

文章编号:1001-7380(2017)03-0023-05

糙皮桦‘*Jacquemontii*’茎段离体 快速微繁殖技术研究

常 苹,王婷婷,胡春宏,王 晨

(江苏东郁园林科技有限公司,江苏 无锡 214000 中国)

摘要:以糙皮桦‘*Jacquemontii*’带腋芽茎段为外植体,以WPM为基础培养基,添加不同类型及质量浓度的植物生长调节剂,进行诱导茎段的腋芽萌发、丛芽增殖及生根等一系列组织培养研究,以筛选出适合‘*Jacquemontii*’组织培养的最优培养基配方,成功获得健壮的再生植株。结果表明,腋芽茎段最佳诱导培养基:WPM+1.5 mg/L 6-BA +2.5 mg/L GA₃,其萌芽率达71.67%;最佳增殖培养基:WPM+3.0 mg/L 2-ip +0.5 mg/L IAA +1.5 mg/L GA₃,其增殖倍数为8.12;最佳生根培养配方:1/2WPM+0.8 mg/L IBA +0.5 mg/L NAA +0.5 mg/L 活性炭,生根数为3—6条,生根率达97.92%。

关键词:糙皮桦‘杰克蒙蒂’;腋芽萌动;增殖;生根

中图分类号:Q943.1; S792.159

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2017.03.006

Rapid micropropagation for *Betula utilis* var. ‘*Jacquemontii*’

CHANG Ping, WANG Ting-ting, HU Chun-hong, WANG Chen

(Jiangsu Orisis Landscape Science and Technology Company, Wuxi 214000, China)

Abstract: On the basis of WPM, the axillary buds of stem segments of *Betula utilis* var. ‘*Jacquemontii*’ were used as explants to culture by adding different types and concentration ratio of plant growth regulator to induce a series of processes of germination of axillary buds and proliferation, rooting and so on, to select the optimal culture medium formula which is suitable for ‘*Jacquemontii*’, successfully getting robust generated plantlet. The results show that the best initiation medium for the axillary buds was WPM+1.5 mg/L BA + 1.0 mg/L GA₃, the induction rate of which is 71.67%. The optimum proliferation medium was WPM+3.0 mg/L 2-ip + 0.5 mg/L IAA +1.5 mg/L GA₃, the proliferation multiple of which was 8.12. The best rooting medium was 1/2 WPM + 0.8 mg/L IBA +0.5 mg/L NAA, root number is about 3-6, rooting rate reached 97.92 %.

Key words: *Betula utilis* var. ‘*Jacquemontii*’; Germination of axillary buds; Proliferation; Rooting

糙皮桦‘杰克蒙蒂’(*Betula utilis* var. ‘*Jacquemontii*’)属于桦木科桦木属,是糙皮桦的一个变种,首次在尼泊尔发现,喜光,较喜湿润。该种最大的特点就是树干通体雪白,较为耐寒,萌芽力很强,生长快速,树型规整高大,秋季树叶变成金黄色飘落,色彩美观,是冬季少见的园林绿化及观赏树种。目前,国内外关于桦树的很多品种均有研究,其组织培养的研究报道也较多^[1-5],而国内对糙皮桦的引

进与组织培养繁殖研究较少,‘*Jacquemontii*’在组织培养方面的研究也尚未见报道。本次试验则以‘*Jacquemontii*’离体茎段为外植体,通过组织培养快速微繁殖的方式,克服常规繁殖带来的季节周期限制、耗时费力、物种遗传性不稳定等缺点,成功获得健壮的再生植株,而能有效地保留品种的优良性,为糙皮桦的组织培养研究及良种繁育奠定基础,扩充糙皮桦的产业化发展道路,为园林绿化和植物造

收稿日期:2017-05-08;修回日期:2017-06-09

作者简介:常 苹(1987-),女,山东泰安人,硕士,植物学专业。主要研究方向:商业组织培养快速繁殖研究。E-mail:ping.chang@orisis.com;电话:18100655196。

林工程提供更好的参考与保证。

1 材料与方 法

1.1 材料的选择

试验材料于 2016 年 5 月取自江苏东郁园林科技有限公司温室 2 号大棚,以糙皮桦‘Jacquemontii’2 年生扦插苗抽出的新枝为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配制 培养基均以添加基本培养基、蔗糖、6.5 g/L 琼脂、植物生长调节剂(6-BA,2-ip,GA₃,IAA,IBA,NAA,其中 2-ip 是一种可溶性细胞分裂素,主要生理功能是促进细胞分裂和分化以及生长活跃部位的生长发育)进行配制分装成瓶,pH 值调至 5.80,高压高温灭菌 20 min 后冷却备用。其中,萌芽和增殖培养基以 WPM 为基本培养基,蔗糖 30 g/L,生根培养基以 1/2WPM 为基本培养基,蔗糖 15 g/L。

1.2.2 外植体的消毒 消毒液选用次氯酸钠液体溶液,主要成分含量以有效氯计≥8%,按体积 1:4 比例(次氯酸钠:水)混合配制消毒溶液备用。消毒前先将枝条的叶子和顶芽剪掉,分切成单节茎段,75%酒精浸泡茎段 30 s,用无菌水冲洗 2 遍,置于消毒溶液中不断搅动 20—30 min,用无菌水冲洗 3 遍,将茎段插入萌芽培养基中。

1.2.3 腋芽的萌动培养 将消毒好的茎段接种至萌芽培养基中,采用 2 因素的试验设计,每水平做 20 瓶,重复 3 次,每瓶接种外植体 1 个,先暗培养 3 d,随后转入光下培养 21—28 d,28 d 后统计萌芽率。萌芽率=茎段萌芽数/(接种茎段数-茎段污染数)×100%

1.2.4 丛芽增殖的培养 待茎段腋芽抽出长至 2 cm 左右,将芽转接入增殖培养基中培养,采用 3 因素 3 水平正交试验设计,每水平做 3 瓶,重复 4 次,每瓶接种外植体 5 个,28 d 后统计增殖倍数。增殖倍数=丛芽数/接种芽数

1.2.5 生根培养 增殖后的丛芽,将芽基部组织切除,仅留 2—3 cm 顶芽接种于生根培养基进行培养。采用 2 因素 2 水平的试验设计,每水平接 2 瓶,重复 3 次,每瓶接种 16 个外植体,20 d 后统计生根率、根长。生根率=生根茎段数/接种茎段数×100%

每个阶段的培养温度为 25—27 ℃,培养周期为 28—35 d,光照培养 16 h,黑暗培养 8 h,光照条件为 2 000—2 500 lx。

试验数据处理均由 SPSS 19.0 统计软件进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 激素类型与质量浓度对启动培养的影响

将‘Jacquemontii’茎段接种在萌芽培养基 10 d 后,腋芽开始萌动抽嫩芽,21—28 d 后抽茎长大。试验结果如表 1。

表 1 不同激素及质量浓度对萌芽率的影响

处理	植物生长调节剂		萌芽率/%	长势
	6-BA/(mg/L)	GA ₃ /(mg/L)		
1	0.5	1.0	26.67±0.47 d	正常
2	1.0	1.0	48.33±0.37 c	正常
3	1.5	1.0	71.67±0.69 b	正常
4	2.5	1.0	76.67±0.94 a	玻璃化
5	0.5	2.0	23.33±0.47 d	正常
6	1.0	2.0	43.33±0.69 c	正常
7	1.5	2.0	70.00±0.58 b	正常
8	2.5	2.0	78.33±0.37 a	微玻璃化

数据为平均值±标准误,不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上存在显著差异

由方差分析软件的 F 差异性检验结果得出,6-BA 对糙皮桦‘Jacquemontii’萌芽的影响极其显著,GA₃对其显著性影响不明显(见表 2)。同时从表 2 可以看出,6-BA 4 个水平相互之间均存在显著性差异($P<0.05$),而 GA₃(1)和 GA₃(2)之间不存在显著性差异($P>0.05$),2 个因素对糙皮桦萌芽作用大小依次为:6-BA>GA₃。从表 3 得出,6-BA(4)和 GA₃(1)均值最大,最优组合为:6-BA(4)+GA₃(1),即 2.5 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L GA₃。表 1 显示,随着 6-BA 质量浓度的增加,外植体萌芽率升高,玻璃化开始出现,即 6-BA 为 2.5 mg/L 时,出现瓶苗玻璃化现象,虽然随着 GA₃质量浓度的增加,玻璃化程度有所减轻,但并没有完全避免此情况,在 6-BA 质量浓度达 1.5 mg/L 时,外植体没有发生玻璃化,同时添加 1.0 mg/L GA₃,获得较优的启动率 71.67%。因此选择 WPM+1.5 mg/L 6-BA +1.0 mg/L GA₃为最佳的萌芽培养基。

2.2 激素类型与质量浓度对丛芽增殖的影响

外植体在增殖培养基培养 10 d 后,基部开始膨大产生致密的愈伤组织,28 d 后基部底座产生丛芽,试验结果如表 4 所示。

表 2 方差分析配对表					
生长调节剂	<i>I</i>	<i>J</i>	均值差值(<i>I-J</i>)	标准误差	<i>P</i>
6-BA	0.5(1)	1.0(2)	-0.208 *	0.02	0.002
		1.5(3)	-0.458 *	0.02	0.000
		2.5(4)	-0.525 *	0.02	0.000
	1.0	0.5	0.208 *	0.02	0.002
		1.5	-0.250 *	0.02	0.001
		2.5	-0.317 *	0.02	0.001
	1.5	0.5	0.458 *	0.02	0.000
		1.0	0.250 *	0.02	0.001
		2.5	-0.067 *	0.02	0.045
	2.5	0.5	0.525 *	0.02	0.000
1.0		0.317 *	0.02	0.001	
1.5		0.067 *	0.02	0.045	
GA3	1.0(1)	2.0(2)	-0.021	0.014	0.238
	2.0	1.0	0.021	0.014	0.238

基于估算边际均值,*表示均值差值在 0.05 上较显著

表 3 单因素统计量			
生长调节剂	变量值	均值	标准差
6-BA	0.5(1)	0.25	0.014
	1.0(2)	0.458	0.014
	1.5(3)	0.708	0.014
	2.5(4)	0.775	0.014
GA3	1.0(1)	0.558	0.014
	2.0(2)	0.537	0.014

表 4 的 K 值大小显示, $K_{A3}>K_{A2}>K_{A1}$, $K_{B3}>K_{B2}>K_{B1}$, $K_{c3}>K_{c2}>K_{c1}$,得出 ABC 3 个因素的最优水平组合为 $A_3B_3C_3$,即最佳增殖培养基组合为 WPM+3.0 mg/L 2-ip +1.5 mg/L IAA +3.5 mg/L GA_3 。由极差 R 值大小可知, $R_a>R_c>R_b$,3 因素对试验结果影响的主次顺序为 A > C >B,即 2-ip 质量浓度水平对丛芽增殖的影响最大, GA_3 次之,IAA 对其影响最小。

表 4 不同激素及质量浓度对丛芽增殖的影响								
处理	植物生长调节剂及其质量浓度			增殖倍数	丛芽生长状况			
	2-ip/(mg/L) (A)	IAA/(mg/L) (B)	GA_3 /(mg/L) (C)		叶型	叶色	状况	高度/cm
1	1.0	0.5	1.5	4.88±2.27 d	正常	浓绿	健壮	2.0—5.0
2	1.0	1.0	2.5	5.42±2.48 cd	正常	浓绿	健壮	3.0—7.0
3	1.0	1.5	3.5	6.50±2.0 c	偏小	黄绿	较细弱,顶芽少量死亡	3.0—7.0
4	2.0	1.0	1.5	7.28±3.02 b	正常	浓绿	健壮	3.5—7.0
5	2.0	1.5	2.5	7.52±2.73 b	正常	黄绿	健壮	3.0—8.0
6	2.0	0.5	3.5	7.90±2.83 b	偏小	黄绿	细弱,顶芽易死亡	4.0—8.0
7	3.0	1.5	1.5	7.68±3.13 b	正常	浓绿	健壮	3.0—6.0
8	3.0	0.5	2.5	8.12±2.11 ab	正常	浓绿	健壮	3.0—7.0
9	3.0	1.0	3.5	8.48±2.48 a	偏小	黄绿	细弱,顶芽死亡严重	4.0—8.0
K_1	16.8	20.9	19.84					
K_2	22.7	21.18	21.06					
K_3	24.28	21.7	22.88					
R	2.49	0.27	1.01					

增殖倍数的平均值±标准误差,不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上存在显著差异

由表 5 可看出,2-ip(1)和 2-ip(2)之间,2-ip(1)和 2-ip(3)之间均存在显著性差异($P<0.05$),2-ip(2)和 2-ip(3)之间没有显著性差异,增殖倍数随着 2-ip 质量浓度的增加而增加,当质量浓度水平达 1.0 mg/L 时,增殖倍数最高达到 6.50,而最高质量浓度水平 3.0 mg/L 时,增殖倍数 7.68 以上,IAA 3 个水平之间没有显著性差异,而 GA_3 (1)和 GA_3 (3)之间存在显著性差异($P<0.05$), GA_3 (1)和 GA_3 (2)之间, GA_3 (2)和 GA_3 (3)之间均没有显著性差异,增殖倍数随着 GA_3 质量浓度的增加而增加, GA_3 质量浓度在一定水平时,增殖倍数也是随着 2-ip 质量浓度的增加而增加,当 GA_3 质量浓度为最低

表 5 方差分析配对表					
植物生长调节剂	I	J	均值差值 (I-J)	标准误差	P
2-iP	1.0(1)	2.0(2)	-1.793 3 *	0.263	0.023
		3.0(3)	-2.153 3	0.263	0.016
	2.0	1.0	1.793 3 *	0.263	0.023
		3.0	-0.360 0	0.263	0.324
	3.0	1.0	2.153 3 *	0.263	0.016
		2.0	0.360 0	0.263	0.324
IAA	0.5(1)	1.0(2)	-0.093	0.263	0.756
		1.5(3)	-0.267	0.263	0.417
	1.0	0.5	-0.093	0.263	0.756
		1.5	-0.173	0.263	0.577
	1.5	0.5	0.267	0.263	0.417
		1.0	0.173 3	0.263	0.577
GA ₃	1.5(1)	2.5(2)	-0.407	0.263	0.262
		3.5(3)	-1.013	0.263	0.041
	2.5	1.5	0.407	0.263	0.262
		3.5	-0.607	0.263	0.147
	3.5	1.5	1.013	0.263	0.041
		2.5	0.607	0.263	0.147

基于估算边际均值,*表示均值差值在0.05上较显著

1.5 mg/L 时,增值倍数达 7.68,当 GA₃质量浓度为

最高 3.5 mg/L 时,增值倍数达 8.48。

由以上分析综合来看,最优增殖培养基组合水平为 WPM+3.0 mg/L 2-ip +1.5 mg/L IAA+3.5 mg/L GA₃,IAA 3 水平之间没有显著性差异,2.5 mg/L GA₃和 3.5 mg/L 水平之间没有显著性差异,同时根据表 4 植物的状态来看,GA₃质量浓度高于 2.5 mg/L 时,丛芽高度为 4.0—8.0 cm,顶芽容易死亡,叶色黄绿,叶片偏小,可能过高质量浓度的 GA₃对外植体产生了毒害,因此选择最佳的增殖培养基组合为 WPM+3.0 mg/L 2-ip +0.5 mg/L IAA +2.5 mg/L GA₃,增值倍数为 8.12。

2.3 激素类型与质量浓度对生根的影响

顶芽接入生根培养基 14 d 后,基部开始冒出乳白色的根,培养 28 d 后,根系呈辐射状,根长均高于 5 cm,根数 3—6,试验结果如表 6 所示。

经方差分析的 F 差异性检验得出,IBA 对生根没有显著性差异,NAA 对生根的影响较为显著。生根率随着 IBA 质量浓度的增加而增加,当 IBA 质量浓度达到 0.8 mg/L 时,生根率最高达到 97.92%,同时 NAA 的加入,有利于生根率的提升,根系粗壮,根数增多,为 3—6。从表 6 根系的状态和数量、长势综合分析,得出 BJM 最佳的生根配方为 1/2WPM+0.8 mg/L IBA +0.5 mg/L NAA + 0.5 g/L AC(活性炭)。

表 6 不同培养基成分和激素质量浓度对生根的影响						
WPM	植物生长调节剂		生根率/%	生长状况		
	IBA/(mg/L)	NAA/(mg/L)		根系状态	长度/cm	根数
1/2(1)	0.5(1)	0(1)	90.63±0.96 b	纤细,辐射状	>5	2-5
1/2	0.8(2)	0	93.75±0.58 b	纤细,辐射状	>5	2-5
1/2	0.5	0.5(2)	95.83±0.47 a	粗长,辐射状	>5	3-6
1/2	0.8	0.5	97.92±0.47 a	粗长,辐射状	>5	3-6

数据为平均值±标准误,不同小写字母表示在 P<0.05 水平上存在显著差异

3 讨论

有研究表明,日本白桦的茎尖在 MS 培养基上容易褐化,而在 WPM 培养基上生长较好,杨玲等曾在组织培养研究中证明 WPM 是适合紫叶白桦组织培养的基本培养基,詹亚光也曾在白桦组织培养研究中得出 WPM 培养基适合白桦初始培养的诱导^[6-8],本研究在糙皮桦‘Jacquemontii’组织培养试验培养过程中,同样直接以 WPM 作为基本培养基,

外植体生长良好,最终建立了完整的再生体系。

通常在组织培养生产中,细胞分裂素常与生长素合用来刺激细胞分裂和调控形态发生,赤霉素 GA₃加入培养基中产生的效应往往与生长素效应的性质相似^[9],本试验‘Jacquemontii’腋芽萌动培养中,将细胞分裂素 6-BA 与赤霉素 GA₃结合,获得了较高的萌芽率,而 Jamison 等人同样在樱桃小河桦的微繁殖研究中,指出 GA₃与其他细胞分裂素结合时,有利于芽的伸长^[10],石福臣等^[11]也在研究中发

现 GA_3 与 6-BA 同时加入促进了白桦茎的伸长。张学英等^[12]在白桦组织培养研究中,得出 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 的腋芽诱导为 87%,而本试验处理 1.5 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L GA_3 获得最佳诱导率 71.67%。当 6-BA 质量浓度最高 2.5 mg/L 时,出现了玻璃化现象,说明高质量浓度的外源细胞分裂素对外植体产生了不良反应,这也是组织培养中常见的问题,本试验配合加入 2.0 mg/L GA_3 来调节外植体的正常状态,一定程度上缓解了玻璃化,但并没有完全控制,将成为下一步研究与探讨的技术问题。

本试验采用细胞分裂素 2-ip 与 IAA, GA_3 联合使用,使‘Jacquemontii’达到了更好的丛芽增殖效果。Jamison 等人在樱桃小河桦微繁研究中得出,2-ip 是其茎段启动最佳的细胞分裂素,也利于愈伤分化丛芽^[11],杨玲等认为 6-BA 是影响紫叶白桦茎芽增殖的主要生长调节剂^[7],而本试验中,2-ip 对丛芽增殖起着重要的影响作用,增殖倍数随着 2-ip 质量浓度的增加而升高,处理 3.0 mg/L 2-ip + 0.5 mg/L IAA + 2.5 mg/L GA_3 ,增殖倍数达 8.12。添加的生长素 IAA 对丛芽增殖的影响并不明显,或许 IAA 在光下培养中大多数被分解失去了很大的活性,这或许能成为今后的研究方向。 GA_3 的加入,在一定程度上增加了丛芽的增殖倍数,影响了瓶苗的长势,这在不同质量浓度水平上,尤为表现出一定的差异显著性,低质量浓度水平的丛芽量少,长势健壮,株型较低,叶色浓绿,而最高质量浓度 3.5 mg/L 水平,增殖倍数升高明显,植株高度提升,但叶型多数偏小,叶色黄绿,顶芽易死亡,均不利于工厂化生产对瓶苗质量的要求,可能高质量浓度的 GA_3 产生了毒害作用,仍需进一步研究与探索。

本试验以 1/2WPM 为基本培养基,添加 15 g/L 蔗糖成功诱导出根系,Häggmand 等人也曾在疣枝桦的微繁殖研究中得出低盐成分的 WPM 培养基可获

得生根^[13]。同时,生长素类型和质量浓度对‘Jacquemontii’生根也产生了一定的影响,单独加入 IBA 产生的根系较细长,NAA 的加入提高了生根数量,更利于根系的粗壮,生根率达 97.92%,而詹亚光也曾曾在白桦组织培养生根培养的研究中得出 NAA 对生根有效^[8],生根率 95% 以上。

参考文献:

- [1] 杨德浩,杨敏生,王进茂. 白桦种源及繁殖的研究现状[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(z1):101-104.
- [2] AUBAKIROVA L S, KALASHNIKOVA E A. Experimental morphogenesis in a curly birch tissue culture[J]. Russian Agricultural Sciences, 2011, 37(2):109-110.
- [3] 李京,卢慧颖,邢亚娟. 欧洲白桦组织培养芽分化影响因子研究[J]. 林业科技, 2010, 35(6):5-7.
- [4] 湛红辉,曾杰,贾宏炎,等. 光皮桦叶芽离体培养再生植株技术[J]. 广西林业科学, 2006, 35(3):123-124.
- [5] 占爱瑶,由香玲,詹亚光. 不同白桦优树组培快繁体系的筛选[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(11):17-20.
- [6] IDE Y, YAMAMOTO S. In vitro plantlet regeneration of mature monarch birch (*Betula maximowicziana*) by winter bud culture[J]. Journal of the Japanese Forestry Society, 2008, 72:147-150.
- [7] 杨玲,沈海龙. 紫叶白桦茎芽快繁体系的建立及影响因素分析[J]. 经济林研究, 2012, 30(1):81-87.
- [8] 詹亚光. 白桦的组织培养和遗传转化研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2001.
- [9] 乔治 EF, 阿尔 MA, De 克勒克 G C. 植物组培快繁[M]. 北京:化学工业出版社, 2013.
- [10] JAMISON J A, RENFROE M H. Micro-propagation of *Betula uber* (Ashe) Fernald[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1998, 34(2):147-151.
- [11] 石福臣,孔瑾,吴双秀,等. 以叶盘为外植体的白桦的再生[J]. 植物研究, 2001, 21(4):611-614.
- [12] 张学英,刘艳萌,胡淑明,等. 白桦组织培养技术研究[J]. 北方园艺, 2008(8):176-178.
- [13] HÄGGMAN H, SUTELA S, WELANDER M. Micro-propagation of *Betula Pendula* Roth including genetically modified material [M] // Protocols for Micro-propagation of Woody Trees and Fruits. 2006:153-162.