

‘霍巴’海棠组培快繁技术研究

裴轶琨¹, 李晓玲¹, 李克秀¹, 李毅丹²

(1. 长春工业大学 化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012; 2. 吉林省农业科学院, 吉林 长春 130033)

摘要:以‘霍巴’海棠(*Malus* ‘Hopa’)的茎尖和带腋芽的幼嫩茎段为外植体,建立了比较高效的‘霍巴’海棠组培快繁体系。结果表明:‘霍巴’海棠茎尖及茎段外植体在 MS+6-BA 0.1 mg/L+IAA 0.2 mg/L+3% 蔗糖+0.48% 琼脂(pH 5.8)培养基上生长状况较好;将其组培苗在 WPM+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+ZT 0.01 mg/L+3% 蔗糖+0.48% 琼脂(pH 5.8)培养基上继代培养 40 d 左右,继代增殖系数均可达到 3.0 左右;再经 1/2 WPM+NAA 0.8 mg/L+1.5% 蔗糖+0.48% 琼脂(pH 5.8)培养基生根壮苗后,移栽成活率可达 97.5%。

关键词:霍巴海棠;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S 661.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)10-0124-04

‘霍巴’海棠(*Malus* ‘Hopa’)是 Niels Hansen 于 1920 年用红肉苹果与山荆子杂交而来的品种,是第一个玫红杂种海棠。为蔷薇科苹果属大灌木或小乔木,幼叶紫红色,成叶深绿色。花蕾深红色,花粉红,但遇干旱或强光曝晒则变浅,有香味,花期 4 月下旬。株形紧凑向上,树势健壮,花果繁多而色艳。对土壤适应性极强,耐低温,为华北至华东各地均可栽培的园艺品种。

海棠是我国传统的园林观赏植物,可观花、观叶、观果,素有“国艳”之称,与牡丹、梅花、兰花被称为“春花四绝”^[1]。观赏海棠以其独有的观赏价值和文化内涵,正在园林绿化中发挥着越来越重要的作用,应用前景十分广阔^[2]。目前海棠通常多用嫁接或分株繁殖,亦可用播种和扦插等方法繁殖^[1,3-4],但这些方法均受到良种基数的限制,繁殖速度较慢,难于批量化和工厂化生产,在一定程度上限制了海棠资源的进一步开发利用。因此,建立成熟稳定的‘霍巴’海棠组培快繁体系,对该品系的保存、扩增、品种选育和开发应用均具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 取材及材料灭菌

于 4~6 月间选取‘霍巴’海棠(*Malus* ‘Hopa’)(东

北师范大学林木生物工程技术有限公司由国外引进)幼嫩枝条作为试验材料。将材料用浓洗洁精溶液振荡洗涤 20 min,流水冲洗 2~3 h。切取茎尖及带腋芽的茎段,用 70% 酒精表面灭菌 60 s,0.1% HgCl₂ 溶液振荡浸泡 7~10 min,最后用无菌水冲洗 6~10 次备用。

1.2 接种与初代培养

将经灭菌处理后的外植体分别接种于待筛选的初代培养基上(表 1),并置于(25±1)℃、80 μmol·m⁻²·s⁻¹ 光照强度、14 h/d 光照时间条件下培养。随时观察、记录其萌动时间,并于培养 25 d 左右观察其生长状态,据此选择初代培养基的组成和继代培养基的筛选范围。

1.3 继代培养

依据尽量均匀一致作为对照试验的取材原则,剪取在初代培养基上长至约 3 cm 高的无菌苗,分别将其转接于待筛选的继代培养基上(表 1),培养条件同初代培养。于培养 25 d 左右开始观察、记录组培苗的生长状态,据此选择合适的继代培养基并确定继代周期。

1.4 生根壮苗

选取在继代培养基上高约 4 cm 的无菌苗,分别将其转接至待筛选的生根培养基中培养(表 1),在同样条件下培养 20 d 左右统计生根结果。

1.5 移栽驯化

将已生根组培苗在温室中练苗 5 d(最后 1~2 d 开瓶练苗)后,移栽入珍珠岩:草炭土为 1:1 的混合基质中,置于室温 20~26℃、湿度 50%~70% 条件下培养,于 30 d 后统计其成活率。

第一作者简介:裴轶琨(1972-),女,吉林长春人,讲师,现主要从事植物生物技术及生物化学与分子生物学研究工作。E-mail: peiyi-kun@mail.ccit.edu.cn.

收稿日期:2011-03-10

表 1 各培养阶段待筛选培养基组分设计 mg/L

培养阶段	培养基编号	基本培养基	6-BA	KT	IAA	NAA	IBA	ZT	蔗糖
初代培养	A1	MS							3%
	A2	MS	0.1		0.1				3%
	A3	MS	0.1		0.2				3%
	A4	MS	0.2		0.2				3%
	A5	MS	0.5		0.2				3%
	A6	MS	1.0		0.4				3%
	A7	MS	0.5			0.1			3%
	A8	MS	0.75	0.75		0.1			3%
	A9	MS	0.5	1.0		0.1			3%
继代培养	A3	MS	0.1		0.2				3%
	B1	MS	0.5		0.2				3%
	B2	MS	0.5		0.2			0.01	3%
	B3	MS	1.0		0.2				
	C1	WPM	1.0			0.025			3%
	C2	WPM	1.0			0.1			3%
	C3	WPM	1.0			0.2			3%
	C4	WPM	0.5			0.1			3%
	C5	WPM	0.5			0.05		0.01	3%
生根壮苗	C6	WPM	0.5			0.1		0.01	3%
	D1	1/2WPM					1.0		
	D2	1/2WPM					2.0		
	D3	1/2WPM					3.0		
	D4	1/2WPM					4.0		
	E1						1.0		2%
	E2						2.0		2%
	E3						3.0		2%
	E4						4.0		2%
	F1	1/2 WPM			0.1	0.4			1.5%
	F2	1/2 WPM				0.4			1.5%
	F3	1/2 WPM				0.8			1.5%

2 结果与分析

2.1 初代培养基的筛选

抽样观察统计结果表明,‘霍巴’海棠茎段外植体在各种初代培养基上的生长明显与枝条的幼嫩程度有关。最理想的外植体采集部位为从顶芽至顶芽下 5~10 cm 处的嫩枝,该处芽萌发率最高,一般在接种 13~20 d 后萌动,且污染率相对较低。‘霍巴’海棠茎尖和茎段腋芽在各种待筛选的初代培养基上均有萌发和生长,但萌发率和生长状况差异比较明显(表 2)。在不含任何植物激素的 A1 培养基上,芽萌动的时间最迟,萌发率最低,仅达 49.2%。且芽萌发后,生长相对比较缓慢,很少产生不定芽。在培养基中适量添加细胞分裂素和生长素后,芽萌发率和生长状况均有所改善。其中,以含 6-BA 0.1 mg/L 和 IAA 0.2 mg/L 的 A3 培养基培养效果最理想,小芽在接种 13 d 左右开始萌发(图 1-A),萌发率提高至 86.0%。萌动后的小芽在生长 15~20 d 后,高达 3~4 cm,淡绿色叶片较舒展,适合继代培养。进一步提高

培养基中激素含量,芽萌发率略有下降,长势差别不明显。但当 6-BA 增至 1.0 mg/L 时,在 A6 培养基上芽萌发率明显下降,仅为 54.7%。而在含 6-BA 和 NAA 或 KT 的 A7、A8 和 A9 培养基上,芽的萌发和长势均不如含 6-BA 和 IAA 组合的几种培养基,表明 IAA 对霍巴海棠茎尖和茎段外植体生长的启动效果明显。因此,综合生产成本和培养效果,建议选择 A3 培养基作为霍巴海棠茎尖及茎段外植体的初代培养基,培养时间为 40 d。

表 2 霍巴海棠外植体在各种初代培养基上的生长状况

培养基编号	接种芽数/个	萌发芽数/个	萌发率/%
A1	254	125	49.2
A2	281	213	75.8
A3	292	251	86.0
A4	282	220	78.0
A5	279	188	67.4
A6	274	150	54.7
A7	296	146	49.3
A8	281	148	52.7
A9	295	156	52.9

2.2 继代培养基的筛选及继代过程优化

根据初代培养结果,首先选用 A3 培养基作为基础继代培养基,在此基础上逐步增加培养基中 6-BA 含量(表 1),以促进霍巴海棠不定芽在短期内的增殖。从表 3 可看出,霍巴海棠无菌苗在 A3 培养基上继代生长很缓慢,继代 20 d 后小苗平均仅高约 2.5 cm 左右,几乎不出现丛生侧芽,还有部分小苗出现了落叶和干枯现象。随着培养基中 6-BA 含量的提高,在 B1、B2 和 B3 培养基上,小苗增殖状况略有改善,但主茎伸长仍比较缓慢,仍有部分小苗相继落叶、干枯。而在 B3 培养基上,有 20 株小苗新生叶片开始卷曲,含水量增高,呈现玻璃化现象。

根据以上结果及组培苗生长现状,进一步尝试用 WPM 作为基本培养基,以期改善霍巴海棠组培苗继代培养效果。结果表明,更换基本培养基组分后,小苗的长势和增殖率都有很大的改观(表 3)。在 C5 和 C6 培养

基上,增值率分别达到了 214.0% 和 281.0%。培养 40 d 后,其中高达 5 cm 左右、可用于生根的小苗比例均在 80% 以上,且无玻璃化现象出现,因而可满足规模化生产的要求。

表 3 霍巴海棠组培苗继代培养结果

培养基编号	接种芽数/个	增殖芽数/个	增殖率/%	成苗率/%	玻璃苗率/%
A3	200	4	2	6.5	0
B1	200	45	22.5	11.0	0
B2	200	48	24	13.5	0
B3	200	65	32.5	9.5	10
C1	200	343	171.5	53.0	3.5
C2	200	386	193.0	68.0	4.0
C3	200	405	202.5	69.5	7.5
C4	200	393	196.5	64.0	0
C5	200	428	214.0	92.5	0
C6	200	562	281.0	84.5	0

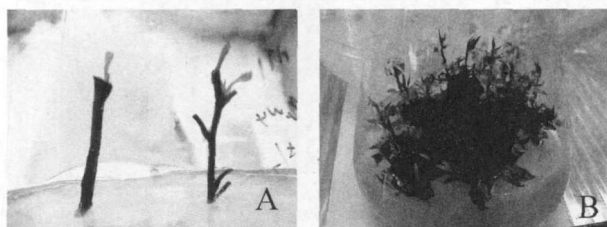


图 1 霍巴海棠茎段外植体的初代培养和无菌苗的继代培养
注: A:开始生长的霍巴海棠腋芽; B:继代生长的霍巴海棠丛生芽。

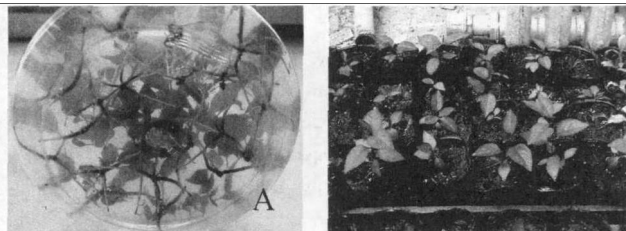


图 2 霍巴海棠组培苗的生根和移栽

注: A: 霍巴海棠组培苗生根状况; B: 霍巴海棠组培苗移栽成活。

2.3 生根培养基的筛选

由表 4 可看出,随着培养基中 IBA 含量的升高,‘霍巴’海棠组培苗生根比例逐渐下降,表明高浓度的 IBA 并不利于该组培苗的生根。进一步观察分析,发现当 IBA 浓度高于 1 mg/L 时,组培苗基部往往膨大并出现愈伤组织,有时在愈伤组织上也会分化出不定根,但这种不定根对组培苗的移栽和成活无实际意义。相比之下,‘霍巴’海棠组培苗在无糖培养基上较无母液培养基更易诱导生根,可能是由于无糖时植物产生的应激性较强,以充分吸收营养元素进行光合作用。相反,较高浓度的 NAA 可促进‘霍巴’海棠组培苗的生根。当培养基中 NAA 含量为 0.8 mg/L 时,‘霍巴’海棠组培苗在 F3 培养基上,生根率可达到 90%,平均每株组培苗长出 3~4 根不定根,且根系较健壮、适合移栽(图 2-A)。

表 4 霍巴海棠组培苗生根情况

培养基编号	接种苗数/株	生根株数/株	生根率/%
D1	150	132	88.0
D2	150	113	75.3
D3	150	103	68.7
D4	150	47	31.3
E1	150	86	57.3
E2	150	66	44.0
E3	150	57	38.0
E4	150	28	18.7
F1	150	43	28.7
F2	150	118	78.7
F3	200	180	90

2.4 移栽驯化

选取 400 株已生根的较健壮的‘霍巴’海棠组培苗,在温室中进行练苗后,将其移栽入珍珠岩:草炭土(1:1)混合基质中培养(图 2-B)。移栽 30 d 后观察并统计结果,发现其中 390 株长势良好(图 2-B),计算成活率为 97.5%,表明‘霍巴’海棠组培苗在该混合基质中移栽效果比较好。该组培苗在温室中过渡培养 2 个月后即可移入大地。

3 讨论

‘霍巴’海棠组培苗喜光照,因此要尽量选用透光好的培养瓶。在培养基中,‘霍巴’海棠组培苗叶片颜色不一,呈现绿、红、棕和棕绿色等几种颜色。移栽后新叶为红色,老叶逐渐变为绿色,这种叶色变化可能与光照条件和叶片幼嫩程度有关;在 2 种添加微量 ZT 的 C5 和 C6 培养基上,‘霍巴’海棠组培苗增殖率明显提高,因此微量 ZT 可促进其丛生芽的增殖。进一步比较分析发现,该组培苗在 C6 培养基上的丛生增殖效果要比在 C5 培养基上更为明显,而这 2 种培养基组成仅在 NAA 含量上有差别,据此推测培养基中 NAA 含量对‘霍巴’海棠丛生芽的增殖也具有重要的影响。另外,为保证继代培养效果,继代接种时尽量不要分成单株,可能是因为 2 株或小簇时含有一定量的愈伤,更有利于丛生芽增殖;高浓度的 IBA 不利于‘霍巴’海棠的生根,这一结果与金

芳对丽珠海棠的研究结果相近^[5]。

参考文献

- [1] 王丽斯. 观赏海棠的选择与繁殖[J]. 河北林业科技, 2010(5):84-86.
[2] 邢美丽, 姜永峰, 唐世勇, 等. 北方城市观赏海棠品种及在园林绿化中的应用[J]. 农业科技通讯, 2010(2):161-163.
[3] 陈新林, 张守琪, 王吉, 等. 14 个北美海棠观赏品种在兰州地区引繁

及栽培试验初报[J]. 林业实用技术, 2010(7):51-52

[4] 付红祥. 海棠的繁殖技术研究[J]. 南京林业大学学报, 2004(4): 168-173.

[5] 金芳. 珠美海棠适宜培养基的选择研究[J]. 甘肃农业科技, 1996(4): 23-24.

Study on Rapid Propagation of *Malus* 'Hopa' by Tissue Culture

PEI Yi-kun¹, LI Xiao-ling¹, LI Ke-xiu¹, LI Yi-dan²

(1. College of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun, Jilin 130012; 2. Biotechnology Research Centre, Jinlin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033)

Abstract: An efficient protocol for the rapid propagation of *Malus* 'Hopa' by tissue culture was developed, with the stem apex or sections as the explants. The results showed that the above explants could grow on the primary medium contained MS basal salts and vitamins, 6-BA 0.1 mg/L, IAA 0.2 mg/L and 3% sucrose and solidified with 0.48% agar (pH 5.8). After the shoots *in vitro* were subcultured for about 40 days on the subculture medium contained WPM basal salts and vitamins, 6-BA 0.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L, ZT 0.01 and 3% sucrose and solidified with 0.48% agar (pH 5.8), the propagation coefficient by subculture could be up to 3.0 or so. Whereafter, the shoots *in vitro* were rooted and grew stronger on the rooting medium contained 1/2 WPM basal salts, all the vitamins of WPM, NAA 0.8 mg/L and 1.5% sucrose and solidified with 0.48% agar (pH 5.8). The survival rate of the shoots *in vitro* with strong roots reached up to 97.5% after they were transplanted to soil.

Key words: *Malus* 'Hopa'; tissue culture; rapid propagation

空腹时不能吃的蔬果

人们都知道吃水果有益于健康,很多追求苗条的女孩还把它作为一种正餐的食品,但是有些水果是不宜在空腹的状态下食用的。

西红柿含有大量的果胶、柿胶酚、可溶性收敛剂等成分,容易与胃酸发生反应,凝结成不易溶解的块状物。这些硬块可将胃的出口幽门堵塞,使胃里的压力升高,造成急性胃扩张而使人感到胃胀痛。

橘子含有大量糖分和有机酸,空腹时吃橘子,会刺激胃黏膜,导致胃酸增加,使脾胃满闷、泛酸。

菠萝内含的蛋白分解酵素相当强,如果餐前吃,很容易造成胃壁受伤。

山楂味酸,具有行气消食作用,但若在空腹时食用,不仅耗气,而且会增强饥饿感并加重胃病。

黑枣含有大量果胶和鞣酸,易和人体内胃酸结合,出现胃内硬块。特别不能在睡前过多食用,患有慢性胃肠疾病的人最好不要食用。