

研究报告 Original Papers

欧洲李‘红艳1号’的组织培养与快速繁殖

孙清荣, 王金政*, 薛晓敏, 孙洪雁

山东省果树研究所, 山东泰安27100

摘要: 为了建立欧洲李新品种‘红艳1号’的组织培养快繁技术体系, 研究了基本培养基及植物生长物质对腋芽启动、试管苗增殖及生根的影响。结果表明: 以半木质化的嫩枝茎段为外植体进行腋芽的启动培养, 基本培养基QL比MS有效。增殖培养时MS最佳, 其次为QL, WPM和1/2MS较差。壮苗培养时WPM最优, 其次为MS, 1/2MS和QL较差。生根培养时1/4MS比1/2QL有效, 最佳生根培养基为1/4MS+1 mg·L⁻¹ IBA+20 g·L⁻¹蔗糖, 生根率为84%。

关键词: 欧洲李; ‘红艳1号’; 组织培养; 增殖; 生根

Tissue Culture and Rapid Proliferation of *Prunus domestica* Variety ‘Hongyan 1’

SUN Qing-Rong, WANG Jin-Zheng*, XUE Xiao-Min, SUN Hong-Yan

Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000, China

Abstract: In order to establish the technology system of tissue culture and rapid proliferation of *Prunus domestica* variety ‘Hongyan 1’, the effects of basal medium and plant growth substances on initial culture of axillary buds, proliferation and rooting of *in vitro* shoots were examined. Results showed that basal medium QL was more effective than MS in inducing the initial growth of axillary buds when half lignification stem section was selected as explants. For proliferation, basal medium MS was better, followed by QL, and WPM and 1/2MS were poorer. For vigorous shoots culture, basal medium WPM was the optimal, followed by MS, and 1/2MS and QL were poorer. For *in vitro* rooting, basal medium 1/4MS was more effective than 1/2QL. The optimal rooting medium was 1/4MS+1 mg·L⁻¹ IBA+20 g·L⁻¹ sucrose, the rooting percentage reached 84%.

Key words: *Prunus domestica*; ‘Hongyan 1’; tissue culture; proliferation; *in vitro* rooting

植物的组织培养广泛应用于种质资源的离体保存、苗木快繁、离体诱变育种及利用遗传工程技术进行品种改良等。因此越来越多的植物种类获得了组织培养的成功。但是核果类果树包括桃、李、杏、樱桃、扁桃等树种一直被认为是组织培养比较困难的种类之一。尽管在桃(郭伟伟等2010; 张恒涛等2004; Fotopoulos和Sotiropoulos 2004)、杏(孙清荣和孙洪雁2003; 齐高强等2006; Koubouris和Vasilakakis 2006; Pérez-Tornero和Burgos 2000)、樱桃(韩文璞和袁明莲2000; 张志勤和王喆之2005; Durkovic 2006)、扁桃(斯琴巴特尔等2002; 陈子萱等2004; Ainsley等2001; Miguel等1996)等树种中有些品种或类型已有组织培养成功的报道, 而李的组织培养以砧木或野生类型组培成功的报道较多, 如紫叶李(*Prunus cerasifera*) (孙在红等2005)、黑刺李(*Prunus spinosa*) (吴建华等2011)、红叶李(*Prunus cerasifera* f. *atropurpurea*)

(马林等2005)、欧洲李(*Prunus domestica*) (吴建华等2009; Nowak等2007; Scorza等1994)等; 商业化栽培的品种组培成功报道较少(邹英宁等2007; Nowak等2004)。即使是同一个种, 由于品种或基因型的不同, 其组织培养的条件也不同。因此针对不同的品种或基因型研究筛选其最适宜的组织培养条件是非常必要的。

李(又叫李子)是深受人们喜爱的核果类果树之一, 育种家们不断选育出新品种以适应生产和消费者的需求。欧洲李品种‘红艳1号’是山东省果树研究所最新选育并定名的一个早熟和丰产性好、着色艳丽、优质耐贮、适应性强等综合经济性状优良的欧洲李新品种(薛晓敏等2014)。本文的研

收稿 2015-04-08 修定 2015-06-02

资助 山东省农业良种工程项目(鲁科字[2014]96号)。

* 通讯作者(E-mail: wjz992001@163.com; Tel: 0538-8298263)。

究目的就是建立欧洲李新品种‘红艳1号’的组培快繁技术体系, 为生产快速提供优良苗木, 同时为利用生物技术手段改良品种奠定技术基础, 为其他核果类果树成年树品种的组织培养提供参考。

材料与方 法

1 材料

山东省果树研究所苗圃种植的欧洲李(*Prunus domestica* L.)新品种‘红艳1号’的成年大树。

2 方法

2.1 试管苗建立

2014年5月, 从生长健壮的大树上剪取半木质化绿枝条, 去掉叶片, 带回实验室, 把绿枝剪成一芽一段的芽段。先用洗衣粉水对芽段进行清洗, 再用自来水流水冲洗30 min以上, 吸干水, 把芽段放入无菌烧杯, 加入70%酒精杀菌1 min, 倒掉酒精再加入0.1% HgCl_2 , 杀菌8 min, 期间摇动3~5次, 倒出 HgCl_2 用无菌水洗4~5次, 接种到装有芽启动培养基的试管内, 每管一个芽段。芽启动培养基为分别添加1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA、0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA和0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 的QL和MS培养基, 所有培养基在灭菌前调pH为5.8。接种后放在光周期为16 h/8 h (光/暗), 光强为40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度为(25±2) °C的培养条件下培养, 4周后, 腋芽萌发并伸长生长形成绿梢, 获得的这些无菌苗用于进一步进行增殖实验的材料。

2.2 试管苗增殖

腋芽萌发获得的无菌绿苗, 转移到增殖培养基进行增殖培养。增殖培养基为都添加0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

BA和0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的MS、1/2MS、WPM和QL培养基及添加1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA和0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的MS培养基, 共5个不同培养基处理(表1)。每个处理接种5瓶, 每瓶种5个外植体。每一继代培养周期为5周, 继代培养3次, 每个继代周期记录每个外植体的新增梢数。每个处理每个继代周期的增殖梢数为继代培养3次的平均值。实验重复2次。

2.3 试管苗的生根

切取在壮苗培养基WPM+BA 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 上生长到1.5 cm以上的健壮绿苗, 转移到生根培养基进行生根诱导。生根培养基为添加0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的1/2QL培养基和1/4MS培养基及添加1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的1/2QL培养基和1/4MS培养基, 共4

个不同培养基处理(表2), 所有处理都加20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖。接种后放在与增殖培养相同的条件下进行生根诱导培养, 4周后记录并计算生根率和平均每株根数, 实验重复2次。

2.4 试管苗移栽

生根植株在瓶内生长5周左右, 松开瓶盖, 放在太阳光下炼苗3 d, 然后把生根苗取出, 用自来水洗去根部残留的培养基, 移栽到育苗基质中(泥炭:珍珠岩:蛭石=1:1:1), 栽后浇透水, 盖塑料膜保湿。以后每隔3 d喷水1次, 待新叶长出, 统计移栽成活率。

2.5 数据分析

实验结果采用DPS 7.5分析软件进行统计分析, 不同处理平均值用LSD法进行差异显著性分析。

实验结果

1 试管苗的建立

采用半木质化绿枝进行试管苗的建立, 污染率低, 污染率为5%。不同芽启动培养基, 腋芽萌发率不同。本实验中在添加外源激素相同的条件下, 基本培养基QL比MS更有利于腋芽的萌发和伸长生长(图1-A), QL培养基的萌发率为90%, 而MS培养基的萌发率仅为78% (资料未列出)。表明QL是欧洲李‘红艳1号’适宜的芽启动基本培养基。

2 试管苗的增殖

培养基组成明显影响试管苗的增殖和苗的生长形态(表1)。从试管苗的增殖数量分析, 在添加外源生长物质相同的条件下(处理1~4), 基本培养基QL显著高于MS、1/2MS和WPM, 而1/2MS和WPM之间差异不显著(表1)。在基本培养基相同(处理1和5)条件下, 细胞分裂素BA的浓度从0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 生长素IBA浓度从0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 平均增殖梢数也显著增加, 但新梢生长较弱。这一结果表明基本培养基的组分及细胞分裂素和生长素浓度都影响‘红艳1号’试管苗的增殖生长。

从试管苗的生长形态分析, WPM上生长的试管苗最健壮, 表现为叶色深绿, 叶片伸展、大(图1-B)。添加0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA的MS及1/2MS上虽然也表现为叶片伸展, 但叶色比WPM上浅, 呈黄绿色(图1-C和D), 特别是在1/2MS上随培养时间的延长, 出现黄化现象(资料未列出)。培养基4和5上虽然都有良好的增殖生长, 但表现叶较小、卷曲、不伸

表1 不同培养基对欧洲李‘红艳1号’试管苗增殖生长的影响

Table 1 Effects of medium composition on *in vitro* shoots proliferation and growth of *P. domestica* variety ‘Hongyan 1’

处理	培养基/mg·L ⁻¹	一个继代周期平均增殖梢数/个	增殖生长形态表现
1	MS+BA 0.5+IBA 0.1	4.45±0.68 ^b	伸长生长良好, 叶片伸展、较大, 叶色黄绿
2	1/2MS+BA 0.5+IBA 0.1	1.81±0.65 ^c	伸长生长较差, 叶片伸展、大, 叶色黄化
3	WPM+BA 0.5+IBA 0.1	2.18±0.68 ^c	伸长生长较差, 叶片伸展、大, 叶色浓绿
4	QL+BA 0.5+IBA 0.1	5.42±0.73 ^a	伸长生长较差, 叶片卷曲、较小, 叶色黄绿
5	MS+BA 1.0+IBA 0.2	5.76±0.61 ^a	伸长生长较差, 叶片卷曲、较小, 叶色黄绿

同一列中不同小写字母表示经LSD法检验差异显著($P<0.05$)。下表同。

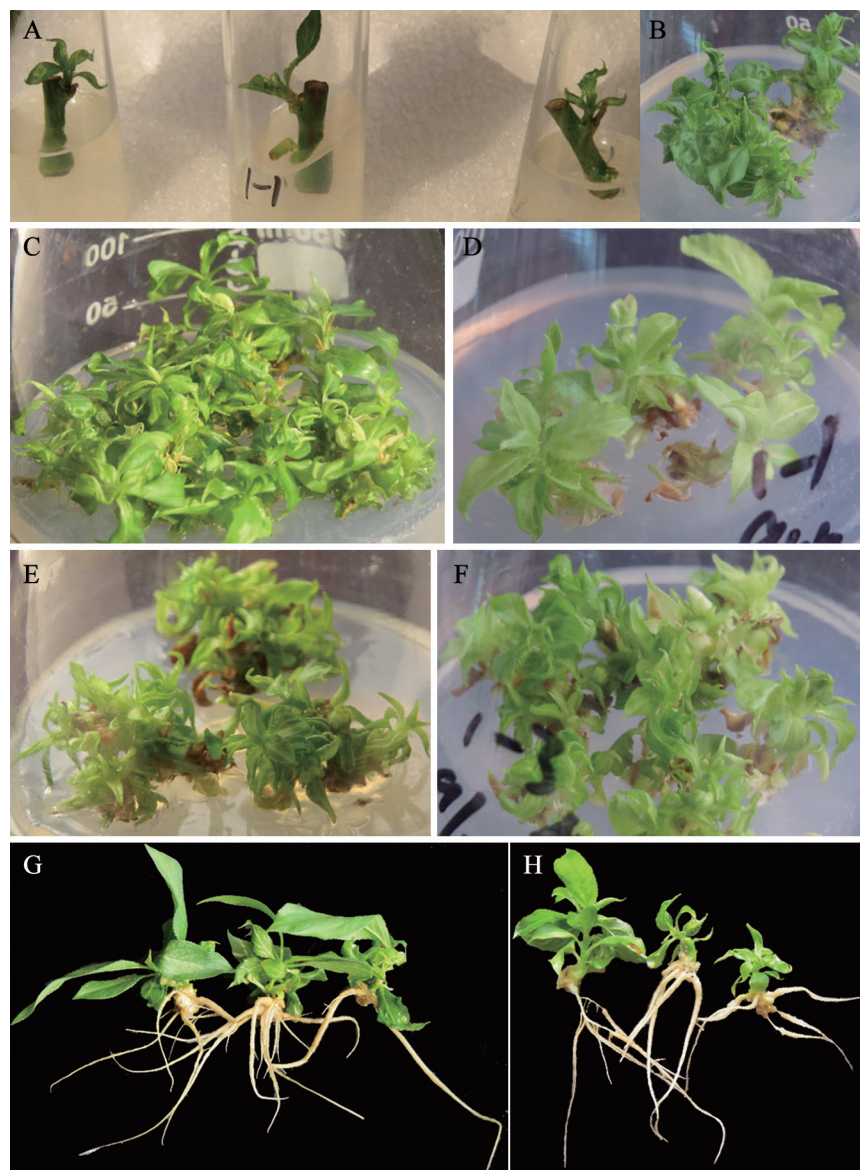


图1 欧洲李‘红艳1号’试管苗的建立、增殖和生根

Fig.1 Establishment of *in vitro* culture and proliferation and rooting of *in vitro* shoots of *P. domestica* variety ‘Hongyan 1’

A: 腋芽在QL+BA 1 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹+GA₃ 0.3 mg·L⁻¹上萌发生长; B~F:增殖培养。B: WPM+BA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹; C: MS+BA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹; D: 1/2MS+BA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹; E: QL+BA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹; F: MS+BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹; G和H: 试管苗生根。G: 1/4MS+IBA 1.0 mg·L⁻¹; H: 1/2QL+IBA 1.0 mg·L⁻¹。

展,不是理想的试管苗生长状态(图1-E和F)。这一结果表明,WPM培养基最适于健壮绿苗的获得。

综合以上分析,欧洲李‘红艳1号’的适宜增殖培养基为MS+BA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹,在该培养基上既表现有良好的增殖生长(虽然不是增殖最高的),又表现有良好的茎叶生长(图1-C)。适宜的壮苗培养基为WPM+BA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹,该培养基有利于获得叶色深绿、茎较粗的健壮绿苗(图1-B)。因此快繁时,这两种培养基交替培养可获得试管苗的理想增殖。

3 试管苗的生根和移栽

IBA的浓度显著影响‘红艳1号’试管苗的生根率和单株根数。两种基本培养基上都表现出生根率及平均单株根数随IBA浓度的增加而增加(表2),并且不同浓度上的生根率和平均单株根数都达到差异显著水平,表明IBA较高浓度(1 mg·L⁻¹)比低浓度(0.5 mg·L⁻¹)更有利于诱导‘红艳1号’试管苗的生根。在相同IBA浓度下,基本培养基的组成对生根能力也有重要影响。从生根率分析,1/4MS显著高于1/2QL。从单株根数分析,IBA在较低浓度0.5 mg·L⁻¹时,1/4MS和1/2QL无显著差异;但在较高浓度1.0 mg·L⁻¹时,1/4MS显著高于1/2QL,但根的生长无明显差异(图1-G和H)。这些结果表明诱导‘红艳1号’试管苗的生根,IBA选用较高浓度比低浓度更有效,基本培养基1/4MS比1/2QL有效。最佳生根培养基为:1/4MS+IBA 1.0 mg·L⁻¹。

表2 不同培养基对欧洲李‘红艳1号’离体生根的影响

Table 2 The effects of different media on *in vitro* rooting of *P. domestica* variety ‘Hongyan 1’

培养基/mg·L ⁻¹	生根率/%	平均单株根数/个
1/2QL+IBA 0.5	33.92±4.74 ^d	2.30±0.63 ^c
1/2QL+IBA 1.0	62.38±9.65 ^b	3.70±0.92 ^b
1/4MS+IBA 0.5	48.26±7.13 ^c	2.61±0.43 ^c
1/4MS+IBA 1.0	83.79±9.72 ^a	4.38±0.31 ^a

所有处理都添加蔗糖20 g·L⁻¹。

不同生根培养基上获得的生根小植株,其移栽成活率相似,移栽成活率为78%(资料未列出)。

讨 论

试管苗的建立多采用水培催芽,然后经过杀

菌等系列消毒程序,把外植体接种到启动培养基培养获得无菌绿苗(赵艳华等2009),这一方法虽然操作比较简单,但常常存在成苗率较低,污染率难以控制等问题。因为水培催出的芽比较幼嫩,能否成苗易受杀菌时间的影响。杀菌时间较短时,嫩芽受伤害较轻,芽成苗率较高,但污染率也较高;反之,杀菌时间较长时,虽然污染率低,但嫩芽受伤害较重,芽成苗率下降。本文中采用半木质化绿枝芽段做外植体进行欧洲李新品种‘红艳1号’试管苗的建立,有效解决了高成苗率和高污染率相互矛盾的问题。试管苗的成功建立,为实现‘红艳1号’欧洲李组培快繁提供了试材基础,也为其他果树树种试管苗的建立提供了参考。

启动培养基的组成及基因型影响芽启动培养的成功。尤萨李(*Prunus salicina*)的启动培养在添加1.0 mg·L⁻¹ BA和0.05或0.1 mg·L⁻¹ NAA的MS培养基上可获得叶片伸展及芽伸长生长的正常绿梢,而在添加0.5 mg·L⁻¹ BA和0.05或0.1 mg·L⁻¹ NAA的MS培养基不能获得芽伸长生长的绿苗(赵艳华等2009)。MS培养基能有效启动欧洲李的腋芽生长(吴建军等2009),而野生欧洲李的启动培养以B₅优于MS(耿文娟等2009)。本研究中,成年树欧洲李新品种‘红艳1号’的启动培养以QL优于MS,与前人研究结果不一致。表明启动培养的最适培养基组成因基因型的不同而不同。

试管苗的增殖,不同品种或类型所用基本培养基、生长物质种类及浓度都有所不同。MS培养基添加细胞分裂素BA获得了欧洲李(*Prunus domestica*) (吴建华等2009)、日本李(*Prunus salicina*) (赵艳华等2009; 陈卫雪等2014; Tian等2007)等的丛生芽增殖,而野生欧洲李在MS和B₅培养基上都获得了良好的增殖(耿文娟等2009)。本研究中的‘红艳1号’欧洲李在MS培养基上可获得增殖良好试管苗,而在WPM上可获得健壮生长的试管苗,这两种培养基交替使用可获得既有良好增殖又有健壮生长的试管苗,这同赵艳华等(2009)报道的较高浓度BA和较低浓度BA交替使用才能获得正常增殖生长的日本李试管苗的研究结果相一致。

参考文献

陈卫雪,石开明,李闯,周梦莹,杨秋玲,池政松(2014). 空心李组织培养条件研究. 园艺与种苗, (2): 47~49, 53

- 陈子萱, 曹孜义, 田福平(2004). 扁桃砧木Nemaguard和 Lovell的组培快繁. 甘肃农业大学学报, 39 (5): 524~528
- 耿文娟, 吴玉霞, 袁海英, 廖康, 周龙, 许正(2009). 野生欧洲李组织培养技术. 经济林研究, 27 (1): 45~48
- 郭伟伟, 孟庆杰, 黄勇, 王光全, 高菲娅(2010). ‘黄金冠’桃组织培养的初步研究. 北方园艺, (19): 142~144
- 韩文璞, 袁明莲(2000). 中华矮樱桃的组织培养与快速繁殖技术. 中国农学通报, 16 (6): 58~59
- 马林, 李卫锋, 张玲(2005). 红叶李组织培养快繁技术. 西南科技大学学报, 20 (1): 60~62
- 齐高强, 赵忠, 张存旭, 周锋利(2006). 大扁杏组培基本培养基与培养条件的优化研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 34 (3): 115~118
- 斯琴巴特尔, 满良, 王振兴, 吴铁军, 张玉平(2002). 珍稀濒危植物蒙古扁桃的组织培养及植株再生. 西北植物学报, 22 (6): 1479~1481
- 孙清荣, 孙洪雁(2003). 仁用杏的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 39 (6): 628
- 孙在红, 夏阳, 梁慧敏, 刘荣堂(2005). 紫叶李组织培养及快繁体系的建立. 草原与草坪, (1): 58~61
- 吴建华, 闵有军, 王立英, 闵丽霞(2009). 欧洲李的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 45 (7): 691
- 吴建华, 王立英, 闵丽霞(2011). 黑刺李的组织培养与快速繁殖. 安徽农业科学, 39 (1): 37, 51
- 薛晓敏, 王金政, 张安宁, 陈汝(2014). 李子新品种红艳1号的选育及栽培技术. 山东农业科学, 46 (1): 119~121
- 张恒涛, 李靖, 宋尚伟, 夏国海, 任凝辉, 王珂(2004). 桃矮化砧木的组织培养及植株再生. 河南农业大学学报, 38 (1): 77~81
- 张志勤, 王喆之(2005). 马哈利樱桃砧木组培快繁技术研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 33 (11): 23~26
- 赵艳华, 程和禾, 吴雅琴, 吴永杰, 李玉生(2009). 李离体茎尖组培快繁试验. 河北果树, (3): 12~13
- 邹英宁, 李国怀, 吴强盛(2007). 中国李组织培养过程中褐变的抑制研究. 山地农业生物学报, 26 (6): 508~512
- Ainsley PJ, Collins GG, Sedgley M (2001). *In vitro* rooting of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In Vitro Cell Dev Biol—Plant*, 37 (5): 778~785
- Durkovic J (2006). Rapid micropropagation of mature wild cherry. *Biol Plant*, 50 (4): 733~736
- Fotopoulos S, Sotiropoulos TE (2004). *In vitro* propagation of the peach rootstock: the effect of different carbon sources and types of sealing material on rooting. *Biol Plant*, 48 (4): 629~631
- Koubouris G, Vasilakakis M (2006). Improvement of *in vitro* propagation of apricot cultivar ‘Bebecou’. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 85 (2): 173~180
- Miguel C M, Druart P, Oliveira MM (1996). Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* mill.) explants. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant*, 32 (3): 148~153
- Nowak B, Miczynski K, Hudy L (2004). Sugar uptake and utilisation during adventitious bud differentiation on *in vitro* leaf explants of ‘Wegierka Zwyczajna’ plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 76: 255~260
- Nowak B, Miczynski K, Hudy L (2007). The effect of total inorganic nitrogen and the balance between its ionic forms on adventitious bud formation and callus growth of ‘Wegierka Zwyczajna’ plum (*Prunus domestica* L.). *Acta Physiol Plant*, 29: 479~484
- Scorza R, Ravelonandro M, Cailahan AM, Cordts JM, Fuchs M, Dunez J, Gonsalves D (1994). Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Rep*, 14: 18~22
- Pérez-Tornero O, Burgos L (2000). Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 63 (2): 133~141
- Tian L, Wen Y, Jayasankar S, Sibbald S (2007). Regeneration of *Prunus salicina* Lindl (Japanese plum) from hypocotyls of mature seeds. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant*, 43: 343~347