

钙果苗木组培技术初探

徐萍, 谭剑锋

(广东中科琪林园林股份有限公司, 广州 510520)

摘要:以钙果带2个腋芽的茎段为外植体进行快速繁殖, 结果表明, 基本培养基都以改良的MS为最好, 筛选出各培养基分别为: (1) 侧芽萌动, 1/2MS+5% 椰子乳为培养基是最好, 茎切段在该培养基上萌芽快, 且侧芽长而粗壮; (2) 分化及继代, MS+5% 椰子乳+6-BA (0.3~0.6) mg/L+NAA 0.01 mg/L 为培养基是最适合的; (3) 生根, 1/2MS+1% 椰子乳+IBA 2.5 mg/L 为培养基, 试管苗生长良好, 有利于钙果的生根。

关键词: 钙果; 组织培养; 快速繁殖

钙果(*Cerasus humilis* Sok.), 也叫欧李是蔷薇科樱桃属一种矮小灌木, 为我国特有的果树, 是集果、木、花、药多用途的生态型树种。钙果是由山西农业大学杜俊杰教授为首的一批科技人员, 根据野生欧李树种成功培育出来的。具有成活率高、生长快、可食性强、效益高的特点。此项成果1998年通过山西省科教委组织的专家鉴定, 居于国际领先水平。钙果株高0.5~1 m, 无明显主枝, 基生枝年抽生5~7条, 花期4月下旬至5月初, 开白花或粉花, 果期8~10月初, 结核果, 形似樱桃, 味似李子, 酸甜可口, 风味独特。钙果具有多项开发价值: 可作果树, 有结果早、产量高、收益快的特点。每百克鲜果钙铁含量分别达到60 mg和1.5 mg, 是苹果的6倍, 含有17种氨基酸, 是儿童和老人的高级保健水果。钙果的仁、根皆可药用, 果实还可加工成酒和蜜饯等。钙果具有美化环境的功效, 在庭院、街道、公园、公路两边栽植钙果, 可春天观花, 夏天赏叶, 秋季品果; 由于其植株矮, 株丛占地少, 果实色彩多而艳丽, 还可盆栽。钙果抗旱抗寒抗贫瘠能力强, 适应性强, 具有巨大的应用前景^[1-4]。目前, 只有少数育种单位拥有少量的种苗, 如果采用播种、扦插、压条的常规繁殖方式, 速度太慢, 不能满足市场的需求, 我们首次对其进行了组织培养的研究, 以期通过快繁途径加速其繁殖速度。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为华南热带农业大学园艺所组培实验室提供的钙果盆栽苗(农大四号)。试验于2006年11月至2007年6月在园艺所组培实验室进行。

1.2 方法

选取钙果当年萌发的枝条, 将叶片摘除, 去掉顶部的嫩梢, 在流水下冲洗10 min, 后剪成10 cm左右的茎段。放入75%的酒精中漂洗30 s, 在0.1% HgCl₂+2滴吐温60的消毒液中浸泡10 min, 然后用无菌水冲洗5~8次, 再用无菌吸水纸吸干后, 切成含2个腋芽的茎段, 放入初代培养基上诱导侧芽萌动。当诱导成功后, 将侧芽切下, 诱导出的新茎段切成1~2 cm长的小段, 转入继代培养基使其分化增殖。经过多次继代培养, 将无根苗接入生根培养基中培养, 获得完整的小植株。

1.3 培养条件

钙果的快繁均以MS为基本培养基, 根据不同培养阶段的需要附加6-BA、NAA、IBA等成分, 市售白糖3%, 另加0.65%琼脂进行固化, pH值调至5.8。培养过程中温度保持在25~27℃, 每天连续光照12 h, 光强度2 000 lx左右。

1.4 培养基

初代培养基: (1) 1/2MS+5% 椰子乳; (2) 1/2MS。
继代培养基: (3) MS+5% 椰子乳+6-BA (0.1~1.0) mg/L(单位下同)+NAA 0.01 mg/L(单位下同); (4) MS+5% 椰子乳+6-BA 0.3+NAA (0.01~0.03)。
生根培养基: (5) MS+NAA 0.1; (6) 1/2MS+NAA 0.1; (7) 1/2MS+1% 椰子乳+IBA (0.1~10.0)。

2 结果与分析

2.1 初代培养

灭菌后的茎段接种到初代培养基上, 经过4~10 d的培养, 侧芽开始萌动。

2.1.1 椰子乳对钙果的侧芽的诱导的影响

灭菌后的茎切段采用竖放分别接种到初代培养基(1)、(2)上(表1), 通过观察侧芽的萌动时间和生

收稿日期: 2008-06-20

修回日期: 2008-07-03

第一作者简介: 徐萍(1979-), 女, 助理园艺师, 主要从事园艺栽培、植物组织培养开发和园林绿化工作。E-mail: xuping0813@163.com

长势,可以看出培养基(1)对诱导侧芽的萌动效果理想,茎切段在该培养基上萌芽快,且侧芽长而粗壮,12 d 侧芽的平均高度为 7.5 mm。可见椰子乳对外植体的生长有明显的促进作用。

表1 椰子乳对钙果的侧芽的诱导的影响

| 基本培养基 | 侧芽萌动的时间/d | 12d 侧芽平均高度/mm | 生长势 |
|-------------|-----------|---------------|-----|
| 1/2MS+5%椰子乳 | 4 | 7.5 | +++ |
| 1/2MS | 6 | 3.5 | + |

注:接种后 25 d 对生长势的统计结果;+表示生长势不好,+++表示生长势很好,下同。

2.1.2 茎切段放置方式的影响

灭菌后的茎切段采用横放或竖放的方式,接种到培养基(1)上。从表 2 可以看出,竖放萌芽快,接种的 4 d 就开始萌动,侧芽长,12 d 时侧芽的平均高度为 7.5 mm。

表2 茎切段放置方式对侧芽萌动的影响

| 培养基 | 放置方式 | 侧芽萌动时间/d | 12d 侧芽平均高度/mm | 生长势 |
|--------|------|----------|---------------|-----|
| 1/2MS+ | 竖放 | 4 | 7.5 | ++ |
| 5%椰子乳 | 横放 | 10 | 3.0 | ++ |

注:接种后 25 d 对生长势的统计结果,++表示生长势好。

竖放对诱导侧芽的萌动效果理想,但随着培养时间越长生长势不明显。这是因为在培养初期内源激素在起作用,而横放不利于内源激素的运输,竖放有利于内源激素的运输,到后期主要是外源激素起作用,而横放与培养基接触面积大,可吸收外激素多,生长较快,所以随着培养时间越长生长势不明显。

2.2 继代培养

将 2~2.5 cm 长的无菌芽从原茎段上切下转入分化继代培养基 MS+5%椰子乳+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.01 mg/L,经过 25~30 d 的培养,从每株芽的基部愈伤处可形成 8~15 个 2.5~4.0 cm 丛生状不定芽。然后将丛生芽切成 1~2 cm 的小段(需带 1 个节以上),在不同成分的新鲜培养基上分化继代。

2.2.1 6-BA 浓度对增殖的影响

把丛生芽切成 1~2 cm 的茎段,接入到继代培养基(3)中,经过 15d 的培养(表 3),结果表明 MS+5%椰子乳+6-BA 0.1+NAA 0.01 的增殖系数 3.8,增殖速度慢,且丛生芽易老化,少部分叶尖已变黄,长势弱。MS+5%椰子乳+6-BA 1.0+NAA 0.01 的增殖系数 15.2,增殖速度快,但是丛生芽长得细长且密集,丛生芽茎段较嫩且脆,在基部形成大块的愈伤组织,长势不好。当浓度为 0.8 mg/L 时,长势也不如 0.6 mg/L 的好。由此可知,6-BA < 0.1 mg/L 或 > 1.0 mg/L 都不适合钙果的分化继代,适合的 6-BA 浓

度范围是 0.3~0.6 mg/L。过高的 6-BA 浓度,可加速侧芽的增殖,但是长势受到抑制,使枝条过于纤细,苗的质量下降,不适合用于生根。

表3 6-BA 浓度对钙果增殖的影响

| 培养基 | 6-BA/mg·L ⁻¹ | 接种数/个 | 增殖系数 | 生长势 |
|---------|-------------------------|-------|------|-----|
| | 0.1 | 100 | 3.8 | + |
| | 0.3 | 100 | 6.4 | +++ |
| MS+ | 0.5 | 100 | 7.2 | +++ |
| 5%椰子乳 | 0.6 | 100 | 7.6 | +++ |
| +6-BA + | 0.8 | 100 | 10.2 | +++ |
| NAA0.01 | 1.0 | 100 | 15.2 | ++ |

注:继代培养第 15 d 的统计结果,其中+表示生长势不好,++表示生长势好,+++表示生长势很好。

2.2.2 NAA 浓度对的影响

采用培养基(4),固定 6-BA 浓度,利用不同的生长素浓度,观察其生长情况。表 4 试验结果表明,从增殖速度来看:NAA 0.01 > NAA 0.03 > NAA 0.02。

表4 NAA 浓度对钙果增殖的影响

| 培养基 | NAA/mg·L ⁻¹ | 接种数 | 增殖系数 | 生长势 |
|-----------|------------------------|-----|------|-----|
| MS+5%椰子乳+ | 0.01 | 48 | 6.4 | +++ |
| 6-BA0.3 | 0.02 | 48 | 5.0 | ++ |
| +NAA | 0.03 | 48 | 6.0 | + |

注:继代培养第 15 d 的统计结果,其中+表示生长势不好,++表示生长势好,+++表示生长势很好。

但是从生长势来看,NAA 0.01 > NAA 0.02 > NAA 0.03。由此可以看出,当 6-BA 质量浓度不变时,随着 NAA 浓度的升高,对钙果丛生芽的生长是不利的,表现在丛生芽生长缓慢,愈伤组织生长旺盛等。说明 6-BA 要与 NAA 适量配合才能达到最好的增殖效果。最佳的培养基是:MS+5%椰子乳+6-BA 0.3+NAA 0.01。

2.3 生根培养

将在继代培养基为 MS+5%椰子乳+6-BA 0.5+NAA 0.01 的长至 3~5 cm 的健壮,叶色浓绿的丛生芽基部切下(不带有愈伤组织),单株地转入生根培养基中。在生根的过程中,部分植株有少量的不定芽分化,且生根率偏低,可能是增殖阶段 6-BA 浓度用量过高,而没有在 1/2MS 培养基进行过渡培养。

2.3.1 无机盐浓度对钙果生根的影响

表 5 的试验表明,植株在培养基(6)上比在培养基(5)上提前生根 1 d,且生根率高,为 40.2%,根的生长快,根粗细均匀。所以采用 1/2MS 比 MS 更有利于生根培养,即低质量浓度的无机盐有利于生根。

表5 无机盐浓度对钙果生根的影响

| 无机盐 | NAA /mg/L | 生根时间/d | 生根率 /% | 平均根数 | 平均根长/cm |
|-------|-----------|--------|--------|------|---------|
| MS | 0.01 | 11 | 28.1 | 0.47 | 0.78 |
| 1/2MS | 0.01 | 10 | 40.2 | 0.50 | 0.98 |

注:生根培养后第 25 d 的统计结果。

技术开发

2.3.2 IBA 的质量浓度对生根的影响

采用培养基(7),从表 5、6 可以看出,IBA 和 NAA 都为 0.1 时,IBA 的生根率虽不及 NAA,但平均根长长,生根快(比 NAA 0.1 早 1 d),从促进生根的存活性考虑,IBA 较优于 NAA,从而选用了 IBA 作为钙果的生根剂。

表 6 IBA 的质量浓度对钙果生根的影响

| 培养基 | IBA/ mg/L | 接种数 | 生根时 间/d | 生根 率/% | 平均每 株根数 | 平均根 长/cm |
|----------------------------|--------------|------|------------|-----------|------------|-------------|
| 1/2MS + 1% 椰子乳 + IBA | 0.1 | 32 | 9 | 39.2 | 0.57 | 1.12 |
| | 1.0 | 32 | 9 | 43.8 | 0.69 | 2.33 |
| | 1.5 | 50 | 8 | 44.0 | 0.64 | 2.47 |
| | 2.0 | 49 | 8 | 36.7 | 0.57 | 2.56 |
| | 2.5 | 74 | 7 | 62.3 | 1.22 | 2.59 |
| | 3.0 | 32 | 9 | 40.6 | 0.63 | 2.03 |
| | 3.5 | 41 | 9 | 31.7 | 0.39 | 1.90 |
| | 9.0 | 45 | 9 | 38.9 | 0.61 | 0.75 |
| | 0.65 | 10.0 | 45 | 10 | 30.8 | 0.92 |

注:生根培养后第 25 d 的统计结果。

从表 6 可以看出,IBA 的浓度在 1.0 ~ 3.0 mg/L 范围内,无论是生根率、根长、平均根数都较好;特别是 IBA 2.5 mg/L 时,植株生根率最高,达到 62.3%,平均根长为 2.56 cm,植株生长较健壮,根粗细均匀。所以钙果最佳的生根培养基是 1/2MS+1% 椰子乳+IBA 2.5。可知,IBA 浓度 > 3.0 或 < 1.0 都不利于钙果的生根,根粗而短,栽植时不易成活。

2.3.3 椰子乳对钙果生根壮苗的影响

在培养基 1/2MS+IBA 0.5 上分别加椰子乳 1%、0% 进行培养 25 d 时结果如表 7。结果表明:有椰子乳培养的钙果生根苗生根率较大,达到 39.6%,根粗细均匀,较壮。没加椰子乳的生根小苗部分叶片顶部变黄,植株有明显老化的现象。

表 7 椰子乳对钙果生根壮苗的影响

| 椰子乳/% | 接种数 | 生根率/% | 平均根数 | 平均根长/cm |
|-------|-----|-------|------|---------|
| 1 | 38 | 39.6 | 0.54 | 2.12 |
| 0 | 38 | 22.8 | 0.40 | 1.89 |

注:生根培养后第 25 d 的统计结果。

2.4 移栽

将生根苗培养 30 d 达到移植标准的生根苗移到室外炼苗 3 ~ 4 d,移栽前 3 d 打开瓶盖。移栽基质为:1/3 园土+1/3 椰糠+1/3 珍珠岩,移栽前基质要用水浇透,搭遮阴网。移栽后 1 ~ 3 周,每天喷水 5 ~ 6 次,阴雨天可减少喷水次数,空气相对湿度保持在 60% ~ 80%,温度高于 35℃,易发生烂苗。移栽后 4 ~ 5 周,植株长出新叶后,减少遮阳网,进行常规的管理,成活率达 70%。

3 结语

(1)钙果具有很好的食用、药用、美化环境、盆栽观赏、退耕还林等特点,具有很高的经济效益。快繁技术取得成功,扩大了钙果种苗的数量,可使此树种能大量推广到生产中,特别是我国乃至全世界的干旱地区。

(2)在钙果的组培快繁过程中,茎段对 6-BA 的反应极为敏感,从诱导愈伤组织到丛生芽的分化继代中,都要求较低的 6-BA (< 1.0 mg/L),稍高就表现出长势受到抑制,侧芽枝条过于纤细且密集。另外,在培养过程中还表现出 6-BA 累积现象,特别是要生根培养时,由于没有在 1/2MS 培养基上进行过渡培养,有少量的不定芽分化出来。因此,随着继代次数的增多,培养基中的 6-BA 水平应降低,以免出现侧芽畸形、组培苗瘦弱及影响生根等情形。

(3)根据连续继代培养的统计结果,侧芽在 MS+5% 椰子乳+6-BA 0.5+NAA 0.01 培养基上增殖系数(15 d)为 7.2 倍,按此计算,一个无菌苗经过 60 d(继代 4 次),可获得 207 个新芽。由此可见,快繁速度远远超过常规育种。在生根培养时,生根率偏低,这和木本植物生根难有关,再加上在生根前没有进行壮苗处理。在快繁的全过程中,都采用了椰子乳作为添加剂,长势很好。

参考文献

- [1]吴广宇,杨玲玲.大叶黄杨带腋芽茎段组织培养研究[J].安徽农业科学,2005(5):815,817.
- [2]周先容.叶子花的组织培养及快速繁殖研究[J].重庆师范学院学报:自然科学版,2003(3):48-49.
- [3]熊丽,吴丽芳.观赏花卉的组织培养与大规模生产[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [4]陈菁瑛,宋瑞琳,陈景耀,等.枳和枳橙的茎尖培养与增殖研究[J].福建农业学报,1991(1):53-59.

(责任编辑 周贤军)

