

东亚唐棣增殖培养条件的优化

何志宇¹, 尹鹏先¹, 程林林¹, 蔺小丽¹, 蔡 靖¹, 姜在民^{2*}

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:以东亚唐棣(*Amelanchier asiatica*)无菌试管苗为材料,研究了不同基本培养基、激素组合、蔗糖浓度以及琼脂浓度对东亚唐棣增殖的影响。结果表明:最为适合东亚唐棣增殖的培养基组合为MS+6-BA 1.00 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹+IBA 0.10 mg·L⁻¹+40 g·L⁻¹蔗糖+8 g·L⁻¹琼脂,增殖系数可达6.83,幼苗叶片生长舒展,苗高和茎的生长量也有了很大提高。试验结果将为东亚唐棣工厂化育苗提供技术指导。

关键词:东亚唐棣;组织培养;优化;增殖

中图分类号:S503.53 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)01-0126-04

Optimization on Shoot Proliferation Culture Media of *Amelanchier asiatica*

HE Zhi-yu¹, YIN Peng-xian¹, CHEN Lin-lin¹, LIN Xiao-li¹, CAI Jing¹, JIANG Zai-min^{2*}

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The objective of this study was to examine the influences of different basic media, hormone combination, sucrose concentration, agar concentration on shoot proliferation of *Amelanchier asiatica*. The results showed that an optimum medium was MS supplemented with 1.00 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.05 mg·L⁻¹ NAA, 0.10 mg·L⁻¹ IBA, 40 g·L⁻¹ sucrose and 8 g·L⁻¹ agar, by which the multiplication coefficient reached 6.83. The height and quality of the shoots were greatly improved. This system could be used for rapid mass clonal propagation of *A. asiatica* for commercial production.

Key words: *Amelanchier asiatica*; tissue culture; optimization; proliferation

东亚唐棣(*Amelanchier asiatica*)为蔷薇科苹果亚科唐棣属植物,是我国仅有的2种唐棣属植物之一,分布于我国浙江西北部(天目山)、安徽南部(黄山)、江西西北部、陕西南部(秦岭)等地,生长于海拔1 000~2 000 m的河边山坡混交林中。东亚唐棣为落叶乔木,单叶互生,叶片卵形,边缘有细锐锯齿;总状花絮,下垂;苞片膜质,早落;花瓣5,长圆披针形或卵状披针形,花白色;梨果近球形,蓝黑色。因其开花时白色花多较繁密,具有较高的观赏价值,可作园林观赏树种^[1]。果实含钙量高,具较高的食用价值。

国内外对唐棣属植物的研究报道多集中在桤叶

唐棣(*A. alnifolia*)^[2-5]和加拿大唐棣(*A. canadensis*)^[6],但对我国唐棣属植物的研究报道较少。我国园林绿化植物资源极为丰富,但包括东亚唐棣在内的大量种类仍处于野生状态,未被开发利用^[7-8]。在前期研究中,尹鹏先^[9]等发现适合东亚唐棣的增殖培养基为MS+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹,其最佳组培苗的增值系数为4.8,健康指数为2.04,但在研究过程中进而发现在继代培养达6~8代以上时,组培苗表现出生长退化、质量不高等性状,难以用于炼苗移栽等工厂化生产。本试验旨在以前的研究基础上,以东亚唐棣的无菌苗为材料,对其增殖培养技术进行进一步优化,以期提高其增

收稿日期:2015-03-16 修回日期:2015-05-08

基金项目:林业公益性行业科研专项(201204308)。

作者简介:何志宇,男,硕士,研究方向:森林植物。E-mail:1025586032@qq.com

*通信作者:姜在民,男,副教授,研究方向:植物学。E-mail:jiangzmz@163.com

殖系数和幼苗质量,为东亚唐棣生根炼苗技术及后期东亚唐棣作为园林绿化苗木的规模化生产提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为生长健壮 ≥ 3 cm 的东亚唐棣无菌试管苗。

1.2 方法

1.2.1 基本培养基的选择 基本培养基选择 MS、WPM、1/2MS、1/4MS,附加 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每个处理接种 15 瓶,每瓶 2 株,40 d 后观察统计增殖情况。

1.2.2 激素组合的选择 以 MS 为基本培养基,采用 3 因素、3 水平完全随机设计,6-BA 选择 0.10 、 0.50 、 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个水平,NAA 选择 0.01 、 0.05 、 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个水平,IBA 选择 0.01 、 0.05 、 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 种不同激素组合对增殖的影响。

1.2.3 蔗糖浓度的选择 蔗糖浓度选择 10 、 20 、 30 、 40 、 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,培养基选择 MS 培养基,附加 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA,每个处理接种 15 瓶,每瓶 2 株,40 d 后观察统计增殖情况。研究不同蔗糖浓度对增殖的影响。

1.2.4 琼脂浓度的选择 琼脂浓度选择 6 、 7 、 8 、 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,培养基选择 MS 培养基,附加 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA,每个处理接种 15 瓶,每瓶 2 株,40 d 后观察统计增殖情况。研究不同琼脂浓度对增殖的影响。

1.2.6 统计分析方法 增殖系数=增殖苗数/接种苗数。生长状况划分为 3 个健康指数“1”“2”“3”,“1”表示组培苗生长健壮,茎干粗壮,叶片大而鲜绿,无黄叶及玻璃化现象;“2”表示生长较为健壮,黄叶较少,无玻璃化苗;“3”表示生长一般,叶片小而卷曲,存在部分黄叶,茎干细弱。

不同特征值差异性分析使用软件 SPSS 17.0,采用单因素方差分析(ANOVA), $p < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对于增殖的影响

不同基本培养基对于增殖的影响差别比较明显,由表 1 可以看出,MS 培养基中试管苗增殖系数为 4.83 ,较 WPM 培养基中试管苗增殖系数高出

126.8% ,较 $1/4\text{MS}$ 培养基中试管苗增殖系数高出 123.6% ,较 $1/2\text{MS}$ 培养基中试管苗增殖系数高出 23.5% 。在增殖培养过程中,培养基无机盐的种类与含量直接影响试管苗发芽的数量及质量,最佳的增殖基本培养基是 MS 培养基,其增殖苗生长较好,茎粗壮,叶片舒展,玻璃化现象明显减少,增殖系数高。而 WPM 则是生长状况最差的培养基,试管苗增殖系数较低,苗矮小,且叶片发黄(图 1-A)。

表 1 不同基本培养基对于增殖的影响

Table 1 Effects of different basic media on proliferation

处理	基本培养基	激素组合	接种数/个	增殖系数	健康指数
1	$1/4\text{MS}$	$6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	30	2.16c	1.91 ± 0.21
2	$1/2\text{MS}$	$6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	30	3.91b	2.30 ± 0.41
3	MS	$6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	30	4.83a	2.43 ± 0.52
4	WPM		30	2.13c	2.13 ± 0.26

注:数字后小写字母示不同处理间差异性,下同。

2.2 不同激素组合对于增殖的影响

将材料接种在不同的增殖培养基上所获得的增殖系数差别明显,由表 2 可以看出 3 因素极差的大小,对增殖率高低产生效应由主到次的因素顺序依次是 6-BA、IBA、NAA,极差分析表明 3 个因素的最佳组合为: $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。

2.3 不同蔗糖浓度对于增殖的影响

由表 3 结果可以看出在增殖培养过程中,培养基中蔗糖的浓度对于试管苗增殖的数量以及质量的影响显著,最佳蔗糖浓度是 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,其增殖系数为 6.83 ,较蔗糖浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基的增殖系数高出 126.2% ,较蔗糖浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基的增殖系数高出 64.6% ,较蔗糖浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基的增殖系数高出 36.3% ,较蔗糖浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基的增殖系数高出 69.5% 。而且其增殖苗生长旺盛,茎粗壮,然而蔗糖浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中的增殖苗生长系数较低,且有玻璃化现象。随着蔗糖浓度的增加,增殖系数呈现先增大后减少的趋势(图 1-B)。

2.4 不同琼脂浓度对于增殖的影响

由表 4 结果可以看出在增殖培养过程中,培养基琼脂的浓度对于试管苗增殖的数量以及质量的影响也很显著,在含有 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基中,其增殖系数和健康指数很接近,含有 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基的增殖系数较 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基的增殖系数高出 106.6% ,较 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基的增殖系数高出 25.1% 。含有 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基其硬度较 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 高,接种时不宜操作,所以选择 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基(图 1-C)。

表 2 不同激素组合对于增殖的影响

Table 2 Effects of different hormone combinations on proliferation

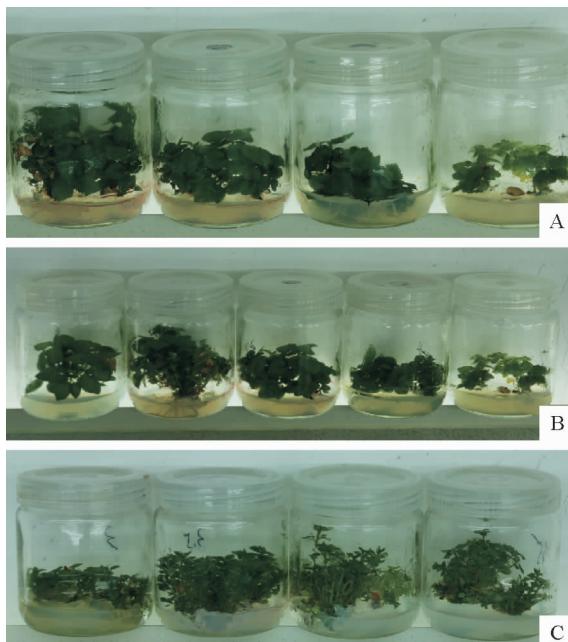
	处理	因素				增殖系数	健康指数	备注
		6-BA /(mg · L ⁻¹)	NAA /(mg · L ⁻¹)	IBA /(mg · L ⁻¹)	接种组 培苗数			
处理	1	0.10	0.01	0.01	30	0.335	1.00±0.00	接种苗茎细弱、叶片大而舒展
	2	0.10	0.05	0.05	30	0.365	1.00±0.00	接种苗茎细弱、叶片大而舒展
	3	0.10	0.10	0.10	30	0.200	1.00±0.00	接种苗茎细弱、叶片大而舒展
	4	0.50	0.01	0.05	30	4.530	2.31±0.66	生长较好
	5	0.50	0.05	0.10	30	4.860	1.91±0.53	茎较粗壮
	6	0.50	0.10	0.01	30	4.800	2.34±0.68	生长较好
	7	1.00	0.01	0.10	30	5.710	2.90±0.45	增殖数目多、苗较高、茎粗壮
	8	1.00	0.05	0.01	30	5.360	2.89±0.50	增殖数目多、苗高生长量多
	9	1.00	0.10	0.05	30	4.530	1.90±0.62	茎较粗壮
平均增殖系数	T1	0.90	10.535	10.495				
	T2	14.19	10.585	9.425				
	T3	15.56	9.53	10.73				
	R	14.66	1.055	1.305				

注: $T_i(i=1,2,3)$ 表示相应的平均值, R 为最大值与最小值水平间距。

表 3 不同蔗糖浓度对于增殖的影响

Table 3 Effects of different sucrose concentrations on proliferation

处 理	蔗糖浓度 (g · L ⁻¹)	激 素 组 合	接 种 数	增 殖 系 数	健 康 指 数
1	10	MS+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ + IBA 0.10 mg · L ⁻¹ + NAA 0.05 mg · L ⁻¹	30	3.02c	1.97±0.45
2	20		30	4.15b	2.01±0.24
3	30		30	5.01b	2.42±0.28
4	40		30	6.83a	2.96±0.31
5	50		30	4.03b	2.32±0.33



注: A. 不同基本培养基对于增殖的影响(从左到右依次是 MS 培养基、1/2MS 培养基、1/4MS 培养基、WPM 培养基); B. 不同蔗糖浓度对于增殖的影响(从左到右依次是蔗糖浓度为 50、40、30、20、10 g · L⁻¹); C. 不同琼脂浓度对于增殖的影响(从左到右依次是琼脂浓度为 6、7、8、9 g · L⁻¹)。

图 1 不同处理对增殖的影响

Fig. 1 Effects of different regulators on proliferation

表 4 不同琼脂浓度对于增殖的影响

Table 4 Effects of different agar concentrations on proliferation

处 理	琼脂浓度 (g · L ⁻¹)	激 素 组 合	接 种 数	增 殖 系 数	健 康 指 数
1	6	MS+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ + IBA 0.10 mg · L ⁻¹ + NAA 0.05 mg · L ⁻¹	30	3.27c	1.65±0.33
2	7		30	4.55b	2.14±0.28
3	8		30	5.69a	2.91±0.31
4	9		30	5.71a	2.86±0.31

3 结论与讨论

木本植物组织培养中应用最广泛的是 MS 培养基, 其无机盐含量较高, 微量元素种类也较全, 浓度也高。我国近 5 a 来在树种成功的离体培养中, 多数选用 MS 培养基。而 1/2MS、1/4MS 的无机盐的含量依次减少, 无机盐含量最少是 WPS 培养基, 多用于生根^[10]。在本试验中, 筛选出的适合东亚唐棣增殖的基本培养基为 MS 培养基, 和前人研究的较为一致^[11], 这说明较高的盐浓度有利于东亚唐棣的增殖。

植物生长调节剂物质对试管苗增殖有很大的影响, 但是由于内源激素难以测定, 所以外源激素的加入靠一系列的实验来验证^[12], 激素的成分配比和浓度会对实验结果造成很大的影响, 而且各因素之间的搭配效果是否适合一直是组织培养研究者所关注的问题^[14]。在东亚唐棣增殖试验中, 不同浓度的 6-BA、NAA、IBA 的组合, 对于东亚唐棣的增殖影响较大, 随着 6-BA 的浓度升高, 增殖系数升高, 随着 NAA 浓度的升高, 增殖系数呈现先上升后下降的趋势, 随着 IBA 浓度的升高, 呈现先下降后升高的趋势, 相互组合的情况则更好, 这与 Pruki^[13]在桤叶

唐棣中得出的结论相似。尹鹏先^[9]等在前期研究中发现适合东亚唐棣的增殖培养基为MS+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹,但在研究过程中进而发现在继代培养达6~8代以上时,组培苗表现出生长退化、质量不高等性状,难用于炼苗移栽等工厂化生产,这很可能是由于高浓度的6-BA在继代培养的过程中不断在植物体中积累形成的,因此,非常有必要探索出新的激素组合。与尹鹏先^[9]等在前期研究中相比,加入IBA激素之后增殖系数达到5.71,健康指数达到2.90,茎干粗壮,叶片舒展与任继文^[15]等的研究相似。与之前东亚唐棣组织培养体系的增值系数与生长状况相比有了很大的提高。并且在经过若干次继代培养之后没有出现生长退化、衰弱等现象,完成了组培苗继代培养的复壮。

高质量的东亚唐棣组培苗对其炼苗移栽的成活率有着重要影响。通过本次试验,培育出了增殖系数较高、生长健康的无菌试管苗,这将为东亚唐棣工厂化育苗生产提供技术支撑。但是研究中发现,随着培养时间继续增长,组培苗增殖出的数量会越来越多,由于受到空间和营养的限制,苗之间的竞争也会增强,叶片和茎的生长量都会受到限制,因此,非常有必要根据组培苗的生长情况及实地更换培养基,已达到最好的培养效果。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志:第3卷[M].北京:中国科学出版社,1974:403.
- [2] 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.
DU B G, YANG T X, WEI A Z, et al. Tissue culture of *Amelanchier alnifolia* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(2): 400-404. (in Chinese)
- [3] 高文韬,孟庆繁,杨春波,等.桤叶唐棣引种试验[J].东北林业大学学报,2007,35(1):16-18,21.
- [4] 杜保国.桤叶唐棣的组织培养和再生系统的建立[D].陕西杨陵:西北农林科技大学,2005.
- [5] 王占龙,黄立华,龙忠伟.桤叶唐棣组培技术[J].林业科技开发,2013,27(3):123-125.
- [6] 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, 2010, 6(13): 1225-1233.
- [7] 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(6):53-55.
- [8] 张桂平,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.
- [9] 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):73-75.
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): 73-75. (in Chinese)
- [10] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986:30-57.
- [11] 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.
DU B G, YANG T X, WEI A Z, et al. Tissue culture of *Amelanchier alnifolia* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(2): 400-404. (in Chinese)
- [12] 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.
- [13] PRUSKI K, NOWAK J, GRAINGER G. Micropropagation of four cultivars of saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 21(2):103-109.
- [14] 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. (in Chinese)
- [15] 任继文,雷颖.金丝桃组织培养再生体系的建立[J].西北林学院学报,2010,25(3):90-92.
REN J W, LEI Y. Establishment of tissue culture regeneration system of *Hypericum monogynum* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(3):90-92. (in Chinese)

(上接第106页)

- [14] 王燕,张黎明.贮藏温度对银杏花粉活力的影响[J].湖北农学院学报,2002,22(3):213-214.
- [15] 赵文飞,刑世岩,姜永旭,等.贮藏时间对银杏花粉活力保护酶活性和萌发的影响[J].武汉植物学研究,2004,22(3):259-263.
- [16] 吕晋惠,赵耀,王媛,等.地被菊花粉活力和储藏性研究[J].园艺学报,2012,39(12):2483-2490.
LYU J H, ZHAO Y, WANG Y, et al. Studies on viability and storage characteristics of pollen of *Groundcover Chrysanthemum* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39 (12): 2483-2490. (in Chinese)
- [17] 邹峰,谭晓风,袁德义,等.油茶花粉数量及4℃储藏萌发特性研究[J].江西农业大学学报,2009,31(5):892-895.
- [18] 张亚利,刘燕,尚晓倩.花粉超低温保存研究进展[J].北京林业大学学报,2006,28(4):139-147.
ZHANG Y L, LIU Y, SHANG X Q. Advances in research of pollen cryopreservation[J]. Journal of Beijin Forestry University, 2006, 28(4): 139-147. (in Chinese)