

# 鲜食山楂新品种蒙山红组织培养初探

孔维龙,王光全,孟庆杰,荣秀珍

(聊城大学 生命科学学院,山东 聊城 252059)

**摘要:**为获得适宜山楂蒙山红快速繁殖的最佳培养基组合,以山楂新品种蒙山红和大金星의当年生带芽茎段为外植体,设置8种培养基组合进行愈伤组织诱导和芽增殖培养,分析两个山楂品种的组织培养的最适培养条件。结果表明:蒙山红诱导愈伤组织的最适培养基是MS+KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,最适宜的芽诱导培养基是MS+KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>。大金星诱导愈伤组织的最适培养基是MS+KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>,最适宜的芽诱导培养基是MS+KT 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>。全部培养基均附加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂7 g·L<sup>-1</sup>,pH5.8。

**关键词:**山楂;蒙山红;大金星;组织培养

**中图分类号:**S661.5

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)08-0028-04

鲜食山楂蒙山红是从山东平邑山区实生山楂树中选出的品质极佳的优良鲜食品系,该品系果皮橘红色,有光泽,果肉淡黄,肉质细嫩,脆甜微酸,十分爽口,适宜鲜食,品质上乘。平均单果重16 g,最大果重23 g,10月中旬成熟,较耐贮存,贮至翌年4月,甜味更浓,风味更佳。该品系丰产性状极好,3 a结果,5 a丰产,盛果期52 500 kg·hm<sup>-2</sup>,自然坐果率高达40%,平均每穗坐果10个,每穗最多36个。该品系适应性极强,抗旱耐瘠,适于山区发展,对炭疽、轮纹病和白粉病等病害表现出极高的抗性。

然而,传统的山楂种子繁殖方式需要2 a时间,且种子出芽率较低,性状不易保持,如果嫁接繁殖周期长达3~5 a,十分不利于优质山楂品种的快速推广。而组织培养增殖系数较大,繁殖周期短,因此,该研究旨在通过大量山楂蒙山红培养基的筛选和改进,建立鲜食山楂高效繁殖再生体系,为新优质山楂品种的推广、山楂的脱毒和转基因育种提供理论依据和技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

2013年4月12日从聊城大

学果树种质基地分别取蒙山红和大金星当年生的生长健壮无病虫害的幼嫩枝条,以带芽茎段为外植体。

**1.1.2 MS培养基母液** 母液配制参考植物生理学实验教程(第2版)<sup>[1]</sup>附加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂7 g·L<sup>-1</sup>,pH5.8,添加不同种类、不同浓度的激素配比,进行愈伤组织和芽诱导<sup>[2]</sup>。

### 1.2 方法

该试验培育山楂试管苗主要通过2种方式:(1)器官型(Organ type):也称丛芽增殖型,主要表现单芽段切口长愈伤组织,从愈伤组织诱导出大量不定芽形成丛状。(2)微枝扦插型(Mini-cutting type):以带芽切段为繁殖单位,在试管内生根的同时通过植株节间的伸长增殖<sup>[2]</sup>。

**1.2.1 外植体材料的灭菌** 将剪取的蒙山红外植体材料,先用洗洁精溶液浸泡15 min后,于自来水下冲洗2 h。在超净工作台上用70%的酒精表面灭菌,无菌水冲洗3次,然后用灭菌剂处理,用无菌水冲洗5次<sup>[3]</sup>。以0.1%的升汞和70%的酒精消毒,酒精消毒时间分别为25、30 s,升汞消毒时间为2、4、6 min,分别对蒙山红外植体进行处理,调查不同的处理方式对污染率、褐化率和死亡率的影响<sup>[4]</sup>,获得最佳灭菌效果处理方式。

**1.2.2 茎段长度对山楂组织培养的影响** 紫外线光照处理30 min超净工作台后,用灭过菌的手术刀把灭过菌的蒙山红枝条截成不同长度的茎段,茎段设4个梯度,分别为0.6、0.9、1.2和1.5 cm,即处理1至处理4。接种到MS培养基上。经暗培养24 h,然后转入光照强度1 500 lx,光照时间14 h·d<sup>-1</sup>,温度25℃环境下培养。10 d

收稿日期:2014-03-07

**基金项目:**大学生科技文化创新基金资助项目(理工类SF2012155);农业科技成果基金资助项目[鲁科农(2012)59];山东省科技攻关资助项目(2009GG10009031)

**第一作者简介:**孔维龙(1991-),男,山东省济宁市人,学士,在读硕士,从事园艺植物资源开发和利用研究。E-mail:kongweilong23@gmail.com。

**通讯作者:**王光全(1957-),男,学士,教授,从事园艺植物种质资源研究。E-mail:wqg@lccu.edu.cn。

后观察成活情况。

1.2.3 愈伤组织培养基的筛选(器官型方式组织培养) 以蒙山红为前期试验材料,获得最佳灭菌方式和最佳茎段长度之后,分别处理蒙山红和大金星健壮的茎段,接种到相同的 MS 培养基培养外植体,为后期选取生长良好的茎段做准备。培养 10 d 之后,以 MS 为基本培养基,附加 KT 激素(0.5,1.0,1.5,2.0 mg·L<sup>-1</sup>)和 IBA 激素(0.1,0.5 mg·L<sup>-1</sup>)不同组合,共 8 个处理。取成活的生长良好的茎段接种,光照强度 1 500 lx,光照时间 14 h·d<sup>-1</sup>,温度 25℃ 环境下培养。培养 28 d 后观察统计愈伤组织增殖生长状况。

1.2.4 芽诱导培养基的筛选(微扦插型方式组织培养) 以 MS 为基本培养基,附加 KT 激素(0.5,1.0,1.5,2.0 mg·L<sup>-1</sup>)和 IBA 激素(0.1,0.5 mg·L<sup>-1</sup>)不同组合,共 8 个处理。取成活的生长良好的茎段接种,光照强度 2 000 lx,光照时间

10 h·d<sup>-1</sup>,温度 23℃ 环境下培养。培养 28 d 后观察统计芽增殖状况。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对蒙山红外植体成活率的影响

由表 1 可知,酒精和升汞处理时间长短对外植体的污染率和成活率有直接的影响。处理 5、处理 6 与处理 1~处理 4 比较,升汞处理时间小于 4 min 外植体污染率较高,所以升汞处理时间应该≥4 min。处理 1~处理 4 污染率无太大差异,但是处理 1 和处理 2 较处理 3 和处理 4 成活率要下降 10 个百分点以上,褐化率较严重。处理 4 和处理 3 相比较,酒精处理 30 s 比处理 20 s 的污染率要低 5%,污染率为 0,成活率相同,外植体嫩绿。总体效果处理 4 要好于处理 3,因此,酒精处理 30 s、升汞处理 4 min 为最适灭菌处理方式。

表 1 不同灭菌时间对蒙山红外植体的影响

Table 1 Effect of different sterilization time on the explants

处理 Treatments	70%酒精处理时间/s Processing time by 70% alcohol	0.1 升汞处理时间/min 0.1 mercuric chloride processing time	接种瓶数 Inoculation bottles	污染率/% Pollution rate	成活率/% The Survival rate
1	25	6	20	0	90
2	30	6	20	0	80
3	25	4	20	5	100
4	30	4	20	0	100
5	25	2	20	50	100
6	30	2	20	35	95

2.2 外植体茎段长度对其成活率的影响

由表 2 可知,茎段长度为 0.6 cm 时,成活率最低,茎段为 1.2~1.5 cm,外植体成活率≥

90%,茎段长度为 1.2 cm 时外植体长得最好。综上考虑,为了保证外植体的成活率,在取山楂茎段外植体时,长度应以 1.2~1.5 cm 为宜。

表 2 不同外植体茎段长度对其成活率的影响

Table2 Effect of different stem length on survival rate of the explants

茎段长度/cm Length of stem	接种数目 Quantity of seeding	成活数目 Quantity of survival	成活率/% Survival rate
0.6	40	22	55.0
0.9	40	29	72.5
1.2	40	38	95.0
1.5	40	36	90.0

2.3 KT 和 IBA 浓度对蒙山红和大金星茎段外植体愈伤组织增殖生长的影响

从表 3 可看出,KT 和 IBA 的不同浓度对两

个品种愈伤组织增殖的影响不同,蒙山红和大金星最适愈伤组织培养基不同。较低浓度的 IBA 有助于蒙山红产生愈伤组织,适当提高 KT 浓度

有利于蒙山红愈伤组织的产生,但浓度超过 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 反而有下降的趋势,故蒙山红诱导愈伤组织的最适培养基为 $\text{MS}+\text{KT } 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。高浓度 KT 不利于愈伤组织的

产生,较高浓度的 IBA 有助于蒙山红产生愈伤组织,大金星诱导愈伤组织的最适培养基为 $\text{MS}+\text{KT } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 3 不同浓度 KT 和 IBA 对蒙山红和大金星茎段外植体愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of different concentration of KT and IBA on explants callus induction of Mengshanhong and Dajinxing

KT 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of KT	IBA 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of IBA	愈伤组织增殖生长状况 Growth condition of callus proliferation	
		蒙山红 Mengshanhong	大金星 Dajinxing
0.5	0.1	75%的外植体有愈伤组织,部分愈伤组织较大。	87%的外植体有愈伤组织,部分愈伤组织较大。
0.5	0.5	80%的外植体有愈伤组织,部分愈伤组织较大。	93%外植体有愈伤组织,部分愈伤组织大。
1.0	0.1	几乎全部产生愈伤组织,愈伤组织大。	60%的外植体有愈伤组织,部分愈伤组织较大。
1.0	0.5	83%外植体有愈伤组织,愈伤组织较大。	75%的外植体有愈伤组织,部分愈伤组织较大。
1.5	0.1	53%外植体有愈伤组织,愈伤组织较小黄绿色。	33%外植体有愈伤组织,愈伤组织较小黄绿色。
1.5	0.5	48%外植体有愈伤组织,愈伤组织较小黄绿色。	40%外植体有愈伤组织,愈伤组织较小黄绿色。
2.0	0.1	极少量的外植体产生黄色的愈伤组织。	极少数外植体产生轻微黄色的愈伤组织。
2.0	0.5	几乎无愈伤组织产生。	16%外植体产生黄色的愈伤组织。

#### 2.4 不同浓度 KT 和 IBA 对蒙山红和大金星茎段芽增殖的影响

由表 4 可知,随着 IBA 浓度的升高,外植体的发芽率也随之升高,促进植物长高。 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 要比  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 效果好。此外,在 IBA 浓度一定时,适当增加 KT 的浓度可以提高新芽数。随着 KT 浓度的升高,芽增殖

数增多,但是浓度继续升高,芽增殖数有下降现象。蒙山红芽诱导的最适培养基和大金星芽诱导的最适培养基略有不同。蒙山红芽诱导的最适培养基为 $\text{MS}+\text{KT } 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。大金星芽诱导的最适培养基为 $\text{MS}+\text{KT } 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 4 不同浓度 KT 和 IBA 对蒙山红和大金星茎段芽增殖的影响

Table 4 Effect of different concentration of KT and IBA on bud proliferation of Mengshanhong and Dajinxing

KT 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of KT	IBA 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of IBA	蒙山红 Mengshanhong		大金星 Dajinxing	
		芽诱导率/% Buds induction rate	芽增殖情况 Bud proliferation situation	芽诱导率/% Buds induction rate	芽增殖情况 Bud proliferation situation
0.5	0.1	27	单株增殖 1.3 个芽	17	单株增殖 0.8 个芽
0.5	0.5	38	单株增殖 0.8 个芽	23	单株增殖 1.1 个芽
1.0	0.1	69	单株增殖 1.6 个芽	54	单株增殖 1.9 个芽
1.0	0.5	86	单株增殖 2.4 个芽	67	单株增殖 2.3 个芽
1.5	0.1	48	单株增殖 1.4 个芽	70	单株增殖 2.1 个芽
1.5	0.5	60	单株增殖 2.0 个芽	83	单株增殖 2.8 个芽
2.0	0.1	37	单株增殖 0.8 个芽	35	单株增殖 1.3 个芽
2.0	0.5	42	单株增殖 1.0 个芽	46	单株增殖 1.7 个芽

### 3 结论与讨论

植物组织培养,外植体灭菌以及保证全程的无菌条件是关键。由该试验的研究结果可得,用酒精和升汞处理外植体,能够明显降低外植体的污染率,但是处理时间太长,成活率明显降低,活性变弱,褐化率升高,不利于组织培养后续试验的进行和培养成健壮植株。所以在山楂组织培养的灭菌过程中一定要多次试验,选择出适宜试验山楂品种的消毒方式。此外,外植体的长度对外植体成活率有明显影响作用,山楂组织培养可以借鉴此试验结果,外植体长度以 1.2~1.5 cm 为宜。植物材料的器官再生途径一般是由培养基中细胞分裂素与生长素的比例来控制的<sup>[5]</sup>。生长素与细胞分裂素的一定比例可刺激根和芽的形成<sup>[6]</sup>。此试验中 IBA 浓度的升高,可以提高外植体的发芽率,KT 浓度的升高,在一定范围内有助于芽的增殖,但继续增加芽增殖率减低。虽然大致趋势相同,最适结果中蒙山红和大金星对 IBA 和 KT 的要求有明显的不同。在其它山楂组织培养中要注

意生长素和细胞分裂素的合理搭配。该试验旨在培育出山楂优质试管苗,建立鲜食山楂高效繁殖再生体系。以期为木本植物的组织培养工作提供理论依据和技术指导。对于培育山楂优质试管苗有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 侯福林. 植物生理学实验教程[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2010.
- [2] 任杰,魏鹏,吴建华. 山楂离体快繁三种增殖方式优化研究[J]. 北方园艺,2009(9):55-57.
- [3] 杨宗芳,孟庆杰,王光全,等. 黄桃新品种‘黄金魁’再生植株的获得[J]. 北方园艺,2012(9):113-115.
- [4] 何玉会,王泽武,王中伟,等. 大果山楂组织培养的研究[J]. 吉林农业,2009(24):26-27.
- [5] Thao N T P. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocastam micholitziana*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2003,73(3):285-289.
- [6] Yam T W. Callus formation and plantlet development from axillary buds of taro[J]. Planta,1990,180(3): 458-460.
- [7] 李新风,赵滢,田玉龙,等. 植物组织培养褐化问题的研究进展[J]. 吉林农业,2010(1):66-67.

## Primary Exploration about Tissue Culture of Fresh Hawthorn Mengshanhong

KONG Wei-long, WANG Guang-quan, MENG Qing-jie, RONG Xiu-zhen

(College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

**Abstract:** In order to obtain the most appropriate rapid propagation medium of hawthorn variety of Mengshanhong, taking stems section from Mengshanhong and Dajinxing as explants. Eight kinds of medium combination on callus induction and bud multiplication culture were set up to analyze the optimum culture conditions of two hawthorn varieties. The results showed that the best culture medium for callus induction was MS + KT  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for Mengshanhong, and the best culture medium for bud proliferation was MS + KT  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The best culture medium for callus induction was MS + KT  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for Dajinxing, and the best culture medium for bud proliferation was MS + KT  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 30 g·L<sup>-1</sup> sugar and 7 g·L<sup>-1</sup> agar were added to all culture medium, and pH was 5.8.

**Key words:** hawthorn; Mengshanhong; Dajinxing; tissue culture