

垂丝海棠无菌体系建立研究

张 玲 玲, 郭 军 站, 张 敏, 杨 梅, 姜 晓 丹

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以垂丝海棠为试材,研究了外植体消毒的影响因素、芽诱导启动最适的培养基和植物生长激素浓度组合。结果表明:每年4~8月取材的幼嫩外植体灭菌效果最好,单芽茎段用75%酒精30 s+0.1% HgCl₂消毒6 min、叶片采用75%酒精30 s+0.1% HgCl₂消毒8 min效果最佳,花瓣作为外植体,染菌率高,不利于无菌体系的建立;正交实验表明,芽诱导启动的最适培养基及激素浓度组合为:WPM+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,启动率为87%。

关键词:垂丝海棠;外植体消毒;芽诱导启动

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)10-0126-04

垂丝海棠(*Malus halliana*)为蔷薇科苹果属落叶小乔木,又称海棠、海棠花、垂枝海棠,原产我国西南、中南、华东等地,花期3~4月,开花时节花蕾绽放、花色艳丽,花梗柔软下垂,其干在老化和风蚀后,苍虬蜿蜒,曲如龙游,相对于花的美艳又别有一番趣味^[1]。其生性强健,喜阳光,爱温暖湿润环境,不耐阴寒,对土壤酸碱性要求不严,栽培容易,在园林绿化中应用广泛,还可作盆花栽培。除具有园林观赏价值外,垂丝海棠还具有一定的食用和药用功能,它的果实酸甜可食,可制蜜饯,花气味微苦,可作为中药材起到调经和血的作用,因而引起相关行业的极大重视,其苗木需求量逐年增加,如何快速繁殖大量垂丝海棠优质苗木成为关键^[2]。

目前,国内对垂丝海棠的研究多集中在栽培方面^[3-4],其繁殖多采用嫁接方式^[5],成活率低,繁殖系数小,采用组织培养,可以加快其生长和繁殖速度。垂丝海棠属于木本花卉,对其进行组织培养难度较大,目前对垂丝海棠组织培养的研究较少^[6],该试验研究垂丝海棠外植体消毒影响因素和最佳的芽诱导启动培养基和激素浓度组合,旨在为垂丝海棠组织培养快速建立无菌体系提供系统依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料取自西北农林科技大学海棠园内,分别于4、6、8、9、10月连续晴天后的某天中午12:00~14:00,取生长健壮、无病虫害、经太阳照射后干燥的垂丝海棠植株的幼嫩枝条和生长成熟的枝条。

第一作者简介:张玲玲(1988-),女,硕士,研究方向为园林植物遗传育种。E-mail:zhang.5527@163.com。

责任作者:郭军站(1963-),男,硕士,副教授,硕士生导师,研究方向为林木遗传育种。E-mail:guojunzhan@163.com。

收稿日期:2012-03-05

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 晴天中午采集外植体后→放入清水中用细软毛刷轻刷表面→去污水浸泡5~10 min→流水下冲洗2~3 h→转入超净工作台上,用75%酒精溶液消毒处理30 s,期间轻微摇动→倒掉酒精→无菌水摇洗1~2次→不同消毒处理(表1),期间轻微摇动→弃去消毒液→无菌水摇洗4~5次,每次摇洗时间不少于1 min→倒去无菌水→将消毒后的外植体置于灭菌培养皿中用无菌滤纸吸干→叶片切成0.5 cm×0.5 cm左右的整齐方块,茎段切成0.5~1.0 cm长的单芽小段,花瓣剪去边缘褐化部分→接种在已灭菌的培养基上。

表 1 不同消毒剂 and 不同消毒时间组合

Table 1 Combination of different disinfectants and disinfection time

消毒处理 Disinfect treatment	1	2	3	4	5	6
A 30% H ₂ O ₂ /min	2	4	5	6	8	10
B 2% NaClO/min	2	4	5	6	8	10
C 0.1% HgCl ₂ /min	2	4	5	6	8	10

1.2.2 不定芽诱导 采用三因素三水平正交实验设计(表2)筛选垂丝海棠单芽茎段不定芽诱导启动的最佳培养基和激素浓度配比,每个处理15瓶,每瓶2个外植体,3次重复,培养条件:光照时间为12~16 h/d,光照强度为1 500 lx,温度为(25±2)℃,培养20 d后,记录试验结果,统计不定芽启动率。

表 2 正交实验设计方案 L₉(3⁴)

Table 2 Plan of orthogonal experiment design L₉(3⁴)

水平 Level	因素 Factor			误差空列 Null columns of error
	(A)培养基 Medium	(B)6-BA /mg·L ⁻¹	(C)NAA /mg·L ⁻¹	
1	MS	2.0	0.5	
2	1/2MS	1.0	0.2	
3	WPM	0.5	0.1	

1.3 数据分析

染菌率(%)=(接种染菌数/接种总数)×100%;褐化率(%)=(接种褐化数/接种总数)×100%;无菌存活率

(%)=(接种存活数/接种总数)×100%;启动率(%)=(芽萌发的外植体数/无菌外植体总数)×100%。用 Microsoft Excel 进行简单数据处理作图,用 SPSS 软件对正交实验结果进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒影响因素

一般菌类污染在接种后 3~10 d 即可出现,试验设计以接种后 30 d 统计外植体的染菌率、褐化率和无菌成活率。

2.1.1 外植体的幼嫩程度对消毒的影响 试验以垂丝海棠茎段为外植体,分别选取幼嫩的茎段和生长成熟的茎段进行试验,每个处理 15 瓶,每瓶 2 个外植体,3 次重复,接种 30 d 后统计外植体的染菌率、褐化率和无菌成活率,比较外植体的幼嫩程度对消毒的影响。图 1 显示幼嫩程度不同的外植体在消毒灭菌方面表现出较大的差异,同样的消毒处理,成熟外植体污染率、褐化率较高,无菌存活率仅有 37%,若延长成熟外植体的消毒时间,又容易引起植物褐化死亡,成活率仍然较低;相比之下,幼嫩外植体污染率和褐化率总体控制在 30%左右,无菌存活率明显较高,在外植体消毒获得无菌苗方面幼嫩外植体明显优于生长成熟的外植体,原因可能是幼嫩的植物材料由于受周围环境的污染程度小,带菌少,更加易于清洗和消毒,所以组织培养宜选取幼嫩外植体作为材料,以降低试验污染率,减少不必要的损耗。

■污染率 Pollution rate ▨褐化率 Browning rate □无菌存活率 Survival rate

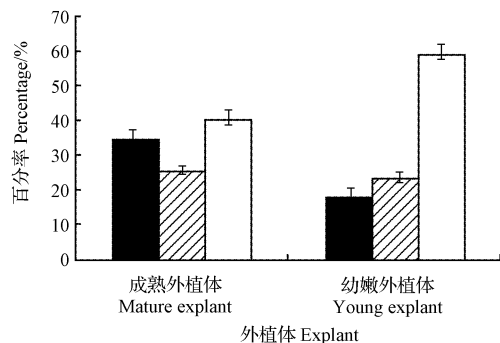


图 1 外植体的幼嫩程度对消毒的影响

Fig. 1 Sterilization effect of different age explants

2.1.2 取材时期对外植体消毒的影响 试验在 5 个取材时期内均以垂丝海棠茎段为外植体材料,每个处理 15 瓶,每瓶 2 个外植体,3 次重复,分别统计各个取材时期内接种 30 d 后外植体的染菌率、褐化率和无菌成活率,比较取材时期对外植体消毒的影响。由图 2 可知,取材时期对垂丝海棠消毒效果有很大影响,取材于 4、6、8 月的外植体无菌存活率明显高于 9、10 月的外植体,原因是 4~8 月是垂丝海棠生长的旺盛季节,植物抗性强,且这段时期阳光较多,杀菌效果好,垂丝海棠外植体染菌率、褐化率较低,无菌存活率较高;9、10 月是陕西杨凌的雨

季,连日多雨的天气造成细菌、真菌、大量滋生,消毒较困难,染菌率高,且这段时期垂丝海棠生长滞后,植物抗性下降,导致褐化率高,无菌存活率下降。

■污染率 Pollution rate ▨褐化率 Browning rate □无菌存活率 Survival rate

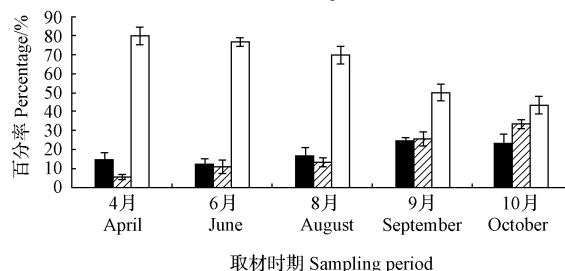


图 2 取材时期对外植体消毒的影响

Fig. 2 Explant sterilization effect of sampling period

2.1.3 消毒剂种类和消毒时间对不同外植体消毒的影响 不同的外植体在自然条件下所带的菌不一样,因此适合的消毒方式也有所不同,试验分别以垂丝海棠茎段、叶片、花瓣为外植体材料,设计不同消毒处理(表 1),30 d 后统计染菌率、褐化率和无菌存活率(表 3)。表 3 显示同样的消毒处理总体染菌率:花瓣≈叶片>茎段,总体褐化率:花瓣>叶片≈茎段,总体无菌存活率:茎段≈叶片>花瓣,可见茎段和叶片是垂丝海棠组织培养建立无菌体系相对较好的外植体材料,无菌成活率较高;花瓣较薄,消毒处理时组织容易遭破坏,褐化死亡较多,成活率低,很难建立无菌体系。茎段作为外植体,0.1% HgCl_2 作为消毒剂,随着消毒时间的延长,无菌存活率先呈上升然后逐渐下降趋势,消毒 6 min 时无菌存活率最高,为 86%;2% NaClO 作为消毒剂,无菌存活率

表 3 不同消毒组合的染菌率、褐化率和无菌存活率

Table 3 Pollution rate, browning rate and survival rate of different disinfection combination %

处理 Treatment	染菌率 Pollution rate			褐化率 Browning rate			无菌存活率 Survival rate		
	茎段 Stem segments	叶片 Leaf	花瓣 Petal	茎段 Stem segments	叶片 Leaf	花瓣 Petal	茎段 Stem segments	叶片 Leaf	花瓣 Petal
A1	100	100	100	0	0	0	0	0	0
A2	83	93	93	0	3	3	17	4	4
A3	80	77	80	0	10	10	20	13	10
A4	73	70	73	3	7	17	24	23	10
A5	70	70	60	17	10	23	13	20	17
A6	57	67	47	30	17	43	13	16	10
B1	100	100	100	0	0	0	0	0	0
B2	87	70	63	3	10	17	10	20	20
B3	73	67	67	7	13	20	20	20	13
B4	63	60	50	3	10	30	34	30	20
B5	33	57	23	17	17	50	50	26	27
B6	7	53	30	13	23	67	80	24	3
C1	93	100	100	3	0	0	4	0	0
C2	67	73	57	7	10	27	26	17	16
C3	23	50	47	10	13	20	67	37	33
C4	7	23	23	7	17	27	86	60	50
C5	7	3	10	43	20	53	50	77	37
C6	3	3	3	67	27	83	30	70	14

随着消毒时间的延长呈上升趋势,在 10 min 处达到最高,为 80%;30% H_2O_2 消毒整体效果差,无菌存活率在 24%(图 3-A)以下。因此茎端消毒建议用 0.1% $HgCl_2$ 消毒处理 6 min。叶片作为外植体,0.1% $HgCl_2$ 作为消毒剂,随着消毒时间的延长,无菌存活率先呈上升然后逐渐下降趋势,消毒 8 min 时无菌存活率最高,为 77%;垂丝海棠叶片消毒用 2% $NaClO$ 、30% H_2O_2 效果均明显低于 0.1% $HgCl_2$,而且用 0.1% $HgCl_2$ 消毒,时间也较茎段长(图 3-B)。这和垂丝海棠的叶片背布柔毛有很大关系,柔毛不易彻底杀菌,需要长时间消毒。花瓣作为外植体,消毒处理无菌存活率整体在 50%以下,效果相对较好的是 0.1% $HgCl_2$ 消毒 6 min,无菌存活率 50%(图 3-C)。结合表 3 可见,花瓣作为外植体建立垂丝海棠组织培养无菌体系较难,适合花瓣的更好的消毒灭菌方法还需要进一步研究确定。

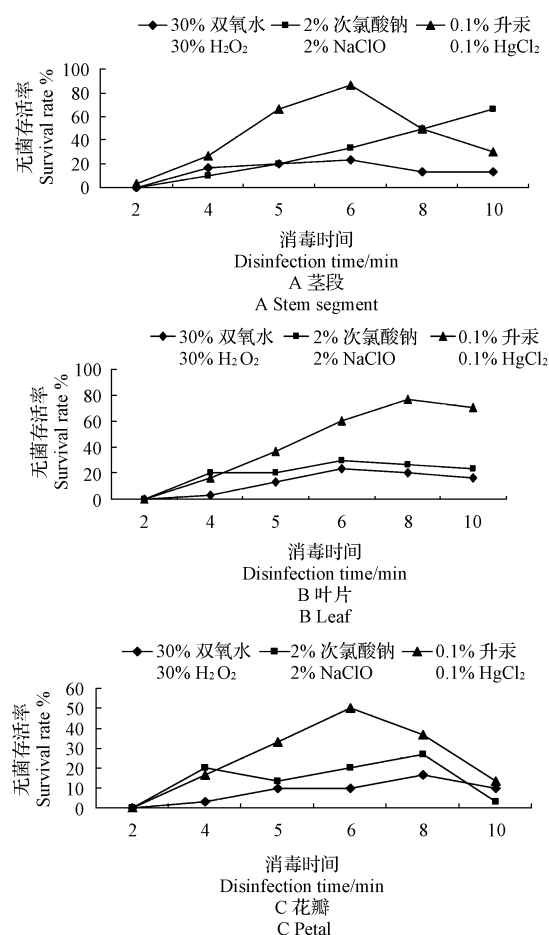


图 3 消毒剂和消毒时间对不同外植体消毒的影响

Fig. 3 Influence of disinfectants and disinfection time on different explants sterilization

2.2 不同培养基及激素浓度对比对不定芽诱导启动的影响

以垂丝海棠经消毒获得的无菌单芽茎段(图 4)为材料,采用正交实验设计,试验因素为培养基(A)、6-BA

(B)、NAA(C),每个因素取 3 个水平,接种 20 d 后统计试验结果(图 5),进行数据分析,极差分析见表 4,方差分析见表 5。



图 4 存活外植体

Fig. 4 The live explants

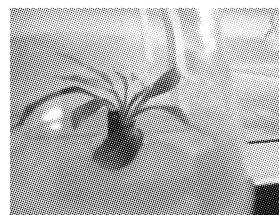


图 5 萌芽外植体

Fig. 5 The budding explants

由表 4 极差分析可知,根据 r 值确定培养基(A)、6-BA(B)、NAA(C)对垂丝海棠不定芽诱导的影响大小为:培养基>NAA>6-BA,根据各因素水平均值(k)的大小,确定最优水平组合为: $A_3B_2C_1$;由表 5 方差分析可知,培养基(A)和 NAA(C)对试验结果的影响达显著水平($0.01 < P < 0.05$),6-BA(B)对试验结果没有显著差异($P > 0.05$),根据 F 值可以看出,3 个因素对试验结果的影响大小为 $A > C > B$,这与极差分析结果一致。

表 4 试验结果直观分析

Table 4 Test result visual analysis

编号 Number	(A)培养基 Medium	(B)6-BA /mg · L ⁻¹	(C)NAA /mg · L ⁻¹	启动率 Starting rate/%
1	1(MS)	1(2.0)	1(0.5)	57.77
2	1	2(1.0)	2(0.2)	50.00
3	1	3(0.5)	3(0.1)	51.11
4	2(1/2MS)	1	2	53.33
5	2	2	3	54.43
6	2	3	1	63.33
7	3(WPM)	1	3	70.00
8	3	2	1	86.67
9	3	3	2	73.33
K_1	158.88	181.10	207.77	
K_2	171.09	191.10	176.66	
K_3	230.00	187.77	175.54	
k_1	52.96	60.37	69.26	
k_2	57.03	63.70	58.89	
k_3	76.67	62.59	58.51	
r	23.71	3.33	10.75	

注: K_1 、 K_2 、 K_3 分别代表不同水平 3 次启动率之和; k_1 、 k_2 、 k_3 分别代表不同水平均值启动率; r 代表平均极差(r =最大均值-最小均值)。

Notes: K_1 、 K_2 、 K_3 denote the sum of starting for different levels respectively; k_1 、 k_2 、 k_3 denote the average of starting for different levels respectively; r denotes the average difference between maximum and minimum.

表 5 方差分析结果

Table 5 Test result variance analysis

差异源 Difference source	SS	df	MS	F	P-value	F crit
A	964.170	2	482.085	89.918 *	0.011	$F_{0.01}(2,2)=99$
B	17.286	2	8.643	1.612	0.383	$F_{0.05}(2,2)=19$
C	223.095	2	111.548	20.806 *	0.046	
误差 Error	10.723	2	5.361			
总计 Total	1 215.274	8				

注: * 表示 0.05 显著水平。

Note: The mark * * denotes significantly different at $P=0.05$.

综合极差直观分析与方差分析结果,得出垂丝海棠芽诱导启动的最优水平组合为 $A_3B_2C_1$,即:WPM+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

3 结论与讨论

垂丝海棠属于木本花卉,对其进行组织培养的难度大于草本植物,尤其在外植体灭菌方面,该试验从多方面研究垂丝海棠外植体灭菌的影响因素,研究表明,外植体幼嫩程度、取材时期,消毒剂种类、消毒时间都会影响消毒效果。试验中取材于4~8月间的垂丝海棠的幼嫩外植体消毒效果较好;在选择消毒剂和消毒时间时,由于75%酒精对植物细胞和组织具有很大的损伤性,消毒时间不宜过长,常与其它消毒剂配合使用^[7],试验设计75%酒精分别配合30% H_2O_2 、2% NaClO、0.1% $HgCl_2$,设置不同消毒时间对3种外植体消毒,结果表明,在供试的3种垂丝海棠外植体中,消毒效果由好到劣依次为幼嫩单芽茎段>幼嫩叶片>花瓣;其中单芽茎段用75%酒精30 s+0.1% $HgCl_2$ 消毒6 min、叶片采用75%酒精30 s+0.1% $HgCl_2$ 消毒8 min效果最佳,花瓣用75%酒精30 s+0.1% $HgCl_2$ 消毒6 min相对较好,无菌存活率为50%,但是花瓣整体消毒效果较叶片和茎段差,不利于无菌体系的建立。

植物激素是影响组织培养快速繁殖的重要因素^[8],其成分、配比和浓度会对试验结果产生较大的影响^[9-13],通过正交实验设计,确定6-BA和NAA在垂丝海棠芽诱导启动中的作用大小为NAA>6-BA,芽诱导启动以6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L效果最好,其萌芽较快且出芽率最高,可达87%;此外,基本培养基也会对试验结果产生影响,不同植物组织培养所需最佳培养基不同^[14],试验采用MS、1/2MS、WPM 3种基本培养基,结果发现芽诱导启动效果由好到劣依次为WPM>1/2MS>MS,这说明垂丝海棠芽诱导启动萌发更适宜低盐浓度培养基。

垂丝海棠的组培机制还不够成熟,还需更多相关方面的研究,该试验探索出垂丝海棠外植体消毒的影响因素、提高芽启动效率的培养基和激素浓度配比,为快速建立无菌体系提供了系统依据,可大大缩短垂丝海棠组织培养试验时间,减少试验成本,节省优良垂丝海棠种质资源,为组培相关方面进行深入研究奠定了扎实的基础。由于条件限制,所研究的外植体还有局限,对于是否可以发展更多的垂丝海棠外植体类型,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 刘志强,汤庚国.海棠在园林中的应用研究[J].苏州科技学院学报(工程技术版),2004,17(3):75-80.
- [2] 许晓岗,童丽丽,赵九洲.垂丝海棠插穗的内源激素水平及其与扦插生根的关系[J].江西林业科技,2007(1):20-24.
- [3] 李晓东,许元峰,李文娟,等.垂丝海棠快速繁育[J].林业实用技术,2002(11):23-24.
- [4] 王嘉祥.垂丝海棠的栽培[J].特种经济动植物,2005(4):34.
- [5] 陈相国,李晓东,许元峰,等.垂丝海棠嫁接繁育技术[J].山东林业科技,2003(2):29-30.
- [6] 张庆田,夏阳,孙仲序,等.垂丝海棠组培再生体系建立的研究[J].生物技术,2007,17(3):73-75.
- [7] 马兰珍,韦力秀,薛鹰,等.杂交松组织培养中外植体的灭菌方法[J].广西科学院报,2005,21(1):37-39.
- [8] 徐振彪,傅作中.植物组织培养中的褐变现象[J].植物生理学通讯,1997,5(1):55-56.
- [9] 李俊明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,1998:215-312.
- [10] 袁红霞,王金虎,陈德燕.何首乌块根愈伤组织培养[J].苏州大学学报,2005,21(3):85-88.
- [11] 包振华,郭军战,周玮,等.枸杞组织培养再生体系优化[J].西北林学院学报,2010,25(5):73-76.
- [12] 马冬青,叶景峰,陈昱,等.贴梗海棠组织培养技术研究初报[J].辽宁林业科技,2007(4):51-52.
- [13] 戴全胜,王雅群,车晓航,等.颐和园古西府海棠的组织培养与快速繁殖[J].林业科技开发,2010,24(2):73-76.
- [14] 梁美霞,戴洪义.苹果组织培养苗离体叶片诱导不定芽分化[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2009,35(5):470-473.

Study on Establishment of Aseptic System of *Malus halliana*

ZHANG Ling-ling, GUO Jun-zhan, ZHANG Min, YANG Mei, JIANG Xiao-dan
(College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking *Malus halliana* as test material, explant disinfection factors of *Malus halliana* and the best combination of culture medium and plant growth hormones concentration for bud germination were studied. The results indicated that the explants of best disinfectant effect were those which were young and sampled in April to August every year; the best disinfection method of stem segment with single bud was 75% alcohol 30 s with 0.1% $HgCl_2$ 6 min, the best disinfection method of leaf was 75% alcohol 30 s with 0.1% $HgCl_2$ 8 min. Because of high infection rate, it was too hard for Petal to establish aseptic system; Orthogonal experimental design showed that the best combination of culture medium and plant growth hormones concentration for bud germination was WPM+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, and germination rate was 87%.

Key words: *Malus halliana*; explant disinfection; bud germination