

欧李组培快速繁殖体系的建立*

陈书明¹ 姜英淑² 王秋玉¹

(1. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 北京市林业局种苗站, 北京 100027)

摘要: 以欧李4个品种的茎尖为外植体, 1/2MS和MS为基本培养基, 初步建立了欧李试管苗的组培快速繁殖体系, 其最佳的初代培养基是MS+0.1 mg/L NAA+1.0mg/L 6-BA和MS+0.4mg/L NAA+1.0mg/L 6-BA, 最佳的增殖培养基是MS+0.2mg/L NAA+0.8mg/L 6-BA和MS+0.2mg/L NAA+0.6mg/L 6-BA+0.05 mg/L PP₃₃₃, 并分别确定了最好的生根培养基。

关键词: 欧李; 茎尖; 组织培养

中图分类号: S 662.5, S 603 **文献标识码:** A

欧李 (*Cerasus humilis*) 别名钙果, 属蔷薇科樱桃属^[1], 是我国特有的一种极矮的落叶灌木, 主要分布在我国的北部地区。欧李花期长, 外形美观, 有极高的观赏价值。其栽培品种的果实中含有丰富的营养成分, 是一种高级保健水果^[2]。其根、种子可以入药, 茎和叶是牛羊的好饲料。欧李特别耐旱、抗寒、耐贫瘠、根系发达 (根冠比为9:1), 还具有“根茎一体化”特征^[3], 是绿化荒山、改良土壤、治理水土流失不可多得的树种。欧李多为异花授粉, 种子育苗变异系数大, 扦插受季节的影响强, 因此, 组织培养是达到商业化生产的较好途径。本研究以4个欧李品种为材料, 采用组织培养技术对其进行繁殖, 探讨不同品种组培快速繁殖体系的差异, 并筛选出最佳的繁殖体系, 以期为欧李工厂化育苗及未来大面积推广种植奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料由北京市林业分局种苗站提供, 2006年初移栽在东北林业大学林木育种基地, 共4个品种, 它们分别是“唐山”、“农大4号”、“黄山店”和“九渡河”。2007年4月份从4个品种上截取嫩枝作为试验材料, 长度为5~6cm。

1.2 培养基配方

外植体启动和扩繁时期是以MS为基本培养基, 生根培养采用1/2MS、MS和WPM3种培养基。在各种培养基内附加不同种类和浓度的植物激素, 以筛选最优的培养基配方。培养基中蔗糖用量为30g/L、琼脂5.5g/L, pH5.8~6.5。

1.3 茎尖处理

将嫩枝清洗干净, 去掉其上的所有叶片, 只留顶芽, 然后用流水冲洗30 min。将冲洗干净的嫩枝先在75%的酒精溶液中浸30s, 用无菌水冲洗1次; 再放入10%的次氯酸钙溶液中浸泡10min, 无菌水浸泡3次, 每次10s^[4]。

1.4 培养条件

培养室温度18~23℃, 光照强度1500~3000Lx, 光照14h/d。

1.5 试验方法

1.5.1 茎尖分生组织启动培养

将经过消毒处理的茎尖放到铺有滤纸的无菌培养皿中切成2~3cm的茎段, 接种在附加不同浓度NAA和6-BA组合的MS启动培养基上。启动培养基激素配比见表1。

1.5.2 增殖培养基的筛选

茎段接种15天后形成展叶枝, 25天后剪成

* 项目来源: 欧李优良新品种选育及综合利用配套技术开发 (2006-38)

1~2cm的茎段(至少带有3个节),并接种于补充不同种类和浓度植物激素的MS培养基上增殖,其激素配比见表2。

1.5.3 生根培养基的筛选

当增殖的幼苗长到一定程度时,剪取长度为3~5cm的新梢,去除基部叶片,接入生根培养基上,先在黑暗条件下培养10~15天,然后进行光下培养。生根培养基激素配比见表3。

2 结果与分析

2.1 植物激素对茎尖分生组织启动培养的影响

接种3天后,可以看到外植体基部有愈伤组织出现,顶芽开始生长;5~7天后侧芽开始萌发;8~20天,试管苗快速生长;20天后生长缓慢。顶端保留5~6片叶的试管苗生长快,少于3个叶片时幼苗生长缓慢,并且容易造成顶芽死亡。

试验结果(表1)表明,当6-BA浓度为1mg/L时,随着NAA浓度的增大,欧李的萌动期没有太大变化,但是萌芽率递减。从生长情况来看,1.0mg/L 6-BA和0.1mg/LNAA组合的效果较好。因此,最佳的启动培养基是MS+0.1mg/L NAA+1.0mg/L 6-BA。不同品种在萌动期上虽稍有变化,但萌芽率没有明显变化。

表1 植物激素对顶芽萌动的影响

试验组	激素/mg·L ⁻¹		萌动期/d	萌芽率/%
	NAA	6-BA		
1	0.00	1.0	3	100
2	0.10	1.0	2	100
3	0.25	1.0	2	92
4	0.40	1.0	2	50

2.2 植物激素对试管苗增殖的影响

材料转入增殖培养基3天后,基部有少量愈伤组织形成;5~7天在基部形成丛生芽;10~20天丛生芽快速生长,此后试管苗生长速度减慢。在增殖培养过程中,虽然有些培养基组合可以使增殖倍数高达7~10倍,但芽通常细弱、质量差,继代培养或生根培养不能使用,从而使实际的增殖倍数下降。除了植物激素能影响嫩梢增殖倍数外,瓶内的空间和营养成分也能影响其增殖倍数,如果一个瓶内接种数大于3株,增殖出来的苗就会徒长、细弱、发黄。所以,一个瓶内接种数最

好在3个以下。

表2 植物激素对试管苗生长的影响

试验编号	激素/mg·L ⁻¹			生长情况	增殖倍数
	NAA	6-BA	PP ₃₃₃		
1	0.04	0.4	0	苗细弱,长势不均匀,叶小而黄	2.1
2	0.08	0.4	0	苗细弱,长势不均匀,叶小嫩绿	3.4
3	0.05	0.25	0	苗细弱,长势不均匀,叶片大、发黄,玻璃化	1.7
4	0.05	0.25	0.05	苗粗壮,长势不均匀,叶片大、浓绿,玻璃化	2.5
5	0.1	0.2	0	苗细,叶片较小、嫩绿	2.7
6	0.1	0.8	0	苗多徒长,叶片稀疏,嫩绿	2.9
7	0.2	0.2	0	苗长势不均匀,叶嫩绿	3.1
8	0.2	0.6	0.05	苗粗壮,叶片较小,叶浓绿	5.3
9	0.2	0.8	0	苗长势不均匀、细弱、徒长,叶片稀疏、绿	6.1
10	0.2	1.0	0	苗细弱、徒长、叶片稀疏、绿,玻璃化	5.2
11	0.3	1.0	0	苗弱、徒长、叶片稀疏、绿,玻璃化	5.0

试验结果(表2)表明,最佳的增殖培养基是MS+0.2mg/L NAA+0.8mg/L 6-BA和MS+0.2mg/L NAA+0.6mg/L 6-BA+0.05mg/L PP₃₃₃。虽然前者比后者的增殖倍数大,但苗的质量没有后者好。当6-BA浓度一定时,随着NAA浓度的增加,欧李苗逐渐转绿。当NAA浓度一定时,随着6-BA浓度的增加,增殖倍数逐渐加大。随着芽数的增加,苗有徒长现象。当6-BA浓度达到1.0mg/L时,虽然形成芽的数量逐渐增多,但是每个芽的生长受到限制,导致继代培养时可用苗数减少。当6-BA浓度高达1.0mg/L或者6-BA与NAA比例超过5:1时,均出现玻璃化现象。当其他激素浓度一定时,增加0.05mg/L的PP₃₃₃能使苗木长的粗壮、浓绿,起到壮苗的效果。在增殖培养时期,不同品种的最佳增殖培养基虽不完全一致,但只有细微的差别,而嫩梢增殖所要求的植物激素条件基本相同。所以,在商业化生产过程中,不同的品种可采用同一种增殖培养基。

2.3 不同培养基对欧李试管苗生根的影响

不同的欧李品种,在组织培养过程中所用启动培养基和增殖培养基几乎没有差别,但生根培养基则有较大的区别。由表3可以看出:(1)唐山品种的最佳生根培养基是1/2MS+0.6mg/L IBA+0.05mg/L PP₃₃₃,虽然1/2MS+0.4mg/L IBA+0.25mg/L PP₃₃₃培养基的生根率更高,但苗的质量和生根质量不如前者。在本试验组合条件下,生长在MS培养基上苗木要比生长在1/2MS培养基上的好,但是生根情况不如1/2MS。对1/

2MS培养基来说, 加入 PP₃₃₃后生根率有明显的提高。随着 IBA 浓度的增加, 苗逐渐变黄; 随 NAA 浓度的增加, 根长势逐渐好转, 但 NAA 浓度达到 0.8mg/L 时, 生长点就会死亡。(2) 九渡河品种的最佳生根培养基是 1/2MS + 4.5 IAA + 0.05 PP₃₃₃。生长在 1/2MS 培养基上的苗要比 MS 培养基上的长的好。随着 IAA 浓度的增加, 生根率逐渐提高, 但生根质量没有明显改观。(3) 黄山店品种的最佳生根培养基是 MS + 4.0 mg/L NAA。生长在 WPM 培养基上的苗的生根率要比 MS 培养基上的高, 但是苗生长缓慢、生长点死亡, 且移栽之后, 很难启动芽的萌发。在 MS 培养基里, 随

着 NAA 浓度的增加, 生根数有明显的增加, 但根的质量在 NAA 浓度为 3.0mg/L 时最好。(4) 农大 4 号的最佳生根培养基是 MS + 3.0 mg/L NAA。虽然 WPM + 3.5 mg/L IAA 和三种 MS 培养基没有明显区别, 但是在生根质量上, MS + 3.0 mg/L NAA 培养基要优于其他培养基, 并且 WPM 培养基上的苗木长势普遍没有 MS 培养基上的好。随着 IAA 浓度的增加, 农大 4 号的生根率逐渐提高, 但浓度过高, 其生长受到影响, 当 IAA 的浓度升高到 3.0mg/L 时, 根褐化, 在 3.5mg/L 时, 生长点死亡。NAA 与 IAA 混合使用能明显提高生根率。

表 3 4 种欧李生根培养基配方及生根情况

欧李品种	培养基	激素/mg · L ⁻¹				生根情况		
		IBA	NAA	IAA	PP333	生长情况	生根率/%	
唐山	1/2MS	0.4			0.10	苗生长较好, 根粗	36	
	1/2MS	0.4			0.25	苗生长缓慢, 根粗长	83	
	1/2MS	0.6			0.05	苗生长好, 根生长状态好	79	
	1/2MS	0.6				苗发黄, 根细弱,	15	
	1/2MS	0.8			0.10	苗发黄, 根生长状态好	50	
	1/2MS		0.1	3.0		苗发黄, 根细长	52	
	1/2MS			3.0		苗发黄, 根细长	42	
	MS		0.2			苗长势弱, 根细弱	50	
	MS		0.6			苗长势好, 根粗细适中	71	
	MS		0.8			苗生长点死亡, 根生长状态好	42	
九渡河	MS			1.0	0.05	苗发黄, 根细小	63	
	MS				1.2	0.05	苗黄, 根细	50
	1/2MS				1.5	0.05	苗长势好, 根系少	25
	1/2MS				2	0.05	苗长势好, 多为须根	31
	1/2MS				4	0.05	苗生长好, 根少、分叉	30
	1/2MS				4.5	0.05	苗长势好, 根多、分叉	50
黄山店	MS		2			苗生长好, 根细	38	
	MS		3			苗生长好, 根生长状态好	30	
	MS		4			苗生长好, 根多、为须状	83	
	WPM		0.1	2.0		苗生长点死亡, 根生长好	98	
	WPM		0.1	3.0		苗生长点死亡, 根生长好	89	
农大 4 号	MS		2			苗生长好, 根系少	48	
	MS		3			苗生长好, 根系多, 有须根	48	
	MS		4			苗生长好, 根系多、粗	50	
	WPM		0.1	2.0		苗生长缓慢, 根系少	50	
	WPM			2.0		苗长势弱, 根系少	18	
	WPM			3.0		苗生长缓慢, 根系多、褐化	72	
	WPM			3.5		苗生长点死亡, 根系多、褐化	79	

2.4 炼苗与移栽

将试管苗从组培室转移到温室内锻炼2~3天,然后打开培养瓶盖,加入适量的蒸馏水^[7],炼苗7天左右移出试管苗,洗掉根际培养基,移栽到消毒的通透良好的培养土中培养,保持温度20~25℃,湿度80%左右,2周后逐渐放宽培养条件。1个月后带土团移栽到育苗器中,浇透水,并用0.1%多菌灵喷雾消毒,并加入少量的尿素,以加快苗木生长,以后每隔7天喷1次灭菌剂。这样在室内生长1个月后,便可移入田间。

3 结论与讨论

3.1 欧李挂果几年后,原来的枝条逐渐老化死掉,并在近根部重新萌发新枝,致使嫁接树不能保持接穗品种的连续生产。而扦插、压条、分株等方法的成活率低、繁殖慢。因此,采用组织培养手段,建立快速繁殖体系,既可获得健壮的欧李苗,也能保证后代的品种特性。

3.2 关于欧李的幼茎组织培养,以往的研究均用一个品种材料为研究对象^[8],但因取材时间不同和培养条件不一样,培养基配方会有一定的差异。本研究以4个欧李品种为研究材料,发现不同品种在诱导芽的分化时培养基没有差异,而生根则要求不同的培养基。因此,找出不同品种组培过程中的共性和差异,将更有利于工厂化生产的需求。

3.3 在欧李组培苗增殖培养和生根培养过程中,苗木会出现黄化现象,但4个品种出现的时间不一样,其原因尚有待进一步研究。在增殖培养阶段,如果6-BA含量过高,苗会出现玻璃化。在

继代培养时不加或少加(少于原来的1/2)6-BA,试管苗会逐渐脱玻璃化,重新长出鲜绿的叶和较粗壮的茎,这与孙新政^[10]等人的研究结果一致。

3.4 本人认为,在欧李组织培养过程中,能够诱导欧李分化的培养基种类和激素浓度相对较宽,但生根时对激素浓度的要求则比较严格,因此,对生根培养基配方的筛选就显得十分重要。

参考文献

- [1] 俞德浚. 中国果树分类学 [M]. 北京: 农业出版社, 1982.
- [2] 曹琴, 杜俊杰, 刘和, 等. 野生欧李营养特性分析 [J]. 中国野生植物资源, 1999, 1 (18): 34-35.
- [3] 奥小平. 欧李的生态特性与栽培技术 [J]. 山西林业科技, 2006, 3 (1): 7-9.
- [4] 潘瑞焱. 植物组织培养 [M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2003.
- [5] 曹改义. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2003.
- [6] 钟士传, 刘琳. 欧李试管苗生根与移栽技术的研究 [J]. 西北农业学报, 2005, 14 (4): 86-88, 109.
- [7] 张东方. 植物组织培养技术 [M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2004.
- [8] 赵玉君, 杜俊杰. 欧李的组织培养 [J]. 山西农业科学, 1997, 25 (3): 65-67.
- [9] 朱道圩. 多效唑对大花高代组培苗生长的效应 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42 (2): 232-234.
- [10] 孙新政, 申顺先, 李庆伟, 等. 钙果4号欧李组织培养技术研究 [J]. 果树学报, 2007, 24 (1): 80-83.

第1作者简介: 陈书明 (1980-), 女, 东北林业大学遗传学科硕士研究生。

收稿日期: 2007-12-12

Establishment of Rapid Propagation System of *Cerasus humilis* by Tissue Culture

CHEN Shuming

(Northeast Forestry University, Heilongjiang Harbin 150040)

Abstract Take 4 species of young stem of *Cerasus humilis* as explant, and 1/2MS, MS as culture medium. Rapid propagation system of *Cerasus humilis* by tissue culture was set up. The results showed that the optimal medium for primary culture was MS + 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA and MS + 0.4 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA. The optimal medium for proliferation were MS + 0.2 mg/L NAA + 0.8 mg/L 6-BA and MS + 0.2 mg/L NAA + 0.6 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L LPP₃₃₃. And the best culture medium has been defined respectively.

Key words *Cerasus humilis*; Young stem; Tissue culture