

大扁杏组培基本培养基与培养条件的优化研究

齐高强, 赵 忠, 张存旭, 周锋利

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以大扁杏龙王帽为材料, 研究了外植体消毒、基本培养基、取材部位和培养条件等因素对组培苗生长的影响。结果表明, 采用 1 g/L HgCl₂ 与 20 g/L NaHCO₃ 按体积比 1:1 混合的消毒剂处理外植体 8 min, 灭菌成功率可达 98%; 以改良的 MS(1/2 NH₄NO₃) 培养基为基本培养基, 适合大扁杏的分化培养; 最适外植体为茎尖; 最佳培养条件为温度 25~27 °C, 光照强度 2 000~3 000 lx, pH 5.6~5.8。

[关键词] 大扁杏; 基本培养基; 培养条件

[中图分类号] S662.2; Q813.1+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)03-0115-04

大扁杏 (*Prunus armeniaca* Linn.) 属蔷薇科杏属植物, 特指近年来北方地区广泛推广栽植的以龙王帽、优一、白玉扁、一窝蜂等优良品系为主的甜仁杏品种。因其经济价值高, 生态适应性强, 栽植大扁杏已成为干旱、半干旱地区农民脱贫致富的门路之一^[1-3]。目前, 生产上繁殖大扁杏仅采用嫁接的方法, 但由于繁殖材料来源有限, 严重制约了大扁杏的大面积推广。

迄今为止, 我国除了有学者对大扁杏茎段的组织培养进行过初步研究外, 有关杏茎尖组培研究仅限个别报道, 至今进展不大^[1]。国外对杏的组织培养研究起步于 20 世纪 50 年代, 研究较多且成功的是通过有性系种胚进行组培^[5-7]。近年来, 葡萄牙的 Miguel 等^[8-9]在杏组织培养, 尤其是在通过叶片转基因方法获得再生体方面取得了突破性进展。利用组培快繁的方法培育良种苗, 可以不受地区、气候的影响, 扩繁速度比常规方法快数万倍, 因而能够及时提供大量优质种苗, 加速大扁杏优良品种的繁育。本试验探讨了外植体消毒、基本培养基、取材部位和培养条件等因素对大扁杏组培苗生长的影响, 以期完善大扁杏组培快繁体系提供科学依据, 为优良品种的选育奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为西北农林科技大学教学实验苗圃内

的 2 年生大扁杏嫁接苗, 品种为龙王帽。

1.2 方 法

1.2.1 外植体灭菌条件的选择 取 2 年生大扁杏植株上当年抽生的幼嫩枝条为外植体, 在实验室水培 2 d, 去叶后用自来水冲洗 30 min, 灭菌滤纸吸干水分, 750 mL/L 酒精表面消毒 30 s 后^[10], 分别用以下 3 组消毒剂进行灭菌处理: (I) 1 g/L HgCl₂; (II) 1 g/L HgCl₂ 与 20 g/L NaHCO₃ 按体积比 1:1 混合; (III) 1 g/L HgCl₂ 与 100 mL/L H₂O₂ 按体积比 1:1 混合。每组各设 6, 8 和 10 min 3 个处理。灭菌处理后用无菌水冲洗 5 遍, 灭菌滤纸吸干水分, 切成 0.5 cm 长、带 1 个节的茎段, 竖直插入培养基中 0.3 cm, 每瓶 3~4 个, 10 d 后统计污染率和存活率。

1.2.2 基本培养基的选择 基本培养基是植物组织培养的重要基质, 由于各种植物的遗传背景、生物学特征不同, 因而对营养成分的需求也不同, 选择合适的培养基对于组织培养成败至关重要^[10]。本试验分别以 WPM [$c(\text{NH}_4^+) : c(\text{NO}_3^-) = 0.68$]、MS [$c(\text{NH}_4^+) : c(\text{NO}_3^-) = 0.5$]、SH [$c(\text{NH}_4^+) : c(\text{NO}_3^-) = 0.10$]、改良 MS [$c(\text{NH}_4^+) : c(\text{NO}_3^-) = 0.16$] 为基本培养基, 其中均附加 1.0 mg/L 6-BA, 0.1 mg/L NAA, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 5 g/L。

1.2.3 培养条件的选择 选定基本培养基后, 按照单因素简单对比试验设计, 分别用光照强度 1 000~5 000 lx, 温度 20~30 °C, pH 5.0~7.2, 并在其他培

[收稿日期] 2005-08-03

[基金项目] 国家林业局重点科研计划项目(2003-030-1.30); 陕西省科技攻关项目(2001K01-G7-01)

[作者简介] 齐高强(1977-), 男, 河南许昌人, 助理研究员, 在读硕士, 主要从事森林培育研究和科技推广管理。

[通讯作者] 赵 忠(1958-), 男, 甘肃宁县人, 教授, 博士生导师, 主要从事森林培育研究。

养条件(光照时间、湿度、通风等)不变的情况下进行不同环境条件下的培养。

1.2.4 取材部位的选择 剪取幼株的茎尖、茎段分别进行诱导,培养 30 d 后统计株高、叶片数和分化数。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌条件对大扁杏外植体的灭菌效果

试验采用 3 种不同消毒剂对大扁杏外植体进行灭菌处理。由表 1 可知,利用消毒合剂的效果优于单独使用 HgCl₂。进一步比较可知,利用第 II 组消毒剂(1 g/L HgCl₂ 与 20 g/L NaHCO₃按体积比 1:1 混合)处理 8 min,对大扁杏幼株茎段外植体的消毒效果最佳,成功率达 98%,且外植体在培养基上生长状况良好,未出现褐变现象。

2.2 不同培养基对大扁杏芽启动和增殖的影响

表 2 结果表明,在 WPM 培养基上生长的外植体分化数量少,生长状态较差,培养基褐化现象较严

重,因此 WPM 不适合作为大扁杏组培的基本培养基。在 SH、MS 和改良 MS 培养基上大扁杏外植体生长状态较好,其中在改良 MS 培养基上的生长效果最佳。因此,以改良 MS 培养基作为大扁杏组培的基本培养基。

表 1 不同消毒剂对大扁杏外植体的灭菌效果比较

Table 1 Comparison of the sterilization effect on different antiseptic of *Prunus armeniaca* Linn.

处理 Disposal	消毒 时间/min Time of pasteurize	死亡率/% Mortality	污染率/% Rate of pollution	存活率/% Rate of success
I	6	2	26	72
	8	6	4	90
	10	38	0	62
II	6	1	15	84
	8	2	0	98
	10	24	0	76
III	6	2	13	85
	8	7	6	87
	10	34	0	66

表 2 不同培养基对大扁杏芽启动和增殖的影响

Table 2 Effect of different medium cultivation on bud startup and proliferation of *Prunus armeniaca* Linn.

培养基 Cultivation substance	株高/cm High	叶数 Leaf count	启动率/% Rate of startup	分化数 Division count	组培苗生长状况 Tissue seedling increment condition
WPM	1.0	0.4	16	0.2	基本无生长,褐化严重 Little grow, grave browning
MS	1.6	3.6	79	0.9	生长健壮,很少出现褐化 Grow haleness, little browning
SH	1.5	3.9	84	1.0	生长健壮,基本无褐化 Grow haleness, no browning
改良 MS Developed MS	1.8	4.3	83	1.3	生长健壮,叶片厚,深绿色,无褐化 Grow haleness, lamma thick and deep green, no browning

2.3 大扁杏不同取材部位的诱导生长效果

剪取茎尖、茎段分别进行诱导生长,结果(表 3)表明,对于不同的外植体,芽启动需要的时间和出芽数均不同,以茎段的分化能力较低,这可能是由不同外植体在内源激素和养分含量上的差异造成的;而茎尖由于解除了顶端优势,分化能力较高。

表 3 大扁杏不同取材部位的诱导生长效果

Table 3 Effect of inducement in different location on *Prunus armeniaca* Linn. growing

取材部位 Inducement location	芽启动时间/d Bud startup time	分化数 Division count
茎尖 Stem tip	32	1.8
茎段 Stem segment	37	1.3

2.4 大扁杏不同培养条件对分化苗生长的影响

2.4.1 光照强度 表 4 表明,当光照强度为 1 000

lx 时,芽分化数少,且叶片发黄、狭小、萎缩,18%的外植体出现褐化;随光照强度增加,芽分化数明显增多,叶片增大。当光照强度为 2 000 和 3 000 lx 时,两处理间的芽分化数差异不显著,植株生长状况较好,叶片深绿色;当光照强度增加到 4 000 和 5 000 lx 时,芽分化数逐渐减少,叶片深绿色。大扁杏属阳性树种,在光照充足的阳坡生长发育良好^[3],因此在大扁杏组织培养过程中适当增加光照强度,有利于芽增殖生长。

2.4.2 温度 温度是大扁杏组织培养中不可忽视的要素之一。由表 5 可知,在 20℃ 时,组培苗无分化;在 21~24℃ 时,组培苗分化较少,且生长缓慢;25~27℃ 时,组培苗较早进入正常生长,生长状态最佳;28℃ 以上时则生长减缓,褐化和污染率均增加。

表4 不同光照强度对大扁杏芽生长的影响

Table 4 Effect of different light intensity on *Prunus armeniaca* Linn. bud growing

光照强度/lx Light intensity	分化数 Division count	平均叶长/cm Averagely leaf length	组培苗生长状况 Tissue seedling growth condition
1 000	0.7	0.24	18%出现褐化 18% browning
2 000	1.5	0.38	无褐化 No browning
3 000	1.7	0.36	无褐化 No browning
4 000	1.3	0.35	无褐化 No browning
5 000	1.1	0.37	无褐化 No browning

2.4.3 pH值 培养基pH值直接影响植物对离子的吸收,因此也影响大扁杏组培苗的生长。由表6可知,pH值低于5.2时,大扁杏外植体分化数较低,且培养30d时玻璃化苗比例升高。实践表明,在低pH

值条件下培养基常出现软化,不仅接种操作的难度增加,而且导致污染加重。而pH值高于7.0时,外植体生长减缓,叶片出现黄化或颜色加深,且褐化率升高。比较而言,以pH 5.6~5.8的处理效果最佳。

表5 不同培养温度下大扁杏芽的生长状况

Table 5 Different temperature cultivate on *Prunus armeniaca* Linn. bud growing

温度/℃ Temperature	分化数 Division count	芽高/cm Bud height	污染率/% Pollute coefficient	组培苗生长状况 Tissue seedling increment condition
20	0	0	1.8	无分化生长 No bud division
21	0.1	0.1	2.1	生长缓慢 Grow slowness
22	0.2	0.3	2.1	生长缓慢 Grow slowness
23	0.3	0.5	2.0	生长缓慢,42%玻璃化 Grow slowness,42% vitrification
24	0.3	0.8	3.6	生长缓慢,叶片发黄,37%玻璃化 Grow slowness,lamma yellow,37% vitrification
25	1.1	1.3	7.0	生长健壮,叶片深绿色 Grow haleness,lamma deep green
26	1.5	2.0	7.3	生长健壮,叶片深绿色 Grow haleness,lamma deep green
27	1.2	1.7	12.4	生长健壮,叶片深绿色 Grow haleness,lamma deep green
28	0.9	1.7	21.2	生长减缓,26%褐化 Grow slowness,26% browning
29	0.7	1.1	29.7	生长减缓,37%褐化 Grow slowness,26% browning
30	0.4	0.7	32.1	生长几乎停止 Little grow

表6 不同培养基pH值对大扁杏外植体生长的影响

Table 6 Effect of different pH on *Prunus armeniaca* Linn. bud growing

pH	分化数 Division count	芽高/cm Bud height	组培苗生长状况 Tissue seedling increment condition
5.0	0.4	1.0	生长缓慢,49%玻璃化 Grow slowness,49% vitrification
5.2	0.7	1.2	生长缓慢,21%玻璃化 Grow slowness,21% vitrification
5.6	1.5	2.0	生长状况良好 Grow haleness
5.8	1.3	1.9	生长状况良好 Grow haleness
6.0	0.9	1.4	生长缓慢 Grow slowness
6.2	0.8	1.2	生长缓慢,叶片黄化 Grow slowness,lamma yellowing
7.0	0.6	1.1	生长缓慢,叶片黄化,17%褐化 Grow slowness,lamma yellowing,17% browning
7.2	0.5	0.9	生长缓慢,叶片黄化,31%褐化 Grow slowness,lamma yellowing,31% browning

3 讨论

本试验结果表明,基本培养基中 $c(\text{NH}_4^+)$:

$c(\text{NO}_3^-)$ 在0.5以下时,大扁杏芽的分化无显著差异,而 $c(\text{NH}_4^+) : c(\text{NO}_3^-)$ 过高明显不利于大扁杏外植体的生长。据报道^[6-7],提高培养基中P,K和S含

量,降低 Mn 含量,有利于大扁杏组培苗生长,并减少褐化现象发生。

玻璃化是大扁杏组织培养中最常见的问题。由于玻璃化苗的生长发育停止,生理活性降低,因此生根率和移栽成活率明显下降。本研究发现,茎尖外植体玻璃化的比例较高,而茎段外植体玻璃化的比例明显较低。这可能是由于较大外植体的分生组织远离培养基表面而使其生长环境的水分状况得到改善所致,这与郭生武等^[7]的研究结果一致。本试验结果还表明,当培养温度低于 24 ℃ 或培养基 pH 值低于

5.2 时,大扁杏外植体玻璃化比例明显升高;另外在试验中还观察到,培养瓶的通气状况越好,组培苗玻璃化比率越低。因此,选择适宜的培养温度和培养基 pH 值,并选用通气性较好的封口材料,可以有效减少玻璃化的发生^[11]。

本试验只采用了定量蔗糖作为碳源,除可为细胞生命活动提供能源外,在培养基中还起着维持一定渗透压的作用,有关蔗糖浓度与大扁杏组培苗玻璃化率的关系还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘海荣. 仁用杏是治理荒山荒坡的优选树种[J]. 北方园艺, 1998(6): 30-31.
- [2] 王延平, 李平, 高鹏程, 等. 陡坡地杏树高产优质与肥水的关系[J]. 西北农业学报, 2000, 9(4): 63-66.
- [3] 王延平, 李平, 鲁向平. 陕北丘陵区杏树引种栽培试验[J]. 陕西林业科技, 1996(3): 7-9.
- [4] 王玖瑞, 吕增仁, 李春立. 杏组织培养研究进展[J]. 河北果树, 2000(2): 6-7.
- [5] 马锋旺, 张军科, 李嘉瑞. 杏离体繁殖的研究[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(4): 12-15.
- [6] 李梦玲, 李嘉瑞, 马锋旺. 杏的茎尖培养研究[J]. 干旱地区农业研究, 1998, 15(1): 111-116.
- [7] 郭生武, 赵忠, 张存旭. 大扁杏离体腋芽增殖和生长的研究[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(3): 31-33.
- [8] Miguel C, Sanchez A, Martins M, et al. *In vitro* culture and improvement of Portuguese almond varieties[J]. Plant Cell Reports, 1999, 18: 562-569.
- [9] Miguel C M, Miguel M M, Oliveira. Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by agrobacterium mediated transformation of leaf explants[J]. Plant Cell Reports, 1999, 18: 387-393.
- [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: 456-465.
- [11] 李云. 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): 52-57.

Studies on selection of basic medium and culture condition in tissue culture and rapid propagation of *Prunus armeniaca* Linn.

QI Gao-qiang, ZHAO Zhong, ZHANG Cun-xu, ZHOU Feng-li

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

Abstract: The key techniques including explants disinfection, basic medium, suitable explant and culture condition were studied. By culturing the stems of *Prunus armeniaca* Linn. *in vitro*, the results showed that the success percentage of disinfection reached 98% when the explants were treated by 1:1 mixture of 1 g/L HgCl₂ and 20 g/L NaHCO₃ for eight minutes; the modified MS(1/2 NH₄NO₃) was suitable for *Prunus armeniaca* Linn. a micropropagation; the optimal explants were stems with double axillary buds; and the cultures were kept under the temperature of 25-27 ℃, light intensity 2 000-3 000 lx, and pH 5.6-5.8.

Key words: *Prunus armeniaca* Linn.; basic medium; culture conditions