

文章编号:1009-0568(2007)01-0013-04

# 甜樱桃离体叶片再生的研究

付宏岐<sup>1,2</sup> 吴云锋<sup>2\*</sup> 张王斌<sup>1,2</sup>

(1 塔里木大学植物科技学院,新疆阿拉尔 843300)

(2 西北农林科技大学植保学院,陕西杨凌 712100)

**摘要** 利用甜樱桃的无菌苗叶片做外植体,进行离体叶片再生不定芽研究。结果表明:培养基中添加的激素浓度、种类和配比均影响不定芽再生,6-BA和NAA组合诱导甜樱桃离体叶片再生的活性较强;在MS+6-BA3mg/L+NAA0.2mg/L+GA<sub>3</sub>0.5mg/L+AgNO<sub>3</sub>5.0~10.0mg/L培养基上,通过3次继代培养的不定梢的叶片,再生不定芽的频率达6.4%,确定良好的生根培养基为1/2MS+IBA0.7mg/L+NAA0.2mg/L+蔗糖20g/L+琼脂7g/L,生根率可达75.1%。

**关键词** 甜樱桃;组织培养;离体叶片;不定芽

**中图分类号**: S662.5

**文献标识码**: A

## Research on Regeneration of Shoots from in Vitro Leaves of Sweet Cherry

Fu Hongqi<sup>1,2</sup> Wu Yunfeng<sup>2\*</sup> Zhang Wangbin<sup>1,2</sup>

(1 College of Plant Science and Technology, Tarim University, Alar, Xinjing 843300)

(2 College of Plant Protection, Northwest A&amp;F University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract** Studies with leaf discs from micro propagated axillaries shoots in sweet cherry show that different types, concentrations and combinations of hormones in the medium could influence regeneration of shoots. 6-BA and NAA is more efficient than the others, 3 subcultures of leaf discs from adventitious shoots on the medium amended with MS+6-BA3mg/L+NAA0.2mg/L+GA<sub>3</sub>0.5mg/L+AgNO<sub>3</sub>5.0~10.0mg/L gave 6.4% of regeneration frequency, Meanwhile, the inducing rate on culture medium of 1/2MS+IBA0.7mg/L+NAA0.2mg/L+sucrose 20g/L+agar 7g/L being responsible for root growth up to 75.1% were accounted for the optimum one.

**Key words** sweet cherry; tissue culture; in vitro leaf; adventitious bud

甜樱桃(*Prunus avium* L.)是蔷薇科(*Rosaceae*)李属樱桃亚属乔木,原产欧洲,在世界许多国家都有栽培。甜樱桃果实鲜艳,味美甘甜,营养丰富,被誉为果中珍品,具有极高的经济价值,备受人们青睐,市场需求剧增。目前,各樱桃产区病害发生普遍严重,严重影响樱桃产量和品质,尤其是甜樱桃对根癌病、细菌性溃疡病等抗性不强,有必要改良,但传统的杂交育种法很难得到理想结果。通过细胞工程和基因工程技术来提高该品种的抗性则是一个有效的新方法。因此,建立起高效、稳定的再生体系是利用

细胞或基因工程育种的重要前提。由于叶不仅是光合作用的器官和水分平衡器官,也是植物的繁殖器官,因此,樱桃叶的离体培养在理论研究和生产实践中都有重要意义。所以我们进行了甜樱桃离体叶片再生不定梢的研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试品种于2003年8月购自陕西杨凌名优杂果基地,以红灯、意大利早红、早红宝石的无菌苗叶

① 收稿日期:2006-10-10

作者简介:付宏岐(1972-),男,讲师,硕士,主要从事植物病理学研究。 \*为通讯作者 E-mail:wuyf@nwsuaf.edu.cn

片为外植体。

## 1.2 试验方法

甜樱桃无菌体系的建立:增殖培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ~ 10.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L, 调节 pH 值至 5.8, 培养温度 25℃, 光照强度 2000 lx ~ 3000 lx, 每天光照 14 h, 黑暗 10 h。每月继代 1 次。在增殖培养基上生长一段时间后把苗高超过 1 cm 的试管苗转移到生根培养基上诱导生根。生根培养基为 1/2 MS + IBA 0.7 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 蔗糖 20 g/L + 琼脂 7 g/L, 接种后先暗培养 10 天, 然后转移到光下培养, 培养条件同增殖培养。

剪取生根幼苗顶端 1 ~ 3 节的新展开叶片作为外植体。去掉叶柄和叶尖端 2/3。然后沿与中脉垂直的方向横伤 3 道。以叶正面贴近培养基接种到诱导培养基上。诱导培养基为 MS、WPM 添加 6-BA 和 NAA、IBA、2,4-D、GA<sub>3</sub> 组成(表 1)。同时添加 3% 蔗糖和 0.68% 琼脂。调节 pH 值为 5.8。外植体接种后先黑暗处理 10 天, 然后在光下培养, 培养条件同增殖培养, 培养过程中每隔 7 天更换一次培养基。培养 7 周后统计叶片的不定芽再生率和再生的不定芽数。

## 2 结果与分析

### 2.1 甜樱桃离体叶片的形态分化及愈伤组织诱导(黑暗处理 15 天)



图 1 红灯叶片经 30 天培养后的愈伤组织



图 2 红灯叶片经 50 天培养后的再生芽

甜樱桃的离体叶片在诱导培养基上黑暗处理 15 天后, 即形成大量的愈伤组织(图 1): 一种是疏松、淡黄色愈伤组织; 另一种为绿色、质密的瘤状突起。在整个培养过程中, 前一种愈伤组织都不分化,

最后褐化死亡; 后一种愈伤组织在光下培养 3 ~ 4 周后能从中分化出绿色小芽(图 2)。从表 1 看出, 在供试的 27 种培养基中, 只有 2 种可以诱导产生不定芽, 而且再生频率较低。孙清荣等<sup>[5]</sup>利用甜樱桃品种吉列玛的叶片做外植体, 诱导叶片再生的频率可以达到 33.3%, 黄文江等<sup>[6]</sup>利用马哈利樱桃品种吉列玛的叶片做外植体, 诱导叶片再生的频率达 52.4%, 这说明外植体的再生能力由它的内在基因型决定。

诱导培养基中添加的激素种类和水平是影响离体叶片再生不定芽的重要因素。细胞分裂素 6-BA 诱导甜樱桃离体叶片再生时活性较强(表 1), 在添加 6-BA 和 NAA 的培养基上叶片的再生频率最高为 6.4%。由此可见选择适宜的激素种类和配比是诱导离体器官高效再生的先决条件。试验采用 MS + 6-BA 3 mg/L + NAA 0.2 mg/L, 做诱导再生培养基。甜樱桃的离体叶片再生频率远远于刘庆忠和孙清荣等用杂种樱桃做的试验。究其原因除外植体的基因型影响外, 也可能是激素的种类或配比不当, 尚有待进一步研究证实。

### 2.2 硝酸银在叶片愈伤组织诱导培养和芽的分化中的作用

表 2 抗氧化剂硝酸银在甜樱桃芽的增殖培养中的作用

AgNO <sub>3</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )	叶、愈 伤褐变	接入不定芽 叶数	再生不定芽 增殖数	再生频率/%	玻璃 化苗数
5.0	暗黄色, 轻度褐变	45	5	11.1	0
10.0	暗黄色, 轻度褐变	42	6	14.3	0
15.0	黄褐色, 褐变	48	3	6.3	0
0	褐色, 严重褐变	43	2	4.7	15

表 2 结果表明, 硝酸银对甜叶片的再生不定芽数有明显影响, 5.0 ~ 10.0 mg/L 的 AgNO<sub>3</sub> 具有良好的抑制愈伤组织中多酚类化合物氧化褐变的作用, 有利于愈伤组织生长和芽的增殖, 可以提高芽的再生频率。试验中观察到添加 AgNO<sub>3</sub> 的培养基对防止试管苗玻璃化也有明显的作用。

表 3 不同浓度的 IBA 对甜樱桃生根的影响

IBA 浓度 mg/L	生根率 (%)	平均根长 (cm)
0.2	17.1	0.7
0.4	24.8	1.1
0.6	35.4	2.4
0.8	48.2	2.8
1.0	51.6	3.4
1.4	20.3	1.7

表1 甜樱桃的离体叶片在不同培养上的再生反应

编号	培养基	激素浓度(mg·L <sup>-1</sup> )					外植体数	产生不定芽的外植体数		平均每个外植体再生的不定芽数
		6-BA	NAA	IBA	2,4-D	GA <sub>3</sub>		个数	再生频率(%)	
1	MS	1.0	0	0	0.1	0	48	0	0	0
2	MS	1.0	0	0	0.2	0	46	0	0	0
3	MS	1.0	0	0	0.3	0	40	0	0	0
4	MS	1.0	0	0	0.5	0	52	0	0	0
5	MS	1.0	0	0	1.0	0	39	0	0	0
6	MS	1.0	0	0	1.5	0	47	0	0	0
7	MS	1.5	0	0	0.3	0.5	52	0	0	0
8	MS	1.5	0.1	0	0	0	47	0	0	0
9	MS	1.5	0.3	0	0	0.5	43	0	0	0
10	WPM	1.5	0.3	0	0	0	45	0	0	0
11	MS	2.0	0	0	0.2	0	48	0	0	0
12	MS	2.0	0	0	0.4	0.5	49	0	0	0
13	MS	2.0	0.3	0	0	0.5	48	0	0	0
14	MS	2.0	0.4	0	0	0.5	40	0	0	0
15	WPM	2.0	0	0	0	0	46	0	0	0
16	MS	2.5	0.2	0	0	0.5	40	0	0	0
17	MS	3.0	0.1	0	0	0	48	0	0	0
18	MS	3.0	0.2	0	0	0.5	47	3	6.4	1.3
19	MS	3.0	0.3	0	0	0.5	48	2	4.2	1.3
20	WPM	3.0	0.3	0	0	0.5	48	0	0	0
21	WPM	3.0	0.5	0	0	0	42	0	0	0
22	MS	4.0	0.20	0	0	0	50	0	0	0
23	MS	4.0	0.4	0	0	0	38	0	0	0
24	WPM	4.0	0.5	0	0	0	37	0	0	0
25	MS	5.0	0	0	0	0	45	0	0	0
26	MS	5.0	0	0.7	0	0	45	0	0	0
27	WPM	5.0	0	0.7	0	0	43	0	0	0

### 2.3 IBA 和 NAA 对甜樱桃生根的影响

表3结果表明,用IBA诱导生根时,其最佳处理浓度为1.0mg/L。IBA在0.2~1.0mg/L的范围内,随浓度增加、生根率及平均株高均增加,且在IBA浓度为1.0mg/L时达最大值,生根率及平均根长分别为51.6%及3.4cm,当IBA浓度超过1.0mg/L时,生根率及平均根长有所下降,IBA浓度为1.4mg/L时,生根率仅为20.3%,仅比IBA 0.2 mg/L的生根率增加3.2%。

从表4可以看出,生根培养基中激素的种类和用量,对生根的影响较大,以MS+6-BA0.7mg/L+NAA0.2mg/L为生根培养基,生根率最高,可达75.1%。试验中观察到转入生根培养基的幼苗基部10d左右以后出现多个瘤状小突起,进而长出幼根,20d根可长到3cm左右(图3,4),根系生长健壮且

柔软不易折断,根系洁白正常。

表4 不同浓度NAA和IBA组合对甜樱桃幼苗生根影响

激素浓度(mg/L)	诱导生根率(%)
IBA 0.3 + NAA0.1	19.3
IBA0.5 + NAA0.1	27.4
IBA0.7 + NAA0.2	75.1
IBA1.0 + NAA0.2	67.2
IBA0.5 + NAA0.2	9.7
IBA0.7 + NAA0.5	70.6
IBA1.0 + NAA1.0	28.5

## 3 讨论

樱桃离体叶片组织培养主要包括子叶和叶片外植体的培养。Mante(1989)<sup>[1]</sup>和Schmidt(1993)<sup>[2]</sup>分别研究了酸樱桃和甜樱桃胚子叶的离体培养方法。Yang等(1992)对甜樱桃品种和砧木F12/1离

体叶片再生培养的光照条件、不同激素的诱导率、基本培养基的诱导差异进行了研究<sup>[3]</sup>。Matsuta 等(1991)对10个樱桃品种的叶片进行了离体培养,试验证明MS基本培养基最适合于叶片的培养<sup>[4]</sup>,这与本实验的研究结果是一致的。

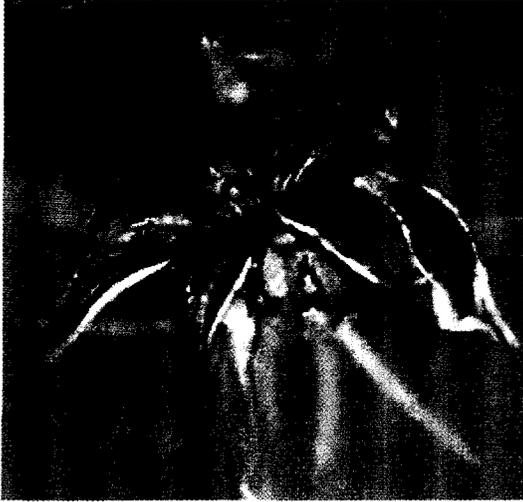


图3 示试管苗诱导生根

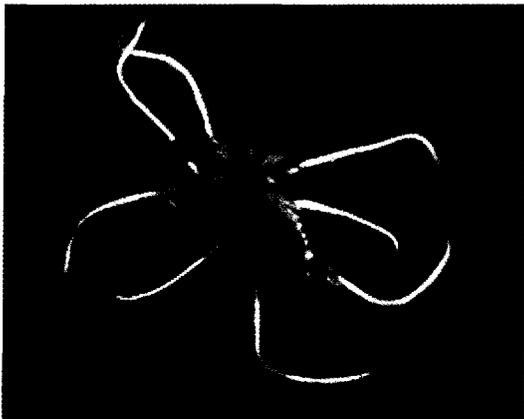


图4 示试管苗根

孙清荣等(2001)对甜樱桃品种吉列玛离体叶片的研究发现基本培养基与适宜的生长调节剂配合是诱导甜樱桃叶片产生不定梢的重要条件,但再生率太低,分析认为基因型对叶片再生不定梢有重要影响<sup>[5]</sup>。黄文江等(2002)采用WPM为基本培养基添加BA和IBA作诱导再生培养基,进行了马哈利樱桃离体叶片再生不定芽的研究<sup>[6]</sup>。马哈利樱桃的离体叶片再生频率远远低于刘庆忠(2001)<sup>[7]</sup>和孙清荣等(2000)<sup>[8]</sup>用杂种樱桃做的试验,认为外植体的

再生能力由它的内在基因型决定。但本试验采用WPM为基本培养基添加一定比例的BA、NAA或IBA作诱导再生培养基,甜樱桃离体叶片都未能再生不定芽。以MS作为基本培养基,其离体叶片的再生率也是比较低的,最高只达到6.4%。

本试验研究发现核果类的甜樱桃离体叶片再生较仁果类果树确实比较困难,这与前人的研究报道是一致的。分析认为用MS为基本培养基添加一定比例的BA和NAA可以诱导甜樱桃的成龄叶片产生不定梢,但再生频率较低。可能品种的基因型对叶片再生不定梢有非常关键的作用。因此,对于影响再生的各种因素以及提高再生频率的方法,还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Mante S, Scoria R, Cordts J M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus clomestica* and *Prunus cerasus* [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1989, 19(1): 1~11.
- [2] Schmidt H, Ketzal A. Regeneration of adventitious shoots in vitro in cherry. IV. use of adventitious shoot regeneration of cotyledons and "embryo rescue" in cherry breeding [J]. *Gartenbauw issenschaft*, 1993, 58(2): 64~67.
- [3] Yang H, Schmid H. Investigations into the regeneration of adventitious in vitro in cherry. H. formation of adventitious shoots in vitro leaves of various *Prunus avium* idiotypes [J]. *Gartenbauw issenschaft*, 1992, 57(1): 7~10.
- [4] Matsuta N, Yamake S. Adventitious regeneration in vitro in cherries. I. adventitious shoot formation from in vitro - cultured leaves of the cherry rootstock 209/1 [J]. *Gartenbauw issenschaft*, 1991, 56(5): 210~213.
- [5] 孙清荣,李勃,张力思,等.甜樱桃品种吉列玛叶片再生不定梢的研究[J].*落叶果树*, 2001, (1): 10~11.
- [6] 黄文江,刘庆忠,赵红军,等.马哈利樱桃叶片再生的研究[J].*落叶果树*, 2002, (4): 1~3.
- [7] 刘庆忠,赵红军,李志强.甜樱桃矮化砧木吉塞拉(*Gisela*)的离体叶片再生植株研究[J].*果树学报*, 2001, 18(5): 255~257.
- [8] Sun qingrong, Shi yinPing, Wang qiangsheng, etal. Shoot regeneration from somatic cells of cherry [A]. *Zhu DeWei, Geffreg Hawin, International Symposium on Biotechnology Application in Horticultural Crops (Abstract)* [C]. Beijing, 2000, 44.