未见报道。由于早樱类枝条纤细,一般扦插和嫁接成活率都较低,无法满足规模化生产的需要,因此,摸索组培繁殖方法具有较大的实际意义。

本试验在总结前人经验的基础上,试图对早樱种系下的‘红枝垂’离体再生系统做初步研究,以带芽茎段为研究材料,对组织培养中的外殖体启动培养、幼苗增殖培养及生根诱导3个步骤的培养,探索主要的影响因素,以期归纳出其组培快繁的培养流程,为樱花工厂化、产业化生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和灭菌处理

2006年4月底,从南京玄武湖公园采集‘红枝垂’的当年生半木质化幼嫩枝条,以带芽茎段为试验材料。

将嫩枝上的叶片全部剪掉,用毛刷蘸洗衣粉洗刷表面,然后将枝条剪成约2 cm的带芽茎段,流水下冲洗2 h,放于70%的酒精30 s,然后用无菌水冲洗4次,再放入0.1% HgCl₂(加1~2滴吐温-20)的溶液中浸泡8 min后,用无菌水冲洗5次,再用无菌滤纸吸干其表面水分,接种于不同培养基上。

1.2 培养条件

培养温度为25±2℃;日光灯照明,光强为1 500~2 000 lx;每天光照12 h。

1.3 试验方法

试验按3个不同的培养阶段设计培养基,通过试验结果分析筛选各阶段的最适培养基。初代培养基添加蔗糖30 g/L(诱导生根时蔗糖量减半),琼脂7 g/L,添加不同种类及不同浓度的植物生长调节物质,pH值为5.75。

1.3.1 初代培养基的筛选试验

以MS为基本培养基,细胞分裂素与生长素混合使用,BA 0.1 mg/L与IBA(0.1、0.5、1.0 mg/L)组合成3个处理;BA 1.0 mg/L与NAA(0.1、0.5、1.0 mg/L)组合成3个处理;共6个处理,用来诱导腋芽萌发。将消毒后的外殖体接种到培养基上,每处理接种30瓶,每瓶接种一个茎段,30 d后统计诱导率。

1.3.2 幼芽增殖培养基的筛选试验

以MS为基本培养基,选用L₉(3⁴)设计进行3因素3水平的正交试验^[4-7],主要考察BA、NAA、蔗糖3个因素的效应。每个因素设置3个水平,BA浓度为0.1、0.5、1.0 mg/L, NAA浓度为0.01、0.05、0.1 mg/L,蔗糖浓度为25、35、45 g/L。按正交表前3列列出不同的试验配比,构成9种培养基处理。待接种的带芽茎段萌发并抽出幼芽后,切取幼芽转入9种增殖培养基中,每处理10瓶,每瓶3~4个幼芽,重复3次,30 d后统计增殖系数,增殖系数=增殖芽数/接种芽数,取3次重复的平均值。

1.3.3 生根培养基的筛选试验

在参考相关文献的基础上^[8-12],采用1/2MS培养基作为幼苗生根的基本培养基。用不同浓度的IBA、NAA及二者组合试验。待培养的幼苗长到2~3 cm时,然后将幼苗转入到生根培养基。每种培养基接种20个芽,25 d后统计生根率。

1.3.4 炼苗与移栽

生根培养30 d后,将株高4 cm以上,根系发达,叶片展开的健壮幼苗在培养室内去掉封口膜,炼苗5~7 d后,将根系附着的培养基洗净,并用0.1%的多菌灵蘸根处理,移植于已作消毒处理的基质中,定期喷洒1/10MS大量元素营养液及1 000倍液的多菌灵,20 d后统计试管苗移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 初代培养基对芽诱导的影响

芽的诱导与分化离不开植物生长调节物质的参与。不同植物生长调节物质的种类与配比对芽诱导的效果不同,试验结果见表1。

表1 初代培养基对‘红枝垂’芽诱导的影响

培养基成分及浓度 /mg·L ⁻¹	接种段数/个	分化数/个	诱导率/%
MS + BA0.1 + IBA0.1	30	11	36.7
MS + BA0.1 + IBA0.5	30	13	43.3
MS + BA0.1 + IBA1.0	30	7	23.3
MS + BA1.0 + NAA0.1	30	24	80.0
MS + BA1.0 + NAA0.5	30	20	66.7
MS + BA1.0 + NAA1.0	30	16	53.3

由表1可知,当细胞分裂素BA分别与IBA、NAA组合使用时,后者优于前者,可能是由于浓度不同或由于IBA、NAA的作用方式不同,外源激素总是通过植物体的内源激素而起作用。当1.0 mg/L的BA与0.1 mg/L的NAA组配使用时,芽的诱导率最高,为80%。幼芽长势旺盛,叶色浓绿,逐渐形成丛芽(图

技术开发

1)。当0.1 mg/L的BA与IBA(0.1、0.5、1 mg/L)组合使用时,对芽的诱导效果差,在0.1 mg/L的BA与1 mg/L的IBA组合使用时,芽的诱导率最低为23.3%。这说明,较低浓度的细胞分裂素与生长素组合使用时,不利于芽的启动。



图1 丛生芽的形成

2.2 增殖培养基对芽增殖的影响

‘红枝垂’幼芽增殖培养试验的统计结果和极差分析见表2,从表2可以看出,9个处理均能形成丛生芽,但各处理间芽的增殖系数差异很大。级差分析表明:A因子(BA)的级差最大为1.51;其次是C因子(蔗糖),级差值为0.52;B因子(NAA)级差最小,为0.27。这说明BA对幼芽增殖的影响最大,其次是蔗糖,对幼芽增殖影响最小的是NAA。

表2 正交试验结果分析

培养基 编号	因子种类			增殖系数
	A(BA)	B(NAA)	C(蔗糖)	
1	0.1(1)	0.01(1)	25(1)	1.74
2	0.1(1)	0.05(2)	35(2)	2.37
3	0.1(1)	0.10(3)	45(3)	2.05
4	0.5(2)	0.01(1)	45(3)	3.12
5	0.5(2)	0.05(2)	25(1)	3.41
6	0.5(2)	0.10(3)	35(2)	4.15
7	1.0(3)	0.01(1)	35(2)	3.04
8	1.0(3)	0.05(2)	45(3)	2.86
9	1.0(3)	0.10(3)	25(1)	2.50
K_1	6.16	7.90	8.00	
K_2	10.68	8.64	9.56	
K_3	8.40	8.70	8.03	
k_1	2.05	2.63	2.67	
k_2	3.56	2.88	3.19	
k_3	2.80	2.90	2.68	
R	1.51	0.27	0.52	

根据表2,把A、B、C3因素对芽增殖系数的相对程度排成主次顺序,用柱状图表示出来见图2。图2表明:随A因素(BA含量)水平的上升,增殖系数先上升后下降,且3水平差异显著;B随因素(NAA含量)水平的上升,增殖系数呈上升趋势,且3水平差异不显著;随C因素(蔗糖含量)水平的上升,增殖系

数先上升后下降,3水平差异显著。考察各因子水平均值,A因素的第2水平最好,B因素的第3水平最好,C因素的第2水平最好。故幼芽增殖系数的最佳组合为 $A_2B_3C_2$,即MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖35 g/L,其增殖系数为4.15。

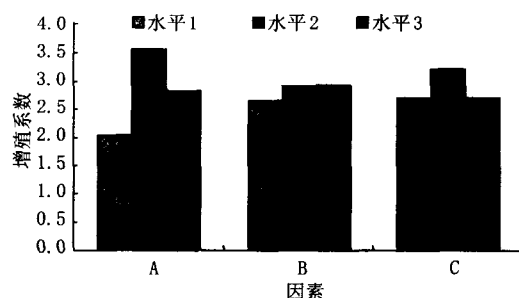


图2 因素与增殖系数关系趋势示意图

2.3 生根培养基对幼苗生根的影响

表3表明:不同浓度及其种类生长素的添加均诱导了根的形成。在仅含有IBA的两种生根培养基上,根系比较细弱,呈放射状,达6~10条,生根率较低,分别为60%、70%。在仅含有NAA的两种培养基上,在茎的基部形成大量愈伤组织,根呈白色,粗壮,没有须根发生,其生根率分别为55%、70%。生长素IBA、NAA二者组合根系较粗壮,基部愈伤组织较少,并伴随有须根的发生,生根条数多,平均为7条,根均长在2 cm以上。根生长粗壮,根毛丰富,根呈现淡黄色。在本试验中,1/2MS+1.0 mg/L IBA+1.0 mg/L NAA培养基中培养,接种10 d后可陆续出现白色根点,接种30 d后,长成完整植株(图3),生根率最高可达95%。

表3 不同培养基对‘红枝垂’生根的影响

培养基成分及浓度 /mg·L ⁻¹	接种苗 数/个	生根苗 数/个	生根率 /%
1/2MS+IBA0.5	20	12	60
1/2MS+IBA1.0	20	14	70
1/2MS+NAA0.5	20	11	55
1/2MS+NAA1.0	20	14	70
1/2MS+IBA0.5+NAA0.5	20	18	90
1/2MS+IBA1.0+NAA1.0	20	19	95



图3 完整的再生植株

2.4 试管苗的移栽

由表4可知,不同栽培基质对‘红枝垂’试管苗移栽成活率的影响不同。其中以沙:珍珠岩:蛭石=1:1:1为基质成活率最高,可达84%。其次是珍珠岩:蛭石=1:1混合基质,成活率为64%。珍珠岩:泥炭=1:1混合基质移栽成活率最低,为52%。研究还发现,含泥炭的栽培基质部分幼苗基部叶片枯黄,腐烂死亡的现象。这可能是因泥炭中含有大量腐殖质土,通气性差造成的。

表4 基质对‘红枝垂’移栽成活率的影响

基 质	移栽株数/株	成活数/个	成活率/%
珍珠岩:蛭石=1:1	25	16	64
珍珠岩:泥炭=1:1	25	13	52
蛭石:泥炭=1:1	25	14	56
沙:珍珠岩:蛭石=1:1:1	25	21	84

3 结论与讨论

在组织培养工作中,一种植物组培的成功,与所选取的外植体材料紧密相连。本研究以‘红枝垂’当年生的带腋芽茎段为材料,其优点是萌芽率高,易成活,而且有良好的遗传稳定性。在诱导培养基中,MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上芽诱导率高,达80%,芽长势旺盛。闫道良等^[13]在研究钟花樱组织培养中得出,BA/NAA 约为10时,即BA 0.8~1.0 mg/L,NAA 0.08~0.1 mg/L,对芽的诱导有较好的效果。这表明,细胞分裂素与生长素比值较大时,有利于芽的诱导。

在幼芽增殖阶段,激素的种类浓度、蔗糖含量对增殖有显著的影响。通过正交试验得出,A₂B₃C₂组合即MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA+35 g/L 蔗糖,为最优组合,其增殖系数为4.15,长势好。随着BA浓度的增大,幼苗出现轻微的玻璃化现象,即叶片卷曲,出现半透明状况,这与李云等^[14]在珠美海棠上的研究相一致。在组织培养中蔗糖的作用是为幼苗提供碳源,适当提高蔗糖含量,能降低培养基中的渗透势,可以预防试管苗的玻璃化。

在生根培养基中分别添加NAA、IBA两种生长调节物质,外植体的生根率都低于70%;在IBA与NAA组合的两种培养基中,幼苗均能达到90%的生根率,其中以1/2MS+NAA 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L培养基的诱导生根效果最好,愈伤组织小、单株根数多、根生长粗壮,生根率高达95%。这与刘兴菊等^[15]在紫叶矮樱生根培养中的研究结果相同,而周丽华等^[16]在绯寒樱组织培养中采用1/2MS+IBA

1.0 mg/L 配方,生根率达100%。一方面由于不同的种或品种在某一特定阶段,对植物生长调节剂的要求不同,另一方面,由于前期培养阶段造成外源激素的累积。

移栽前期试管苗生长在高湿的环境中,基部易腐烂死亡。试管苗移栽前在0.1%的多菌灵中浸泡3~5 min,能有效地避免茎腐病发生。试验结果表明:以沙:珍珠岩:蛭石=1:1:1为基质,并用1/10 MS 大量元素营养液及1000倍液的多菌灵进行叶面喷施有利于‘红枝垂’试管苗的移栽成活,最高成活率达84%。

参考文献

- [1]王贤荣. 国产樱属分类学研究[D]. 南京:南京林业大学,1997.
- [2]王贤荣. 早樱种系的分类及其观赏价值[J]. 南京林业大学学报, 2000,24(6):44-46.
- [3]徐兆波,陈秀云,郭绍霞,等. 垂枝樱花引种观察与繁育技术研究[J]. 莱阳农学院学报,2001,18(1):32-36.
- [4]李春喜,王志和. 生物统计学[M]. 北京:北京科学出版社,2000.
- [5]袁志发,周静宇. 实验设计与分析[M]. 北京:北京高教出版社,2000.
- [6]廖桂宗,彭世揆. 试验设计与抽样技术[M]. 北京:中国林业出版社,1993.
- [7]康冰,于福科,张广军,等. 应用正交实验筛选玫瑰茎段增殖培养基[J]. 西北植物学报,2003,23(4):653-655.
- [8]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: 207-211.
- [9]Rao M S, Purohit S D. In vitro shoot bud differentiation and plantlet regeneration in *Celastrus paniculatus* Willd [J]. Biologia Plantarum 2006,50(4): 501-506.
- [10]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.
- [11]朱志国. 紫叶矮樱的离体快速繁殖[J]. 安徽农学通报,2005,11(3):72.
- [12]袁小环,彭向永,李青,等. 甜樱桃组培苗的生根研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(4):71-73,78.
- [13]闫道良,王贤荣,钦佩,等. 钟花樱组织培养再生体系的建立[J]. 林业科技开发,2006,20(3):21-24.
- [14]李云,田亨,罗晓芳. 珠美海棠试管苗玻璃化发生机理的初步研究[J]. 北京林业大学学报,1996(1):52-58.
- [15]刘兴菊,梁海永,郑辉,等. 紫叶矮樱组织培养的研究[J]. 河北林果研究,2005,20(1):44-47.
- [16]周丽华,王振师,许冲勇,等. 绯寒樱的组织培养快繁研究[J]. 广东林业科技,2004,20(4):1-4.

(责任编辑 吴祝华)