

# 红蛇果接穗组织培养体系的建立

胡春宏, 王婷婷, 常革, 季翔 (江苏东郁园林科技有限公司, 江苏无锡 214000)

**摘要** [目的]建立红蛇果接穗组织培养体系。[方法]于早春取红蛇果接穗两年生苗半木质化茎段作为外植体,通过消毒、萌芽、增殖、生根过程建立组织培养体系。[结果]最适宜的萌芽培养基为 MS+6-BA(1.0 mg/L)+IBA(0.1 mg/L),其萌芽率可达 93.33%,添加 PVP(0.5 g/L)和  $V_c$ (100 mg/L)可以有效地防止褐化。将萌发后的芽转入 MS+6-BA(1.2~1.6 mg/L)中,可以进行高效增殖的同时抑制玻璃化情况的发生,增殖倍率可以达 3.79。最适宜红蛇果接穗顶芽生根的培养基为 1/2MS+IBA(1.0 mg/L),生根率为 34.17%。[结论]该研究可为提供大量的红蛇果组培苗以及之后的组培微嫁接提供技术基础。

**关键词** 接穗;红蛇果;组织培养

中图分类号 S604+.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)01-0105-03

## Establishment of Tissue Culture System of Red Delicious Scion

HU Chun-hong, WANG Ting-ting, CHANG Ping et al (Jiangsu Orisis Landscape Science & Technology Limited Company, Wuxi, Jiangsu 214000)

**Abstract** [Objective]To establish the tissue culture system of red delicious. [Method]Semi-woody stem segments from two-years red delicious seedlings were chosen as the explants in the early spring to establish the tissue culture system by sterilization, germination, multiplication and rooting process. [Result]The most suitable germination medium was MS+6-BA(1.0 mg/L)+IBA(0.1 mg/L) and the sprout rate can up to 93.33%. Adding PVP(0.5 g/L) and  $V_c$ (100 mg/L) can effectively prevent browning. The germinated buds were transferred into MS+6-BA(1.2~1.6 mg/L) which could bring a highly efficient multiplication and inhibit the vitrification with a multiplication rate of 3.79. The most suitable rooting medium for the apical buds was 1/2MS+IBA(1.0 mg/L) and the rooting rate was 34.17%. [Conclusion]The study provided a technical basis for providing a large number of tissue culture seedling of red delicious and subsequent micrografts.

**Key words** Scion; Red delicious; Tissue culture

红蛇果(*Malus domestica* “Red Delicious”)原产于美国,是世界上苹果主要栽培品种之一,该品种最早于 1880 年在美国爱荷华州麦迪逊县被培育成功。根据美国苹果协会统计,该品种在美国是 15 个最受欢迎的苹果品种之一。红蛇果果实大小中等,总体呈圆锥形,顶大底小,霞红色的果皮颜色以及耐贮藏的特性使得该品种在市场上很受欢迎。其果肉为黄白色,肉质甜脆多汁,甘甜可口,含有果糖、葡萄糖、蔗糖以及多种维生素,其中果胶和钾居水果类之首。国内蛇果产地多为山东、陕西,主要生产方式为嫁接,即选用健壮的红蛇果接穗条嫁接于砧木之上,实现果树的方便管理以及高产。

将红蛇果接穗通过组织培养方式繁殖,可以在短时间内得到大量的生长势一致的组培苗,方便其商业化嫁接。目前国内外对于红蛇果接穗组织培养技术的研究较少。笔者通过大量试验研究,以期建立一个高效的可以商业化大规模生产的组培体系,为国内市场提供大量的红蛇果组培苗,同时为之后的组培微嫁接提供技术基础。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 红蛇果接穗母本来自于江苏无锡高科技农业示范园区内的试验苗圃。母本树为已经嫁接好的两年生苗,在取材之前进行适当的灌溉施肥,促进植株生长。

5—6 月份春末夏初为最佳的取材时间,待当年生枝条呈现半木质化状态时便可以采集外植体。于晴朗的午后,挑选生长健壮无病虫害的母株,剪取植株顶端 10 cm 左右的枝条,封存于密封袋内,避光贮藏在 4 ℃ 冰箱,24 h 后取出消毒。

**1.2 外植体消毒** 将剪取的枝条于流水下冲刷 2 h,在超净工作台上将枝条分割为单节茎段,用 75% 乙醇溶液浸泡 30 s,之后将顶芽和其他节段分别进行消毒。顶芽采用 20% 消毒试剂(市售消毒试剂,有效成分为次氯酸钠)消毒 40 min,其他节段使用 25% 消毒试剂消毒 40~50 min。消毒完成后,用无菌去离子水冲洗 3 次,最后一次使用添加 300 mg/L 的抗坏血酸溶液浸泡 3 min,以最大程度地减少外植体的褐化<sup>[1]</sup>。培养室内环境条件如下:光照强度为 4 000~6 000 lx,光周期为 16 h/d,温度保持在(23±2)℃。

## 1.3 组培体系的建立

**1.3.1 不定芽萌发** 将消毒成功的外植体接种于不同的萌芽培养基上,每瓶接种 1 个茎段。所用的萌芽培养基为 MS 培养基,添加不同质量浓度的 6-BA 和 IBA,蔗糖浓度为 30%,同时添加 8% 的琼脂,保持培养基 pH 为 5.8。由于苹果外植体中含有的大量酚类物质非常容易褐化,因此在培养基中均添加了一定浓度的防褐化试剂,防褐化试剂有活性炭(AC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)以及抗坏血酸( $V_c$ )<sup>[2-4]</sup>。所用的萌芽培养基如表 1 所示,每组合处理 30 瓶,试验设置 3 次重复。将消毒后的外植体放置于 9 ℃ 冰箱中避光存储 4~6 d 可以有效地减轻褐化现象,之后转入培养室内进行培养,培养 40 d 后统计植株的萌芽率。

**1.3.2 腋芽增殖** 待芽萌发之后,挑选健壮无玻璃化的无菌芽,转入增殖培养基中进行增殖培养。所用的增殖培养为 MS 基础培养基添加不同质量浓度的 6-BA+琼脂 8 g/L+蔗糖 30 g/L,培养基的 pH 保持在 5.8。不同试验组中添加的 6-BA 浓度为 0.2、0.5、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/L。每个组合处理 10 瓶,每瓶放置 12 个无菌苗,试验设置 3 次重复。培养 30 d 后统计增殖倍率(增殖后的株数/接种的株数)和生长状况。

**作者简介** 胡春宏(1982—),男,江苏溧阳人,从事木本经济作物、观赏植物组培商业化应用研究。

**收稿日期** 2017-11-08

表1 红蛇果接穗萌芽培养基

Table 1 Sprout medium of red delicious scion

| 编号<br>No. | 激素组合<br>Hormone combination    | 防褐化物质<br>Antibrowning material           |
|-----------|--------------------------------|------------------------------------------|
| 1         | 6-BA(0.5 mg/L) + IBA(0.1 mg/L) | AC(0.5 g/L) + V <sub>c</sub> (100 mg/L)  |
| 2         | 6-BA(1.0 mg/L) + IBA(0.1 mg/L) | AC(0.5 g/L) + V <sub>c</sub> (100 mg/L)  |
| 3         | 6-BA(1.5 mg/L) + IBA(0.1 mg/L) | AC(0.5 g/L) + V <sub>c</sub> (100 mg/L)  |
| 4         | 6-BA(2.0 mg/L) + IBA(0.1 mg/L) | AC(0.5 g/L) + V <sub>c</sub> (100 mg/L)  |
| 5         | 6-BA(0.5 mg/L) + IBA(0.1 mg/L) | PVP(0.5 g/L) + V <sub>c</sub> (100 mg/L) |
| 6         | 6-BA(1.0 mg/L) + IBA(0.1 mg/L) | PVP(0.5 g/L) + V <sub>c</sub> (100 mg/L) |
| 7         | 6-BA(1.5 mg/L) + IBA(0.1 mg/L) | PVP(0.5 g/L) + V <sub>c</sub> (100 mg/L) |
| 8         | 6-BA(2.0 mg/L) + IBA(0.1 mg/L) | PVP(0.5 g/L) + V <sub>c</sub> (100 mg/L) |

**1.3.3 生根诱导。**经过 30 d 左右的增殖培养,挑选其中 3 cm 左右高、生长健壮无玻璃化的顶芽,将其底部的愈伤组织切除,切口为“V”形,插入生根培养基中进行生根培养。在培养起初,将苗放置于 30 ℃ 环境中暗培养 7 d,之后转入培养室内进行培养,每个培养瓶放置 16 个顶芽,每 10 个培养瓶为 1 组,试验设置 3 次重复。培养室环境条件如下:光照强度为 4 000 ~ 6 000 lx,光周期为 16 h/d,温度保持在 (25 ± 2) ℃。30 d 后统计植株的生根率,生根率 = 生根顶芽数/接种顶芽数。所用的生根培养基为 1/2MS 培养基,添加不同质量浓度的 IBA 和活性炭(AC),不同生根培养基配方见表 2。

表2 红蛇果接穗生根培养基

Table 2 Rooting medium of red delicious scion

| 编号<br>No. | IBA 浓度<br>IBA concentration<br>mg/L | AC 浓度<br>AC concentration<br>g/L |
|-----------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1         | 0.2                                 | 0                                |
| 2         | 0.5                                 | 0                                |
| 3         | 1.0                                 | 0                                |
| 4         | 1.5                                 | 0                                |
| 5         | 0.5                                 | 0.5                              |
| 6         | 1.0                                 | 0.5                              |
| 7         | 1.5                                 | 0.5                              |
| 8         | 2.0                                 | 0.5                              |

## 2 结果与分析

**2.1 不定芽萌发** 起初将外植体放置于 9 ℃ 环境中暗培养一段时间,可以显著减轻外植体的褐化情况,但是低温培养在一定程度上也抑制了外植体的生理活性,因此红蛇果接穗外植体所需萌芽时间较长,一般在 20 d 左右开始启动,通常顶芽最先萌发,接着是靠近培养基部分的腋芽开始启动,中间段的腋芽所需萌发时间最长。不同培养基中外植体萌发情况如表 3 所示。

由试验结果可以看出,3 种防褐化物质均可以在一定程度上减轻植株的褐化程度。但在培养基中添加活性炭时,添加同等质量浓度的植物生长调节剂,植物的萌芽率普遍要低

于添加 V<sub>c</sub> 作为防褐化剂的接穗。这可能是由于活性炭对于植物生长调节剂的吸附作用所致。同时发现,后期挑选消毒不彻底的带菌苗时,活性炭的存在使培养基变为黑色,很容易造成漏挑苗现象,从而导致带菌苗在增殖阶段大量繁殖,给组培生产带来后续困难。因此,在实际生产中一般不使用活性炭作为防褐化物质。

表3 不同培养基中红蛇果接穗萌发情况

Table 3 Germination situation of red delicious scion on different medium

| 编号<br>No. | 萌芽率<br>Germination rate//% | 萌芽情况<br>Germination situation |
|-----------|----------------------------|-------------------------------|
| 1         | 47.77                      | 部分顶芽可以萌发,萌芽速度慢                |
| 2         | 60.00                      | 植株健康,叶片颜色浓绿,腋芽可以萌发            |
| 3         | 85.56                      | 顶芽可以萌发,部分植株玻璃化,愈伤组织较少         |
| 4         | 70.00                      | 顶芽可以萌发,植株玻璃化                  |
| 5         | 68.89                      | 植株健康,叶片颜色浓绿,腋芽可以萌发,愈伤组织较少     |
| 6         | 93.33                      | 萌芽速度较快,但是部分顶芽呈现玻璃化状态,腋芽较为健康   |
| 7         | 72.22                      | 外植体愈伤化严重,大量白绿色疏松愈伤组织,部分顶芽可以萌发 |
| 8         | 48.33                      | 部分顶芽可以萌发,但叶子大而透明,植株玻璃化严重      |

当使用 V<sub>c</sub> 和 PVP 作为防褐化物质时,随着培养基中 6-BA 浓度的增加,植株的萌芽率呈现先增后减的趋势,当培养基中添加 1.0 mg/L 的 6-BA 时,植株的萌芽率最高,可以达到 93.33%。但同时植株玻璃化的概率也逐渐增加,尤其是当 6-BA 浓度增加到 2.0 mg/L 时,只有顶芽可以萌发,同时萌发出的新植株叶子大而透明,即使转至增殖培养基中也不能继续生长。而腋芽均被愈伤组织包裹,10 ~ 15 d 即死亡。

综上所述,最适宜红蛇果接穗萌芽的培养基为 6 号培养基,即 MS + 6-BA(1.0 mg/L) + IBA(0.1 mg/L),在此培养基中培养的外植体其萌芽率可以高达 93.33%。在培养基中同时添加 PVP(0.5 g/L) + V<sub>c</sub>(100 mg/L),可以有效防止外植体褐化,同时不会影响到培养基中激素的吸收。

**2.2 不定芽增殖** 一般植株转入增殖培养基后 7 d 左右,没入培养基的部分膨大,之后靠近基部的腋芽最先萌发,待 20 d 左右之后,部分上部的腋芽开始萌发。不同培养基中增殖情况如表 4 所示。

表4 不同培养基中红蛇果接穗增殖情况

Table 4 Multiplication situation of red delicious scion on different medium

| 编号<br>No. | 6-BA 浓度<br>6-BA concentration//mg/L | 增殖倍率<br>Multiplication rate | 生长情况<br>Growth situation |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 1         | 0.2                                 | 0.99 ± 0.07                 | 大部分不增殖,部分发黄枯萎            |
| 2         | 0.5                                 | 1.03 ± 0.08                 | 大部分不增殖,部分发黄枯萎            |
| 3         | 0.8                                 | 2.01 ± 0.27                 | 部分增殖,部分发黄枯萎              |
| 4         | 1.2                                 | 3.23 ± 0.36                 | 大部分可增殖,无发黄现象             |
| 5         | 1.6                                 | 3.79 ± 0.35                 | 可增殖,小部分玻璃化               |
| 6         | 2.0                                 | 3.99 ± 0.45                 | 可增殖,但玻璃化概率较高             |

由试验结果可以看出,随着 6-BA 浓度的增加,增殖倍率也逐渐增加。当 6-BA 浓度低于 0.5 mg/L 时,植株几乎不增殖,同时长时间地放置于低浓度 6-BA 培养基中,会造成植株死亡。具体表现为植株下部的叶片开始发黄掉落,之后顶芽死亡,最后整株植物褐化死亡。而当培养基中的 6-BA 浓度大于 1.6 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的增加,植株玻璃化概率也随之增加。具体表现为接种于培养基中的植株最先表现为玻璃化现象,之后萌发的腋芽也开始玻璃化,部分玻璃化植株不能继续增殖,甚至会被过多的白色愈伤组织包裹而死亡。

因此,最适宜红蛇果接穗增殖的培养基中 6-BA 浓度为 1.2~1.6 mg/L。在此培养基上培养的植株,其增殖倍率可以达 3.79,同时植株健壮,长势旺盛,玻璃化概率几乎为 0。

**2.3 生根诱导** 在没有添加活性炭的培养基中,顶芽转入生根培养基 15~20 d,基部首先长出乳黄色致密的愈伤组织,之后在此愈伤组织之上根系开始形成,一般为 3~4 条黄绿色粗壮的根系。而在添加活性炭的培养基中,愈伤组织可以被有效抑制,但根系形成所需的时间较长,一般需要 25~30 d。同时,根白色细长,一般只有 1~2 条根系。不同培养基中红蛇果接穗的生根率如图 1 所示。

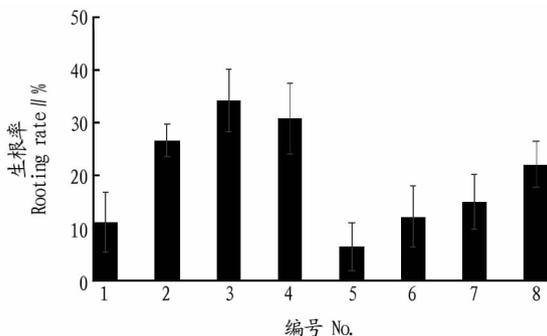


图 1 不同培养基中红蛇果接穗生根率

Fig. 1 Rooting rate of red delicious scion on different medium

从图 1 可以看出,在没有添加活性炭的培养基中(1~4 号),随着 IBA 浓度的增加,顶芽底部的愈伤组织越来越多,生根率呈现先上升后下降的趋势,在 3 号培养基中,顶芽的生根率达到最高(34.17%)。而当培养基中 IBA 浓度继续增加至 1.5 mg/L 时,生根率反而下降至 30.83%,推测可能是由于过多的愈伤组织阻碍了根系的发生和生长。而在添加活性炭的培养基中,随着 IBA 浓度的增加,生根率随之上升,最高为添加 2.0 mg/L IBA 的 8 号培养基,生根率为 22.08%。

### 3 讨论

在实际生产中发现,红蛇果接穗的组培苗在多次继代之后很容易发生玻璃化的现象,尤其是夏季组培室内的温度不稳定的时候。通过调高培养基内琼脂的浓度,将组培室的温度降低 2~3 ℃,降低培养基中 6-BA 的浓度可以有效地抑制玻璃化苗的产生<sup>[5-7]</sup>。

随着继代次数的增加,组培苗对于培养基中的 6-BA 浓度逐渐适应,同时体内累积了大量的 6-BA,如果一直在培养基中添加高浓度的 6-BA 容易造成组培苗畸形、玻璃化进而影响后续的生根<sup>[8-9]</sup>。在实际生产中梯度性地降低培养基中 6-BA 浓度可以有效地避免上述情况的发生,如每一个继代周期降低培养基中 1/3 的 6-BA 浓度,直至将增殖情况稳定为止。

生根过程中将组培苗放置于暗环境下培养 5~7 d 有利于根系的发生和生长。试验结果显示,红蛇果接穗的组培苗不太容易生根,最高的生根率仅为 34.17%。因此,之后的研究方向主要为组培微嫁接。选择合适的易于生根的蛇果砧木进行组织培养,组培苗生根后于温室进行驯化移栽,小苗成活后将驯化好的无根红蛇果接穗小苗直接嫁接于砧木之上,此种方法有利于生产出洁净无菌的嫁接苗,同时可以简化红蛇果接穗的组培流程,省去生根步骤,提高组培苗的成活率同时缩短育苗周期<sup>[10-11]</sup>。

### 参考文献

- [1] 张庆田. 几种苹果砧木组织培养技术的研究[D]. 哈尔滨: 山东农业大学, 2007.
- [2] BLOCK R, LANKES C. Ursachen der Verbräunung von explantaten der apfelunterlage M9 bei der *in vitro*-etablierung / reasons for tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during *in vitro* establishment[J]. Die gartenbauwissenschaft, 1995, 60(6): 276-279.
- [3] THOMAS T D. The role of activated charcoal in plant tissue culture[J]. Biotechnology advances, 2008, 26(6): 618-631.
- [4] JAMES D J, THURBON I J. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M. 9[J]. Journal of horticultural science, 1979, 54(4): 309-311.
- [5] 张洪胜, 牟云官, 辛培刚. 苹果离体培养中试管苗玻璃化现象发生机理的探讨[J]. 果树学报, 1991, 8(2): 71-74.
- [6] 程家胜, 史永忠, 张志云, 等. 苹果组织培养中的玻璃苗问题(简报)[J]. 植物生理学通讯, 1990(1): 33-35.
- [7] 邹恩强, 杜希华, 李成刚, 等. 影响苹果砧木 M9 组培苗玻璃化的因素与改善措施[J]. 山东林业科技, 2010, 40(5): 27-30.
- [8] 潘丽梅, 马小军, 莫长明, 等. 不同培养条件对罗汉果组培苗玻璃化的影响[J]. 中国种业, 2011(2): 43-45.
- [9] 裘珍飞, 曾炳山, 李湘阳, 等. 6-BA 的动态效应对桉树组培出苗率的影响[J]. 浙江林业科技, 2005, 25(3): 6-9.
- [10] 及华, 张海新, 葛会波. 梨矮砧组培苗微嫁接技术研究[J]. 河北农业科学, 2005, 9(2): 37-40.
- [11] 赵恺, 刘伟. 果树组织培养微嫁接技术研究进展[J]. 现代农业科技, 2011(20): 150.

## 科技论文写作规范——题名

以最恰当、最简明的词句反映论文、报告中的最重要的特定内容,题名应避免使用不常见的缩略语、首字母缩写词、字符、代号和公式等。一般字数不超过 20 字。英文与中文应相吻合。英文题名词首字母大写,连词及冠词除外。