

榲桲的组织培养初报

韩 晶, 秦 伟, 克热木·伊力

(新疆农业大学 园艺学院校级植物组织培养重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:以苹果型榲桲嫩枝茎段为试材,研究了不同灭菌剂、灭菌时间、基本培养基、激素组合等对榲桲外植体灭菌、初代培养、继代培养和生根培养的影响。结果表明:用 0.1%升汞溶液消毒 5 min,灭菌效果最好;初代培养基以 MS+6-BA 0.6 mg/L 效果较好,萌芽率和增殖倍数均较高,分别为 93.3%和 4.7 倍;继代培养基以 MS+6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.2 mg/L 和 MS+6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.4 mg/L 组合交替使用 更有利于组培苗的增殖和壮苗;生根培养基以 1/2 MS (I)+NAA 1.0 mg/L 生根率最高达 50%,平均根数为 7~10 根;短时间(7d)暗培养对诱导榲桲苗生根有利,随着暗培养天数的增加叶焦边现象逐渐加重甚至出现顶端枯死现象;6-BA 对诱导榲桲组培苗生根无益且易出现畸形叶。

关键词:榲桲;组织培养

中图分类号:S 661.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)05-0191-03

榲桲(*Cydonia. oblonga* Mill),蔷薇科榲桲属,别名木梨,维吾尔语叫比也,是新疆南部及我国北方干旱地区开发利用价值很高的稀有果树。与其它水果相比,榲桲的酸量和鞣质含量都很高,芳香成分无论在数量上还是质量上均属上等。榲桲也是疗效独特、具有浓郁的地方民族色彩的传统维药,可入药治肠虚水泻、镇咳等。实生苗木可作苹果和梨树的矮化砧。耐修剪,宜作绿篱。在新疆,榲桲尚处于零星分散种植,还未形成生产规模,这主要与其繁殖率低有关。榲桲可采用种子、压条、扦插、分株、枝接和芽接等方法繁殖。在生产中果农习惯用分株法繁殖,此法成活率较高,但大量繁殖时取材不易。近年来多采用种子繁殖和扦插繁殖^[1-2],但繁殖速度很慢,远不能满足大规模生产的需要。目前国内对榲桲的繁殖研究较少,主要集中在品种资源调查^[3-5]及果实成分含量的测定^[6-8]方面,采用榲桲嫩枝茎段进行组培快繁的研究国内尚未见报道。因此试验针对榲桲繁殖率低的问题,利用组织培养快繁技术,初步探讨了榲桲快繁新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

2007 年 4 月采自新疆农业大学园艺学院温室,盆栽

2 a 生苹果型榲桲的春季嫩枝有芽茎段(图 1A)。

1.2 方法

1.2.1 无菌外植体的建立 将 10~15 cm 长的榲桲嫩枝用湿纱布保湿带回实验室,剪去叶柄,经流水冲洗 30 min,在超净工作台中用 70%酒精灭菌 1 min,再用不同灭菌剂灭菌,最后用无菌水摇晃冲洗 4~5 次,剪成 1.5~2 cm 单芽茎段,放置于滤纸上吸干多余水分,接入初代培养基中。

1.2.2 培养基的筛选 初代培养设 4 个处理,主要考察基本培养基(B5、MS)和 6-BA 浓度(0.4、0.6 mg/L)对外植体萌芽的影响。继代培养考察不同激素组合对榲桲继代增殖的影响。生根培养分别考察不同激素(IBA、NAA、6-BA)和暗培养天数(7、14、21 d)对生根培养的影响。

1.2.3 培养条件 初代和继代培养:蔗糖 30 g/L,琼脂条 7 g/L;生根培养:蔗糖 20 g/L,琼脂条 7 g/L。培养基 pH 均为 5.6~6。培养室温度(27±2)℃,光照周期 15 h/d,光照强度 1 500~2 000 lx,每 5~6 周继代 1 次。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌剂及灭菌时间对无菌外植体建立的影响

接种 10 d 发现,4 种灭菌方式中以 0.1%升汞灭菌 5 min 效果最好,污染率为 6.7%,完全杀死率为 5%。1% NaClO 灭菌效果不及升汞,不仅污染率和完全杀死率较高,而且容易出现灭菌不彻底问题。同时可以看出灭菌时间并不是越长越好,灭菌时间过长会导致杀死率增加,死亡的植株很容易被菌感染,从而扩大染菌数量(表 1)。

2.2 不同基本培养基及 6-BA 浓度对榲桲初代培养的影响

第一作者简介:韩晶(1982-),女,辽宁人,硕士,研究方向为果树栽培与生理。

通讯作者:克热木·伊力。E-mail: karimali@xjau.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金启动资助项目(C02021003);新疆高校科研计划青年启动基金资助项目(XJEDU2006S20)。

收稿日期:2007-12-25

表 1 不同灭菌剂及灭菌时间对无菌外植体建立的影响

处理	灭菌剂	灭菌时间	调查芽数	污染率	完全死亡率
		/min	/个	/ %	/ %
1	1%NaClO	20	60	13.3	20
2	1%NaClO	30	60	36.7	30
3	0.1%升汞	5	60	6.7	5
4	0.1%升汞	10	60	8.3	15

接种 30 d 结果显示,基本培养基 MS 在萌芽率及增殖倍数上均好于 B5, B5 培养基玻璃化现象比 MS 严重,分析原因可能与 B5 培养基的硝态氮、钙、锌、锰的含量比 MS 培养基低有关。6-BA 浓度为 0.6 mg/L 时可以促进腋芽很快萌发,萌发期主要在 7~10 d,且萌芽率和增殖倍数均显著大于 6-BA 0.4 mg/L(表 2)。

表 2 不同培养基及 6-BA 浓度对槲樟初代培养的影响

处理	基本培养基	6-BA 浓度	调查芽数	萌芽率	增殖倍数	玻璃化率
		/mg · L ⁻¹	/个	/ %	/倍	/ %
1	MS	0.4	60	80.0	3.0	3.3
2	MS	0.6	60	93.3	4.7	8.3
3	B5	0.4	60	76.7	2.3	13.3
4	B5	0.6	60	86.7	3.9	21.7

2.3 不同激素组合对槲樟继代培养的影响

接种 40 d 发现,随着 6-BA 浓度的增大槲樟试管苗的增殖倍数也不断增加,当 6-BA 浓度大于 0.6 mg/L 时虽然增殖倍数较高,但组培苗表现出茎细弱、簇化、玻璃化等不良症状(图 C),不利于再次继代或生根。当 6-BA 浓度相同时,IBA 浓度为 0.4 mg/L 处理的增殖倍数小于 0.2 mg/L 的处理,但平均株高比 0.2 mg/L 的处理高。由表 3 可见,MS+6-BA 0.6 mg/L +IBA 0.2 mg/L 组合虽然平均株高不是最高,但有利于槲樟增殖培养;MS+6-BA 0.6 mg/L +IBA 0.4 mg/L 组合更有利于槲樟的壮苗培养,两组合交替使用效果较好。

表 3 不同激素组合对槲樟继代培养的影响

处理	6-BA 浓度 /mg · L ⁻¹	IBA 浓度 /mg · L ⁻¹	调查芽 数/个	增殖倍 数/倍	平均株 高/cm	生长 状况
1	0.6	0.2	30	5.4	1.98	叶绿,舒展
2	0.6	0.4	30	4.8	2.35	正常,粗壮
3	0.8	0.2	30	7.2	1.69	细弱,簇化
4	0.8	0.4	30	6.0	1.82	细弱,簇化
5	1.0	0.2	30	7.8	1.45	脆弱,簇化
6	1.0	0.4	30	7.2	1.78	脆弱,簇化

2.4 不同生长素及浓度对槲樟生根培养的影响

结果显示(表 4),NAA 处理的组培苗生根时间普遍早于 IBA 的处理,接种后 8 d 开始生根,且生根数较多,其中以 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时生根率最高达 50%,平均根数为 7~10 根,但不足的是部分根从愈伤发出,不利于移栽成活(图 1B)。

2.5 暗培养和 6-BA 对槲樟生根的影响

接种 30 d 调查生根情况,得出短时间暗培养(7 d)对槲樟生根有利,暗培养时间越长叶焦边现象越严重甚至出现生根苗顶端枯死现象。6-BA 对诱导槲樟生根无

益且易出现畸形叶(表 5)。

表 4 不同生长素及浓度对槲樟生根培养的影响

处理	NAA 浓度	IBA 浓度	最早生根	生根率	平均根
	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	时间/d	/ %	数/根
1	0.6	-	9	40	2~3
2	0.8	-	8	41.7	2~4
3	1.0	-	8	50	7~10
4	1.2	-	10	46.78	4~6
5	-	1.0	10	6.7	1~2
6	-	1.2	-	-	-
7	-	1.4	22	13.3	1~2
8	-	1.6	23	6.7	1~2

注:基本培养基为 1/2MS(大量元素减半)。

表 5 暗培养和 6-BA 对槲樟生根的影响

IBA 浓度	6-BA 浓度	暗培养	生根率	长势
/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	天数/d	/ %	
1.0	-	0	6.7	良好
1.0	-	7	35	良好
1.0	-	14	-	轻度叶焦边
1.0	-	21	-	严重叶焦边
1.2	-	0	-	叶微黄
1.2	0.2	7	-	叶微卷,畸形
1.2	0.2	14	-	叶焦边,畸形
1.2	0.2	21	-	叶黄化,畸形
1.4	-	0	13.3	叶微卷
1.4	-	7	33	叶微黄
1.4	-	14	-	叶卷,黄化,焦边
1.4	-	21	-	叶焦边,枯尖
1.4	0.2	7	17	叶微黄,微卷
1.4	0.2	14	-	叶焦边,畸形
1.4	0.2	21	-	焦边严重,枯尖

注:基本培养基为 1/2MS(大量元素减半);暗培养为连续性黑暗培养。

3 小结与讨论

建立无菌外植体时采用 0.1%升汞溶液,灭菌 5min 效果最好,外植体利用率约达 90%。灭菌时茎段不宜剪得过短,以 1.5~2 cm 为宜,否则灭菌剂很容易渗透到腋芽处将其杀死,或接种时腋芽离培养基表面太近,因湿度过大而玻璃化。

初代培养基选用 MS+6-BA 0.6 mg/L 诱导,萌芽率和增殖率最高,存在轻度玻璃化现象,可能与培养室湿度及光照条件有关。组培苗在 B5 培养基上玻璃化现象比在 MS 培养基严重。可能由于其硝态氮、钙、锌、锰的含量较 MS 低的缘故。

继代培养基 MS+6-BA 0.6 mg/L+IBA 0.2 mg/L 和 MS+6-BA 0.6 mg/L+IBA 0.4 mg/L 两组配方交替使用有利于槲樟苗增殖和壮苗。曾云英^[9]在金花梨组织培养研究中得出随着 GA₃ 浓度的升高外植体的增殖系数和伸长长度增加,试验中也发现适当加入 GA₃ (0.2 mg/L)可提高增殖倍数和株高。

试验中发现在继代培养条件相同时(6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.4 mg/L),初代培养中由 6-BA 0.4 mg/L 诱导继代的苗长势明显好于由 6-BA 0.6 mg/L 诱导继代的苗(如图 1C、D)。可能是 6-BA 在植物体内存在积累效应,积累到一定程度后开始不利于植物的生长,出现苗

簇化、徒长、细弱、玻璃化等不良现象。

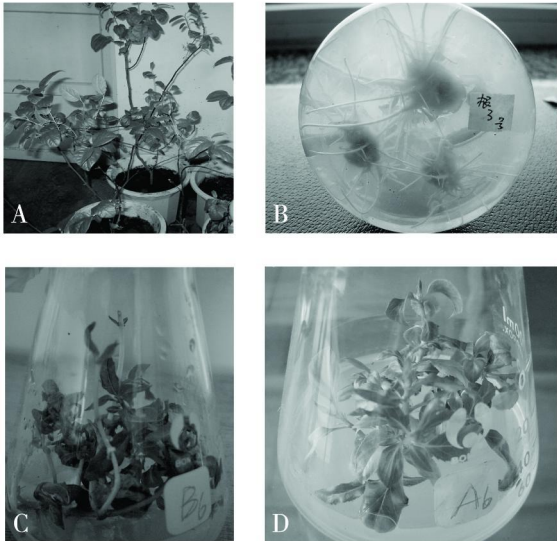


图 1 榲桲的组织培养图版

图版说明: 图 A: 温室 2 a 生榲桲苗; 图 B: 榲桲组培苗生根; 图 C: 榲桲组培继代苗 (初代: 6-BA 0.6 mg/L, 继代: 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.4 mg/L); 图 D: 榲桲组培继代苗 (初代: 6-BA 0.4 mg/L, 继代: 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.4 mg/L)。

榲桲生根培养基以 1/2 MS(I)+NAA 1.0 mg/L 最好, 生根率为 50%, 平均根数为 7~10 根, 但不足的是部分根从愈伤发出, 不利于移栽成活。很多报道称添加活性炭可以减少愈伤组织, 提高生根质量。榲桲是否也表

现这样, 还有待于进一步研究。试验中采用短期 (7 d) 连续暗培养进行生根诱导, 结果明显好于光照培养, 同报道^{[10][12]} 结论一致。但随暗培养时间的延长, 生根苗逐渐出现黄化、叶焦边及顶端枯死现象。

试验结果显示 6-BA 对榲桲生根培养无益且较多表现出叶畸形, 这与王振星等^[13] 所做的西洋梨茎段离体培养与快速繁殖的探讨文中得出的结论相一致。

参考文献

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴 [M]. 北京: 科学出版社 2002.

[2] 陆承志. 果树品种—榲桲 [J]. 新疆农垦科技, 2005 (5): 40-41.

[3] 陆承志. 新疆的榲桲 [J]. 林业实用技术, 2005 (8): 44-45.

[4] 王济宪. 新疆的稀有果类—榲桲 [J]. 特种经济动植物 2000 (5): 29.

[5] 陆承志. 新疆品种资源调查 [J]. 山西果树 2005 (5): 25-26.

[6] 马木提·库尔班. 长马力别克·吾买尔. 榲桲中总黄酮的测定 [J]. 新疆师范大学学报 2004 23 (4): 67-68.

[7] 马木提·库尔班. 新疆榲桲中总生物碱的测定 [J]. 食品科学 2005 26 (2): 186-188.

[8] 夏扎日·夏克尔, 买合布白. 新疆榲桲中鞣质类化合物及其生物活性 [J]. 生物技术通讯, 2006, 17 (5): 840-842.

[9] 曾云英. 金花梨组织培养研究 [J]. 北方园艺, 2007 (1): 145-146.

[10] 曾斌, 罗淑萍, 李 疆. 新疆野生巴旦杏的组织培养和植株再生 [J]. 新疆农业大学学报 2006 29 (4): 27-31.

[11] Barghdi M, Alderson P G. In vitro propagation of Pistacia vera species [J]. Acta Horti, 1983, 131: 49-60.

[12] Zimmerman R H, Fordham I. Simplified method for rooting apple cultivars in vitro [J]. J. Am. Soc. Hortic. Sc, 1985 110: 34-38.

[13] 王震星 张 磊, 刘贵仁. 西洋梨茎段离体培养与快速繁殖的探讨 [J]. 天津农业科学 1998 (4): 16-19.

Primary Study on Tissue Culture of *Cydonia oblonga* Mill

HAN Jing, QIN Wei, KARIM ° Ali

(Key Laboratory of Plant Tissue Culture, Horticultural College of Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052 China)

Abstract: Using the tender-stem of *Cydonia oblonga* Mill to have a study on the effect of different disinfectant, sterilization time, culture medium, hormone combinations, etc. The results showed that (1) Using HgCl₂ 0.1% for 5 min was the best for sterilization; (2) The better Primary medium was MS+6-BA 0.6 mg/L and its bud ratio and multiplication multiple were all higher, they were 93.3% and 4.7; (3) Using MS+6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.2 mg/L and MS+6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.4 mg/L by turns was better for multiplication and strong seedlings; (4) Rooting medium chose 1/2 MS (I)+NAA 1.0 mg/L can achieve the highest 50% rootage rate and 7~10 average root number; (5) Short dark treatment (7 d) was benefit for rooting but as the time longer the leaf-burnt became more serious and even lead to dead of stem tip; (6) 6-BA was not benefit for rooting and even lead to abnormal leaves.

Key word: *Cydonia. oblonga* Mill; Tissue culture