

文章编号:1001-4829(2007)03-481-05

# CAB 系列甜樱桃砧木离体快繁技术研究

李洪雯<sup>1,2</sup>, 刘建军<sup>2\*</sup>, 陈克玲<sup>2</sup>, 李旭锋<sup>1</sup>, 杨毅<sup>1</sup>

(1. 四川大学生命科学院, 四川 成都 610064; 2. 四川省农业科学院园艺研究所, 四川 成都 610066)

**摘要:**以 CAB6P 和 CAB11E 2 种脱毒甜樱桃砧木嫩梢茎尖为试材, 成功地进行了离体快繁研究。结果表明: 外植体在改良的 DKW 培养基上进行诱导培养和继代增殖培养最好, 在 1/2MS 培养基(铁盐为 DKW) 生根较好; 同时特定的液体培养基可以显著地将增殖培养的不定稍拉长。温室中的温度、湿度控制和病害防治是试管苗移栽成活率的一个关键环节。

**关键词:** CAB; 樱桃砧木; 簇生芽; 不定梢; 离体快繁; 成活率

中图分类号: S339.4; S662.5 文献标识码: A

## Studies on in vitro rapid propagation of the sweet cherry rootstock of CAB series

LI Hong-wen<sup>1,2</sup>, LIU Jian-jun<sup>2\*</sup>, CHEN Ke-ling<sup>2</sup>, LI Xu-feng<sup>1</sup>, YANG Yi<sup>1</sup>

(1. College of Life, Sichuan University, Sichuan Chengdu 610064, China; 2. Horticulture Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Sichuan Chengdu 610066, China)

**Abstract:** Plantlets have been successfully induced from the young stem tip of two CAB virus-free cherry rootstocks. At the same time we have succeeded in vitro rapid propagation. The results showed that the optimal basal medium for the primary culture and subculture was the reformative DKW medium. The 1/2MS (Fe<sup>2+</sup> come from DKW) medium is good for the rooting. A reformative liquid medium can notably prolong the adventitious shoots. Furthermore, the temperature, the humidity and the disease controlled are the key factor of survival rate during the greenhouse management.

**Key words:** CAB series; cherry rootstock; fascicular bud; adventitious shoot; in vitro rapid propagation; survival rate

果树砧木对果实产量、品质、抗逆性、早结丰产性、生产管理成本和管理方式有直接的影响。欧美许多发达国家, 新种植果园或重茬果园都采用优良砧木。对一些果树(如甜樱桃)只能采用特定的无性系砧木。由于这些优良砧木必须通过营养繁殖的方式才能保持其植物学遗传特性, 而扦插育苗成活率相对较低, 在短期内不能大量繁殖。国外一般采用组培快繁、工厂化育苗来满足生产的需要。CAB 系列甜樱桃砧木是意大利博洛尼亚大学从 *Prunus cerasus* 中选育而成, 与目前生产上主要栽培品种表

现出亲活力强, 适应性广。其中 CAB6P 和 CAB11E 是半矮化砧木, CAB6P 和 CAB11E 作甜樱桃砧木表现出根系发达、早果性、丰产性、稳产性非常明显<sup>[1]</sup>。意大利仅 Vivai Battistini 在 2004 年就组培快繁甜樱桃砧木 100 万株以上, 试管苗移栽成活达到 95% 以上。甜樱桃在我国作为一种新兴的高档水果, 正在一定区域快速发展, 生产上急需大量的砧木种苗。目前我国对甜樱桃砧木的植株再生有许多成功的例子<sup>[2-4]</sup>, 但成功地进行 CAB 系列植株离体快繁技术的研究, 还未见相应报道。本项目成功地研究出最适培养基进行诱导培养、继代增殖培养、拉长壮苗培养、生根培养以及培养条件、温室管理技术, 极大地提高了试管苗有效繁殖系数、生根率和苗木移栽成活率, 降低了生产成本。

## 1 材料与方法

试验材料为中国-意大利政府合作项目(四川

收稿日期: 2007-01-02

基金项目: 中国-意大利政府合作项目(四川果树无毒苗木繁育中心); 四川省“十一五”农作物育种攻关(甜樱桃新品种选育编号: 2006-07-06); 四川省农科院青年基金项目

作者简介: 李洪雯(1972-), 男, 助理研究员, 在读博士, 主要从事果树生物技术与遗传育种, E-mail: sc\_lhw@163.com, \* 为通讯作者。

果树无毒苗木繁育中心)隔离网室的 CAB6P 和 CAB11E(下简称 CAB 系列)。选生长健壮枝条,带回实验室用 800 倍多菌灵浸泡 5 min,晾干后仔细清洗,放入无菌水中并置于无菌培养室黑暗水培,促发新梢。试验选用 5 种基本培养基(表 1)和一种液体培养基<sup>[5]</sup>。

在四川省农业科学院园艺研究所高效组培快繁实验室、温室、苗圃进行各项试验。300 mL 的培养瓶中固体培养基 100 mL,液体培养基 20 mL。继代增殖培养每瓶接种 8 株,生根培养每瓶接种 15 株。设置 3 次重复。

**初代培养:**将水培促发的新梢(1.5 cm 左右)去掉叶片,用无菌去离子水中漂洗 2 次,再用 0.1% 升汞加 2 滴吐温 80 消毒 5 min,然后用无菌去离子水漂洗 4 次,每次在磁力搅拌器作用下漂洗 2 min。无菌滤纸吸干水分,取下 0.5 cm 左右的茎尖,接种于 5 种诱导簇生芽的培养基。培养基中添加琼脂 6.3 g · L<sup>-1</sup>(液体培养基中无琼脂),蔗糖 30 g · L<sup>-1</sup>(生根培养 15 g · L<sup>-1</sup>),pH5.8,121 °C 高压灭菌 15 min。光照 16 h · d<sup>-1</sup>,光照度 2500 lx,温度 24 ± 1 °C 下培养。

**继代增殖:**初代培养 3 周后,90% 的茎尖产生出 3~9 个簇生芽,5 周时不定梢达 2.0 ± 0.5 cm。取此时的不定梢短茎切段(带有 2 腋芽)接种于 5 种继代增殖培养基。3 周继代 1 次,达到一定数量后,一部分继续继代增殖;另一部分在继代增殖 3 周后加入拉长液体培养基<sup>[5]</sup>培养 10 d。其他条件同初代培养。

**生根培养与移栽:**将拉长培养的不定梢接种于表 1 不同试验中使用的增殖和诱导基本培养基的盐和有机成分

Table 1 Salts and organic content of proliferation and induction basal media used in the different experiments

	1#	2#	3#	4#	5# (DKW-R)
大量元素 Macro-elements	MS	F <sub>14</sub>	WPM	DKW	DKW
微量元素 Micro-elements	MS	F <sub>14</sub>	WPM	DKW	MS
铁盐 (FeNa <sub>2</sub> EDTA)	MS	F <sub>14</sub>	MS	DKW	DKW
有机成份 Organic ingredient	MS	F <sub>14</sub>	WPM	DKW	MS

注: MS: Murashige T. and Skoog F, *Physiol. Plant*, 15, 473 (1962)<sup>[6]</sup>; F<sub>14</sub>: 见《实用植物组织培养技术教程》P29-31(曹政义 刘国民主编 2001 年)<sup>[7]</sup>; WPM: Lloyd G. and McCown B., *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30, (421) 1980<sup>[8]</sup>; DKW: Driver, J. A., Kuniyuki, A. H., *Hort Science*, 19 (4), August 1984<sup>[9]</sup>。

4 种生根培养基,4 周后生根试管苗的根长到 1.2 ± 0.3 cm 时,取出并洗净幼苗上的培养基,及时移栽到有机质丰富、pH5.5 左右营养土(泥炭:蛭石 = 4:1)的穴盘或营养钵进行育苗。移栽后及时转入温室小拱棚中,保湿、控温<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 水培法促生嫩梢

直接取自隔离网室中的嫩梢,由于较长时间暴露在外界,受到细菌、真菌等的感染,甚至感染到嫩梢组织内部,不易彻底消毒、灭菌,试验中污染率一度高达 90% 以上,有时 100% 的污染,根本不能满足进一步试验的要求。水培法促生的嫩梢,由于经杀菌剂预处理,自来水清洗,并在无菌培养室用灭菌去离子水中培养,促生的嫩梢(2~3 cm)受细菌、真菌感染的机会大大降低。经消毒剂处理,0.5 cm 左右的茎尖外植体接种在诱导培养基 7 d 后,污染率低于 10%,达到了进一步试验的要求。

### 2.2 诱导培养基中茎尖簇生芽的促生

茎尖外植体太小,操作较困难,容易失水枯死;外植体太大,易产生顶端优势,不容易形成簇生芽。经过多次试验,选取 0.5 cm 左右的茎尖作外植体最适。外植体在 5 种初代培养基上经过 2 周培养后,开始产生部分簇生芽,但簇生芽发生的数量、速度在不同培养基上有较大差异(表 2)。1#、2#培养基上的外植体簇生芽产生较慢,数量较少;3#培养基上的簇生芽发生速度较 2#快,数量相当;4#、5#上的外植体簇生芽发生速度快,5#上的簇生芽数量最多(达 5~8 个),萌芽率接近 90%。4 周时,1#、2#上的簇生芽生长缓慢,叶色淡绿;3#上的簇生芽长势一般,叶色绿;4#上的簇生芽长势中上,叶色绿;5#上的簇生芽长势旺(不定梢长高度 1.5 ± 0.3 cm),叶色浓绿(图 1)。分析以上结果可以看出基本培养基对簇生芽的诱导有直接影响,特别是大量元素 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 代替 CaCl<sub>2</sub>对 CAB 茎尖分生簇生芽有增强作用。

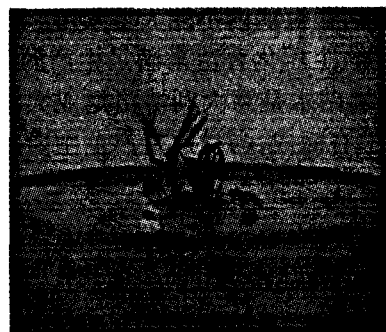


图 1 茎尖簇生芽诱导 4 周

Fig. 1 Fascicular buds of the stem tip in the induction medium 4 weeks

表 2 不同初代培养基对 CAB 茎尖簇生芽诱导的影响

Table 2 Effects of different primary medium on fascicular bud induction of CAB stem tip

培养基 Media	6-BA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	IBA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\text{GA}_3$ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	水解酪蛋白 CH( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	接种外植体数 Number of explant	萌芽的外植体数 Number of explant with budding	外植体萌芽率(%) Budding of explant	外植体萌 发的簇生芽数 Number of fasci- cular buds
1#	1.2	0.05	0.1	300	30	12	40	2~4
2#	1.2	0.05	0.1	300	30	14	47	2~5
3#	1.2	0.05	0.1	300	30	19	63	4~6
4#	1.2	0.05	0.1	300	30	23	77	4~7
5#	1.2	0.05	0.1	300	30	26	87	5~8

表 3 CAB 在不同继代培养基和同一液体培养基上的增殖倍数、拉长效果

Table 3 Multiplication and elongation of CAB in the different subculture medium and the same liquid medium

基本培养基 Basal medium	6-BA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	IBA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	外植体 切段数 Cutting No. of explant	10 d 底部和顶部腋 芽处的新生簇生芽 Fascicular bud No. on the bottom and top axilla after 10 days	3 周后簇生芽数 No. on the bottom and top axilla after 3 weeks	3 周后不定梢高度 Height of the Adventitious shoots after 3 weeks (cm)	液体培养基 10 天不定梢高度 Height of the adventitious shoots in the liquid medium after 3 weeks (cm)
1#	1.0	0.02	30	1~2/0	2~4/0	$0.7 \pm 0.3$	$0.8 \pm 0.3$
2#	1.0	0.02	30	1~3/0	2~4/0	$0.7 \pm 0.3$	$1.0 \pm 0.3$
3#	1.0	0.02	30	2~4/1	2~5/1	$0.7 \pm 0.3$	$1.2 \pm 0.3$
4#	1.0	0.02	30	2~4/1	3~5/1	$1.2 \pm 0.3$	$1.5 \pm 0.3$
5#	1.0	0.02	30	2~5/1~2	4~7/1~2	$1.5 \pm 0.3$	$2.5 \pm 0.5$

### 2.3 不同继代增殖培养基培养的效果

在继代增殖培养中,培养基和茎段腋芽(底部和上部腋芽)的部位不同,腋芽处萌发的簇生芽数量和长势出现明显的差异(表 3)。3~5 d 后发现底端腋芽原基处开始萌动,7~10 d 上部腋芽原基开始萌动。1#、2#培养基上的短茎切段在培养 10 d 后虽然发出少量簇生芽,但长势缓慢。3#培养基上发生的簇生芽数量相对较多,长势一般;4#培养基上发出的簇生芽数量相对较多,长势也较好;5#培养基上的簇生芽相对最多,长势也最旺,叶色浓绿。3 周



图 2 不定芽继代增殖培养 21 d 后加入拉长培养基 7 d 及对照

Fig. 2 Adventitious buds in elongation medium 7 days after proliferation 21 days and CK

后的不定梢经过拉长液体培养基(附加 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和活性炭  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 10 d,不定梢的高度明显增加,粗度也有一定增加(图 2、图 3)。分析以上结果得出 5#培养基对 CAB 继代增殖最好。液体培养基能加速不定梢对营养成分的吸收,促进新城代谢,使其短时间内迅速增加高度和一定粗度,叶色浓绿。

### 2.4 生根与移栽

将经过拉长增粗的不定梢转入生根诱导培养基(表 4)。7 d 左右出现根尖白色的生长点,2~3 周时长出根 2~5 条,并出现部分须根;4 周左右生根



图 3 不定梢在生根培养基中第 3 周时的根系

Fig. 3 The roots of the adventitious shoots in rooting media at 3rd weeks

表 4 CAB 在不同培养基中生根培养 4 周后的效果

Table 4 Effects of different medium on rooting induction of CAB after 4 weeks

基本培养基 Basal medium	IBA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NAA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	PG ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	活性炭(CA) ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	生根 4 周 Rooting after 4 weeks		
					叶色 Leaf color	根数量 No. of root	根长度(cm) Length of root
A	1.0	0.05	-	100	Light green	1~2	0.1~0.2
B	1.0	0.05	80	100	Green	2~4	0.1~0.3
C	1.0	0.05	-	100	Green	2~6	0.2~0.4
D	1.0	0.05	80	100	Green	2~6	0.2~0.4

注:A:1#1/2 大量元素,1#微量、铁盐、有机成分,PG 0; B:1#1/2 大量元素,1#微量、铁盐、有机成分,PG 80; C:1#1/2 大量元素,1#微量、有机成分,5#铁盐,PG 0; D:1#1/2 大量元素,1#微量、有机成分,5#铁盐,PG 80。



图 4 生根试管苗移栽到温室第 5 周时小苗的根系

Fig. 4 The roots of the rooted tube plants transplanted into greenhouse at 5th weeks

率达到 95% 以上,根的长度达到  $1.2 \pm 0.3$  cm。A、B 培养基中的幼苗虽然可以长出一些不定根,但生根时间相对较长,幼苗长势不旺;C、D 培养基中生根相对更快,长势也旺,根系也发达(图 3)。试验表明:较高浓度的螯合铁有助于生根和须根的形成,PG 对根的诱导有促进作用。为防止培养基的污染,生根试管苗上的培养基需洗净,移栽到有机质含量丰富、疏松(优质泥炭:珍珠岩 = 4:1)的营养土穴盘或营养钵中。试验表明:生根试管苗经 800 倍多菌灵浸泡 2 min,对防止幼苗在温室中染病有促进作用。3 周后逐步揭开温室小拱棚,5 周左右小苗根系发达、健壮,成活率达到 85% 以上(如图 4、图 5)。3 个月幼苗可达到 60 cm 左右(图 6)。



图 5 生根试管苗移栽到温室 5 周

Fig. 5 The rooted tube plants transplanted into greenhouse for 5 weeks

### 3 结论与讨论

基本培养基的大量元素和铁盐对 CAB 的培养有重要影响。代红艳等<sup>[4,11]</sup>认为 WPM 培养基适宜甜樱桃微繁,本试验得出 DKW-R 更适宜 CAB 的培养。

初代培养的外植体来自水培,其污染率可大大降低。继代增殖培养后的不定梢较纤弱。若直接用来生根,一方面生根时间较长;另一方面生根量不足,生根率较低,较困难。从而直接导致移栽到温室后成活率低,管理成本增加。本试验采用液体培养基<sup>[5]</sup>并经过改良,增加相应的有效成分,使不定梢迅速吸收营养物质,拉长生长,从而利于生根培养和试验操作。

生根试管苗移栽时间是移栽成活率的一个重要因素<sup>[10]</sup>。根系太长,容易折断、损伤,恢复生长较慢;根系太短,适应过程较长,在 1.0~1.3 cm 移栽最好。由于培养基的 pH 5.8~5.9,所以营养土以微酸性营养土最适宜。

本项目通过多年来的不断探索并与国外相关科研院所的长期学术交流,研究出了这一套高效组培快繁技术(茎尖成芽数 5~8 个,有效继代增殖系数达到 5,生根率达 95% 以上,温室移栽成活率达到 85%,苗圃移栽成活率达到 95% 以上),极大的降低



图 6 温室幼苗移栽到苗圃中 3 个月

Fig. 6 The greenhouse younger plants transplanted into the nursery for 3 months

了生产应用成本,同时为高效快繁其它优良甜樱桃砧木提供了良好借鉴。

#### 参考文献:

- [1] S J Wertheim. Cherry rootstocks [C]. Rootstock Guide, 1998. 95 - 96.
- [2] 韩文璞. 甜樱桃的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(2): 119 - 120.
- [3] 黄文江, 刘庆忠, 樊圣华, 等. 甜樱桃砧木吉塞拉 (Gisela) 叶片再生体系研究 [J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 221 - 223.
- [4] 代红艳, 张志宏, 高秀岩, 等. 甜樱桃品种微繁体系的建立及优化 [J]. 果树学报, 2004, 21(3): 216 - 219.
- [5] Tewary P K, Oka S. Simplified clonal multiplication of mulberry using liquid shake culture [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 3(4): 223 - 226.
- [6] Marashige T and Skoog F. Physical. Plant [J]. 1962(15): 473.
- [7] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 北京: 人民出版社, 2001. 29 - 31.
- [8] Lloyd G, McIown B [J]. Int. Plant Prop. Soc. Proc, 1980, 30: 421.
- [9] Driver J A, Kuniyuki A H [J]. Hort Science, 1984, 14: 19.
- [10] A. Battistini, G. De Paoli. LARGE SCALE MICROPROPAGATION OF SEVERAL PEACH ROOTSTOCKS [C]. ISHS Acta Horticulturae [C], V International Peach Symposium, 2002, 11. 592.
- [11] 袁小环, 彭向永, 李青, 等. 甜樱桃组培苗的生根研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2004, 32(4): 71 - 73, 78.

(责任编辑 谢成英)