

4 种贵州樱桃的高效离体再生^①

宋常美¹, 文晓鹏²

1. 贵阳学院 生物与环境工程学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学 贵州省农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025

摘要: 通过探讨植物生长调节剂对试管苗增殖、壮苗及生根的影响, 建立了 4 种贵州樱桃的离体繁殖技术. 结果表明: 供试材料以 MS+1.5—2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA 增殖效果良好, 添加 1.0 mg/L GA 能明显促进增殖; 添加 0.5 mg/L GA 利于壮苗; NAA 最适合供试材料组培苗生根, 沿河樱桃和凯里樱桃生根培养基为 1/2 MS+1.0 mg/L NAA, 赫章樱桃和红水樱桃为 1/2 MS+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L GA.

关键词: 贵州; 樱桃; 植物生长调节剂; 离体再生

中图分类号: S662.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)09-0019-06

植物离体快繁具有占地少、不受环境影响等优点, 是种质资源保存和繁殖较为理想的方式, 亦可培养脱毒苗. 迄今为止, 樱桃离体快繁多为欧洲甜樱桃的报道^[1-4], 中国樱桃较少^[5-7], 且未见贵州樱桃相关报道, 即使是同一种植物, 品种不同, 离体繁殖的条件亦有所差别. 贵州为樱亚属植物起源中心之一^[8], 樱桃种质资源丰富, 是遗传改良的物质基础, 但由于生态环境不断地被破坏, 贵州樱桃种质资源流失严重^[9], 这极不利于贵州樱桃资源的开发利用, 急需对其进行保护. 此外, 贵州樱桃已出现了病毒感染情况, 需要培育脱毒苗. 因此, 本文探索了 4 种贵州樱桃的离体快繁体系, 旨在为其资源保存、脱毒苗生产和遗传改良奠定技术基础.

1 材料与方法

1.1 材料

以赫章县樱桃 *Prunus pseudocerasu* L. ‘Hezhang’、镇宁县红水樱桃 *Prunus pseudocerasu* L. ‘Hongshui’、沿河县野樱桃 *Prunus pseudocerasu* L. ‘Yanhe’及凯里市樱桃 *Prunus pseudocerasu* L. ‘Kaili’的茎段为材料, 均采自生长地.

1.2 方法

在当地采集生长健壮、无病虫害的枝条后去掉叶片, 插入瓶中, 以干净塑料袋包裹后尽快带回实验室, 将枝条切为 2 cm 左右的带芽茎段, 用洗洁精漂洗干净, 然后用清水冲洗; 接着用 70%酒精浸泡 30 s 后用 0.1%升汞+数滴吐温 80 灭菌 6~8 min(视材料而定); 再用无菌水清洗 5 次后在超净工作台上, 切除药液接触过的切口后接种在 MS(Murashige and Skoog)+1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-Benzylaminopurine, 简称 6-BA)+0.5 mg/L 吲哚丁酸(Indolebutyric acid, 简称 IBA)培养基上诱导萌发, 萌发后转入增殖培养基,

① 收稿日期: 2013-10-08

基金项目: 贵州自然科学基金联合基金项目(黔科合 J 字[2013]17); 贵州省自然科学基金项目(黔科合 J 字[2015]2007); 贵州省高校优秀科技创新人才支持计划(黔教科合 KY[2013]143).

作者简介: 宋常美(1981-), 女, 贵州遵义人, 博士, 副教授, 主要从事植物生物技术研究.

共设 21 个处理(表 1). 接着将生长至高 1 cm 以上的增殖苗转入添加不同种类[赤霉素(Gibberellin, 简称 GA)、吲哚乙酸(Indoleacetic acid, 简称 IAA)、IBA 和萘乙酸(1-Naphthaleneacetic acid, 简称 NAA)]和质量浓度(IAA,IBA 和 NAA 均为 0.5 mg/L, 同时添加 0.5 mg/L GA; GA 为 0,0.5,1.0 mg/L, 同时添加 0.5 mg/L IBA)植物生长调节剂的壮苗培养基进行壮苗培养. 最后将生长健壮的苗转入添加不同质量浓度 NAA(0,0.2,0.5,1.0,1.5 mg/L)的培养基进行生根培养. 以上每处理均接种 5 株, 重复 4 次. 将 3 cm 以上的组培苗洗净琼脂后, 以无菌砂质壤土为基质进行移栽, 随即浇透水分并喷施少量百分比为 0.1% 的百菌清, 30 d 后移植到大棚.

增殖的基本培养基为 MS, 其余为 1/2 MS. 壮苗培养基附加 30 g/L 蔗糖, 其余附加 20 g/L 蔗糖, 所有培养基均附加 7 g/L 琼脂和 2 g/L 聚乙烯醇, pH=5.8, 并经 121 ℃ 高压灭菌. 培养温度(25±2) ℃, 光强 33 μmol/m² · s, 光周期 14 h/d.

增殖培养 90 d 后统计数据, 其余 60 d 后统计数据, 增殖系数=培养后的芽数/原接种数, 生根率=生根苗数/原接种数×100%, 数据采用 DPS 7.05 软件分析.

表 1 植物生长调节剂对贵州樱桃组培苗增殖的影响

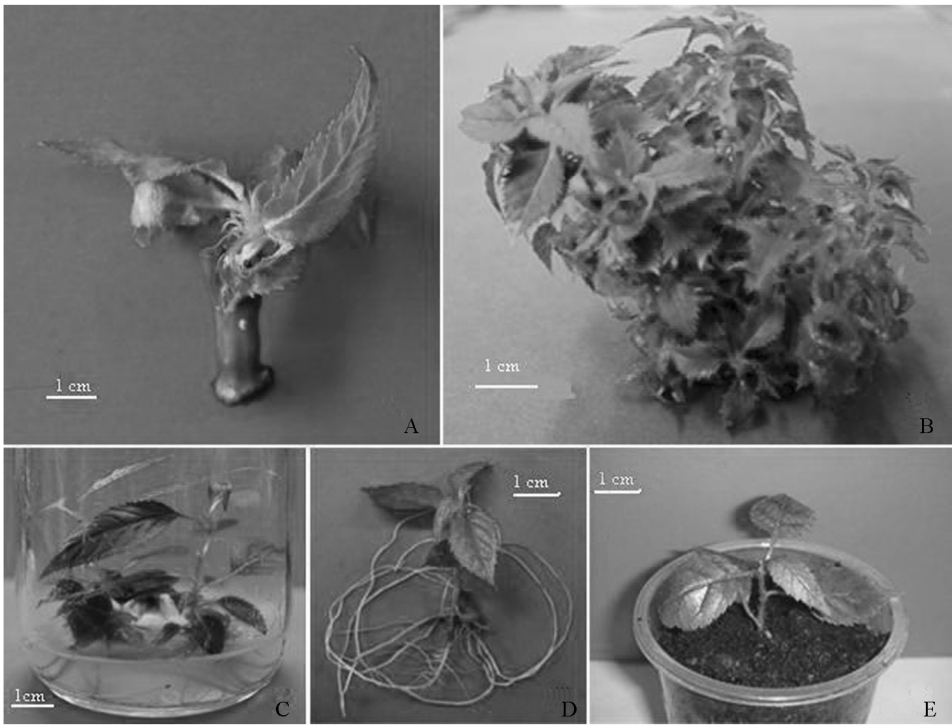
处理	植物生长调节剂质量浓度/(mg·L ⁻¹)							增 殖 系 数				备注
	BA	KT	TDZ	IBA	NAA	IAA	GA	赫章	红水	凯里	沿河	
细胞分裂素种类												
1	2.0			0.5			0.5	12.10±2.50a	5.95±1.25a	8.15±0.34a	6.50±0.62b	CTT
2		2.0		0.5			0.5	2.40±0.73b	3.15±0.41b	8.10±0.48a	7.85±0.70a	CTT
3			1.0	0.5			0.5	4.20±1.25b	4.10±0.42b	2.45±0.42b	3.25±0.34c	CTT
生长素种类												
4	2.0			0.5			0.5	11.00±2.50a	5.95±1.25ab	8.15±0.34a	6.50±0.62b	ATT
5	2.0				0.5		0.5	7.10±3.39b	4.85±0.75b	5.25±0.5b	8.10±0.58a	ATT
6	2.0					0.5	0.5	11.55±2.13a	7.00±0.76a	8.60±0.71a	5.55±0.44c	ATT
BA 质量浓度												
7	0			0.5			0.5	1.30±0.20e	2.70±1.06c	1.60±0.16c	2.95±0.57c	BCT
8	1.0			0.5			0.5	9.40±1.40c	5.50±0.95b	8.30±0.50a	11.35±1.71b	BCT
9	1.5			0.5			0.5	11.00±1.56bc	9.95±1.21a	7.90±0.38ab	17.85±6.62a	BCT
10	2.0			0.5			0.5	12.10±2.50a	5.95±1.25b	8.15±0.34ab	6.50±0.62bc	BCT
11	2.5			0.5			0.5	3.65±0.82d	5.30±1.36b	7.65±0.38b	9.20±3.96b	BCT
12	3.0			0.5			0.5	13.65±1.77a	6.75±0.66b	7.60±0.52b	7.90±0.53bc	BCT
IBA 质量浓度												
13	2.0			0			0.5	4.25±1.59c	2.35±0.62b	2.55±0.25d	3.20±0.28e	ICT
14	2.0			0.5			0.5	12.10±2.50a	5.95±1.25a	8.15±0.34a	6.50±0.62d	ICT
15	2.0			1.0			0.5	8.20±2.03b	5.10±1.63a	7.55±0.41a	8.55±0.72c	ICT
16	2.0			1.5			0.5	11.40±2.35a	5.00±1.48a	5.05±0.34b	10.50±0.62b	ICT
17	2.0			2.0			0.5	7.50±1.06b	3.00±0.43b	3.75±0.62c	12.55±0.68a	ICT
GA 质量浓度												
18	2.0			0.5			0	5.60±0.99d	4.95±0.44b	3.20±0.23c	3.50±0.74b	GCT
19	2.0			0.5			0.5	12.10±2.50a	5.95±1.25a	8.15±0.34b	6.50±0.62a	GCT
20	2.0			0.5			1.0	22.70±0.93a	9.05±0.70a	12.15±1.27a	7.40±0.82a	GCT
21	2.0			0.5			1.5	19.20±3.16b	8.75±1.66a	12.40±0.52a	7.35±0.60a	GCT

注 1: *CTT, 分裂素种类试验; ATT, 生长素种类试验; BCT, BA 质量浓度试验; ICT, IBA 质量浓度试验; GCT, GA 质量浓度试验.
注 2: 同列内相同字母表示经邓肯氏多重极差检验在 0.05 水平上差异不具有统计学意义.
注 3: TDZ(苯基噻二唑基脲, 英文名 Thidiazuron); KT(激动素, 英文名 Kinetin).

2 结果与分析

2.1 无菌系的建立

4 种樱桃茎段接种约 15 d 开始萌发, 20 d 萌发良好, 色绿叶大茎粗(图 1A), 30 d 萌发数不再增加; 4 种樱桃萌芽率差别不大, 均在 70%左右, 以安顺樱桃最高, 达 78%, 赫章樱桃最低, 仅 61%; 4 种樱桃污染率差别较大, 凯里樱桃最高达 48%, 安顺樱桃最低仅 27%(图 2).



A. 茎段外植体萌发; B. 增殖; C. 壮苗; D. 生根试管苗; E. 移栽.

图 1 贵州樱桃的离体再生

2.2 试管苗增殖

生长调节剂种类和质量浓度对试管苗增殖影响大. 由表 1 可见, 本文中 4 种樱桃苗多数在基本培养基添加 IBA,BA 和 GA 时表现优异, 增殖系数高(表 1), 色浓绿, 茎粗长(图 1B), 而在 TDZ 上增殖系数较低, 长势差. 实验中发现, 在添加 GA,IBA 和 BA 后, 赫章樱桃及红水樱桃生根较多, 凯里樱桃及沿河樱桃极少生根, 而 IAA 上均无根. 综合考虑 4 种樱桃的增殖培养基如下: MS+2.0 mg/L BA+0.5 mg/L IBA+1.0 mg/L GA(赫章樱桃和凯里樱桃); MS+1.5 mg/L BA+0.5 mg/L IBA+1.0 mg/L GA(红水樱桃); MS+2.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L GA(沿河樱桃).

2.3 试管苗壮苗

本文中, 4 种樱桃壮苗均需添加 GA, 否则效果不理想, 0.5 mg/L GA 便能促进壮苗, 苗高色浓绿, 茎较粗壮(图 1C). 实验中发现, 赫章樱桃和红水樱桃与增殖时的表现一样, 添加 GA 后有大量生根, 但凯里

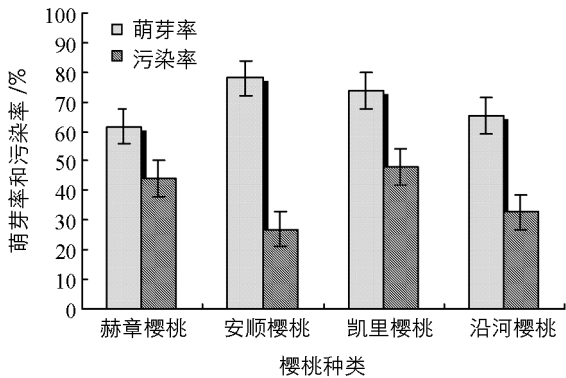
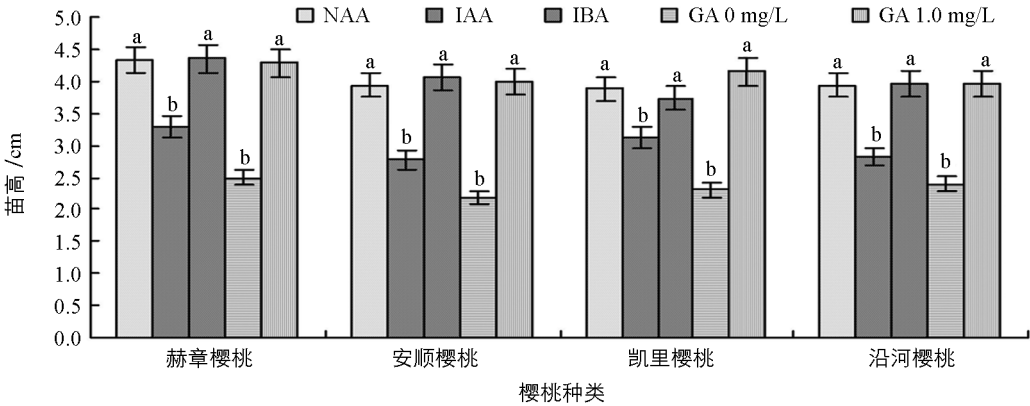


图 2 4 种樱桃外植体萌芽率和污染率

樱桃和沿河樱桃生根较少. 生长素类以 IBA 及 NAA 为好(图 3), 苗生长高度均可达 4 cm 左右, 色浓绿, 茎较粗壮(图 1C). 综合考虑 4 种樱桃壮苗培养基均为 1/2 MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L GA.

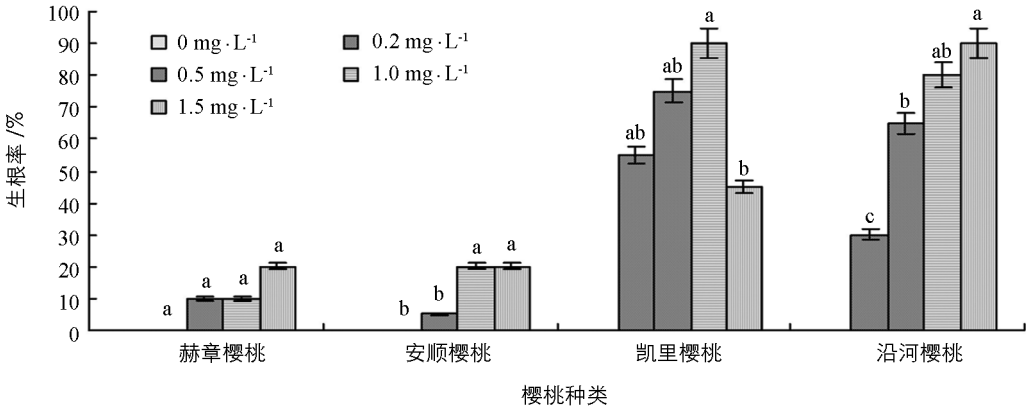


柱上相同字母表示经邓肯氏多重极差检验在 0.05 水平上差异不具有统计学意义.

图 3 植物生长调节剂对 4 种樱桃壮苗的影响

2.4 试管苗生根

木本植物组培苗生根困难, 甚至试验材料品种不同, 对生长调节剂的反应也不一样. 本文中, 4 种樱桃虽然都以较高质量浓度 NAA(≥ 1.0 mg/L)为好, 但亦有差别. 凯里樱桃和沿河樱桃单独使用一定量的 NAA 就可获得较高生根率, 分别在 1.0 mg/L(90%)和 1.5 mg/L(95%)时生根率最高(图 4), 生根数约 2~7 条, 根长约 1~7 cm(图 1D); 而赫章樱桃和红水樱桃任何质量浓度下生根率都低, 最高仅 20%(图 4), 结合前面二者增殖、壮苗的表现可知, 其生根需要 GA 参与. 因此, 4 种樱桃生根培养基为 1/2 MS+1.0 mg/L NAA(凯里樱桃); 1/2 MS+1.5 mg/L NAA(沿河樱桃); 1/2 MS+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L GA(赫章樱桃); 1/2 MS+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L GA(红水樱桃).



柱上相同字母表示经邓肯氏多重极差检验在 0.05 水平上差异不具有统计学意义.

图 4 NAA 质量浓度对 4 种樱桃生根的影响

2.5 试管苗移栽

将腐殖土与园土按 1 : 1 配比, 并喷施百分比为 0.1% 的百菌清溶液混匀分装至一次性水杯作为移栽基质, 移栽前打开瓶盖, 室温下炼苗 3 d 后将苗上培养基清洗干净栽植, 浇透水后盖上一次性塑料杯, 7 d 后摘去塑料杯, 置于通风干燥处培养, 1 个月后移栽成活率均可达 100%(图 1E).

3 讨 论

3.1 组培苗增殖

植物生长调节剂是影响无菌苗增殖的重要因素, 尤其以细胞分裂素的影响最大. TDZ 虽然被认为是包

含李属在内的许多木本植物离体植株茎尖形成及形态发生的最有效物质, 但本实验发现, 供试 4 种樱桃均以 BA 增殖系数最高, 而 KT 和 TDZ 相对较次, 尤其在赫章樱桃上表现为甚. 笔者曾以为 1.0 mg/L TDZ 质量浓度过低或过高, 因而使用 0.5 mg/L 及 1.5 mg/L 进行试验, 亦不能获得较好结果, 低质量浓度下增殖少, 高质量浓度下节间缩短, 苗小畸形, 与 Pruski 等^[10]在蒙古樱桃和南京樱桃上发现高质量浓度 TDZ 使苗矮小畸形的结论一致, 这种现象在许多木本植物上亦有发现. 不同樱桃品种对 BA 的质量浓度反应不一样, 本文中沿河樱桃最为敏感, 这可能与樱桃内源激素质量浓度的高低及比例有关, 沿河樱桃在采集时就发现其生长旺盛, 分支多. 4 种樱桃在高质量浓度 BA 上增殖的丛芽较多, 但不具有明显的节间, 且部分苗有一定的玻璃化现象, 与高质量浓度 TDZ 使苗矮小的现象相似, 说明细胞分裂素与生长素比例较大使组培苗节间缩短, 这在欧洲野樱桃^[11]、蒙古及南京樱桃^[10]等上亦有相同结论.

本实验发现 GA 能明显促进樱桃组培苗增殖, 4 种樱桃均以 1.0 mg/L 时最好, 质量浓度较高后易产生玻璃化苗. GA 能促进增殖与其能促进节间生长的作用密不可分, GA 可促进 IAA 的生物合成和转运, 并刺激形成层的生长^[12], 因而使得组培苗节间生长. GA 不仅能促进增殖, 同时促进赫章樱桃和安顺樱桃生根, 这样在增殖培养的阶段就可将部分生根的组培苗直接用于移栽, 节省了壮苗生根的时间, 可使繁殖效率得以提高.

3.2 组培苗生根

木本植物组织培养生根困难, 樱桃也是一种生根困难的植物^[2]. 虽然樱桃组培苗生根以 IBA 使用广泛^[3], 但本文认为 NAA 最适合贵州樱桃组培苗生根, 且质量浓度较高为好, 其次是 IBA, IAA 几乎不能诱导生根. 据报道, 蒙古樱桃加入少量 NAA 后可提高生根率^[10]; 甜樱桃 Vista, Heidelfingen 和 Vogue 均以 NAA 上生根率高于 IBA^[2]. 本文还发现, 赫章樱桃和安顺樱桃在仅含生长素的培养基上生根困难, 1.5 mg/L NAA 上的生根率仅为 20%, 而加入 0.5 mg/L GA 后生根率可达 60% 以上, 说明 GA 能促进樱桃生根, 与 Ford 等^[12]利用 GA 处理组培苗后使生根率从 37% 上升到 80% 的结论一致. 究其原因, 可能是 GA 抑制樱桃开花, 使其转为营养生长, 这是樱桃嫩化的标志, 而处于幼年期的植株比老龄期的植株更易生根^[13].

参考文献:

- [1] 吴雅琴, 程和禾, 刘国俭, 等. 基因型和采样时期对甜樱桃体细胞胚胎发生的影响 [J]. 河北农业科学, 2008, 12(11): 33—35.
- [2] CANLI F A, TIAN L. In Vitro Shoot Regeneration from Stored Mature Cotyledons of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 116(1): 34—40.
- [3] LIU X M, PIJUT P M. Plant Regeneration from in Vitro Leaves of Mature Black Cherry (*Prunus serotina*) [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2008, 94(2): 113—123.
- [4] PESCE P G, RUGINI E. Influence of Plant Growth Regulators, Carbon Sources and Iron on the Cyclic Secondary Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Transgenic Cherry Rootstock ‘Colt’ (*Prunus avium* × *P. pseudocerasus*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 79(2): 223—232.
- [5] 魏海蓉, 刘庆忠, 艾呈祥, 等. 中国樱桃泰山干樱的组织培养及植株再生研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(1): 39—41.
- [6] 赵彦杰. 莱阳矮樱桃的离体培养技术研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 115—116.
- [7] 郑巧娜, 陈学森, 焦其庆, 等. 中国樱桃泰小红樱的组培快繁研究 [J]. 山东农业科学, 2011(6): 20—23.
- [8] 曹东伟. 李属樱亚属植物分子亲缘地理学研究 [M]. 西安: 西北大学, 2006.
- [9] 李金强, 吴亚维, 袁启凤. 贵州樱桃种质资源调查初报 [J]. 贵州农业科学, 2009, 37(3): 126—128.
- [10] PRUSKI K, ASTATKIE T, NOWAK J. Tissue Culture Propagation of Mongolian Cherry (*Prunus fruticosa*) and Nank-

ing Cherry (*Prunus tomentos*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 82(2): 207—211.

[11] DURKOVIĆ J. Rapid Micropropagation of Nature Wild Cherry [J]. Biologia Plantarum, 2006, 50(4): 733—736.

[12] FORD Y Y, TAYLOR J M, BLAKE P S, et al. Gibberellin A3 Stimulates Adventitious Rooting of Cuttings from Cherry (*Prunus avium*) [J]. Plant Growth Regulation, 2002, 37(2): 127—133.

[13] OLIVEIRA C M, BROWNING G. Gibberellin Structure-Activity Effects on Flower Initiation in Mature Trees and on Shoot Growth in Juvenile and Mature *Prunus Avium* [J]. Plant Growth Regul, 1993, 13(1): 55—63.

Highly Efficient *in vitro* Regeneration of Four Cherry Lines in Guizhou via Organogenesis

SONG Chang-mei¹, WEN Xiao-peng²

1. College of Biological and Environmental, Guiyang University, Guiyang 550025, China;

2. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: In the current work, the influences of plant growth regulators on the multiplication, growth vigor and root formation of test tube plantlets of four cherry (*Prunus pseudocerasu* L.) lines from Guizhou Province were investigated, and an optimized efficient *in vitro* regeneration system for them was established. The result showed that MS+1.5—2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA was best for bud multiplication of the tested lines, the addition of 1.0 mg/L GA significantly promoted multiplication, and 0.5 mg/L GA was most suitable for the growth vigor of the *in vitro* shoots. NAA gave the best result for root formation. 1/2MS+1.0 mg/L NAA was best for root formation of lines Yanhe and Kaili. However 1/2MS+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L GA was essential for root induction in lines Hezhang and Hongshui.

Key words: Guizhou; *Prunus pseudocerasu* L.; plant growth regulator; *in vitro* regeneration

责任编辑 夏 娟

