



吉塞拉樱桃砧木组培苗分化的研究

范志强¹,李成刚²,潭志坤²,刘玲艳²,孙仲序²

(1 山东省林业局, 济南 250014; 2 山东农业大学, 山东 泰安 271018)

摘要:通过对二个品种樱桃砧木的叶片和叶柄的诱导和分化研究,认为两种砧木的叶柄再生能力都强于叶圆盘,BA作用强于KT,NAA优于IBA。综合平衡后可总结出一种诱导和分化芽的通用配方,即:MS+BA 1~2 mg/L+KT 1~2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L。再生芽的频率最高可达42%~67%。1/2MS培养基附加生根粉(ABT)2 mg/L,黑暗处理3 d后,生根率和移栽成活率能达到91.8%~93.8%。

关键词:吉塞拉樱桃砧木;组织培养;快繁;正交设计

大樱桃果实色艳品质好,味甜而有芳香,为落叶果树中成熟期较早的树种。正确选择和利用砧木,迅速推出适宜的栽培品种和优良砧木,将有利于推广大樱桃栽培^[1-4]。目前大部分樱桃砧木是通过实生繁殖而成,而无性繁殖的还较少^[5,6],但组织培养将成为果树快繁的实用方法^[7-9]。与压条、扦插等常规繁殖的苗木相比,组培苗繁殖快,不占空间,遗传性状一致,根系发达,生长旺盛^[7,8,10]。目前有些果树已利用组培技术建立起工厂化育苗的生产线,在很多地方实现了商品化生产^[10,11],为此很多单位进行了樱桃砧木茎尖的组织培养研究^[10]。本试验选用从美国引进的矮砧吉塞拉樱桃(Gisela)为材料进行组织培养,以器官再生为目的,为以后基因转化和深入研究打下物质和理论基础。目前研究了分化、防止污染、生根、炼苗、移栽、露地移栽以及整个生产的管理等,成功地获得了30万株苗木。现将研究情况总结如下。

1 材料与方法

以大樱桃砧木吉塞拉5号和6号1年生苗木为试材,春季切取新梢幼嫩部分叶片和叶柄进行组织培养。

1.1 诱导培养的培养基及植物生长调节剂组合的设计

以MS为基本培养基,设计细胞分裂素KT和BA及生长素NAA、IAA、IBA为处理因素,每个因素设计3个水平。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计(表1),每个组合重复3次,每重复10瓶,每瓶三四片试验材料。

取露地苗顶部2~4位正在伸展或已展开的幼嫩叶片和叶柄,按常规消毒,用直径0.4 cm的打孔器,将叶片做成圆盘,平铺接种在培养基表面;取长度0.3 cm左右的叶柄斜插入培养基中。培养温度 $25\pm 3^\circ\text{C}$,光强约为2000 lx。接种后50 d,对再生频率进行调查分析,其

指标为:叶圆盘愈伤组织分化频率=分化愈伤组织叶片数/接种叶片数 $\times 100\%$;叶柄愈伤组织分化频率=分化愈伤组织叶柄数/接种叶片数 $\times 100\%$;叶圆盘和叶柄平均分化愈伤组织数(个/叶片)=愈伤组织总数/接种叶片数;叶柄芽再生频率=再生芽叶柄/接种叶片数。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表

水 平	BA	KT	NAA	IBA
I	2	2	0.5	0.5
II	1	1	0.1	0.1
III	0	0	0	0

1.2 生根培养基的设计

A-1:MS培养基附加生根粉(ABT)2 mg/L,黑暗处理3 d;A-2:只附加生根粉(ABT)2 mg/L;B-1:幼苗浸蘸500 mg/L滑石粉剂插入1/2MS培养基,黑暗处理3 d;B-2:幼苗浸蘸500 mg/L滑石粉剂插入MS培养基。CK:设置无附加物MS培养基为对照。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对叶片愈伤组织形成的影响

由表2的统计结果可以看出,两个砧木品种叶片愈伤组织形成难易、生长调节剂配比及生长状况均存在差异。5号品种在正交2、3、4、5组合中表现较好,接种两周左右,叶柄端伤口处可见少数绿色愈伤组织;大小如小米粒,柔软,透明,结构密实,生长缓慢;3周左右愈伤组织迅速增多、增大,生长较快;4周左右叶柄端伤口处全部形成愈伤组织,其频率达到80%以上。部分已长至与玉米粒般大小,颜色由绿转白,新鲜旺盛,同时有的愈伤组织分化出绿色小芽;6、7周后愈伤组织生长开始减缓,部分愈伤组织由白色转为褐色。6号砧木虽

然形成的愈伤组织性状与5号相同,但愈伤组织形成频率普遍低于5号,分化相对较难。从愈伤组织形成频率的动态变化来看,5号的愈伤组织形成频率的高峰期大约在接种3周后,高峰期比较集中,6号的再生频率的高峰期约在接种4周左右,高峰期持续时间较长。

表2 植物生长调节剂对叶片愈伤组织形成影响

处理	5号			6号		
	接种	愈伤组织	百分率	接种	愈伤组织	百分率
	叶片数	叶片数	(%)	叶片数	叶片数	(%)
1	18	18	25	17	15	88
2	16	16	97	20	12	6
3	16	13	81	24	8	33
4	12	12	84	13	6	46
5	15	15	91	22	15	68
6	18	18	56	21	21	100
7	20	3	15	21	2	10
8	16	5	31	20	7	35
9	15	0	0	21	0	0
CK	17	0	0	24	0	0

由表3可知,从两个品种平均值的极差来看,其处理因素的重要程度排列为,5号:BA>KT>NAA>IBA;6号:BA>NAA>IBA>KT。BA在两者都表现出较高活性,促进叶片愈伤组织形成的效果要比KT、NAA、IBA都要好。计算结果可确定,5号叶片愈伤组织形成最适宜的培养基组合为BA 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L,6号最适宜的培养基组合是BA 1.0 mg/L+KT 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L。

表3 $L_9(3^4)$ 正交设计各个因素处理平均值和极差

处理 平均值	5号				6号			
	BA	KT	NAA	IBA	BA	KT	NAA	IBA
k1	0.89	0.70	0.77	0.67	0.56	0.55	0.77	0.53
k2	1.00	0.77	0.67	0.59	0.75	0.50	0.34	0.54
k3	0.13	0.56	0.59	0.65	0.18	0.44	0.39	0.42
R	0.87	0.21	0.18	0.08	0.57	0.11	0.43	0.12

2.2 叶片愈伤组织芽再生体系的建立

2.2.1 叶片再生芽

从表4中看出,NAA对两个品种叶片再生芽的应用效果明显,激素作用效果大小依次为NAA>IBA>BA>KT,两品种结果相同。但两品种适宜的植物生长调节剂配比有所不同。5号比较好的配方是:BA 1.0 mg/L+KT 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L;6号比较好的配方是:BA 2.0 mg/L+KT 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L。利用该配方进行再生体系的建立,接种4周左右它们可在叶片边缘伤口处和褐色愈伤组织上长

出少量的小的绿色愈伤组织,结构密实,而且生长缓慢,由此逐渐分化出绿色芽点,再生出芽苗。5号再生芽的频率最高可达44%,6号叶片再生芽的能力高达67%。

表4 $L_9(3^4)$ 正交设计叶片再生芽的百分率

处理 平均值	5号				6号			
	BA	KT	NAA	IBA	BA	KT	NAA	IBA
k1	0.21	0.21	0.24	0.29	0.55	0.55	0.86	0.57
k2	0.27	0.07	0	0.19	0.39	0.05	0.04	0.35
k3	0	0.19	0.07	0	0	0.33	0.04	0.02
R	0.27	0.14	0.41	0.29	0.55	0.50	0.82	0.55

2.2.2 叶柄再生芽

表5结果表明,生长激素对叶柄再生影响重要程度可排列为,5号:BA>NAA>IBA>KT,6号:BA>IBA>KT>NAA,两者略有差异。5号接种两周左右,叶柄端伤口处可见少数小米粒大小的绿色愈伤组织,柔软、透明、生长较慢;3周左右愈伤组织生长加快,愈伤组织增多,而且部分分化成嫩白色短根;4周左右有大量的叶柄分化出浅白色的根;6周左右在愈伤组织处和

表5 $L_9(3^4)$ 正交设计叶柄再生芽百分率 mg/L

处理 平均值	5号				6号			
	BA	KT	NAA	IBA	BA	KT	NAA	IBA
k1	0.90	0.90	0.92	0.94	0.89	0.91	0.76	0.93
k2	0.98	0.81	0.63	0.90	0.95	0.57	0.40	0.89
k3	0.14	0.79	0.71	0.66	0.15	0.76	0.36	0.42
R	0.84	0.11	0.39	0.28	0.80	0.44	0.40	0.52

根上分化出大量的绿色小芽,有的直接从叶柄上分化出较为密集的小芽;7周左右叶柄的再生频率可达72%。6号接种4周左右分化出根,数量较多,生长较旺,陆续形成大量愈伤组织,然后从愈伤组织上逐

表6 不同组合处理樱桃砧木生根及移栽成活率

材料	处理组合	平均根长 (cm)	平均生根量 (条)	生根率 (%)	移栽成活率 (%)
5号	A-1	4.3	3.6	91.8	93.8
	A-2	3.5	3.1	91.4	87.4
	B-1	3.2	3.6	90.7	83.5
	B-2	2.8	2.8	89.5	80.2
	CK	0	0	0	0
6号	A-1	3.9	3.6	92.1	89.1
	A-2	3.3	3.0	84.6	78.9
	B-1	2.5	2.8	86.7	72.3
	B-2	2.1	2.2	78.2	69.8
	CK	0	0	0	0

渐分化出芽苗,分化芽的频率为69%。其分化的配方和叶片分化配方一样,两者形成芽苗再生体系通用配方为:MS+BA 1.0 mg/L+KT 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L。

2.3 樱桃砧木根的再生体系形成

由表6看出,两个品种的生根量和生根长度都相差不大,5号的生根率和移栽成活率比6号要高一些。从激素的处理来看,1、2号组合的生根率和3、4号组合差异不大,但移栽成活率用ABT 2mg/L比用滑石粉+ABT 500 mg/L好。前者处理后幼苗的基部大部分能直接长出幼根;而后者由于生根粉的浓度高,致使基部膨大,形成愈伤组织,由此长出的根疏松,侧根少,移栽后愈伤组织易腐烂,影响正常生长。另外,黑暗条件处理的苗木生根率高,根长,生根条数较多,因此选用A-1配方进行生根,可提高生根率和移栽成活率。

3 小结

(1)本实验的结果显示,同一基因型不同组织和器官的再生能力不尽相同,而且对培养条件的要求也有差异。两个品种砧木的叶柄再生能力都强于叶圆盘,在其他园艺作物上,如猕猴桃与菠菜上,同样也表现出叶柄的再生能力高于叶片的现象^[2,3]。就激素来看,BA对于叶片和叶柄而言,不论那一个品种都是分化的重要激素,其作用强于KT,而NAA的作用效果要优于IBA。

(2)在本试验条件下,5号和6号的再生能力差异显著,在叶片再生培养中,5号再生芽的频率最高可达44%,而6号叶片再生芽的能力高达67%。6号的叶柄再生较早,但接种后30~40 d仍有愈伤组织陆续发生,生长也较慢,再生频率可达72%;5号的叶柄再生较晚,

愈伤组织生长速率较快,生长高峰出现早,生长量大,分化芽的频率为69%。

(3)综合上述分析,两个品种在诱导愈伤组织和分化芽的试验中,其生长素浓度基本一样,而BA和KT的浓度变动在1~2 mg/L之间,二者处理效果差别不是太大。综合平衡后可总结出一种诱导和分化芽的通用配方,即:BA 1~2 mg/L+KT 1~2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L。

参考文献:

- [1] 郑晓军.樱桃的栽培[J].河南科技,1989(11):12-14.
- [2] 高新一,王玉英.樱桃的新砧木[J].植物杂志,1991(4):13-15.
- [3] 张建阁,李泽文.介绍几种甜樱桃的砧木[J].河北果树,1997(2):23-25.
- [4] 王白坡,管远定.浙江省樱桃资源及其繁殖方法的研究[J].浙江农业科学,1990(2):12-16.
- [5] 苏贵兴,张爽.甜樱桃的繁殖方法[J].山西果树,1989(4):4-5.
- [6] 李师翁.苹果茎尖培养和脱毒苗快速繁殖研究[J].甘肃农业科技,1994(6):17-19.
- [7] 祁玮.草莓茎尖的组织培养技术[J].沈阳农业大学学报,1995(2):12-15.
- [8] 马雪筠,周丽依.香蕉组织培养快速繁殖技术的研究[J].广东农业科学,1989(1):6-8.
- [9] 李宝苹,张向平.香蕉种苗工厂生产若干问题的探讨[J].广东农业科学,1989(3):45-46.
- [10] 阎贤伟.甜樱桃茎尖培养和快速繁殖研究[J].园艺学报,1990(4):34-36.
- [11] 韩东生,吴绛云.樱桃砧木的茎尖培养和快速繁殖[J].北方园艺,1993(3):12-13.
- [12] 孙加顺.优质大樱桃砧木大青叶通过鉴定[J].北京农业,2001(5):36.

Research of Regeneration System on Cherry Rootstock of Gisela

FAN Zhi-Qiang¹, LI Cheng-gang², TAN Zhi-kun², LIU Ling-yan², SUN Zhong-xu²

(1 Shandong Forestry Bureau, Jinan 250014, China;

2 Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Through the studies of the induction and differentiation of leaves and petioles of two varieties of cherry rootstock, we got the conclusion that the differentiating ability of petioles is more efficient than the leaf-discs, BA does better than KT, NAA is more effective than IBA. From all these factors considered, we get the a formula used both for shoot induction and subculture: MS+BA 1~2 mg/L+KT 1~2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L. The highest frequency of shoot induction reaches 42%~67%. In the medium of 1/2MS with ABT 2 mg/L, the rooting rate can reach 91.8% and the survive rate can reach 93.8%.

Key words: Cherry rootstock of Gisela; Plant tissue culture; Rapid propagation; Orthogonal design