

Damas 1869 李组培繁殖技术研究

许建兰,马瑞娟*,俞明亮,沈志军

(江苏省农业科学院园艺研究所,南京 210014)

摘要:以 Damas1869 李腋芽为材料,研究了不同消毒方法对冬季水培芽及春季田间芽污染率、存活率的影响。采用 3 因素 2 水平正交实验,研究不同激素配比对芽增殖的影响,不同浓度的 IBA、NAA 对生根的影响。结果表明,与春季田间芽相比以冬季水培芽灭菌效果较好,即以 75%酒精浸洗 10 s,再用 20%次氯酸钠浸洗 8 min,存活率为 64.1%;最佳芽增殖培养基是 MS+6-BA1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+20 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂粉,增殖系数最高可达 7.1;适宜生根的培养基是 1/2MS+IBA 2.0 mg/L+20 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂粉+0.05%活性炭,生根率为 87.8%,平均生根数 3.9。

关键词: Damas1869 李; 组织培养

中图分类号: S662.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9980(2008)05-740-04

Studies on the tissue culture of Damas 1869 plum

XU Jian-lan, MA Rui-juan*, YU Ming-liang, SHEN Zhi-jun

(Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014 China)

Abstract: Experiment was carried out using the buds of winter shoots advanced by water culture method in room and the spring shoots directly from the field of Damas1869 as material for evaluating the effect of different sterilization on contamination and survival rate *in vitro*. The effects of different hormones on bud proliferation by 3 factors and 2 levels, the effect of IBA and NAA on rooting were studied. Results showed that the buds of winter shoot were better used as explants than those of spring shoots. The best method for disinfect was washed by 75% alcohol for 10 s and 20% NaClO for 8 min. The survival rate was 64.1%. The optimal medium for shoot generation was MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+20 g/L sugar+5 g/L agar, the proliferation times could be reached to 7.1. The optimal medium for rooting was 1/2MS+IBA 2.0 mg/L+20 g/L sugar+5 g/L agar+0.05% charcoal, the rooting rate was 87.8%, the average number of roots was 3.9.

Key words: Damas1869 plum; Tissue culture

Damas1869 李是法国农业科学院果树试验站培育的砧木品种,为 Damas de Toulouse 的自然实生后代,该品种与李和大多数桃品种嫁接亲和性良好,其主要特点是抗涝性优于桃砧木。Damas1869 李已引入我国,但还没有在生产中得到应用,鉴于其具有良好的抗涝性,可能成为我国南方高温多湿地区以及排水不良的黏土地区的潜在砧木。在法国和美国等地该砧木以绿枝扦插和硬枝扦插作为主要的繁殖方式^[1],但在我国由于母本树少,有限的插条来源限制了其繁殖规模。组织培养具有繁殖速度快,不受季节和气候等因素影响的特点,目前国内外未见对该砧木进行组培快繁的报道,为此我们开展了这一方面的研究,目的是摸索建立 Damas1869 李的组培快繁

体系,为今后 Damas1869 李在我国生产中的应用提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料 Damas1869 李取自江苏省农业科学院园艺研究所国家果树种质桃资源圃,2001 年定植,株行距为 3 m × 5 m,按常规栽培措施管理,树体生长良好。

1.2 方法

1.2.1 不同外植体种类灭菌方法比较 2 种不同外植体,一是在 2005 年冬季落叶后,从田间剪取 1 a 生长枝,带回实验室用流水冲洗干净,晾干后将枝条

收稿日期: 2008-02-27 接受日期: 2008-05-28

基金项目: 农业行业科研专项(nyhyzx07-025); 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21002-21)

作者简介: 许建兰,女,在读硕士生。Tel: 025-84390225, E-mail: jlxjaas1976@yahoo.com.cn

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel: 025-84390220, E-mail: rjmjaas@yahoo.com.cn

顶部用腊封住,以减少水分损失,然后在组培室(25℃左右)水培催芽,每隔1d换1次水,并剪去基部2~4mm,待发出新芽,采集腋芽作为外植体,以下简称冬季芽。另一是2006年春季直接从田间采取刚萌发的腋芽作为外植体,以下简称春季芽。

结果统计:死亡率在接种后3d调查,污染率与存活率在接种后15d调查,因污染原因造成不能正常生长而死亡的记入污染率中。污染率(%)=(污染外植体数/接种外植体数)×100;死亡率(%)=(死亡外植体数/接种外植体数)×100;存活率(%)=(存活外植体数/接种外植体数)×100。

1.2.2 不同灭菌方法的比较 外植体采下后先流水冲洗3h,后于超净工作台用75%酒精消毒10s,无菌水冲洗2次,再采用4种不同的方法灭菌,方法1:20%次氯酸钠消毒8min;方法2:20%次氯酸钠+少量吐温消毒8min;方法3:方法1+0.1%升汞消毒5min;方法4:方法2+0.1%升汞消毒5min。最后无菌水冲洗6次。取出芽在吸水纸上吸干水分,切去基部,接种在培养基上培养。每试管接种1个芽体,每处理接种20个芽,重复3次,污染率、死亡率、存活率的统计方法同上。

1.2.3 增殖培养基的筛选 以MS为基本培养基,添加不同浓度的6-BA、NAA、IBA,进行正交设计(表1)。选用生长一致的芽,接种到8种不同培养基中进行增殖培养基的筛选,每处理接种10个三角瓶,每瓶3个芽,重复3次。每6周转接继代1次,统计生长情况。

表1 芽增殖试验生长调节剂处理水平
Table 1 Factors and levels of plant growth regulators in shoot multiplication mg/L

水平	激素 Hormone		
Level	6-BA	NAA	IBA
1	0.5	0.5	0.5
2	1.0	1.0	1.0

1.2.4 生根培养基的筛选 以1/2MS为基本培养基,添加不同浓度的NAA、IBA,并加入0.05%活性炭,共5个处理,每处理接种40个芽,重复2次,30d后统计生根情况。

以上所有培养基,灭菌前均附加20g/L蔗糖和5.0g/L琼脂粉,pH 5.8,在121℃下高压灭菌20min。培养条件为温度(24±2)℃,光周期12h/d,光照强度约为2500lx。

1.2.5 数据处理 将数据输入Excel中,用DPS数据分析软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体种类污染及成活情况比较

从表2可以看出,不同种类的外植体经消毒处理后,污染率存在很大的差异;存活率中冬季芽达64%,比春季芽存活率高10%,差异显著,而死亡率2处理间相差不大。这可能因为冬季枝条剪回后经自来水冲洗,在相对比较清洁的组培室中催芽,本身带菌量少,而春季芽直接从田间采集,杂菌较多。

表2 不同取材方法对芽成活的影响
Table 2 Effect of different buds on survival

处理	接种数	污染率	死亡率	存活率
Treatment	No. of inoculation	Contamination rate (%)	Death rate (%)	Survival rate (%)
冬季芽	120	24.3 b	11.7 a	64.0 a
Buds from winter shoots				
春季芽	120	35.7 a	12.3 a	52.0 b
Buds from spring shoots				

注:不同字母表示差异达0.05显著水平。下同。

Note: Different letters are significantly different at 0.05 level. The same as below.

2.2 外植体不同灭菌方法的比较

比较4种消毒方法,污染率最低的为方法3(16.7%),与未加入0.1%升汞消毒的方法1、2差异达显著水平;死亡率最低的是用20%次氯酸钠消毒的方法1,仅为5%,而加入升汞的死亡率较高,且存在显著差异;加吐温与不加吐温之间存活率达显著差异,存活率最高的达到66.7%;用20%次氯酸钠消毒与先用20%次氯酸钠消毒再用0.1%升汞二次消毒的方法间存活率无显著差异,但用20%次氯酸钠消毒的在接种后20d开始生长发芽,而用0.1%升汞2次消毒的生长较晚,在接种后25d才开始露绿萌发(表3)。

表3 不同灭菌方法对芽成活的影响
Table 3 Effect of different sterilization on bud survival

方法	接种数	污染率	死亡率	存活率
Method	No. of inoculation	Contamination rate (%)	Death rate (%)	Survival rate (%)
1	60	28.3 b	5.0 b	66.7 a
2	60	36.7 a	6.7 b	56.6 c
3	60	16.7 c	18.3 a	65.0 a
4	60	18.3 c	20.0 a	61.7 b

2.3 不同激素对芽增殖情况的比较

不同种类生长素IBA、NAA与细胞分裂素6-BA的配合使用对芽的增殖产生不同效果。在相同浓度的细胞分裂素6-BA情况下,同样种类的生长素,较低浓度时增殖系数较大,小于2cm的苗所占比例稍高,但未达到显著水平;而在同样种类、同样浓度

的生长素条件下,又以较高浓度的细胞分裂素 6-BA 的增殖系数较大,大于 2 cm 或小于 2 cm 的苗所占比例间均达显著差异,说明细胞分裂素对增殖的影响较大,而生长素中以 NAA 的增殖作用优于 IBA (表 4)。其中以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 增

殖系数最大,达 7.1,其大于 2 cm 的苗所占比例为 75.3%,且叶色浓绿,生长健壮(图版-A);处理 6 增殖系数最低。综合比较,无论增殖系数、增殖芽株高均以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 更利于其生长。

表 4 不同激素对比对芽增殖的影响

Table 4 Effects of different hormones on bud proliferation

处理 Treatment	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	株高大于 2 cm Height over 2 cm (%)	株高小于 2 cm Height below 2 cm (%)	增殖倍数 Proliferation times
1	0.5	0.5	0.0	69.3 c	30.7 b	6.5 ab
2	0.5	1.0	0.0	72.3 bc	27.7 bc	6.3 ab
3	1.0	0.5	0.0	75.3 ab	24.7 cd	7.1 a
4	1.0	1.0	0.0	78.7 a	21.3 d	6.4 ab
5	0.5	0.0	0.5	59.7 d	40.3 a	6.0 b
6	0.5	0.0	1.0	60.3 d	39.7 a	4.2 c
7	1.0	0.0	0.5	75.3 ab	24.7 cd	6.3 ab
8	1.0	0.0	1.0	78.3 ab	21.7 cd	5.0 c

注:株高大于 2 cm=株高大于 2 cm 的芽数/增殖总芽数×100;株高小于 2 cm=株高小于 2 cm 的芽数/增殖总芽数×100。

Note: Height over 2 cm=Buds of height over 2 cm/total proliferated buds×100; height below 2 cm=Buds of height below 2 cm/total proliferated buds×100.

2.4 生根培养基的比较

当幼芽有 3~6 片叶,株高在 2 cm 以上时,选取叶色正常,生长健壮,有良好生长芽点的苗,接种在不同质量浓度的 IBA、NAA 生根培养基上(表 5),进行根的诱导。结果表明,随着生长素质量浓度的增加,生根率也随之增加,且根越粗壮。当生长素质量

浓度大于等于 2.0 mg/L 时处理间无显著差异,NAA 质量浓度为 2.0 mg/L 时,生根率最高,可达 95.6%,平均生根数为 3.1,但根粗无须根。1/2MS+IBA 2.0 mg/L 的生根率为 87.8%,平均生根数最多,达 3.9(图图版-B),与其它处理的平均生根数存在显著差异。

表 5 不同生长素对生根的作用

Table 5 Effects of different auxins on rooting

培养基 Medium	接种株数 No. of shoots	生根率 Root rate (%)	平均生根数 The average number of root
1/2MS+IBA 1.0 mg/L+0.05% 活性炭	80	68.9 c	2.1 c
1/2MS+IBA 1.0 mg/L+0.05% Activated Charcoal			
1/2MS+IBA 2.0 mg/L+0.05% 活性炭	80	87.8 ab	3.9 a
1/2MS+IBA 2.0 mg/L+0.05% Activated Charcoal			
1/2MS+IBA 2.5 mg/L+0.05% 活性炭	80	90.0 a	3.2 b
1/2MS+IBA 2.5 mg/L+0.05% Activated Charcoal			
1/2MS+NAA 1.0 mg/L+0.05% 活性炭	80	77.0 bc	1.9 c
1/2MS+NAA 1.0 mg/L+0.05% Activated Charcoal			
1/2MS+NAA 2.0 mg/L+0.05% 活性炭	80	95.6 a	3.1 b
1/2MS+NAA 2.0 mg/L+0.05% Activated Charcoal			

3 讨 论

木本植物组织培养的困难之一是无菌材料的获得^[2],而同一材料又受不同取样时期外植体老嫩的影响。本研究发现,加入吐温消毒虽然具有一定的吸附作用,但不利于随后的清洗工作,反而影响最后的存活率。而加入升汞进行再次消毒时虽然降低了污染率,但并未能显著提高存活率。对 Damas1869 李而言,若外植体较嫩时选用 75%酒精消毒 10 s,无菌水冲洗 2 次,再 20%次氯酸钠消毒 8 min,无菌水冲洗 6 次;外植体稍大时选用 75%酒精消毒 10 s,无菌水

冲洗 2 次,20%次氯酸钠消毒 8 min,无菌水冲洗 2 次,再用 0.1%升汞消毒 5 min,无菌水冲洗 6 次,均能取得较好的结果,存活率超过 65%。说明在获取无菌材料时,根据情况只要能保证一定的存活率,可采用不同的消毒方法。

植物在生长发育期间,体内激素处于一个动态变化过程,植物生长调节剂对其生长可以起到一定的调节作用。而不同种类和浓度的生长调节剂,在不同品种中的作用有显著的区别,所以选择适宜的激素组合和浓度,才能达到较好的增殖效果。钟士传等^[9] 钙果增殖用 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,

增殖系数为 6.9, 庄丽娟等^[4]欧李试管苗的增殖系数为 4.99, 孙新政等^[5]钙果 4 号用改良 MS+6-BA 2.0 mg/+NAA 0.02 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L 的增殖率远高于前 2 者, 达 11.8, 但经几次继代培养后有玻璃化现象产生, 有效芽变少。本试验 Damas1869 李的增殖系数为 7.1, 虽然增殖芽不及前者多, 但生长点良好, 芽生长健壮, 经多次继代并无不良现象。

不同材料生根时, 所用生长素种类、浓度不同。毕艳娟等^[6]对欧李的试验中以 1/2MS+IBA 1.0 mg/L 为最好, 陈子萱等^[7]在对桃砧木 Nemaguard 和 Lovell 的生根中采用 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 为最好, 生根率可达 80% 和 66.7%。孙新政等^[5]钙果 4 号欧李在 1/2 MS+IBA 1.0 mg/L+KT 0.02 mg/L 中生根率可达 100%, 但平均生根数最高的只有 2.3, 不利于移栽。活性炭在诱导生根中有两面性, 一方面吸附培养基中的非极性物质和色素等有害物质而有利于生根^[8-9], 另一方面, 也会吸附生根所必需的生长激素及其它营养物质而抑制生根^[10]。本试验在生根培养基中未加活性炭的处理中都产生了或多或少的愈伤, 且根系粗大, 可能由于体内积累了较多的细胞分裂素, 不利于生根, 而加入活性炭后能有效的抑制愈伤的产生, 根系生长正常, 有利于组培苗的移栽。(本文图版见封 3)

参考文献 Reference:

- [1] BECKMAN T, CUMMINS J.N. Rootstocks for peaches[J]. HortScience, 1991, 26(8): 974.
- [2] CHEN Zheng-hua. Wood plant tissue culture and apply [M]. Beijing: Higher Education Press, 1986.
陈正华. 木本植物组织培养与应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [3] ZHONG Shi-chuan, WANG Xia-li, YU Jun-xiang, CAO Bang-hua. Effect of phytohormone on tissue culture of *Carasus lumilis* Bunge[J]. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition, 2005, 36(1): 39-41.
- [4] ZHUANG Li-juan, SU Fu-cai. Rapid propagation of *Prunus humilis in vitro*[J]. Journal of Mongolia Institute of Agriculture and Animal Husbandry, 2005, 26(1): 16-19.
庄丽娟, 苏福才. 欧李试管苗的快繁[J]. 内蒙古农业大学学报, 2005, 26(1): 16-19.
- [5] SUN Xin-zheng, SHEN Shun-xian, LI Qing-wei, CHEN Shi-chang. Studies on tissue culture of Gaigu4 a line of *Cerasus humilis*[J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(1): 80-83.
孙新政, 申顺先, 李庆伟, 陈世昌. 钙果 4 号欧李组织培养技术研究[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 80-83.
- [6] BI Yan-juan, ZHOU Li-yan, GAO Shu-guo. Effect of growth regulators in a vitro culture of *Prunus Humilis* Bge[J]. Journal of Hebei Normal University of Science & Technology, 2006, 20(3): 17-21.
毕艳娟, 周丽艳, 高书国. 植物生长调节剂对欧李离体培养的影响[J]. 河北科技师范学院学报, 2006, 20(3): 17-21.
- [7] CHEN Zi-xuan, CAO Zi-yi, TIAN Fu-ping. Micropropagation of almond's rootstocks (Nemaguard and Lovell)[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2004(5): 524-528.
陈子萱, 曹孜义, 田福平. 扁桃砧木 Nemaguard 和 Lovell 的组培快繁[J]. 甘肃农业大学学报, 2004(5): 524-528.
- [8] BU Xue-xian, CHEN Wei-lun. The effect of activated charcoal on the adsorption of plant regulators in culture medium[J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 1988, 14(4): 401-405.
卜学贤, 陈维伦. 活性炭对培养基中调节物质的吸附作用[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 401-405.
- [9] LIU Yong-sheng, LI You-yong. The use of activated charcoal in plant tissue culture[J]. Plant Physiology Communications, 1994, 30(3): 214-217.
刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214-217.
- [10] CHEN Long-qing, JU Qing-kun. The effect of activated carbon on the rooting culture of the tube plantlets in three species of plants[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1995, 14(6): 600-602.
陈龙清, 鞠庆坤. 活性炭对几种植物试管苗生根的影响[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(6): 600-602.

徐春香等：利用胚性细胞悬浮系研究香蕉枯萎病抗性离体筛选技术 图版
(正文见686-690页)

XU Chun-xiang et al: Study on *in vitro* screening technique for mutants resistant to *Fusarium wilt* through embryogenic cell suspension of banana (*Musa* spp. AAA group)



图版说明

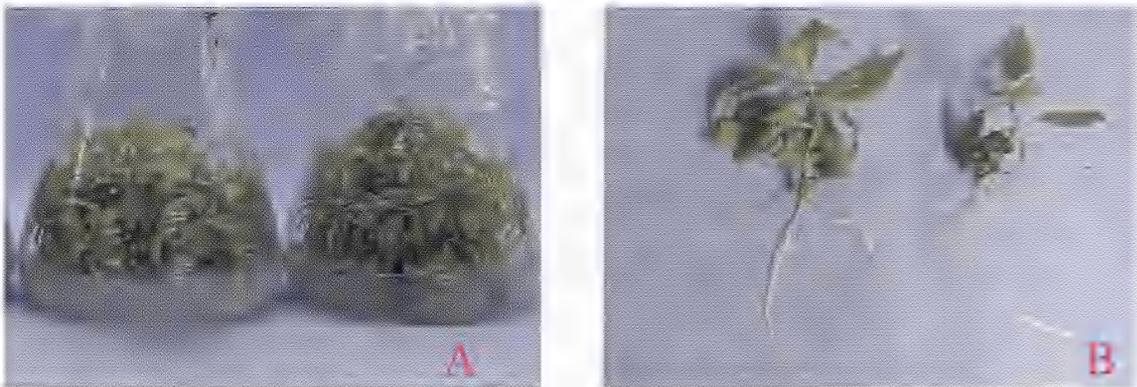
A. RD1培养基培养6周; B. RD2培养基培养4周; C. REG培养基培养4周; D. 生根培养基培养5周

Explanation of plates

A. Six weeks after inoculation on RD1 medium; B. Four weeks after inoculation on RD2 medium; C. Four weeks after inoculation on REG medium; D. Five weeks after inoculation on rooting medium

许建兰等：Damas 1869李组培繁殖技术研究 图版
(正文见740-743页)

XU Jian-lan et al: Studies on the tissue culture of Damas 1869 plum Plates



图版说明

A. 增殖生长; B. 生根

Explanation of plates

A. Proliferation of buds; B. Roots of Damas 1869