

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.03.023

# 红桦组织培养体系的建立

付雪宁<sup>1</sup>, 高洪治<sup>1</sup>, 申耀荣<sup>2</sup>, 王永康<sup>3</sup>, 姜在民<sup>4</sup>, 蔡靖<sup>1\*</sup>

(1. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 甘肃省小陇山林业实验局洮坪林场, 甘肃 陇南 742200; 3. 陕西省宝鸡市马头滩林业局, 陕西 宝鸡 721006; 4. 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** [目的] 探究红桦组织培养各个阶段的最佳培养基配比, 建立红桦组织培养体系, 为红桦良种选育、定向培育及遗传转化等研究提供理论支持。[方法] 以红桦休眠芽为外植体, 研究外植体最佳消毒灭菌方法, 6-BA、NAA 浓度对休眠芽萌发、增殖培养的影响以及基本培养基类型、IBA 和蔗糖浓度对不定根诱导的影响。[结果] 表明: 完整的红桦组织培养体系为: (1) 以红桦休眠芽为外植体, 先用 70% 酒精消毒 30 s, 无菌水冲洗 3~4 次, 再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌 8 min, 无菌水冲洗 5~6 次获得无菌材料; (2) 休眠芽萌发最适宜培养基配方为 WPM+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 外植体萌发率为 83.33%; (3) 增殖培养所需最佳激素配比为 WPM+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 增殖系数达到 4.77, 健康指数达到 2.45; (4) 不定根诱导最佳配比为 WPM+0.8 mg·L<sup>-1</sup> IBA, 生根率达 100%, 根健康指数为 2.61; 所有培养基均附加 30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖与 7 g·L<sup>-1</sup> 琼脂。[结论] 红桦以 WPM 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA、NAA、IBA, 可成功进行各阶段的培养, 最终建立完整的红桦器官发生途径再生体系, 再生植株移植成活率在 80% 以上。

**关键词:** 红桦; 器官发生; 植物生长调节剂; 植株再生

**中图分类号:** S792.15

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2021)03-0194-07

红桦 (*Betula albo-sinensis* Burk.) 是桦木科桦木属树种, 为我国特有种, 分布于陕西、甘肃、宁夏、青海、云南、四川、湖北、河北、河南、山西等地, 垂直分布海拔为 1000~3400 m。树高可达 30 m, 树皮为淡红褐色或紫红色, 呈薄层状剥落, 剥落树皮为纸质<sup>[1]</sup>。

红桦枝干挺拔, 颜色亮丽, 观赏价值高, 可用于园林绿化; 其独特的纸质树皮可用于工艺品制作以及包装行业, 具有较高的经济价值; 其木材质地坚韧, 结构细密, 可作优良的板材; 适应能力强, 亦可用做荒山造林树种, 是我国北方高海拔地区重要的先锋造林树种, 也是高山主要成林树种<sup>[2]</sup>。但由于 20 世纪 70~80 年代的大量砍伐, 红桦原始林遭到了严重破坏, 采伐后恢复起来的次生林, 林分密度过大、质量不高, 生产力低, 各种生态和社会服务功能没有得到有效发挥, 且红桦种子天然萌发

对光照和昼夜温差要求较高, 种子更新困难<sup>[3]</sup>, 因此, 建立简单高效的红桦再生体系具有重要意义。

国外在桦树组织培养方面先后建立了纸桦 (*B. papyrifera* Marshall)<sup>[4]</sup>、日本白桦 (*B. platyphylla* var. *Japonica*)<sup>[5]</sup>、垂枝桦 (*B. pendula* Roth.)<sup>[6]</sup> 等桦树的组培再生体系; 我国从 20 世纪 70 年代开始, 亦已进行了白桦 (*B. platyphylla* Suk.)<sup>[7]</sup>、光皮桦 (*B. luminifera* H. Wink.)<sup>[8]</sup>、西南桦 (*B. alnoides* Buch Ham. ex D. Don)<sup>[9]</sup>、裂叶垂枝桦<sup>[10]</sup> 等桦木组织培养体系研究。

由于国内对于红桦组织培养方面的研究尚无, 故本研究通过器官发生途径建立高效稳定的红桦组织培养技术体系, 以期红桦良种选育、定向培育及遗传转化等方面的研究提供理论支持, 为高海拔地区荒山红桦造林提供技术支持, 同时也可填补红桦无性繁殖研究方面的空白。

收稿日期: 2020-07-26 修回日期: 2020-12-30

基金项目: 国家重点研发计划子课题“红桦高效培育技术研究”(2017YFD0600603-02)

\* 通讯作者: 蔡靖, 女, 教授. 主要研究方向: 植物资源开发利用, 森林生态. E-mail: cjcaijing@163.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料的获得及预处理

分别于2017年冬季至2018年早春在陕西省宁陕县火地塘林场,采集生长健壮、无病虫害的红桦带休眠芽枝条,选取饱满休眠芽,剥去外层芽鳞,剩余内部长约0.5 cm的芽尖,基部连带1~2 mm长的茎段,置于大烧杯中,用纱布封口后,自来水冲洗1~2 h。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌时间对无菌外植体获得的影响** 将休眠芽在超净工作台上先用70%酒精消毒30 s,接着用无菌水冲洗4~5次,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>分别灭菌4、6、8、10、12 min,用无菌水冲洗5~6次,消毒过程中轻微地摇晃灭菌容器。处理完成后接种在不添加任何激素的WPM培养基上。每个处理接种20瓶,每瓶接种1个外植体,共重复3次,接种15 d后统计外植体污染率和萌发率。

**1.2.2 激素组合对休眠芽萌发的影响** 以WPM为基本培养基,同时添加浓度为0.8、1.0、1.2、1.5、1.8、2.0 mg·L<sup>-1</sup>的6-BA和0.1、0.2 mg·L<sup>-1</sup>的NAA及0.01、0.02 mg·L<sup>-1</sup>的IBA。接种灭菌后的休眠芽,每个处理接种10瓶,每瓶接种1个外植体,共重复3次,培养3~4周后统计外植体萌发情况。

**1.2.3 激素组合对增殖的影响** 初代培养得到的不定芽长到3~5 cm时,剪成长约1 cm的带芽茎段进行增殖,增殖培养基为WPM基本培养基附加浓度为0.5、1.0、1.5、2.0 mg·L<sup>-1</sup>的6-BA和0.01、0.02、0.05 mg·L<sup>-1</sup>的NAA,每个处理接种15瓶,每瓶接种2个外植体,共重复3次,培养40 d后统计芽苗增殖系数、增殖苗健康指数。

**1.2.4 基本培养基类型、IBA及蔗糖浓度对不定根诱导的影响** 选取生长健壮、叶色浓绿、高约5 cm无根单苗进行生根培养。分别以WPM、MS、1/2 MS为基本培养基,添加蔗糖20、25、30、35 g·L<sup>-1</sup>,附加浓度为0.4、0.5、0.8、1.0 mg·L<sup>-1</sup>的IBA。每个处理接种20瓶,每瓶接种1个外植体,共重复3次,接种后定期观察、记录生根时间,培养25 d时统计生根条数,计算生根率、生根指数、根健康指数。

**1.2.5 炼苗移植** 选用生根培养25 d后生长健壮、叶色鲜绿、根系发育良好的组培苗进行炼苗移

植,先将组培苗取出培养室,让其带盖适应温室环境5 d,第6天开始逐渐开盖,第8天完全开盖后再存放5 d。用清水冲洗干净组培苗根系附着的培养基,移植于装有混合基质(国产泥炭:国产水苔:腐殖质体积比为1:4:1)的营养钵中。移植后每天喷水4~6次,保持小环境湿度在90%以上,温度控制在20~25℃,21 d后统计成活率及生长状况。

**1.2.6 培养条件与数据统计分析** 若无特别说明,所有培养基均添加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>、琼脂7 g·L<sup>-1</sup>,pH调至5.8,高温(121℃)高压灭菌20 min,培养温度为(25±2)℃,光周期16 h/8 h,光照强度36 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

增殖系数 = 增殖芽数/接种芽数

增殖苗健康指数 = 增殖苗生长状况值之和/增殖苗总数(增殖苗生长状况划分为“3”、“2”、“1”3个级别,其中,“3”表示芽苗生长健壮、茎干粗壮、叶片大且鲜绿;“2”表示生长较健壮、黄叶较少、无玻璃化;“1”表示生长一般、叶片小而卷曲、存在部分黄叶茎干稍细弱)。

根健康指数 = 根系生长状况值之和/生根苗总数(根系生长状况划分为“3”、“2”、“1”3个级别,其中,“3”表示根粗细适中不易断裂,长度适中,有大量须根;“2”表示根较粗壮易断裂,有少量须根;“1”表示根较细弱,无须根)。

生根指数 = 生根率 × 平均根长 × 平均生根数

使用SPSS软件对所统计数据进行分析(ANOVA)和显著性检验,显著水平为P<0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 0.1% HgCl<sub>2</sub>对无菌外植体获得的影响

高污染率、褐化死亡率及低萌发率极大地限制了植物组织培养体系的建立。由表1可以看出:灭菌剂处理时间不同,外植体接种后生长状态不同;随着0.1% HgCl<sub>2</sub>处理时间的延长,外植体的污染率呈现逐渐降低的趋势,但与此同时,由HgCl<sub>2</sub>自身引起的外植体褐化程度也逐渐加剧,当处理时间为8 min时,除去褐化及污染的影响,外植体萌发率达到所有处理中最高值,为60%。因此,综合上述3个指标,筛选出最适宜红桦外植体消毒灭菌的方法为:先用70%酒精消毒30 s,无菌水冲洗3~4次,然后用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒8 min,无菌水冲洗5~6次。

表1 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌时间对无菌外植体获得的影响Table 1 Effects of 0.1% HgCl<sub>2</sub> sterilization time on the acquisition of sterile explants

试验号 Test number	灭菌时间/min Sterilization time	外植体数/个 Number of explants	污染率/% Pollution rate	褐化死亡率/% Browning mortality rate	萌发率/% Germination rate
A1	4	60	51.7 ± 0.19 <sup>a</sup>	6.7 ± 0.09 <sup>a</sup>	41.7 ± 0.15 <sup>a</sup>
A2	6	60	45.0 ± 0.22 <sup>b</sup>	15.0 ± 0.31 <sup>ab</sup>	40.0 ± 0.18 <sup>a</sup>
A3	8	60	15.0 ± 0.25 <sup>c</sup>	25.0 ± 0.27 <sup>b</sup>	60.0 ± 0.32 <sup>b</sup>
A4	12	60	13.3 ± 0.17 <sup>c</sup>	58.3 ± 0.19 <sup>c</sup>	28.3 ± 0.44 <sup>a</sup>

注：表中数据为平均值 ± 标准差，不同小写字母表示不同处理间差异显著 ( $p < 0.05$ )，下同。

Notes: The data in the table are the mean ± standard deviation, and different lowercase letters indicate significant differences between different treatments ( $p < 0.05$ ), the same below.

## 2.2 激素组合对休眠芽萌发的影响

初代培养结果 (表2) 表明：不同激素组合对休眠芽的萌发以及生长状态影响不同；当添加一定浓度的 NAA 时，随着 6-BA 浓度的增加，外植体的萌发率总体呈先上升后下降的趋势，当 NAA 浓度为 0.1 mg·L<sup>-1</sup>、6-BA 浓度为 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 时，外植体萌发率达到最高，为 83.33%，且此时外植体生长状态最佳，休眠芽在培养 1 周左右时开始萌发，叶片全部展开后茎也逐渐开始伸长生长；而当 6-BA 浓度一定时，NAA 浓度升高，外植体萌发率逐渐下降，外植体生长状态无明显变化，当 NAA 浓度为 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 时，所有处理下的外植体均不产生茎，平均萌发率也较添加 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 时下降了 10.61%。休眠芽初代培养过程中最主要的问题是只萌发展叶而不伸长生长，这样状态的外植体无法用于增殖以及生根培养。初代培养所有试验中，

只有 B4 和 B5 处理下，外植体产生了茎，但 B5 诱导产生的茎较细弱，且叶片出现黄化现象，综合考虑，红桦休眠芽初代培养最佳激素配比组合为 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA。

## 2.3 激素组合对增殖的影响

将红桦带芽茎段接种到含有不同激素配比的增殖培养基中，培养约 7 d 茎段基部开始分化出芽点，周围产生绿色愈伤组织。培养 40 d 后的统计结果 (表3) 表明：增殖系数以及增殖苗健康指数均随 6-BA 浓度的升高呈先上升后下降的趋势，当 6-BA 浓度为 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 时，增殖系数较 1.0、2.0 mg·L<sup>-1</sup> 浓度分别高出 66.54%、62.37%，健康指数分别高出 64.18%、46.67%，增殖情况最佳；随着 NAA 浓度增加，增殖系数和健康指数的变化趋势也表现为先上升后下降，在浓度为 0.02 mg·L<sup>-1</sup> 时，平均增殖系数为 3.73，平均健康指数为 1.75，均达

表2 植物生长调节剂对初代培养的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on primary culture

试验号 Test number	植物生长调节剂浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) Concentration of plant growth regulator			外植体数/个 Number of explants	萌发率/% Germination rate	外植体生长状态 The growth state of the explants
	6-BA	NAA	IBA			
B1	0.8	0.1	0	30	53.33 ± 0.65 abc	基部无愈伤，无茎，叶皱缩
B2	1.0	0.1	0	30	56.67 ± 0.91 abc	基部无愈伤，无茎，叶破损发黄
B3	1.2	0.1	0	32	62.50 ± 0.34 abc	基部无愈伤，无茎，叶正常
B4	1.5	0.1	0	30	83.33 ± 0.55 d	基部有褐色疏松愈伤，茎健康，叶鲜绿
B5	1.8	0.1	0	28	71.43 ± 0.67 cd	基部有米黄色疏松愈伤，茎细弱，叶发黄
B6	2.0	0.1	0	28	72.41 ± 0.39 cd	基部有米黄色疏松愈伤，无茎，叶蜷曲发黄
B7	0.8	0.2	0	30	46.67 ± 0.44 abc	基部无愈伤，无茎，叶黄化
B8	1.0	0.2	0	32	56.25 ± 0.43 abc	基部无愈伤，无茎，叶破损发黄
B9	1.2	0.2	0	31	67.74 ± 0.58 bcd	基部有绿色坚实愈伤，无茎，叶黄化
B10	1.5	0.2	0	31	64.51 ± 0.71 bc	基部有绿色愈伤，无茎，叶皱缩
B11	1.8	0.2	0	29	62.07 ± 0.66 abc	基部有米黄色疏松愈伤，无茎，叶蜷曲发黄
B12	2.0	0.2	0	30	60.00 ± 0.80 abc	基部有米黄色疏松愈伤，无茎，叶黄化
B13	1.5	0.1	0.02	30	43.33 ± 0.63 a	基部产生绿色愈伤，无茎，叶正常
B14	1.5	0.1	0.05	30	50.00 ± 0.57 ab	基部产生绿色愈伤，无茎，叶正常

到3个浓度处理中最高值。因此, 红桦增殖培养最佳植物生长调节剂配比为  $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+  $0.02$

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 此处理下红桦增殖系数达到 4.77, 健康指数达到 2.45。

表3 植物生长调节剂对增殖培养的影响

Table 3 Effects of plant growth regulators on the proliferation culture

试验号 Test number	植物生长调节剂浓度/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) Concentration of plant growth regulator		增殖系数 Proliferation coefficient	健康指数 Health index
	6-BA	NAA		
C1	1.0	0.01	$2.56 \pm 0.15^{\text{ab}}$	$1.28 \pm 0.13^{\text{a}}$
C2	1.0	0.02	$3.04 \pm 0.12^{\text{ab}}$	$1.24 \pm 0.09^{\text{a}}$
C3	1.0	0.05	$2.57 \pm 0.32^{\text{ab}}$	$1.51 \pm 0.22^{\text{a}}$
C4	1.5	0.01	$4.45 \pm 0.21^{\text{ab}}$	$2.16 \pm 0.32^{\text{a}}$
C5	1.5	0.02	$4.77 \pm 0.18^{\text{a}}$	$2.45 \pm 0.14^{\text{a}}$
C6	1.5	0.05	$4.37 \pm 0.22^{\text{ab}}$	$1.99 \pm 0.25^{\text{a}}$
C7	2.0	0.01	$2.67 \pm 0.41^{\text{ab}}$	$1.64 \pm 0.23^{\text{a}}$
C8	2.0	0.02	$3.39 \pm 0.24^{\text{ab}}$	$1.55 \pm 0.16^{\text{a}}$
C9	2.0	0.05	$2.30 \pm 0.21^{\text{b}}$	$1.32 \pm 0.26^{\text{a}}$

## 2.4 基本培养基类型、IBA 及蔗糖浓度对不定根诱导的影响

生根培养约 7 d, 外植体基部可见嫩根生出, 生根培养过程中也伴随着壮苗效果, 组培苗的长势逐渐变好, 茎变粗, 叶片变大且颜色由淡绿变为翠绿。培养 25 d 不同基本培养基以及不同浓度 IBA 对生根的影响见图 1, 3 种不同基本培养基下的平均生根率 (图 1A) 高低次序依次为:  $1/2 \text{ MS} > \text{WPM} > \text{MS}$ ,  $1/2 \text{ MS}$  培养下的平均生根率为 84.9%, 为 MS 培养的 2.6 倍; 虽然  $1/2 \text{ MS}$  培养下红桦生根率最高, 但其平均生根条数 (图 1B)、根长 (图 1C)、生根指数 (图 1D) 均小于 WPM 培养下生根苗的相应指标, 分析根健康指数 (图 1E), WPM 培养下根健康指数平均为 1.77, 高于另外 2 种基本培养基, 生根苗也更易移植成活, 因此, 红桦最佳生根基本培养基为 WPM。

不同浓度 IBA 处理的平均生根率高低次序为:  $0.8 > 1.0 > 0.5 > 0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 分别为 75.8%、74.2%、73.3%、14.67%, 可看出 IBA 浓度与生根率先呈正相关, 在  $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时生根率达最高值, 而当浓度升至  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 生根率则有所下降。综合考虑生根率及无根单株生根状态, 即生根数、根长、健康指数及生根指数, 得出以 WPM 为基本培养基, 附加  $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 时生根效果最佳, 此处理下生根率达到 100%, 健康指数也高达 2.61。

蔗糖浓度对生根培养的影响见表 4, 生根率随蔗糖浓度的升高而逐渐增加, 当浓度超过  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 各处理间的差异并不显著。在浓度为 30、35

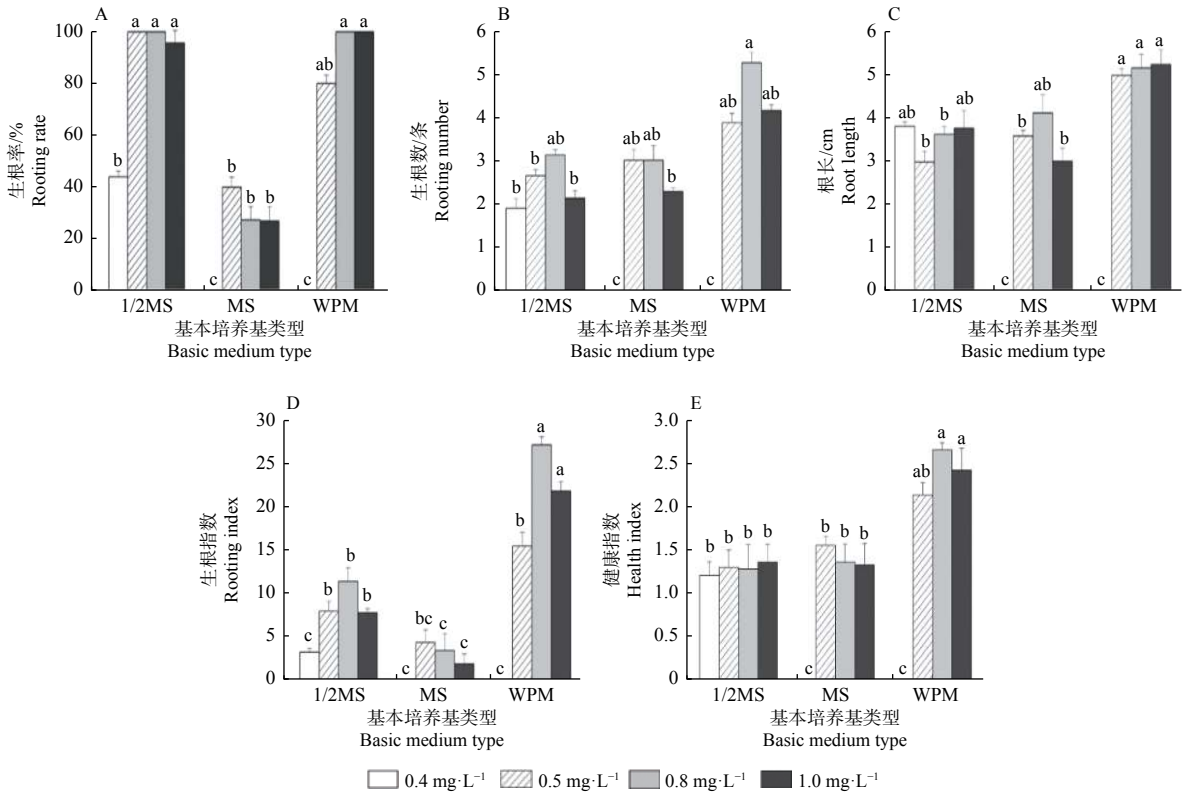
$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时均达到了 100% 的生根率, 但在  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖的处理下, 平均生根条数、根长、生根指数、健康指数均高于  $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的处理, 表明红桦生根培养添加最适蔗糖浓度应为  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 2.5 炼苗移植

组培瓶苗移植第 2 天开始原有叶片开始逐渐萎蔫掉落, 第 7 天开始从侧芽处萌发新叶, 第 14 天左右结束缓苗, 植株长势逐渐恢复, 叶片逐渐变大且颜色变翠绿, 茎也变粗壮且逐渐木质化, 21 d 统计移植成活率为 83.9%。

## 3 讨论

无菌外植体的获得是植物组织培养无菌体系建立的第一步, 选择合适的消毒灭菌方法对组织培养研究具有重要意义<sup>[11-12]</sup>。郭军战等<sup>[13]</sup>通过对四倍体刺槐的研究, 发现用茎段作外植体时, 用  $0.1\%$   $\text{HgCl}_2$  灭菌 10 min 效果最好, 而本研究用红桦休眠芽做外植体, 得出用  $0.1\%$   $\text{HgCl}_2$  处理 8 min 时灭菌效果最佳, 当灭菌时间为 10 min 时, 外植体污染率无显著变化而萌发率却显著降低。这可能是因为外植体类型及状态有所不同, 剥去芽鳞的休眠芽比茎段更脆弱, 长时间接触灭菌剂会造成外植体损伤而降低萌发率。不同外植体的适宜消毒灭菌方法不尽相同, 灭菌剂的选择需要根据外植体的大小与坚硬程度等决定, 其成分及处理时间会对外植体产生不同的灭菌效果, 灭菌时间过短会灭菌不彻底, 导致外植体出现污染, 而灭菌时间过长则会损伤外植体, 引起外植体的褐化死亡现象。



注：图中数据为平均值 ± 标准差，不同小写字母表示不同处理间差异显著 ( $p < 0.05$ )。

Notes: The data in the figure are means ± standard deviation, different lowercase letters indicate significant differences between different treatments ( $p < 0.05$ ).

图1 基本培养基类型及 IBA 浓度对红桦不定根诱导的影响

Fig. 1 Effects of basic medium type and IBA concentration on the induction of adventitious roots of *Betula albo-sinensis*

表4 蔗糖浓度对生根培养的影响

Table 4 Effects of sucrose concentration on rooting culture

试验号 Test number	基本培养基 Basic medium	蔗糖浓度/(g·L <sup>-1</sup> ) Concentration of Sucrose	生根率/% Rooting rate	平均生根数/条 Mean rooting number	根长/cm Root length	生根指数 Rooting index	健康指数 Health index
E1	WPM	20	72 ± 3.09 b	3.06 ± 0.21 b	4.21 ± 0.40 a	9.28 ± 0.62 b	2.11 ± 0.15 a
E2		25	96 ± 2.54 a	3.25 ± 0.19 ab	4.52 ± 0.29 a	14.10 ± 0.84 a	2.17 ± 0.09 a
E3		30	100 ± 0.00 a	4.24 ± 0.35 a	5.01 ± 0.33 a	21.62 ± 0.66 a	2.44 ± 0.22 a
E4		35	100 ± 0.00 a	3.84 ± 0.31 ab	4.33 ± 0.25 a	16.63 ± 0.58 a	2.20 ± 0.27 a

增殖培养的效果好坏是大规模快繁体系建立的关键<sup>[14]</sup>，细胞分裂素与生长素的合理使用可促进芽苗增殖。他人研究发现，适宜白桦、垂枝桦、西南桦增殖培养的植物生长调节剂配比分别为 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA、0.75 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.75 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA、0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.01 mg·L<sup>-1</sup> NAA<sup>[15-17]</sup>。本研究得出最适宜红桦增殖的激素配比为 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA。可见，桦木科树种增殖培养所用激素多为 6-BA 与 NAA，且前者常用浓度为 0.5~1.5 mg·L<sup>-1</sup>，后者则为 0.01~0.1 mg·L<sup>-1</sup>，垂枝桦的增殖培养虽然使用了 6-BA 和 KT 两种细胞分裂素，但其总量仍未超

过 1.5 mg·L<sup>-1</sup>。此外，本研究发现，随着 6-BA 和 NAA 浓度的增加，增殖系数、增殖苗健康指数均呈先上升后下降的趋势，两类激素浓度过高或过低虽在一定程度上可使芽苗数量增加，但增殖系数与增殖苗健康指数均不佳，增殖苗不适用于生根培养。不同桦树增殖苗质量随着激素浓度变化呈现不同的变化趋势，细胞分裂素与生长素的最佳比例需在具体研究过程中进行不断试验。

外植体是否生根决定了组培快繁体系建立的成败<sup>[18]</sup>，影响生根培养的因素主要有基本培养基、激素浓度与配比、蔗糖、琼脂等附加物的浓度、培养条件等<sup>[19]</sup>。一般用于生根培养的培养基有 1/8 MS、

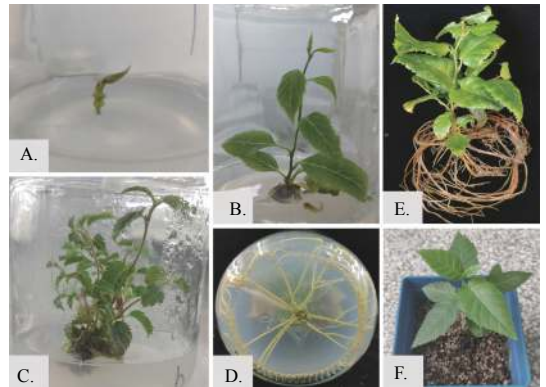
1/4 MS、1/2 MS、MS、WPM 等,而生根率一般随着培养基盐浓度的降低而升高,但浓度过低则会无法满足组培苗生根的营养需求<sup>[20-21]</sup>。本研究发现,红桦生根培养效果为 WPM > 1/2 MS > MS。张丽杰等<sup>[22]</sup>通过对欧洲垂枝桦生根的研究也得出了相同的结论,虽然 1/2 MS 培养下红桦生根率与 WPM 培养下无显著性差异,但所生根质量不高,根粗壮、易断裂、须根少,而 WPM 培养下所生根粗细适中不易断裂,长度适中,有大量须根,更适宜于炼苗移植,这可能是因为在 WPM 培养下组培苗基部形成的愈伤组织较少,使得所生根与维管束联系更紧密,地上部分长势更好,移植成活率高。除去基本培养基,生长素 IBA 在多种植物不定根的诱导起到较好的作用<sup>[23]</sup>。本研究表明,当添加 IBA 浓度小于  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,其浓度与生根效果呈正相关,而当浓度达到  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,生根率、生根指数、健康指数均有所下降,最适于生根培养的浓度为  $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,这与黄永伟等<sup>[24]</sup>对文冠果生根因素研究结果相同,IBA 虽然对不定根的产生有促进作用,但浓度过高则会起到抑制作用。

一切植物组织都不能在没有碳水化合物的条件下生长,碳水化合物的作用是作为碳源和渗透压稳定剂,一般植物组织培养在以蔗糖为碳源的培养基中<sup>[25-26]</sup>。魏爽<sup>[27]</sup>研究结果表明,在蔗糖浓度为  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,辽东栎的根长势较好,而在浓度为  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,根系虽健壮,但苗的长势弱,叶片发黄。本研究试验了 20、25、30、35  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖对红桦不定根诱导的影响,结果也表明,当添加  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖时,对生根培养起到有效的促进作用;而詹亚光等<sup>[28]</sup>对白桦的相关研究则表明,蔗糖浓度对白桦组培苗生根率影响不显著。不同植物的生长特性导致其生长所需蔗糖量不同,通过上述研究结论对比可知,辽东栎与红桦生根过程对蔗糖的需求量相近,当蔗糖浓度过低时,植物无法获得生长所需碳源而生长不良,过高则会导致培养基渗透压过高影响外植体的正常生长;而白桦的研究结论则可能是因为其试验是在添加了  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 的条件下进行的,IBA 对生根的影响程度更大,蔗糖浓度在一个适宜的范围内并不会对生根率造成明显影响。

## 4 结论

通过对红桦组织培养各个阶段进行试验,最终建立了完整的红桦器官发生途径再生体系,培养过程见图 2,即以红桦休眠芽为外植体,先用 70% 酒

精消毒 30 s,无菌水冲洗 3~4 次,然后用  $0.1\%$   $\text{HgCl}_2$  消毒 8 min,无菌水冲洗 5~6 次获得无菌材料,初代培养最适宜激素配比为 WPM +  $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA;增殖培养最佳配比为 WPM +  $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA;生根培养最佳配比为 WPM +  $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA,所有培养基配比均附加  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖与  $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂;生长良好组培苗移植于装有混合基质(国产泥炭:国产水苔:腐殖质体积比为 1:4:1)的营养钵中,21 d 统计移植成活率为 83.9%。此体系可为红桦良种选育、定向培育、遗传转化等研究奠定重要基础。



注: A. 接种休眠芽; B. 初代培养; C. 增殖培养; D. 生根培养; E. 完整组培苗; F. 移植组培苗。

Notes: A. Inoculate dormant buds; B. Primary culture; C. Proliferation culture; D. Rooting culture; E. Complete tissue culture plant; F. Transplanting tissue culture plant.

图 2 红桦组织培养过程

Fig. 2 Tissue culture of *Betula albo-sinensis*

## 参考文献:

- [1] 张志翔. 树木学: 北方本[M]. 北京: 中国林业出版社, 2008.
- [2] 任坚毅, 林 玥, 岳 明. 太白山红桦种子的萌发特性[J]. 植物生态学报, 2008, 32(4): 883-890.
- [3] 吴 彦, 刘 庆, 何 海, 等. 光照与温度对云杉和红桦种子萌发的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(12): 2229-2232.
- [4] Tremblay F M. Callus formation from protoplasts of *Betula papyrifera* March. cell suspension culture[J]. Journal of Plant Physiology, 1988, 133(2): 247-251.
- [5] Ide Y, Yamamoto S. In vitro plantlet regeneration of mature monarch birch (*Betula maximowicziana*) by winterbud culture[J]. Journal of the Japanese Forestry Society, 2008, 72(2): 147-150.
- [6] Nuutila A M, Kauppinen V. Nutrient uptake and growth of anembryogenic and a non-embryogenic cell line of birch (*Betula pendula* Roth.) in suspension culture[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992, 30(1): 7-13.
- [7] 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.
- [8] 谌红辉, 曾 杰, 贾宏炎, 等. 光皮桦叶芽离体培养再生植株技术[J]. 广西林业科技, 2006, 35(3): 123-124.

- [9] 陈 伟, 施季森, 陈金慧, 等. 西南桦不同种源外植体组织培养研究技术[J]. 南京林业大学学报, 2007, 31 (1): 27-30.
- [10] 张丽杰, 和敬渊, 孙昕森, 等. 裂叶垂枝桦组织培养与植株再生[J]. 林业科学研究, 2018, 31 (4): 135-141.
- [11] 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.
- [12] 李庆伟, 梁明勤, 樊亚敏, 等. 不同取材时期和处理方法对瓦松无菌体系建立的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (1): 55-58.
- [13] 郭军战, 舒庆艳, 王丽玲, 等. 四倍体刺槐组织培养中的外植体选择和消毒研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17 (1): 15-18.
- [14] Andreu P J A. Marín. In vitro culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insittia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition[J]. *entia Horticulturae*, 2005, 106(2): 258-267.
- [15] 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.
- [16] 吴宗泽, 王世杰, 王立福, 等. 垂枝桦的组培快繁[J]. 分子植物育种, 2016, 14 (7): 1815-1820.
- [17] 冯立新, 庞正姝, 陈 荣, 等. 西南桦组织培养体系的建立[J]. 贵州农业科学, 2013, 41 (5): 27-29.
- [18] 金建邦, 祝遵凌. 桦木科植物组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2013 (23): 202-206.
- [19] Pawlicki N, Welander M. Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9[J]. *Plant Science*, 1995, 106(2): 167-176.
- [20] 杨锋利, 杜保国, 张存旭. 成龄栓皮栎组培苗生根影响因素研究[J]. 绵阳师范学院学报, 2006, 25 (5): 79-82+95.
- [21] 赵展平, 何 芳, 唐军荣, 等. 樟叶越橘组培苗生根和移栽技术研究[J]. 广西植物, 2019, 39 (7): 967-975.
- [22] 张丽杰, 周 强, 刘延军, 等. 欧洲垂枝桦的组织培养和植株再生[J]. 西北林学院学报, 2011, 26 (1): 65-67.
- [23] Logesh P, Settu A, Thangavel K, *et al.* In vitro callus induction and regeneration studies in *Withania somnifera* L. (Dunal)[J]. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 2011, 12(1): 51-56.
- [24] 黄永伟, 贾明仁, 王洪波, 等. 影响文冠果组织培养苗离体生根的因素[J]. 北方果树, 2010 (4): 7-9.
- [25] 吕芝香. 碳源种类和浓度对愈伤组织生长的影响[J]. 植物生理学通讯, 1981, 17 (6): 1-5.
- [26] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 2005.
- [27] 魏 爽. 辽东栎合子胚的离体培养[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2011.
- [28] 詹亚光, 陶 静, 杨传平, 等. 白桦组培再生系统的研究(II)—影响因素及培养程序[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26 (6): 1-5.

## Establishment of Tissue Culture System of *Betula albo-sinensis*

FU Xue-ning<sup>1</sup>, GAO Hong-zhi<sup>1</sup>, SHEN Yao-rong<sup>2</sup>, WANG Yong-kang<sup>3</sup>, JIANG Zai-min<sup>4</sup>, CAI Jing<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. Taoping Forest Farm, Xiaolongshan Forestry Experimental Bureau, Longnan 742200, Gansu, China; 3. Matoutan Forestry Bureau, Baoji 721006, Shaanxi, China; 4. College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the optimal medium ratio at each stage of the tissue culture of *Betula albo-sinensis*, to establish the tissue culture system of *B. albo-sinensis*, and provide theoretical support for the studies on species selection of superior varieties, directional cultivation and genetic transformation of *B. albo-sinensis*. [Method] Using dormant buds of *B. albo-sinensis* as explants to study the optimal disinfection and sterilization method of explants, the effect of 6-BA and NAA concentrations on the germination of dormant buds and proliferation culture, and the effects of basic medium types, IBA and sucrose concentrations on the induction of adventitious root. [Result] The optimal tissue culture system of *B. albo-sinensis* established in this study is as follows. (1) Using *B. albo-sinensis* dormant buds as explants, and sterilized with 70% alcohol for 30 seconds and washed with sterile water for 3-4 times, then sterilized with 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 8 minutes and washed with sterile water for 5-6 times to obtain sterile materials. (2) The optimal medium for the germination of dormant buds is WPM basic medium with 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, the germination rate of explants is 83.33%. (3) The best proliferation culture is WPM adding 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA, with a proliferation coefficient of 4.77 and a health index of 2.45. (4) The most suitable medium for adventitious root induction is WPM supplemented with 0.8 mg·L<sup>-1</sup> IBA, the rooting rate is 100%, and the root health index is 2.61. All the media are supplemented with 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose and 7 g·L<sup>-1</sup> agar. [Conclusion] With WPM as the basic medium and different concentrations of 6-BA, NAA and IBA added, the culture of *B. albo-sinensis* at all stages could be successfully carried out, and a complete regeneration system of organogenesis generation pathway is established. The transplant survival rate of regenerated plants is higher than 80%.

**Keywords:** *Betula albo-sinensis* Burk; organogenesis; plant growth regulators; plant regeneration