



## 酸樱桃组培快繁技术体系的研究

孙 宁, 许雪峰, 韩振海, 孔 瑾, 王 忆\*

(中国农业大学 园艺植物研究所, 北京 100094)

**摘 要:**以酸樱桃(*Prunus cerasus*)新梢茎尖和带腋芽的茎段为外植体,采用茎段组织培养的方法,用MS和F<sub>14</sub>培养基,分别添加不同质量浓度的6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)和3-吲哚丁酸(IBA),进行酸樱桃组培快繁技术体系研究。结果表明,MS培养基是适合酸樱桃生长的基本培养基;培养基中分别加入0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA和0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA,增殖效果最好,增殖率为4.46倍,有效新梢数可达83.6%;组培苗在1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA培养基上根诱导效果最好,生根率可达71.4%,平均根长2.1 cm;移栽到蛭石基质中成活率可达80%。

**关键词:**酸樱桃;离体快繁;组织培养

**中图分类号:**Q813.1;S662.5 **文献标识码:**A

### *In vitro* Tissue Culture and Rapid Propagation of Sour Cherry

SUN Ning, XU Xue-feng, HAN Zhen-hai, KONG Jin, WANG Yi\*

(Institute for Horticulture Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The technology of tissue culture and rapidly propagation of sour cherry was studied using new shootings and stem sections with axillary bud as explants. There were 2 kinds of basal cultural medium (MS and F<sub>14</sub>), 2 kinds of hormone with different concentration [6-benzyladenine (6-BA) and 3-indole butyric acid (IBA)]. The results showed that the buds grown better in MS than that in F<sub>14</sub> medium. MS medium with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA was the most suitable for the propagation of sour cherry and the propagation rate reached 4.46 times. The effective number of new shoot was up to 83.6%. On the other hand, the good medium to induce root was 1/2 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA with 71.4% of rooting rate and 2.1 cm of average root length. There was higher proportion of viability planted test-tube seedlings in the substratum (vermiculite), the survival rate was up to 80%.

**Key words:** *Prunus cerasus*; rapid propagation; tissue culture

酸樱桃属蔷薇科樱桃属,原产欧洲,既可作为栽培品种又可作为甜樱桃的砧木,同时也是加工果汁和果酒优质原料<sup>[1]</sup>。它的特点为丰产早果,根系发达,固地性强,与甜樱桃品种间嫁接亲和力强,长势健壮,树冠高大。该种砧木对土壤要求不严格,适应性较强,抗寒,比较耐涝,是优良的樱桃种质。

酸樱桃多用实生播种进行繁殖,但存在苗木不

整齐,种子收集困难等问题。近年来,国内外开始利用组织培养快速繁殖酸樱桃,但主要是通过微茎尖或芽孢经过脱分化过程,最终实现分化<sup>[2-5]</sup>。但该方法存在操作繁琐,对设备要求高,扩繁时间长等问题。戴洪义等<sup>[6]</sup>在研究樱桃砧木‘Colt’时发现,以腋芽分生增殖既能减少遗传变异,又可直接应用于生产,明显地缩短了快繁周期。

收稿日期:2007-08-20;修改稿收到日期:2007-11-07

基金项目:北京市自然科学基金重点项目(6071002);北京市重点实验室项目资助

作者简介:孙 宁(1982-),女(汉族),硕士研究生,主要从事果树组织培养与保存方面研究。E-mail:sunning301@126.com

\* 通讯作者:王 忆,博士,讲师,主要从事果树分子生物学及组织培养研究。Email:wangyi@cau.edu.cn

酸樱桃‘CAB’砧木,能延迟开花期,避开晚霜期,预防冻害发生,是常用的优良砧木品种<sup>[7]</sup>。目前,酸樱桃‘CAB’组培快繁技术未见报道,本试验旨在建立和优化其组培快繁技术体系,以期为酸樱桃的组培快繁生产提供参考,为进一步研究酸樱桃种质离体保存奠定技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

采自北京市农林科学院林业果树研究所苗圃内的酸樱桃(*Prunus cerasus* Mill.)春季根蘖苗,品种为‘CAB’。

### 1.2 外植体消毒

将酸樱桃的顶芽和带腋芽的茎段作为外植体,经自来水清洗,剪成1 cm茎段。在超净工作台中用75%乙醇浸泡30 s,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>分别消毒5和7 min,后用无菌水清洗5次,无菌滤纸吸干多余水分<sup>[8]</sup>。

### 1.3 培养基及培养条件

初代培养为基本培养基MS(琼脂6 g·L<sup>-1</sup>、蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8)和F<sub>14</sub>(琼脂6 g·L<sup>-1</sup>、蔗糖20 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.4)培养基<sup>[9]</sup>。

培养温度为(23±2)℃,每天光照时间10 h,光照强度1 800~2 000 lx。

### 1.4 试管苗增殖培养

增殖培养基以筛选出的适合初代培养的培养基为基础,添加不同浓度配比的生长素和细胞分裂素。

每处理均接种10棵苗,3次重复,培养1个月后,统计增殖系数、有效新梢数(即分化苗长度>1 cm的植株)、有效新梢率。

增殖系数=分化苗总数/接种数

有效新梢率=有效新梢数/分化苗总数×100%

### 1.5 试管苗生根及移栽

本试验采用两种方法进行生根实验:一是高浓度生长素苗基浸蘸法,二是1/2基本培养基添加不同浓度的生长激素IBA。

每种处理接种数为30株,培养1个月后,统计生根数(即生根的植株数)、生根率、平均根长。

生根率=生根数/接种数×100%

平均根长=所有根的长度总和/根总数

蒋启林等<sup>[10]</sup>在研究樱桃砧木‘Colt’生根苗移栽时,发现移栽成活率与移栽后1周的温度及湿度有很大关系。选择根长2 cm左右、生长势一致的生根苗,开盖炼苗3~5 d后将苗取出,洗净根上的琼

脂,移入已经灭过菌的基质河砂、蛭石和营养土+蛭石(1:1)中,移栽温度保持18~23℃,移栽第1周主要覆膜保证湿度,定时通风。

每种基质中移栽生根苗30株,培养1个月后,统计成活率。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体的消毒和初代培养基的选择

试验采用0.1% HgCl<sub>2</sub>对外植体杀菌,考虑到升汞对外植体的毒害作用及预试验结果,杀菌时间控制在5和7 min,预期得到无菌植株即可,观察发现,植株主要出现细菌污染,成活率分别达66.7%、82.9%,因此消毒时间采用7 min较为适宜。

植株培养1个月后,顶芽和茎段不经形成愈伤组织阶段,直接分化产生不定芽。接种在MS培养基上的无菌苗,生长健壮,颜色翠绿,而接种在F<sub>14</sub>培养基上的无菌苗,生长点褐化死亡,玻璃化现象严重(图版I,1),因此试验认为MS培养基较适合于酸樱桃初代培养。

### 2.2 激素对酸樱桃增殖的影响

Wilkins<sup>[11]</sup>曾报道6-BA和IBA是适合酸樱桃扩繁的最佳激素,因此本试验重点研究不同浓度的6-BA和IBA激素对酸樱桃生长和扩繁的影响。结果如表1所示,在1、2、3、4号(IBA质量浓度均为0.1 mg/L,6-BA质量浓度分别为0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)培养基中,植株生长缓慢,有黄化、死亡现象,增殖系数也较小;在7、8、11、12号(6-BA质量浓度高,为1.5、2.0 mg/L)培养基中,酸樱桃的增殖系数较高,尤其以12号(6-BA质量浓度2.0 mg/L、IBA质量浓度0.3 mg/L)培养基最为突出,增殖系数可达6.1倍,但由于分裂素浓度较高的原因,分化苗均有不同程度的玻璃化现象;而在5、6、9、10号(IBA质量浓度为0.2、0.3 mg/L)培养基中,分化苗生长势较好,其中5号培养基(MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA)分化苗的增殖系数为4.5倍,有效新梢(即新梢长度>1 cm)率可达83.6%,综合所有指标,以5号培养基(MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA)为酸樱桃增殖的最佳培养基(图版I,2)。在9号培养基(MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA)中,植株生长最为健壮,其分化苗均为节间分化,相对于其它培养基来说,其最适合酸樱桃的壮苗生长。

### 2.3 不同生根方式对酸樱桃生根的影响

结果如表2、3所示,100 mg·L<sup>-1</sup> IBA浸泡30

min, 200 mg · L<sup>-1</sup> IBA 浸泡 5 min, 生根效果均较好, 生根率可达 100%, 并且平均根长均大于 8 cm (图版 I, 3); 当培养基中添加质量浓度为 0.5 mg · L<sup>-1</sup> IBA 时, 酸樱桃生根率可达 76.7%, 平均根长 2.1 cm (图版 I, 4)。由此可以看出, 高浓度生长激素短时间浸泡和低浓度长时间浸泡, 生根效果都比较好, 但是当生长激素浓度过高时, 会产生较大愈伤组织, 不利于生根。比较两种生根方法, 前一种方法操作较复杂, 但生根率较高, 根生长速度也比较快,

可缩短生根及移栽的时间。后一种方法比较容易, 但生根率稍低, 根生长比较慢, 1 个月后可满足正常的移栽。因此可根据实际需要, 选择其中一种方法进行生根。

#### 2.4 生根苗的移栽

移栽成活率如表 4 所示, 当基质为蛭石时, 成活率最高可达 80%, 1 个月后, 新叶开始长出, 表明移栽成活后将其移入温室, 成活率可达 100%。

表 1 不同激素浓度对比对酸樱桃生长和扩繁的影响

Table 1 The growth and propagation of *Prunus cerasus* with different hormone combinations

培养基编号 Code of medium	激素浓度 Hormone concentration /(mg · L <sup>-1</sup> )		增殖系数 Propagation rate	有效新梢数 Effective new shoot number	有效新梢率 Effective new shoot rate /%	植株生长势 Plant growth potential
	6-BA	IBA				
1	0.5	0.1	1.3h G	0g E	0	生长缓慢, 1/3 植株黄化死亡, 分蘖较少
2	1.0	0.1	1.5gh FG	0g E	0	生长缓慢, 1/2 植株黄化死亡, 黄色丛生芽
3	1.5	0.1	2.5f E	0g E	0	生长缓慢, 1/10 植株黄化死亡, 黄色丛生芽
4	2.0	0.1	2.1fg EFG	0.6fg DE	9.7	生长缓慢, 1/3 植株黄化死亡, 黄色丛生芽
5	0.5	0.2	4.5de CD	11.2a A	83.6	生长旺盛, 基部绿色丛生芽, 较多有效新梢
6	1.0	0.2	4.5de CD	6.6c B	49.3	生长旺盛, 基部绿色丛生芽
7	1.5	0.2	5.6ab AB	8.2b B	48.8	生长旺盛, 基部丛生芽, 有愈伤组织玻璃化现象
8	2.0	0.2	5.3bc BC	7.8bc B	49.4	生长旺盛, 基部丛生芽, 愈伤组织玻璃化现象严重
9	0.5	0.3	2.3f EF	2.0e CD	28.6	植株伸长, 茎较粗壮, 略有高脚现象。节间分化芽, 生长势较好
10	1.0	0.3	3.9e D	0.6fg DE	13.6	生长旺盛, 基部绿色丛生芽, 轻微玻璃化现象
11	1.5	0.3	4.8cd BC	1.6ef DE	12.5	生长旺盛, 基部绿色丛生芽, 轻微玻璃化现象
12	2.0	0.3	6.1a A	3.4d C	18.5	基部绿色丛生芽, 分蘖较多, 分化苗玻璃化现象严重

注: 表中数据采用邓肯新复极差检验法, 小写字母表示 5% 显著水平, 大写字母表示 1% 显著水平。

Note: The data were analyzed with Duncan's new multiple range test, and the different normal letter indicates significant difference at 5% level and different capital letter indicates significant difference at 1% level.

表 2 苗基浸蘸法对生根的影响

Table 2 Effect of dipping method on root formation

IBA 浓度 Concentration of IBA /(mg · L <sup>-1</sup> )	处理时间 Treatment time/min	生根数 No. of rooting	生根率 Rooting rate/%	平均根长 Average length of root/cm	备注 Note
100	5	10	33.3	0.5	
	10	20	66.7	5.5	
	15	23	76.7	6.2	生根粗壮, 有较小愈伤组织。
	20	30	100	5.1	
	30	30	100	8.9	
200	5	30	100	8.6	
	10	10	33.3	4.1	
	15	20	66.7	5.2	处理时间短的生根好, 长的有愈伤组织产生。
	20	0	0	0	
	30	0	0	0	
300	5	0	0	0	
	10	0	0	0	
	15	0	0	0	产生较大愈伤组织, 节间、叶片划伤处愈伤生须根。
	20	0	0	0	
	30	0	0	0	

表 3 不同 IBA 浓度对酸樱桃生根的影响

Table 3 Effect of different IBA concentrations on root formation of *Prunus cerasus*

IBA 浓度 Concentration of IBA /(mg · L <sup>-1</sup> )	生根数 No. of rooting	生根率 Rooting rate /%	平均根长 Average length of root /cm	备注 Note
0	13	44.3	1.2	生根较早,由基部直接生根。
0.5	23	76.7	2.1	根生长粗壮,且有大量须根。
1.0	19	63.3	1.3	生根较好,有愈伤组织产生。
1.5	19	63.3	1.0	生根较好,有愈伤组织产生。
2.0	18	60.0	0.6	根生长粗而短,有较大愈伤组织产生。

表 4 不同基质对酸樱桃成活率的影响

Table 4 Effect of different substations on survival rate of *Prunus cerasus*

基质 Substratum	成活数 No. of survival	成活率 Survival rate /%
河砂 Sand	6	20
蛭石 Vermiculite	24	80
蛭石:营养土 Vermiculite:Nourish soil (1:1)	18	60

### 3 讨论

本试验中,0.1%升汞杀菌 7 min 即可达到较好的杀菌效果,杀菌效果与外植体的类型、树龄、取材时间及材料所处的环境不同有关<sup>[12]</sup>,针对不同发育时期和种类的外植体,应采取不同的杀菌处理时间。F<sub>14</sub>是樱桃组织培养过程中常用的培养基<sup>[13]</sup>,但本试验中采用 F<sub>14</sub>作为酸樱桃生长的初代培养基,出现茎尖生长点褐化死亡以及玻璃化的现象,分析原因可能是由于酸樱桃的基因型不同于其它樱桃种属的品种;此外,杨振国等<sup>[14]</sup>在研究酸樱桃玻璃化苗时发现添加 20 g · L<sup>-1</sup>蔗糖可导致酸樱桃 20%的玻璃化苗,随着蔗糖浓度的增加,玻璃化苗数逐渐减少。

因此,蔗糖含量少也可能是 F<sub>14</sub>培养基导致试管苗玻璃化的原因。Borkow 和 Opilow<sup>[15]</sup>在培养酸樱桃‘北斗’和‘Schattenmorell’时发现,高浓度的 BA 是导致试管苗玻璃化的原因,与本试验结果较一致。高红兵等<sup>[16]</sup>研究分析高浓度 6-BA 导致组培苗内源 IAA、GA<sub>3</sub> 和 ZR 含量的上升和内源 ABA 含量的下降。植物体内 IAA、GA<sub>3</sub> 和 ZR 具有促进植物细胞生长、分裂和分化等生理作用,而 ABA 具有抑制生长作用,因而导致玻璃化现象的发生。James<sup>[17]</sup>研究结果表明,较高 IBA 水平和短时间培养有利于苹果砧木 M<sub>9</sub> 的生根,而长时间培养则形成大量愈伤组织,影响生根。但伍克俊等<sup>[18]</sup>进行的脱毒大樱桃分化苗生根试验结果显示,当 IBA 质量浓度在 0.4 ~ 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 范围内,其浓度越高,根诱导率越高。本试验结果与前者较为一致,与后者存在一定差异,这可能与外植体材料不同有关,其具体原因有待进一步研究。

本试验建立了酸樱桃‘CAB’组培快繁的体系,不仅能为酸樱桃这一常用的砧木规模化生产提供可行的技术依据,而且为其它樱桃属植物的生产提供很好的借鉴。

### 参考文献:

- [1] ZHOU Y(周 宇),ZHANG X M(张晓明),YANG H(闫国华). Technology of cutting and seeding for sour cherry[J]. *China Countryside Well-off Technology*(中国农村小康科技),2005,10:31-32(in Chinese).
- [2] JIANG Q L(蒋启林),DENG J L(邓家林),DAI ZH L(代正林). Tissue culture and rapid propagation from dormancy buds of sour cherry [J]. *Southwest Horticulture*(西南园艺),1994,3:11(in Chinese).
- [3] TANG X J(唐晓杰),MENG Q F(孟庆繁),YANG ZH G(杨振国). On the technology of tissue culture and rapid propagation of *Prunus cerasus*[J]. *Journal of Beihua University*(Nat. Sci. Ed.) (北华大学学报·自然科学版),2004,5(4):355-357(in Chinese).
- [4] PONIEDZIALEK W, LECH W, MALODOBRY M. Effect of growth regulations on rooting sour cherry in tissue culture[J]. *Acta Horticulturae Growth Regulators*,1986,179:847-851.
- [5] SNIR I. A micropropagation system for sour cherry[J]. *Scientia Hortic*,1983,22:311-386.
- [6] DAI H Y(戴洪义),WANG R(王 然),YU SH M(于士梅). *In vitro* propagation of virus-free ‘Colt’ as rootstock for cherry[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯),1995,1:41(in Chinese).

- [7] ZHANG X H(张学河), LU W D(路卫东). The frost occurring and recovery for sweet cherry[J]. *Yantai Fruits* (烟台果树), 2006, (1): 15—16(in Chinese).
- [8] LIU H J(刘海军), GUO B(郭 斌), YAN Q(晏 琼), LIU Y J(刘玉军), LIU CH CH(刘春朝). Tissue culture of four *Rhodiola* species [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2006, 26(10): 2 023—2 027(in Chinese).
- [9] LI H W(李洪雯), CHEN K L(陈克玲), LIU J J(刘建军). Studies on the *in vitro* tissue culture of Mirabolano 29 C[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2003, 30: 686(in Chinese).
- [10] JIANG Q L(蒋启林), DENG J L(邓家林), DAI ZH L(代正林). Tissue culture of 'Colt' as rootstock for cherry[J]. *Southwest Horticulture* (西南园艺), 1994, 4: 13—14(in Chinese).
- [11] WILKINS C P, DODDS J H. Effect of various growth regulators on growth *in vitro* of cherry shoot tips[J]. *Plant Growth Regulation*, 1982, 1: 209—216.
- [12] ZHENG H J(郑红军), LIU Q ZH(刘庆忠). Research progress in cherry *in vitro* culture[J]. *Shandong Agriculture Sciences* (山东农业科学), 2005, 6: 69—71(in Chinese).
- [13] CHEN J ZH(陈君帆), LI Q(李 青), SUN ZH(孙 钊). Studies on shoot-tip culture of *Prunus pseudocerasus*[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2003, 30(3): 317—318(in Chinese).
- [14] YANG ZH G(杨振国), MENG Q F(孟庆繁), TANG X J(唐晓杰). Occurrence and prevention of vitrification in tissue culture of *Prunus cerasus*[J]. *Economic Forest Researches* (经济林研究), 2004, (2): 47—48(in Chinese).
- [15] BORKOW S B, OPILOW S M. Influence of BA and other CTK on proliferation and metabolic status of sour cherry cultures cultivated *in vitro*[J]. *Fruit Sci. Reports*, 1988, 15(4): 147—156.
- [16] GAO H B(高红兵), WANG P F(王朋飞), DIAO SH Q(刁绍启), CAO L J(曹丽娟). Effect of 6-BA on dynamic changes of four endogenous hormones concentrations of *Prunus cerasus* tissue culture seedlings[J]. *Journal of Northeast Forestry University* (东北林业大学学报), 2007, 7(35): 46—48(in Chinese).
- [17] JAMES D J, ISOBEL J T. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M<sub>9</sub>[J]. *Hortic. Sci.*, 1979, 54(4): 309—311.
- [18] WU K J(伍克俊), XUN Y P(荀永平), JIA F M(贾福明). Effect of IBA and NAA on rooting of regenerated plantlets from virus-free sweet cherry[J]. *Northern Fruit* (北方果树), 1997, 1: 16(in Chinese).



图版 I 1. 不同培养基的初代培养; 2. 离体增殖的酸樱桃苗; 3. 苗基浸蘸法生根苗(1/2MS+IBA 浸蘸 5 min); 4. 普通生根法生根苗(1/2 MS+0.5 mg · L<sup>-1</sup> IBA)。

Plate I Fig. 1. Different primary culture; Fig. 2. Propagation of bud; Fig. 3. Plant of dipping method for rooting (1/2 MS+IBA dipping at 5 min); Fig. 4. Plant of common method for rooting (1/2 MS+0.5 mg · L<sup>-1</sup> IBA).