

垂枝樱花组培技术研究

王红梅¹,李园莉¹,李洪光²,董晓辉²,孙艳艳¹

(1. 江苏农林职业技术学院,江苏句容 212400;2. 嘉汉生态苗木(苏州)有限公司,江苏苏州 215028)

摘要:为了建立更高效的垂枝樱花的组织快繁体系,以垂枝樱花的当年生带腋芽茎段为外植体,进行了外植体的灭菌、启动、增殖和生根培养,探讨了适宜的外植体灭菌方法与程序,不同培养基配方对启动、增殖、生根培养效果的影响。结果表明:适宜的表面灭菌方法为75%乙醇浸泡30 s,0.1%的HgCl₂浸泡10 min,最后无菌水冲洗5遍,成活率达66.7%;较适宜的启动培养基为1/2 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹,分化达68.3%;适宜的增殖培养基为:MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹+GA₃ 10 mg·L⁻¹,增殖系数为7.0,平均苗高2.9 cm;适宜的生根培养基为:1/2 MS+NAA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖20 g·L⁻¹,生根率达93%。

关键词:垂枝樱花;离体培养;表面灭菌;增殖;生根

中图分类号:S662.5 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2016)09-0001-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.09.0001

垂枝樱花(*Cerasus subhirtella* Miq. var. *pendula* Tanaka),又名枝垂樱,别名线樱,为江户彼岸樱的垂枝型变异^[1]。属蔷薇科(Rosaceae),李亚科(Prunoidea),樱属(*Cerasus*)观赏植物。主要分布于我国西部、西南部以及朝鲜、日本等地^[2],现浙江、安徽、江西、四川、湖北等地也有栽培^[3-4]。垂枝樱因其枝条悬垂,轻盈摇曳,如柳树般柔美,非常具有诗情画意,在园林绿化美化建设中受到青睐^[5]。垂枝樱传统的繁殖方式为嫁接繁殖,然而嫁接繁殖受季节限制和嫁接技术影响,繁殖率低。利用离体培养因其能周年生产,不受季节影响,繁殖系数高,能克服优良种苗供应不足的现状。垂枝樱虽然枝条柔垂,但仍有较强的干性,对于离体培养的苗木,移栽后注意修剪整形,即可培养干型优美的苗木。国内对于垂枝樱的研究主要集中在品种介绍^[1]、引种栽培^[2]、观赏性状观察^[6-8]、园林应用^[9-10]、整形修剪^[11]及扦插繁殖^[12]等方面,对于组织培养的研究仅荣冬青等^[13]对红枝垂的组织培养进行了报道,但繁殖系数不高;王红梅等^[14]对垂枝樱花外植体的灭菌和不定芽的诱导进行了报道,但没有完整的组培过程。因此,建立更高效的垂枝樱花的组培快繁体系是非常必

要的。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2013年3月至2015年12月在江苏农林职业技术学院组培中心进行。供试材料为生长于江苏省句容市天王镇嘉润苗圃的垂枝樱,选取当年生带腋芽茎段。

1.2 方法

1.2.1 材料的选取及预处理 于晴天的中午,截取当年生垂枝樱健壮枝条的嫩梢10~15 cm,去掉多余的叶片,将枝条剪成2~3 cm带腋芽小段,放入洗涤剂清洗干净,并用流水连续冲洗1 h。

1.2.2 材料表面灭菌 将预处理后的材料,转入超净工作台进行消毒灭菌。处理方法为75%的酒精处理30 s,再用0.1% HgCl₂消毒处理4~10 min,最后用无菌水冲洗5遍^[14]。消毒处理完后沥干水分,再将茎段的上下两端进行适当修剪,修剪成1 cm左右的单芽茎段,然后形态学上端朝上,直立式接种于培养基中,每瓶接种3个材料,每个处理接种20瓶,重复3次,20 d后分别统计污染率、褐变率、成活率等指标^[15]。

1.2.3 启动培养 启动培养基的筛选,选择L₉(3⁴)的正交设计,设置3个试验因素,每个因素选取3个水平,分别为基本培养基(MS、1/2 MS、1/4 MS)、6-BA(0.1、0.5、1.0 mg·L⁻¹)、NAA(0.02、0.05、0.10 mg·L⁻¹),共9个处理,每种处理均附加蔗糖30 g·L⁻¹,琼脂6.5 g·L⁻¹,pH调至5.8。

收稿日期:2016-07-16

基金项目:2015江苏省大学生实践创新训练计划资助项目(201513103020X);2012江苏农林职业技术学院科技资助项目(2012kj004)

第一作者简介:王红梅(1976-),女,河北省任丘市人,硕士,副教授,从事林木育种教学与科研工作。E-mail:whmei132@sohu.com。

每种处理接种 30 瓶,每瓶 3 株,重复 3 次,30 d 后统计分化数,计算分化率,并记录生长状况。

1.2.4 增殖培养 将经过启动培养 25 d 的组培苗,截成 1.0 cm 左右的单芽茎段,减去下部较大的、能接触到培养基的叶片,垂直接种于增殖培养基中,培养温度为 25 ℃,光照强度 3 000 lx,光照时间 12 h。

首先进行增殖培养基的初选,初选仍采用启动培养时的试验设计。然后根据初选配方中材料的长势调节培养基配方,添加 GA₃,并对 GA₃ 的不同浓度(0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹)进行单因素试验,每个处理接种 10 瓶,每瓶接种 2 株,重复 3 次。30 d 后统计平均苗高、平均节间长度,并计算增殖系数^[16],增殖系数=增殖芽数/原接种数,增殖芽数按 1 cm 左右苗高的单芽进行统计^[17]。

1.2.5 生根培养 增殖培养 20 d 后,选取健壮的组培苗,剪去基部膨大的愈伤组织,及能接触到培养基的叶片,转人生根培养基进行根的诱导。对于生根培养基的筛选,采用双因素完全随机区组设计,试验因素为 NAA(0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹), IBA(0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹),基本培养基选用的是 1/2 MS,并附加蔗糖 20 g·L⁻¹,琼脂 6.5 mg·L⁻¹。每个处理接种 10 瓶,每瓶接种 3 株,重复 3 次,20 d 后统计生根率,记录生长状况。

1.2.6 驯化移栽 选取生长健壮,根长达 1.5 cm,并有侧根长出时的试管苗进行驯化移栽。将试管苗拿到温室的苗床上在自然光下闭瓶进行驯化,驯化 14 d 后,试管苗的茎由原来的嫩绿色转变为暗绿色,再开瓶驯化 2 d,然后进行移栽。移栽基质为营养土:蛭石:珍珠岩=1:2:1。移栽前用温水将试管苗基部的培养基清洗干净,然后将试管苗移栽入营养钵,注意移栽过程要轻,不能伤根。移栽后将移栽苗放入自动喷雾的塑料拱棚内,前 5 d 保持空气湿度在 95% 以上,注意早晚打开薄膜进行透气。5 d 后采用半封闭状态,相对湿度在 80% 左右继续培养 20 d,待移栽苗有明显的新梢抽出后,进行成活率的调查。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间的影响

由表 1 可知,灭菌时间短污染率较高,HgCl₂灭菌时间为 4 min 时,污染率最高,达到 90%。随着灭菌时间的延长,污染率逐渐降低,但同时也发现 HgCl₂ 灭菌时间越长对植物的伤害也越严重,因此,综合考虑确定垂枝樱花茎段适宜的表面灭菌方法为:75% 的酒精处理 30 s,再用 0.1% HgCl₂ 消毒处理 10 min,最后用无菌水冲洗 5 遍,成活率最高,达 66.7%。

表 1 表面灭菌效果比较

Table 1 Effects of surface sterilization

灭菌时间/min Sterilizing time	接种数 Vaccination number	褐变数 Browning number	污染数 Pollution number	成活数 Survival number	褐变率/% Browning rate	污染率/% Pollution rate	成活率/% Survival rate
4	60	6	54	0	10.0	90.0	0
5	60	10	41	9	16.7	68.3	15.0
6	60	10	39	11	16.7	65.0	18.3
7	60	0	40	20	0	66.7	33.3
8	60	7	22	31	11.7	36.7	51.6
10	60	6	14	40	10.0	23.3	66.7
12	60	13	9	38	21.7	15.0	63.3

2.2 启动培养

植物激素的种类与浓度对离体器官的组织培养至关重要,不同配方对启动培养效果见表 2 至表 4。

对表 2 的试验结果进行反正弦转换后再进行方差分析(见表 3),结果表明,基本培养基和 NAA 的各水平间存在显著差异,而 6-BA 各水平间差异不显著。结合方差分析、多重比较和平均

分化率的大小,最终选定在所试验的配方中适宜垂枝樱花的启动培养基为 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.10 mg·L⁻¹。

2.3 增殖培养

2.3.1 增殖培养基的初选 由表 5 可知,在所试验的配方中,MS + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.10 mg·L⁻¹ 的配方增殖系数为 2.4,1/2MS + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.05 mg·L⁻¹ 的配方增殖

表 2 不同培养基对启动培养效果

Table 2 Effects of different media on survival rate during initiation period

基本培养基 Basic medium	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	接种数 Vaccination number	分化数 Differentiated number	分化率/% Differentiated rate	生长状况 Growth situation
1(MS)	1(0.1)	1(0.02)	60	17	28.3	芽细弱
1	2(0.5)	2(0.05)	60	17	28.3	芽皱缩
1	3(1.0)	3(0.10)	60	25	41.7	愈伤组织明显
2(1/2 MS)	1	2	60	30	50.0	愈伤组织明显
2	2	3	60	41	68.3	芽健壮
2	3	1	60	18	30.0	芽畸形
3(1/4 MS)	1	3	60	10	16.7	芽细弱
3	2	1	60	3	5.0	芽细弱
3	3	2	60	1	1.7	芽细弱

表 3 启动培养方差分析

Table 3 Variance analysis of the initial culture

变异来源 Variation source	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F	Sig.
基本培养基 Basic medium	1407.746	2	703.873	90.976	0.011*
6-BA	86.682	2	43.341	5.602	0.151
NAA	326.281	2	163.140	21.086	0.045*
误差 Error	15.474	2	7.737		
总计 Total	10689.298	9			

表 4 基本培养基和 NAA 的多重比较结果

Table 4 Multiple comparison table of basic culture medium and NAA

基本培养基 Basic medium	转换后的平均分化率 Average differentiation rate after transform	NAA/(mg·L ⁻¹)	转换后的平均分化率 Average differentiation rate after transform
MS	34.8 b	0.02	26.1 b
1/2 MS	44.6 a	0.05	28.2 b
1/4 MS	14.6 c	0.10	39.8 a

表 5 增殖培养基的初选效果

Table 5 Effects of different media on proliferation coefficient

因子种类 Type of factors	接种数 Vaccination number	增殖数 Proliferated number	增殖系数 Proliferated coefficient	生长状况 Growth situation
基本培养基 Basic medium	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)		
1(1/2MS)	1(0.1)	1(0.02)	26	1.3
1	2(0.5)	2(0.05)	44	2.2
1	3(1.0)	3(0.10)	30	1.5
2(MS)	1	2	38	1.9
2	2	3	48	2.4
2	3	1	32	1.6
3(1/4MS)	1	3	26	1.3
3	2	1	28	1.4
3	3	2	24	1.2

系数为 2.2, 增殖系数均较低, 且叶片大, 顶芽不明显(见图 1)。经方差分析发现上述两种配方对增殖系数的影响无显著差异。分析增殖系数低的主要原因是节间不伸长, 苗高较矮, 因此, 还需进一步进行优化试验。

2.3.2 增殖培养基的优化 为了解决节间不伸长的问题, 在上述配方的基础上添加了能促进节间深长的赤霉素 $GA_3^{[18]}$, 试验配方: 基本培养基为 MS, 6-BA($0.3, 0.5$) $mg \cdot L^{-1}$ 、NAA(0.05) $mg \cdot L^{-1}$ 、 $GA_3(0.5, 10, 15)$ $mg \cdot L^{-1}$, 共 8 种处理, 培养基的 pH 为 5.8, 配方中蔗糖浓度均为 $30\ g \cdot L^{-1}$, 琼脂 $6.5\ g \cdot L^{-1}$ 。培养基优化结果统计见表 6。



图 1 增殖初选

Fig. 1 Primary proliferation

表 6 不同激素对增殖的影响

Table 6 Effects of different hormones on proliferation coefficient

编号 No.	6-BA/ ($mg \cdot L^{-1}$)	$GA_3/$ ($mg \cdot L^{-1}$)	接种数 Vaccination number	增殖数 Proliferated number	增殖系数 Proliferated coefficient	平均苗高/cm Average height of seeding	平均节间长度/cm Average internode length
①	0.5	0	20	44	2.2 e	1.8 f	0.2 f
②	0.5	5	20	50	2.5 d	2.3 de	0.4 e
③	0.5	10	20	142	7.1 a	2.8 b	0.7 b
④	0.5	15	20	80	4.0 c	2.5 cd	0.6 c
⑤	0.3	0	20	46	2.3 e	1.6 f	0.2 f
⑥	0.3	5	20	52	2.6 d	2.3 e	0.5 d
⑦	0.3	10	20	140	7.0 a	2.9 a	0.8 a
⑧	0.3	15	20	92	4.6 b	2.6 c	0.6 c

由表 6 可知, 添加了赤霉素 GA_3 的配方能明显促进垂枝樱花节间的伸长, 从而提高苗高, 增加增殖系数, 且苗木生长健壮。以添加 $10\ mg \cdot L^{-1}$ 的效果最好(见图 2、图 3)。结合方差分析, 最终选定培养基⑦, 即: MS+6-BA $0.3\ mg \cdot L^{-1}$ +NAA $0.05\ mg \cdot L^{-1}$ + $GA_3 10\ mg \cdot L^{-1}$ 为增殖培养的适宜配方。



图 2 第一次增殖优化培养

Fig. 2 First proliferation optimization



图 3 第二次增殖优化培养

Fig. 3 Second proliferation optimization

2.4 生根培养基的筛选

由表 7 可知, 生根效果最好的培养基的激素组合为 $A_2 B_1$, 即 $1/2\ MS + NAA\ 1.0\ mg \cdot L^{-1} + IBA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1} + 蔗糖\ 20\ g \cdot L^{-1}$, 附加琼脂 $6.5\ g \cdot L^{-1}$, pH 调至 5.8, 生根率达 93%, 平均根数为 4.2 条, 且根粗壮, 侧根多, 愈伤组织少(见图 4)。

表 7 生根培养基诱导不定根的情况

Table 7 The situation of inducing adventitious roots on different root media

激素组合 Hormone combination	生根率/% Rooting rate	平均根数 Average root number	根长势 Root growth
A ₁ B ₁	40 g	1.5 f	细长,侧根少,愈伤少
A ₁ B ₂	68.7 f	2.2 e	细长,侧根较多,愈伤少
A ₁ B ₃	84.3 c	2.8 d	较细长,侧根多,大块愈伤
A ₂ B ₁	93 a	4.2 a	粗壮,侧根多,愈伤少
A ₂ B ₂	90 b	3.9 b	粗壮,侧根多,愈伤较少
A ₂ B ₃	77.7 d	2.9 d	较粗,长,侧根少,大块愈伤
A ₃ B ₁	84.3 c	3.4 c	较粗,长,侧根少,愈伤少
A ₃ B ₂	72 e	3.2 c	较粗,侧根少,大块愈伤
A ₃ B ₃	62.8 f	3.2 c	较粗,侧根少,大块愈伤

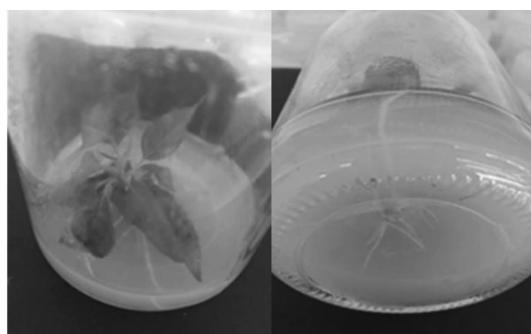


图 4 生根培养

Fig. 4 Rooting culture

2.5 驯化移栽

经调查发现,试管苗的移栽成活率达90%以上。但同时也发现,死亡苗多为茎的基部腐烂,或茎叶发生霉变,因为移栽环境为高湿环境,菌类容易滋生,因此,移栽当天应喷洒百菌清和多菌灵1 000倍液,两种药液交替使用,每7 d喷洒1次,可有效提高移栽成活率。

3 结论

该研究以垂枝樱当年生幼嫩的带腋芽茎段为外植体进行离体培养,并建立适宜垂枝樱以芽繁芽的离体培养技术体系,苗木健壮,组培苗的增殖系数达到7.0,生根率和移栽成活率均较高。

在增殖培养基的优化试验中,GA₃添加浓度低促进效果不明显,浓度达15 mg·L⁻¹时虽然也有较好促进节间伸长的效果,但苗木尖端容易变黄,造成尖端死亡。本研究中也发现GA₃虽有明显促进节间伸长的效果,但节间一旦伸长后,在后

面的继代培养过程应及时去除GA₃,否则,组培苗很容易出现尖端死亡的现象。此外,本研究中GA₃采用了直接加入培养基的方法。因GA₃在培养基高温高压灭菌的过程会有部分分解,因此,若采用过滤灭菌加入,则加入量需大幅度减少。

组织培养中,苗木的生长情况受多方面因素的影响,本试验仅就基本培养基的种类、植物激素(6-BA、NAA、GA₃)等对苗木生长的影响进行了试验,而培养条件等方面的影响未进行研究。下一步可从培养条件,如光质的变化、培养温度、培养方式上进行更深入的研究,有待找到更适宜垂枝樱花组培的培养体系。

参考文献:

- [1] 张毅,刘伟.日本垂枝樱花资源[J].北方园艺,2012(3):95-98.
- [2] 陈先友,王青华.武汉地区垂枝樱栽培技术[J].花木盆景(花卉园艺),2015(3):39-41.
- [3] 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:自然科学版,2000,24(6):44-46.
- [4] 谢春平.不同居群野生早樱形态特征及其群落学研究[D].南京:南京林业大学,2007.
- [5] 刘丽莉.高铁时代下的武汉市赏花游发展探析[J].武汉职业技术学院学报,2013(1):116-120.
- [6] 杜丹,况红玲,黄冬,等.日本垂枝樱花在武汉的生物学性状观测[J].湖北林业科技,2016,45(1):36-39.
- [7] 汪结明,李瑞雪,魏万亮.垂枝樱花的观赏特性及其园林应用研究[J].中国园艺文摘,2011(15):61-63.
- [8] 王红梅,李园莉.垂枝樱花观赏特性初步研究[J].生物技术世界,2015(8):16-17.
- [9] 张艳芳,刘荣枝.垂枝樱[J].园林,2010(3):17-19.
- [10] 冯玮.垂枝樱花在园林绿化中的应用[J].河北农机,2015(7):42-44.
- [11] 张艳芳.垂枝樱花的整形和修剪[J].南方农业:园林花卉版,2007(12):30-32.
- [12] 汪结明,李瑞雪,王冬良,等.静电场处理对垂枝樱花插穗生根及相关生理生化特性的影响[J].西北植物学报,2012,32(6):1185-1190.
- [13] 荣冬青,王贤荣.垂枝早樱‘红枝垂’组培快繁试验[J].林业科技开发,2007,22(5):72-75.
- [14] 王红梅,李园莉,李洪光,等.垂枝樱花外植体灭菌及不定芽的诱导[J].安徽农业科学,2014(35):12421-12422,12439.
- [15] 王红梅,续九如.4种台湾青枣组培技术研究[J].西部林业科学,2008(4):65-70.
- [16] 卢绪娟.玫瑰微体快繁技术体系的建立[D].泰安:山东农业大学,2007.
- [17] 李玉萍,刘进军,罗凤霞.铁皮石斛组培快繁技术研究[J].金陵科技学院学报,2015(3):78-83.
- [18] 李艳敏,孟月娥,赵秀山,等.赤霉素对樱花组培苗壮苗及生根的影响[J].园艺学报,2012(39增刊):2749.

铁棍山药茎尖组培及茎段侧芽成苗研究

平阿敏,侯雷平,邢国明,李梅兰

(山西农业大学 园艺学院,山西 太谷 030801)

摘要:山药富含淀粉、多糖、黏液蛋白、矿物质及其它营养物质,但营养繁殖导致山药病害积累、产量下降、品质退化,通过组织培养获得脱毒种苗是解决这一问题的有效途径。以铁棍山药为材料,研究山药的茎尖脱毒及茎段侧芽成苗。结果表明:最适宜的茎尖诱导成苗培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA,成苗茎尖率达到77.8%;茎段侧芽成苗培养基以MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA为最好,成苗时间短;1/2 MS+0.05 mg·L⁻¹ NAA为最适宜的生根培养基,这对无毒种苗的繁殖及防治山药品种退化、提高品种质量具有重要的指导意义。

关键词:山药;组织培养;脱毒

中图分类号:S632.1 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2016)09-0006-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.09.0006

山药(*Dioscorea opposita*)是薯蓣科薯蓣属植物,既是食用的滋补保健佳品,又是常用的药材,广泛分布于我国华北、西北及长江流域各省区^[1]。人工种植的山药,肉色洁白,味甘粉足,个大质坚,多供食用。在民间,山药是人所共知的滋

补佳品^[2]。山药不仅含有蛋白质、糖类、维生素、脂肪、胆碱和淀粉酶等成分,还含有碘、钙、铁和磷等人体不可缺少的无机盐和微量元素^[3],营养价值高,又容易被人体吸收利用,所以山药作为药菜兼用的重要农产品,深受群众青睐,在国内外市场十分畅销。

近年来山药病毒病的发现和逐渐蔓延,已经开始威胁到山药的普遍种植和产品的深入开发。由于种性退化,山药品质下降,抗逆能力变弱,单产低而不稳。因此,如何遏制病毒蔓延,减缓威胁,保证产品质量,稳定经济效益,已成为摆在人们面前的一个重大课题。

收稿日期:2016-07-8

基金项目:山西省农业科技攻关资助项目(20140311011-4,20150311010-2);山西省煤基重点科技攻关资助项目(FT201402-06)

第一作者简介:平阿敏(1991-),女,山西省晋城市人,在读硕士,从事蔬菜育种及生物技术应用研究。E-mail:839103413@qq.com。

通讯作者:李梅兰(1964-),女,山西省怀仁县人,博士,教授,博士生导师,从事蔬菜育种及生物技术应用研究。E-mail:15935485975@163.com。

Study on Tissue Culture of *Cerasus subhirtella* Miq. var. *pendula* Tanaka

WANG Hong-mei¹, LI Yuan-li¹, LI Hong-guang², DONG Xiao-hui², SUN Yan-yan¹

(1. Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, College of Landscape Architecture, Jurong, Jiangsu 212400; 2. Jiahua Urban Ecology Seedlings (Soochow) Limited Company, Suzhou, Jiangsu 215028)

Abstract: In order to establish more efficient tissue culture system, using the stems of *Cerasus subhirtella* Miq. var. *pendula* Tanaka as the explants, the effects of different sterilize time, starting culture, proliferation culture and rooting culture were studied. The results showed that the procedures of surface sterilization was 75% ethanol soak for 30 s, 0.1% HgCl₂ immerse for 10 min, the sterile water rinse 5 times, the survival rate of 66.7%. The suitable inducing medium was: 1/2 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹, the differentiation rate reached 68.3%, the proliferation medium was MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹+GA₃ 10 mg·L⁻¹, and the proliferation coefficient was 7.0, the average height was 2.9 cm, the root inducing medium was 1/2 MS+NAA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹+20 g·L⁻¹ sucrose and the rooting rate could reach 93%.

Keywords: *Cerasus subhirtella* Miq. var. *pendula* Tanaka; culture medium; surface sterilization; proliferation; rootage