

云南樱桃优良单株的组织培养与快速繁殖

叶小玲¹, 胡晓敏², 叶超宏³, 唐伟洲⁴, 沈荔荔⁵, 邓小梅^{4,*}

¹广州天适集团有限公司, 广州510335; ²广东天适樱花悠乐园有限公司, 广州510920; ³广州旺地园林工程有限公司, 广州510335; ⁴华南农业大学林学与风景园林学院, 广东省森林植物种质创新与应用重点实验室, 广州510642; ⁵英德市旺地樱花种植有限公司, 广东英德513000

摘要: 以云南樱桃优良株‘广州’樱的半木质化嫩枝为外植体, 采用丛生芽发生途径, 建立其组培快繁体系。结果表明: 最佳腋芽诱导培养基为改良MS (针对云南樱桃组织培养配制的基本培养基)+1.0 mg·L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.1 mg·L⁻¹ 萘乙酸(NAA)+30 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂, 诱导率高达100%; 最适增殖培养基为改良MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ 吲哚丁酸(IBA)+30 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂, 继代周期15 d, 增殖系数达4.72; 最适生根培养基为1/2改良MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ IBA+15 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂, 15 d生根率达100%, 平均每株苗生根5条以上。炼苗后, 移栽于泥炭土:珍珠岩:蛭石=2:1:1 (V/V/V)的混合基质中, 成活率达90%以上。

关键词: 云南樱桃; 组织培养; 基本培养基; 快速繁殖

云南樱桃(*Cerasus yunnanensis*)为蔷薇科(Rosaceae)樱属落叶乔木, 原产我国云南、四川和广西, 是重要园林观赏和绿化树种。其树形优美, 花白色, 近伞房总状花序, 花叶同开或花近先叶开放(中国科学院中国植物志编辑委员会1986; 黄珂等2011)。¹‘广州’樱是从野生云南樱桃中选育出来的一个优良、速生成年单株, 其花色粉嫩、花瓣大、耐热性好、抗逆性强, 在广东地区的花期为2月下旬至3月中旬, 是适合华南地区种植的新优速生樱花观赏品种, 开发前景广阔(叶超宏等2014)。

樱花常规繁殖主要通过种子繁殖、嫁接繁殖及少量扦插繁殖, 而樱花组织培养研究较晚, 主要集中在食用樱桃及其砧木树种上, 占多数的观赏樱花上则少有报道, 且大多尚处于初步研究和探索阶段, 仅福建山樱花(*Cerasus campanulata*) (王光萍和黄敏仁2002; 吕月良等2006; 闰道良等2006; 王贤荣和荣冬青2008; 徐楠2008; 贾利娜2010; 李勇等2015)、早樱(*Cerasus subhirtella*) (荣冬青和王贤荣2008)等少数几个种的组培技术有报道, 取得了较好的成果。但和其他木本植物一样, 种(品种)、种源、取材部位等对樱花组培影响很大, 且初次培养的褐变死亡和继代培养中玻璃化苗大量产生是普遍存在的问题, 还没找到彻底解决的方法。目前尚未见云南樱桃的组培快繁报道, 已有报道的樱花相关组培技术不适用于‘广州’樱, 而常规繁殖速度慢, 严重制约了‘广州’樱的快速推广应用。本研究所建立的‘广州’樱组培快繁技术体系为其规模化高效快繁提供了有效途径, 以期加快其推广应用进程。

材料与方法

1 植物材料

云南樱桃[*Cerasus yunnanensis* (Franch.) Yu et Li]优良株‘广州’樱定植于广州天适集团有限公司韶关大布基地, 为五年生实生植株。

2 外植体处理

采集外植体前, 每隔7 d用多菌灵和百菌清交替喷洒萌枝4~5次。于天气晴朗的上午10:00左右, 从‘广州’樱母株上剪取生长健壮、无病虫害的半木质化嫩枝为外植体。将枝条剪成4 cm左右长的带叶腋茎段, 在超净工作台上先用无菌水擦洗干净, 再用1% (m/V)新吉尔灭溶液浸泡6 min。倒掉新吉尔灭溶液后, 用无菌水冲洗3次, 然后加入0.1% (m/V)升汞(HgCl₂)溶液, 根据外植体幼嫩程度浸泡1~6 min, 其间不断摇动, 倒掉升汞溶液后, 再用无菌水冲洗6次。用无菌滤纸吸干无菌材料表面水珠, 再用无菌刀片切除叶柄和茎段两端受伤部位, 将茎段切成2 cm左右带1~2个节间, 接种到诱导培养基上。

3 腋芽诱导

采用以下10种培养基进行腋芽诱导: (1) MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA); (2) MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ 萘乙酸(NAA); (3) MS+0.5 mg·L⁻¹

收稿 2016-03-08 修定 2016-04-12

资助 广东省省级科技型中小企业技术创新专项(2014A010101097)和广东省省级科技计划项目(2014A030304004)。

* 通讯作者(E-mail: dxmei2006@scau.edu.cn)。

6-BA+0.1 mg·L⁻¹吲哚丁酸(IBA); (4) 1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA; (5) 1/4MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA; (6)改良MS (组成为1 200 mg·L⁻¹ NH₄NO₃、600 mg·L⁻¹ KNO₃、90.6 mg·L⁻¹ CaCl₂、305.8 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂、0.17 mg·L⁻¹ CuSO₄、0.1 mg·L⁻¹ VB₁、0.2 mg·L⁻¹烟酸和0.2 mg·L⁻¹ VB₆, 文中若无特殊说明均同此)+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA; (7)改良MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA; (8)改良MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA; (9)改良MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA; (10)改良MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA; 以上各种培养基均添加30 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂, pH 5.8。每瓶接种1个外植体, 每个处理60瓶。培养条件(文中若无特殊说明均同此): 培养温度(25±2)°C, 光照时间12 h·d⁻¹, 光强60 μmol·m⁻²·s⁻¹。20 d后, 观察腋芽生长状况, 统计诱导率: 诱导率=萌芽外植体数/接种外植体数×100% (污染外植体剔除)。

4 增殖培养

4.1 基本培养基的筛选

待诱导出的腋芽长至2 cm左右时, 接入丛生芽诱导培养基。采用B5 (Gamborg等1968)、MS (Murashige和Skoog 1962)、改良MS、3/4改良MS (大量减1/4)、1/2改良MS (大量减半)、WPM (Lloyd和McCown 1980)和MT (Wang和Chang 1978)共7种不同的基本培养基, 均添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA、0.1 mg·L⁻¹ NAA、30 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂。每处理6瓶, 每瓶接种6个芽段, 重复3次。

4.2 植物生长调节剂水平及配比的筛选

采用L₁₆(4³)正交试验设计, 以改良MS为基本培养基, 设置6-BA (0.1、0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹)、NAA (0、0.05、0.1和0.2 mg·L⁻¹)和IBA (0、0.05、0.1和0.2 mg·L⁻¹) 3因素4水平共16个处理, 每个处理6瓶, 每瓶接种6个芽丛, 重复3次。培养15 d后统计增殖系数(增殖倍数), 并记录增殖情况。

5 生根培养

选取生长健壮、高2 cm的继代芽进行生根培养, 培养温度(25±2)°C, 光照时间12 h·d⁻¹, 光强80 μmol·m⁻²·s⁻¹。采用L₉(3³)正交试验设计, 以1/2改良MS作为基本培养基, 添加15 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂。设置NAA (0.2、0.5和1.0 mg·L⁻¹)和IBA (0.2、

0.5和1.0 mg·L⁻¹) 2因素3水平共9个处理, 每处理5瓶, 每瓶10个芽, 重复3次。15 d后统计生根率和生根苗情况。

6 炼苗和移栽

将生根瓶苗移到温室中适应外界环境5~7 d, 然后将组培瓶盖从半开到全开炼苗1 d, 炼苗后将瓶中的幼苗小心取出, 洗净黏在苗上的培养基, 移植到填满泥炭土:珍珠岩:蛭石=2:1:1 (V/V/V)混合基质的育苗杯中, 覆土深度刚好盖住根系, 移植完成后淋透定根水、覆膜并加盖遮阳网, 5 d后移去遮阳网并逐步增加光照强度, 直到进行全光常规管理, 一个月后统计移栽成活率: 移栽成活率=存活苗数/移栽苗数×100%。

实验结果

1 腋芽诱导

如表1所示, 改良MS适合作为‘广州’樱腋芽诱导的基本培养基, 不定芽的诱导效果最好; 1/2MS基本培养基不利于诱导芽的后期生长, 后期叶色偏黄, 不适合作为‘广州’樱不定芽诱导培养基; MS基本培养基诱导腋芽长势一般, 诱导率较低, 主要是由于褐化现象比较严重。在只添加6-BA的培养基上, 腋芽也能萌动, 但萌动慢, 诱导率较其他处理低, 可见6-BA与NAA或IBA配合使用比6-BA单独使用诱导腋芽效果好, 其中6-BA与NAA组合效果优于6-BA与IBA组合。‘广州’樱的最佳诱导培养基为改良MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, 接种3 d后腋芽开始萌动, 12 d左右为出芽最盛期, 第20日腋芽抽出嫩枝长至3 cm左右, 顶芽抽出嫩枝长至1.0 cm左右, 芽健壮, 叶色浓绿(图1-A), 诱导率可达100% (污染外植体剔除)。

2 增殖培养

2.1 基本培养基对增殖的影响

如表2所示, 以B5、WPM和1/2改良MS为基本培养基, ‘广州’樱的增殖系数低, 芽细小、长势弱, 后期甚至死亡, 表明这3种基本培养基不适合‘广州’樱的增殖培养; 在3/4改良MS、MS和MT基本培养基上, 增殖系数仅略低于改良MS, 但增殖芽长势差。改良MS为‘广州’樱丛芽诱导最适基本培养基, 增殖系数最高, 达3.92, 丛芽生长健壮, 叶片浓绿而开展, 芽粗壮、长势良好。方差分析结果(表

表1 不同诱导培养基对‘广州’樱不定芽诱导及生长的影响

Table 1 Effects of different culture media on adventitious bud induction of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

培养基/mg·L ⁻¹	接种后无菌数/个	诱导数/个	诱导率/%	诱导情况
MS+0.5 6-BA	50	3	6	易发生褐化, 芽萌发慢、长势一般
MS+0.5 6-BA+0.1 NAA	50	15	30	易发生褐化, 芽较粗壮、长势一般
MS+0.5 6-BA+0.1 IBA	52	11	21.2	易发生褐化, 芽一般壮、长势一般
1/2MS+0.5 6-BA+0.1 NAA	46	16	34.8	几无褐化, 芽长势渐弱, 叶偏黄、稍卷曲
1/4MS+1.0 6-BA+0.1 NAA	48	14	29.2	无褐化, 芽长势弱, 叶色较黄、卷曲
改良MS+1.0 6-BA+0.1 NAA	44	44	100	无褐化, 芽长势旺盛, 叶色浓绿
改良MS+1.0 6-BA+0.5 NAA	49	36	73.5	无褐化, 芽长势旺盛, 叶浓绿, 基部愈伤较多
改良MS+1.0 6-BA+1.0 NAA	51	30	58.8	无褐化, 芽长势旺盛, 叶绿色, 基部愈伤多
改良MS+1.5 6-BA+0.1 NAA	51	26	51.0	芽细弱, 长势一般, 部分叶片玻璃化
改良MS+2.0 6-BA+0.1 NAA	53	22	41.5	芽细弱, 长势差, 玻璃化现象严重

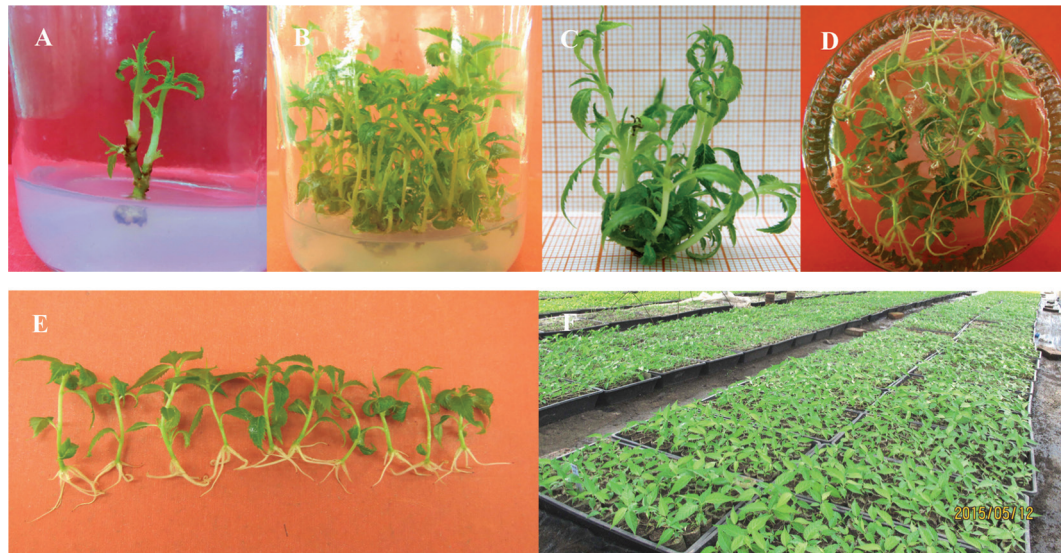


图1 ‘广州’樱的不定芽诱导和植株再生

Fig.1 Adventitious buds induction and plant regeneration of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

A: 不定芽诱导; B: 增殖培养; C: 增殖芽; D: 生根培养; E: 组培生根苗; F: 生根苗移栽。

表2 不同基本培养基对‘广州’樱增殖的影响

Table 2 Effects of different basal media on proliferation of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

基本培养基	增殖系数	生长情况
B5	1.72 ^{Ee}	叶发黄、皱缩, 茎较细, 芽不良
1/2改良MS	2.54 ^{Dd}	叶浅绿、不伸展, 茎细, 芽良好但生长慢
3/4改良MS	3.17 ^{Cc}	叶较绿、伸展, 茎粗一般, 芽较好
改良MS	3.92 ^{Aa}	叶浓绿、伸展, 茎粗壮, 芽生长快且好
MS	3.61 ^{Bb}	叶黄绿、伸展, 茎粗一般, 芽良好
WPM	1.83 ^{Ee}	叶淡绿、较小, 茎较细, 芽不良、偏黄
MT	3.53 ^{Bb}	叶黄绿、伸展, 茎粗一般, 芽良好

同列数据用不同小写字母标识表示差异显著($P<0.05$), 用不同大写字母标识表示差异极显著($P<0.01$), 表5和7同。

3)表明,不同基本培养基对‘广州’樱的增殖系数的影响均达到极显著水平。从Duncan多重比较分析(表2)可以看出,使用改良MS与使用其他培养基间均达到了极显著差异。综上所述,‘广州’樱增殖效果最理想的基本培养基为改良MS培养基。

2.2 不同植物生长调节剂及对比对增殖的影响

如表4所示,整体上,随着培养基中6-BA浓度的增高,‘广州’樱有效芽率呈下降趋势,增殖系数先增高后降低。在6-BA浓度较低($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时,增殖系数虽然较低,但增殖苗生长旺盛,茎段节间伸长明显,茎段较粗,叶大、浓绿、舒展,有效芽率高;随着6-BA浓度的升高,腋芽萌发能力增强,且芽基部有大量丛芽出现,增殖系数因而迅速增高,当6-BA浓度上升至 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,增殖系数整体较其他水平上高;但当6-BA浓度升至 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,丛芽生长一般,叶片明显增厚且有些成水渍状,叶黄绿色、略有卷曲,茎较细弱,茎段节间明显缩短,

从而使有效芽率明显降低,主要是因为随着6-BA浓度升高,芽增多,芽间生长对养分和空间的竞争也随着增大,影响了芽的生长,从而降低了增殖系数和有效芽率。由此可见,6-BA浓度在 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。综合增殖系数和芽生长情况,改良MS+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA为‘广州’樱的最适增殖培养基,增殖系数平均可达4.72,长度适中,植株健壮。

极差分析结果(表5)表明,从极差(R)值来看,影响‘广州’樱增殖系数因素的主次顺序为6-BA>NAA>IBA,影响‘广州’樱有效芽率因素的主次顺序为6-BA>IBA>NAA,其中,6-BA对‘广州’樱增殖系数和有效芽率作用最为显著,极差分别达到2.31和54。以不定芽增殖系数为参考指标,以均值来优选得出适合‘广州’樱增殖的最佳激素水平组合是 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA。

表3 不同基本培养基对‘广州’樱增殖的影响方差分析

Table 3 Variance analysis of the effects of different basal media on proliferation of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

指标	变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
增殖系数	处理间	14.043	6	2.34	413.73	<0.001
	处理内	0.079	14	0.01		
	总计	14.123	20			

F和P分别为统计量的观测值和概率,表6和9同。

表4 不同植物生长调节剂对比对‘广州’樱增殖的影响

Table 4 Effects of different plant growth regulator levels on proliferation of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

培养基/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖系数	有效芽率/%	生长情况
改良MS+0.1 6-BA	1.67 ^{lh}	95.7 ^{Aa}	芽少、长、粗壮
改良MS+0.1 6-BA+0.05 NAA+0.05 IBA	2.05 ^{Hg}	93.9 ^{ABab}	芽少、长、粗壮
改良MS+0.1 6-BA+0.1 NAA+0.1 IBA	2.53 ^{Gf}	91.7 ^{ABab}	芽少、长、粗壮
改良MS+0.1 6-BA+0.2 NAA+0.2 IBA	2.01 ^{Hg}	90.2 ^{ABCa}	芽少、长、粗壮
改良MS+0.5 6-BA+0.05 IBA	2.57 ^{Gf}	78.7 ^{Ee}	芽较多、较长、粗
改良MS+0.5 6-BA+0.05 NAA	2.69 ^{Fe}	81.4 ^{DEe}	芽较多、较长、粗
改良MS+0.5 6-BA+0.1 NAA+0.2 IBA	2.97 ^{DEd}	86.8 ^{BCDdc}	芽较多、较长、粗
改良MS+0.5 6-BA+0.2 NAA+0.1 IBA	2.74 ^{FGe}	83.9 ^{CDEde}	芽较多、较长、粗
改良MS+1.0 6-BA+0.1 IBA	4.21 ^{BCc}	48.8 ^{FGHfg}	芽较多、长一般、粗
改良MS+1.0 6-BA+0.05 NAA+0.2 IBA	4.72 ^{Aa}	49.3 ^{FGf}	芽较多、长一般、粗
改良MS+1.0 6-BA+0.1 NAA	4.18 ^{Cc}	51.1 ^{Ff}	芽较多、长一般、粗
改良MS+1.0 6-BA+0.2 NAA+0.05 IBA	4.39 ^{Bb}	41.5 ^{HIJhi}	芽较多、长和粗一般
改良MS+1.5 6-BA+0.2 IBA	2.81 ^{EFe}	42.5 ^{HIJhg}	芽多、小、弱
改良MS+1.5 6-BA+0.05 NAA+0.1 IBA	2.68 ^{FGe}	39.9 ^{IJhi}	芽多、小、弱
改良MS+1.5 6-BA+0.1 NAA+0.05 IBA	3.09 ^{Dd}	36.2 ^{hi}	芽多、小、弱
改良MS+1.5 6-BA+0.2 NAA	2.77 ^{Fe}	37.1 ^{GHIgh}	芽多、小、弱

表5 不同植物生长调节剂配比对‘广州’樱增殖的影响极差分析

Table 5 Range analysis of the effects of different plant growth regulator levels on proliferation of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

指标	因子	6-BA	NAA	IBA	指标	因子	6-BA	NAA	IBA
增殖系数	水平1	2.07	2.82	2.83	有效芽率	水平1	92.9	66.5	66.3
	水平2	2.74	3.04	3.03		水平2	82.7	66.1	62.3
	水平3	4.38	3.19	3.04		水平3	47.7	66.5	66.1
	水平4	2.84	2.98	3.13		水平4	38.9	63.2	67.2
	极大值	4.38	3.19	3.13		极大值	92.9	66.5	67.2
	极小值	2.07	2.82	2.83		极小值	38.9	63.2	62.3
	R	2.31	0.37	0.3		R	54	3.3	4.9

方差分析结果(表6)显示, 细胞分裂素6-BA对‘广州’樱增殖系数和有效芽率的影响均达到极显著水平; NAA和IBA对‘广州’樱增殖系数和有效芽率均无显著影响; 影响‘广州’樱增殖系数因素的主次顺序为6-BA>NAA>IBA, 影响‘广州’樱有效芽率因素的主次顺序为6-BA>IBA>NAA, 所得结果与

极差分析(表5)一致。

综上可知, 6-BA对‘广州’樱增殖作用最明显。综合考虑增殖系数、有效芽率和腋芽生长情况, 最适合‘广州’樱的增殖培养基为改良MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ IBA (图1-B和C)。

表6 不同植物生长调节剂配比对‘广州’樱增殖的影响方差分析

Table 6 Variance analysis of the effects of different plant growth regulator levels on proliferation of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

指标	变异来源	III型平方和	自由度	均方	F	P
增殖系数	6-BA	11.43	3	3.81	90.017	<0.001
	NAA	0.292	3	0.097	2.297	0.178
	IBA	0.193	3	0.064	1.516	0.303
	误差	0.134	6	0.045		
	总计	156.648	16			
有效芽率	6-BA	8276.737	3	2758.912	560.493	<0.001
	NAA	30.187	3	10.062	1.166	0.397
	IBA	49.797	3	16.599	1.923	0.227
	误差	51.779	6	8.63		
	总计	77144.23	16			

3 生根培养

如表7所示, ‘广州’樱的生根率随着NAA浓度的升高先增高后降低, 最适宜的NAA浓度为0.5 mg·L⁻¹, 植株生长健壮, 叶色翠绿, 生根效果好。结果表明‘广州’樱最佳生根培养基为1/2改良MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ IBA, 当芽接入培养基后第5日, 基部开始直接形成根突起, 之后根系迅速生长, 第10日可长至2~3 cm, 15 d最佳诱导培养基的生根率高达100% (图1-D和E)。表8极差值表明, 影响‘广州’樱生根的因素主次顺序为NAA>IBA; 其中对‘广州’樱生根效果最明显的是NAA, 极差为25.10; 由极差分析结果所得的‘广州’樱最佳生根培养基组合为NAA (水平2)和IBA (水平3), 即0.5

mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ IBA。方差分析结果(表9)显示, NAA对‘广州’樱的生根影响达到显著水平, 而IBA对‘广州’樱生根的影响不显著。综合生根效果及苗生长情况选优, ‘广州’樱最佳的生根培养基为1/2改良MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ IBA。

4 移栽

从表10可以看出, 不同时间移栽成活率不小于90%, 9~12月移栽成活率高达97%, 接下来依次是3~6月、1~2月、7~8月。从苗生长情况看, 除1~2月小苗需要7 d左右新根萌动, 其他时间段, 小苗移栽后3~5 d新根萌动, 苗生长快, 8 d左右新叶萌发, 一个月后苗高达5~6 cm (图1-F), 可见, ‘广州’樱瓶苗移栽受自然条件影响不大, 可终年生产。

表7 不同植物生长调节剂配比对‘广州’樱生根的影响

Table 7 The effects of different plant growth regulator levels on rooting of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

浓度/mg·L ⁻¹		生根率/%	生长情况
NAA	IBA		
0.2	0.2	62.0 ^{Fs}	植株矮小, 叶绿色, 生根慢、不整齐, 根少、一般粗
0.2	0.5	72.7 ^{Ef}	植株矮小, 叶绿色, 生根慢、不整齐, 根少、一般粗
0.2	1	79.3 ^{De}	植株矮小, 叶绿色, 生根较整齐, 根少、一般粗
0.5	0.2	92.0 ^{Bc}	植株健壮, 叶翠绿, 生根较整齐, 根系粗壮
0.5	0.5	100 ^{Aa}	植株健壮, 叶翠绿、平展, 生根快、整齐, 根多、粗壮
0.5	1	96.7 ^{Ab}	植株健壮, 叶翠绿、平展, 生根较整齐, 根粗壮
1	0.2	88.0 ^{Cd}	植株高一般, 叶绿色, 根多而细
1	0.5	90.7 ^{BCcd}	植株高一般, 叶绿色, 根多而细
1	1	89.3 ^{BCcd}	植株高一般, 叶绿色, 根多而细

表8 不同植物生长调节剂配比对‘广州’樱生根的影响极差分析

Table 8 Range analysis of the effects of different plant growth regulator levels on rooting of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

因子	水平1	水平2	水平3	极大值	极小值	R
NAA	71.13	96.23	89.33	96.23	71.13	25.10
IBA	80.67	87.80	88.23	88.23	80.67	7.56

表9 不同植物生长调节剂配比对‘广州’樱生根的影响方差分析

Table 9 Variance analysis of the effects of different plant growth regulator levels on rooting of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

变异来源	III型平方和	自由度	均方	F	P
NAA	1 008.86	2	504.43	58.496	0.017
IBA	108.327	2	54.163	6.281	0.137
对照	53.527	2	26.763	3.104	0.244
误差	17.247	2	8.623		
总计	67 082.85	9			

表10 不同移栽时间对‘广州’樱组培苗移栽效果的影响

Table 10 Effects of various periods on transplanting survival rate of *C. yunnanensis* ‘Guangzhou’

移栽时间/月份	成活率/%	苗生长情况
1~2	95	7 d左右新根萌动, 苗生长较慢
3~6	91	4~5 d新根萌动, 苗生长较快
7~8	90	3~4 d新根萌动, 苗生长快
9~12	97	4~5 d新根萌动, 苗生长快

讨 论

‘广州’樱组织培养在初代培养中污染及褐化问题较严重, 控制污染与褐化是其组织培养的关键。本文所选母本‘广州’樱定植于户外, 由于长期暴露于自然条件下, 外植体带菌较多, 为减少外植体带菌, 在采集外植体前, 每隔7 d用多菌灵和百菌

清交替喷洒萌枝4~5次, 可有效降低污染率。研究发现‘广州’樱外植体最佳采集时间为4月, 5月以后采集外植体污染率高、褐化现象严重。消毒过程中, 不宜选用75%乙醇, 否则褐化严重。较好的消毒组合为1%新吉尔灭溶液6 min+0.1%升汞溶液1~6 min (据外植体幼嫩程度定), 污染率在26.7%以内。

目前, 樱花组培采用的基本培养基为1/4~1MS (李勇等2015; 荣冬青和王贤荣2008; 徐楠2008; 吕月良等2006; 王光萍等2002), 大多数诱导和继代培养以MS为主, 生根以1/2MS为主。研究发现, MS不适合‘广州’樱的组织培养, 因其无机盐浓度过高导致外植体褐变, 这与高国训(1999)的观点一致。本研究通过改良MS, 有效地解决了‘广州’樱组织培养过程中的褐化问题。基本培养基只能保证培

养目标的生存和最低生理活动所需, 只有配合适当的植物生长调节剂才能启动细胞分裂、形态建成、器官分化、发育等。所报道樱花组织培养研究中, 常用细胞分裂素和生长素组合为6-BA与IBA组合或与NAA组合。在‘广州’樱的诱导中, 6-BA单独使用腋芽诱导效果没有6-BA与NAA或IBA配合使用腋芽诱导效果好, 且6-BA与NAA组合诱导不定芽的效果要优于6-BA与IBA组合。

大部分的植物组织培养在光下进行, 但暗培养可以活化伤口细胞, 减少外植体酚类物质的溢出, 有利于芽的分化。本研究发现, 在‘广州’樱增殖培养中, 前期的短期(2~4 d)暗处理有利于‘广州’樱茎的伸长。报道中, 大多数樱花的继代周期为1个月左右, 而‘广州’樱增殖芽生长速度快, 继代周期为15 d, 但其转接周期不能超过20 d, 否则易出现黄叶和烂顶现象, 且带黄叶的芽生根较慢, 植株叶色发黄、瘦弱甚至死亡。故在规模化生产时, 为保证芽的质量和有效利用空间, 要及时转接。

大多数樱花组培生根中, NAA和IBA配合使用的效果优于单独使用(荣冬青和王贤荣2008; 吕月良等2006), 这一点在‘广州’樱生根中同样适用。‘广州’樱芽接入合适的生根培养基后第5日, 基部开始直接形成根突起, 第10日根可长至2~3 cm, 15 d后生根率高达100%, 其生根速率和效果优于所报道的其他樱花品种。‘广州’樱瓶苗移栽受季节性影响小, 但考虑到广州7~8月天气炎热, 补水杀菌工作较重, 这期间可适当减少移栽数量。

综上, 本研究以云南樱桃成年优良单株‘广州’樱的半木质化枝条为外植体, 经腋芽诱导、腋芽增殖和生根培养, 形成完整植株, 移栽到基质后, 得到生长整齐、表型一致的健壮苗木, 具有繁殖系数高、培育周期短、不受季节限制等优点, 可周年规模化快速育苗, 应用前景广阔。

参考文献

- CAS Flora of China Editorial Board (1986). Flora of China. Vol 38. Beijing: Science Press, 64 (in Chinese) [中国科学院中国植物志编辑委员会(1986). 中国植物志. 第38卷. 北京: 科学出版社, 64]
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 50 (1): 151-158
- Gao GX (1999). Browning in plant tissue culture. *Plant Physiol Commun*, 35 (6): 501-506 (in Chinese) [高国训(1999). 植物组织培
- 养中的褐变问题. *植物生理学通讯*, 35 (6): 501-506]
- Huang K, Xue YG, Su SL (2011). Investigation on the resource of *Cerasus* Mill. in the Dashiwei Tianken Group of Leye Country. *Anhui Agric Sci Bull*, 17 (23): 55-57 (in Chinese with English abstract) [黄珂, 薛跃规, 苏仕林(2011). 大石围天坑群驱樱花植物资源的调查. *安徽农学通报*, 17 (23): 55-57]
- Jia L (2010). Studies on adventitious bud culture and somatic embryogenesis of *Cerasus campanulata* (Master's thesis). Nanjing: Nanjing Forestry University (in Chinese with English abstract) [贾利娜(2010). 福建山樱花不定芽繁殖及体细胞胚胎发生研究(硕士论文). 南京: 南京林业大学]
- Li Y, Fang Y, Zheng X, Huang J, Guo J, Zhang Z (2015). A technique on rapid propagation of *Cerasus campanulata* by tissue culture. *For Sci Technol*, 29 (1): 20-23 (in Chinese with English abstract) [李勇, 方扬辉, 郑雪燕, 黄金华, 郭洁, 张志才(2015). 福建山樱花组培快繁技术. *林业科技开发*, 29 (1): 20-23]
- Lloyd G, McCown B (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc*, 30: 420-427
- Lu YL, Chen Z, Shi JS, Huang YX, Liu JY, Xie JL (2006). Adventitious bud inducing and plant regeneration of *Cerasus campanulata* Maxim. in large scale. *J Nanjing For Univ-Nat Sci*, 30 (3): 105-108 (in Chinese with English abstract) [吕月良, 陈璋, 施季森, 黄宇翔, 刘金燕, 谢建丽(2006). 福建山樱花不定芽诱导和植株再生规模化繁殖试验. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 30 (3): 105-108]
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15 (3): 473-497
- Rong DQ, Wang XR (2008). A study on tissue culture and rapid propagation of *Cerasus subhirtella* var. *pendula* 'Rosea'. *For Sci Technol*, 22 (5): 72-75 (in Chinese with English abstract) [荣冬青, 王贤荣(2008). 垂枝早樱‘红枝垂’组培快繁试验. *林业科技开发*, 22 (5): 72-75]
- Wang GP, Huang MR (2002). Tissue culture and plant regeneration of *Cerasus campanulata*. *J Nanjing For Univ-Nat Sci*, 26 (2): 73-75 (in Chinese with English abstract) [王光萍, 黄敏仁(2002). 福建山樱花的组织培养及植株再生. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 26 (2): 73-75]
- Wang TY, Chang CJ (1978). Triploid citrus plantlet from endosperm culture. *Sci Sin*, 21 (6): 823-828
- Wang XR, Rong DQ (2008). Application of orthogonal design in tissue culture of *Cerasus campanulata* (Rosaceae). *Anhui Agric Univ*, 35 (2): 169-173 (in Chinese with English abstract) [王贤荣, 荣冬青(2008). 钟花樱组织培养中多因子正交试验研究. *安徽农业大学学报*, 35 (2): 169-173]
- Xu N (2008). Study on tissue culture technique of *Cerasus campanulata* (Master's thesis). Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract) [徐楠(2008). 福建山樱花组织培养技术研究(硕士论文). 福州: 福建农林大学]
- Yan DL, Wang XR, Qin P, Zai XM, Wang G (2006). Regeneration system of tissue culture for *Cerasus cerasoides* var. *campanulata*. *For Sci Technol*, 20 (3): 21-24 (in Chinese with English abstract) [闫道良, 王贤荣, 钦佩, 宰学明, 王光(2006). 钟花樱

组织培养再生体系的建立. 林业科技开发, 20 (3): 21–24]
Ye CH, Chen JY, Hu XM, Zhang DD, Liu XY (2014). The landscape
application of *Cerasus* plants in Guangdong Province. Guang-

dong Gard, 36 (5): 59–61 (in Chinese with English abstract) [叶
超宏, 陈家艳, 胡晓敏, 张丹丹, 刘湘源(2014). 广东适生樱花
及其园林应用. 广东园林, 36 (5): 59–61]

Tissue culture and rapid micropropagation of superior individual of *Cerasus yunnanensis*

YE Xiao-Ling¹, HU Xiao-Min², YE Chao-Hong³, TANG Wei-Zhou⁴, SHEN Li-Li⁵, DENG Xiao-Mei^{4*}

¹Tianshi Group Co., Ltd., Guangzhou 510335, China; ²Tianshi Cherry Amusement Garden Co., Ltd., Guangzhou 510920, China;

³Wangdi Landscape Architecture Co., Ltd., Guangzhou 510335, China; ⁴College of Forestry and Landscape Architecture, Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ⁵Yingde Wangdi Cerasus Plantation Co., Ltd., Yingde, Guangdong 513000, China

Abstract: In this paper, an economic and high effective technology system for rapid propagation of *Cerasus yunnanensis* was established, through multiple-shoots proliferation. The explants were taken from the late and half lignificational stems with shoot in the adult selected trees. The results show that the optimal inducing medium was modified MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA +0.1mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ sucrose+6 g·L⁻¹ gelatin; the optimal multiplication medium was modified MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ IBA+30 g·L⁻¹ sucrose+6 g·L⁻¹ gelatin, the subculture cycle was 15 d, and the highest multiplication rate was 4.72; the optimal rooting medium was 1/2 modified MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ IBA+15g·L⁻¹ sucrose+6 g·L⁻¹ gelatin, and the rooting rate has reached 100% within 15 d. The transplanting matrix were peat, perlite and vermiculite (3:1:1, V/V/V), and its corresponding transplanting survival rate was over 90%.

Key words: *Cerasus yunnanensis*; tissue culture; basal medium; rapid propagation

Received 2016-03-08 Accepted 2016-04-12

This work was supported by the Technology Innovation Special Funds for SME of Guangdong Province (Grant No. 2014A010101097), and the Science and Technology Projects of Guangdong Province (Grant No. 2014A030304004).

*Corresponding author (E-mail: dxmei2006@scau.edu.cn).