

欧李茎尖分生组织培养与快速繁殖技术研究

王正德, 庞发虎

(南阳师范学院生物系, 河南 南阳 473000)

摘要: 以欧李茎尖分生组织为外植体, 研究了在培养基中添加不同的激素成分及不同浓度对不定芽诱导、继代增殖和生根培养的影响。结果表明: 不定芽诱导的最佳培养基是 MS + 6-BA 0.4 mg/L + IAA 0.5 mg/L; 增殖培养的最适培养基为 MS + 6-BA 0.3 mg/L + IAA 0.4 mg/L; 最佳生根培养基是 2/3MS + IAA 0.5 mg/L。应用症状诊断和指示植物鉴定法进行病毒检测, 平均脱毒率为 73%。

关键词: 欧李; 组织培养; 脱毒; 快速繁殖

中图分类号: S662.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)09-0097-03

Technology System for Stem-apex Meristem Culture and Rapid Propagation of *Prunus humilis*

WANG Zheng-de, PANG Fa-hu

(Biological Department of Nanyang Normal College, Nanyang 473000, China)

Abstract: The influences of the factors such as composition and concentration of hormones in culture medium upon adventitious bud induction, shoot proliferation and rooting were studied with the stem-apex meristem of *Prunus humilis* as explant. The results showed that the optimum medium for adventitious bud regeneration was MS + 6-BA 0.4 mg/L + IAA 0.5 mg/L; the best culture medium for shoot proliferation was MS + 6-BA 0.3 mg/L + IAA 0.4 mg/L; the proper culture medium of rooting was 2/3MS + IAA 0.5 mg/L. And the average virus-free rate was 73% based on the semiological diagnosis and plant indicator identification.

Key words: *Prunus humilis*; Tissue culture; Virus-free; Rapid propagation

欧李(*Prunus humilis* Bunge.) 俗称山樱桃, 属蔷薇科李亚科李属(*Prunus*) 落叶小灌木, 原产我国, 在东北、华北等地区 13 个省市均有分布^[1~3]。欧李株高 0.5~1.5m; 早春开花, 白色至淡红色, 状似樱花; 果实红色, 近球形。整株株型优美, 可作庭院和路旁绿化观赏植物。其果实营养丰富, 酸甜可食, 含有人体所必需的多种营养物质和微量元素, 近年来发现, 其钙和铁的含量居所有水果之冠。据测定, 每 100g 果肉含钙 360mg, 铁 58mg, 被人们称为“钙果”^[4], 是天然的补钙、补铁佳品。欧李果仁入药为“郁李仁”。欧李抗旱耐寒、耐瘠薄, 地下根系发

达, 生长迅速, 是水土保持、退耕还林的优势植物^[5]。欧李属赏、食、药、生态多用途优良树种, 因此, 市场苗木需求量日益增大。但在实际生产中, 欧李通常采用分株繁殖和扦插繁殖, 繁殖系数都很低, 不能满足生产的要求。1987 年以来, 阎贤伟^[6]等人试图用组织培养方法快繁, 目前已获部分成功。欧李长期处于野生状态, 根据李属植物带毒的情况^[7,8]和笔者长期对室外欧李苗木表征的观察, 认为至少存在苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)、李坏死斑病毒(PNRSV)和李矮缩病毒(PDV)的危害。上述病毒可通过无性繁殖进行传播, 影响其生长和果实

收稿日期: 2006-04-17

基金项目: 南阳市科技攻关项目(2005PT064); 南阳师范学院资助项目(nytc2004k10)

作者简介: 王正德(1963-), 男, 河南邓州人, 讲师, 本科, 主要从事应用生物技术研究工作。

产量、质量。目前,未见欧李无毒苗组织培养有关的报道。一般认为,活跃的分生组织是病毒尚未到达的部位^[9,10],笔者在前期欧李幼茎组织培养的基础上,采用茎尖分生组织培养的方法,对获得欧李的无病毒植株的途径进行了研究和探讨。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2003年秋,选取生长正常,初步表现带病毒症状的(用指示植物方法确认,见1.6)一年生分株繁殖苗待用(盆栽),株高0.5m左右。由南阳阳光花木公司提供。

1.2 培养基配方

以MS为基本培养基加蔗糖30 g/L、琼脂7 g/L(前期)或5.5 g/L(生根),固体培养。

茎尖成活培养基为MS+6-BA 0.5mg/L+IAA 0.3mg/L。

茎尖分生组织启动培养基分别采用MS+6-BA 0.7 mg/L, MS+6-BA 0.4 mg/L+IAA 0.5 mg/L, MS+6-BA 0.4 mg/L+IAA 0.3 mg/L。

继代培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L, MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.4 mg/L, MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.2 mg/L。

生根培养基分别采用2/3MS+IAA 0.7 mg/L, 2/3MS+IAA 0.5 mg/L, 2/3MS+IAA 0.3 mg/L。

1.3 茎尖处理

①选取长势好的枝,剪取枝端约1.5 cm长的幼茎,剪去肉眼可见叶片,置烧杯中加入少许洗衣粉,以缓流自来水冲洗25 min;在超净工作台上以75%酒精浸泡35 s,然后用0.1% HgCl₂(加2滴吐温)浸泡约3 min,无菌水冲洗3~5遍,至不再有泡沫泛起,取出置无菌纸上吸干表面水分。②超净工作台上切取前期幼茎培养的试管增殖苗的1 cm左右幼芽。

1.4 茎尖剥离和培养

在超净工作台上解剖镜下用解剖针剥除顶芽及部分已展开的叶原基,切取0.3~0.4 mm带1~2个叶原基的分生组织,迅速接种在茎尖成活培养基上培养。

1.5 培养条件

温度(25±2)℃, pH值为5.8,前期光照1 500~2 000 lx, 13 h/d;生根光照调至2 500~3 000 lx, 8~10 h/d。

1.6 脱毒效果检测

采用表观症状诊断和指示植物鉴定对茎尖组培苗进行病毒检测。以巴西牵牛(*Ipomoea setosa*)、黄瓜和桃(GF305)的实生苗为指示植物。方法:表观症状诊断,即全面观察试管苗长相长势,将长势弱,叶片黄化、黄脉和叶小、有枯斑等症状明显的带毒苗除去;指示植物鉴定,即在温室(以防止携病毒昆虫感染)用灭菌细昆虫针轻刺指示植物的初展叶(2~3片),挤滤出初代培养的待检脱毒苗的幼嫩茎叶的汁液,沾接在针刺部位。用无菌水作对照,试验重复3次,于接种后第2~4周,每天观察叶有无褪绿斑、枯斑和坏死的斑点产生及产生的数量和叶有无畸形。只要3种指示植物检测合计有1种症状,即剔除。

1.7 脱毒试管苗获得

经上述方法检测确信无病毒的继代培养苗继续增殖培养。

1.8 试管苗的炼苗、移栽

在温室逐步打开已生根的培养瓶盖,炼苗7 d左右移出试管苗,洗掉根际培养基,移栽到经0.3%硫酸铜溶液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,1周后逐渐降低湿度和提高光强,1个月后带土团移栽,深度以所带土团低于表土1 cm为宜。

2 结果与分析

2.1 不同外植体的筛选

据观察,欧李茎尖组织培养未见外植体褐化现象,这有利于及时排出污染。培养5 d即开始膨大逐渐形成愈伤组织,20 d左右确认成活后接入初代培养基培养。茎尖成活培养中,总成活率偏低,采用春季自然生长的茎尖接种,成活率显著高于试管苗茎尖,且后期苗健壮(表1)。

表1 不同外植体成活率

外植体	接种数 (个)	污染率 (%)	褐化率 (%)	成活数 (个)	成活率 (%)
栽培株茎尖	50	8	0	33	67
试管苗茎尖	50	0	0	12	27

通过外观筛选和指示植物测试,取自栽培和取自试管的茎尖分生组织脱毒率在73%~77%没有显著差别。因此,后期增殖培养采用栽培苗茎尖培养体系。

2.2 茎尖分生组织启动培养基的筛选

由表2可以看出,初代培养5 d后,愈伤组织出

现绿色芽点,接着长出幼芽;25 d后,丛芽长至3~5 cm,试验中初代培养最适培养基为MS+6-BA 0.4 mg/L + IAA 0.5 mg/L。

表2 培养基对启动不定期芽萌发的影响

培养基	芽始萌 动期 (d)	萌发率 (%)	芽长势
MS+6-BA 0.7mg/L	8	61	芽长势不整齐, 有部分黄苗
MS+6-BA 0.4 mg/L + IAA 0.5 mg/L	5	86	芽较粗状, 色绿光泽好
MS+6-BA 0.4 mg/L + IAA 0.3 mg/L	7	73	长势较好

2.3 继代培养基的筛选

切取初代培养幼茎1.5 cm左右侧芽,转移至继代培养基继代培养,4 d后新侧芽萌动,6 d后开始生长,25 d后新枝长至2~3 cm。由表3可知,继代增殖较好的培养基为MS+6-BA 0.3 mg/L + IAA 0.4 mg/L。

表3 培养基对芽外植体增殖的影响

培养基	10d 平均 芽数 (芽/株)	25d 平均 芽数 (芽/株)	芽长势
MS+6-BA 0.5 mg/L	0.62	3.1	长势较好
MS+6-BA 0.3 mg/L + IAA 0.4 mg/L	0.92	4.6	长势壮色绿
MS+6-BA 0.3 mg/L + IAA 0.2 mg/L	0.65	3.7	长势不齐色淡

2.4 生根培养

选取健壮的芽切成1.5 cm左右的茎段,接入生根培养基,7 d后根尖萌动,15 d后生长迅速。同一培养基中,壮芽生根量显著高于弱芽。由表4可知,较好的生根培养基为2/3 MS+IAA 0.5 mg/L,在此培养基上,根系较粗壮且部分有侧根。

表4 培养基对生根率的影响

培养基	15d 平均 根数 (条)	30d 平均 根数 (条)	35d 总生 根率 (%)	根长势
2/3 MS+IAA 0.7 mg/L	0.8	2	34	粗
2/3 MS+IAA 0.5 mg/L	1.5	4	72	长且粗壮
2/3 MS+IAA 0.3 mg/L	0.7	2.1	35	长

2.5 脱毒效果检测与移栽

试验表明,巴西牵牛初展叶片接种后反应敏感,接种带病毒汁液10 d后即出现症状,20 d后症状明显,侵染点形成数目不等的典型的局部褪绿斑;黄瓜接种10 d左右表现为黄绿色褪绿斑或花叶,有些是开始出现叶脉褪绿,逐渐发展成为系统花叶;桃叶反应为暗绿色凹陷斑或褪绿斑驳畸形叶,节间短,但时间延后。检测结果表明,脱毒率达73%,成活率

达81%。

3 讨论

1) 上述各培养基配方是在前期研究的基础上经初筛选后确定的。

2) 由于脱毒所需茎尖外植体小而脆弱,采自前期试管苗茎尖分生组织成活率低,可能是芽内营养水平低,生理状况弱于栽培苗茎尖,因而其成活率显著低于栽培苗茎尖分生组织。

3) 观察表明,影响欧李试管苗生根的主要原因是苗细弱,这可能与欧李试管苗在继代培养中分化系数高、大量丛生芽竞争体内有机物和培养基养分所致有关,目前,这一方面研究仍在进行和探讨之中。

4) 适当降低生根阶段培养基的琼脂用量,即降低培养基的固相程度,可使生根提前(2~4 d)并提高生根率(3%~5%),使后期洗根更容易,也不易伤根,提高成活率。研究表明,较适宜的琼脂用量是5.5 g/L,既不影响整体培养过程,又使生根更容易。

5) 本研究进行脱毒检测时仅用了表观症状诊断和指示植物检测,但通过1年多对移栽苗观测证明,3种植物监测结果趋向一致,证明效果可靠,指示植物鉴定结合表观症状诊断检测病毒简便易行、成本低,是基层单位适用的方法。脱毒苗与未脱毒苗相比较,明显还苗快,营养生长旺盛,开花多而整齐,结果量和果实品质情况还有待今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 曹贵荣.欧李(钙果)主要性状及开发利用[J].山西果树,2002,3(2):55-56.
- [2] 杜俊杰,杨怀义,曹琴.欧李选种研究[J].中国农史,1998(4):78-79.
- [3] 刘十通.红钙果栽培技术与应用前景[J].中国种业,2004,11(2):67-68.
- [4] 唐宸.天然补钙水果——钙果[J].中国林业,2003(2):45-46.
- [5] 钟士传,王侠礼.钙果微体快繁技术研究[J].中国林业,1997(2):87-89.
- [6] 阎传伟.植物组织培养简报摘编[J].植物生理通讯,1988(4):40.
- [7] 洪建国.国外果树病毒和无病接果树培育[J].世界农业,1990(4):46-47.
- [8] 王国平,洪霓.我国果树病毒发生危害现状与防治对策[J].北方果树,1997(1):8-10.
- [9] 雷增普,赵增仁.果树和葡萄的病毒病及类菌质体病害[M].北京:中国林业出版社,1991.
- [10] 郑金成.苹果树无毒苗木繁育技术[M].北京:中国农业出版社,1995.