

钙果 4 号欧李组织培养技术研究

孙新政, 申顺先*, 李庆伟, 陈世昌

(河南农业职业学院, 河南中牟 451450)

摘要: 以钙果 4 号欧李秋季生长的幼嫩上部枝和春季萌生的幼嫩基生枝为材料, 利用正交试验设计等方法研究了欧李组织培养的最佳基本培养基和植物生长调节剂配比。结果表明, 以春季萌生的幼嫩基生枝为外植体材料较好, 以 70%~75% 酒精浸洗 10~30 s 后用 0.1% 升汞浸洗 6 min 消毒效果最好, 适宜芽诱导的培养基是改良 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+20 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂, 最佳芽增殖培养基是改良 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L+20 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂, 适宜生根培养基是 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+KT 0.02 mg/L+20 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂。

关键词: 欧李; 组织培养; 正交试验

中图分类号: S662.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9980(2007)01-80-04

Studies on tissue culture of Gaiguo 4, a line of *Cerasus humilis*

SUN Xin-zheng, SHEN Shun-xian*, LI Qing-wei, CHEN Shi-chang

(Henan Agricultural Vocational College, Zhongmu, Henan 451450 China)

Abstract: Experiment was carried out using the upper tender stem in Autumn and the inceptive tender stem in Spring of Gaiguo 4 (a line of *Cerasus humilis* Bunge) as material, and utilizing the orthogonal test to obtained the optimal medium for its tissue culture. Result showed: the inceptive tender stem in spring was the best explant. The best method for disinfectant was 70% to 75% alcohol (washed for 10s to 30s) and 0.1% mercuric chloride (washed for 6 min). The optimal medium for inducing shoot was improved MS + NAA 0.1mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + 20 g/L sugar + 7 g/L agar; the optimal medium for shoot generation was improved MS + 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L+20 g/L sugar+ 7 g/L agar; the optimal medium for rooting is 1/2MS + IBA 1.0 mg/L + KT 0.02 mg/L + 20 g/L sugar + 7 g/L agar.

Key words: *Cerasus lumilis* Bunge; Tissue culture; Orthogonal test

欧李 (*Cerasus humilis* Bunge) 为蔷薇科李亚科櫻桃属落叶小灌木, 是我国特有的一个古老的野生果树, 其鲜果钙含量高达 3.6 mg/g, 俗称为“钙果”^[1-2]。欧李的常规繁殖多采用扦插和分株等方法, 受外界环境条件影响较大, 繁殖系数较低。自钱国珍等^[3]利用欧李实生苗进行组织培养研究获得成功以来, 赵玉军等^[4]也对实生苗快繁技术进行了报道, 钟士传等^[5-7]对其进行研究时均没有具体指出所用材料为何品种; 庄丽娟等^[8]以“优质大欧李”、任清盛^[9]以“中华钙果”为材料进行了研究, 然而, 他们对外植体消毒研究不够深入, 虽然也找到了欧李芽增殖的培养基配方, 但芽增殖率不高 (最高为 6.9)。由于试材基因型、外植体类型及其生理状态对植物生长调节剂敏感程度不同, 外植体高效再生成苗也相应存在差异, 适宜培养基的筛选确定成为欧李组织培养技术中的第一步。本试验以欧李新品种钙果 4 号^[10]为材料, 利用正交试验方法进行组织培养技术研究, 深入研究外植

体选择与消毒方法, 筛选适宜的芽诱导、芽增殖和生根培养基, 以建立钙果 4 号的组培体系。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料是 2003 年由山西农业大学引进的欧李优良品种钙果 4 号苗木, 栽植于庭院。2004 年 10 月下旬和 2005 年 4 月初, 分别选用幼嫩上部枝和幼嫩基生枝为外植体进行培养。

1.2 方法

1.2.1 外植体无菌体系建立 将从田间剪取的幼嫩上部枝或基生枝去叶留茎, 放于清水中冲洗 30 min 左右, 用洗洁精溶液洗涤后, 再用流水缓慢冲洗 2~4 h, 蒸馏水漂洗数次带入无菌操作室, 放入 70%~75% 的酒精中浸洗 10~30 s 后, 迅速用无菌水漂洗 2~3 次; 然后用 0.1% 的升汞分别浸洗 6、9、12 min, 无菌水浸洗 4~6 次, 最后用无菌纸吸干残留水分, 剪成 1~2 cm

收稿日期: 2006-06-02 接受日期: 2006-08-01

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0324070047)。

作者简介: 孙新政 男, 副教授, 主要从事园艺植物繁殖与种苗生产技术与教学。Tel: 0371-68520380, E-mail: sunxinzheng@163.com

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel: 0371-68520380, E-mail: shenshunxian@163.com

长茎段(含 1~2 个腋芽),接种在培养基上培养。20 d 后统计污染率、未萌芽率和存活率。试验结果统计参考肖显华等^[1]的方法,并作改动。污染率(%)=(污染外植体数/接种外植体数)×100,未萌芽率(%)=[(死亡外植体数+未萌芽外植体数)/接种外植体数]×100,存活率(%)=(萌芽不污染外植体数/接种外植体数)×100。

1.2.2 芽诱导 芽诱导所用基本培养基是 MS 培养基与改良 MS 培养基 (1/2 大量元素+1/2 微量元素+铁盐+有机物),附加不同浓度的 NAA 与 6-BA(表 1),培养基中添加 20 g/L 的蔗糖和 7 g/L 的琼脂(下同),培养基 pH 值(下同)5.6~6.0。培养条件(下同)为:温度(25±2)℃,光照强度 2000~3000 lx,光照时间 12~14 h/d,培养室空气相对湿度 70%左右。

1.2.3 芽增殖试验 以改良 MS 培养基为基本培养基,进行 3 因素 3 水平正交设计(表 2)。采用芽诱

导中生长一致,长度 1~2 cm 含 1~2 个腋芽的茎段,接种于 9 组培养基中培养,每组试验做 5 次重复。

芽增殖率(%)=最终芽的数量/最初芽的数量×100

表 2 芽增殖试验生长调节剂处理因素水平表
Table 2 Factors and levels of plant growth regulators in shoot multiplication

水平 Level	因素 Factor		
	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)
1	0.02	0.2	0.0
2	0.10	1.0	0.2
3	0.50	2.0	0.5

1.2.4 不定根诱导 将芽增殖中生长一致,株高 3~4 cm、含茎尖的茎段接种于各种培养基上。30 d 后统计生根情况。

2 结果与分析

2.1 无菌体系建立与芽诱导试验

2.1.1 外植体存活情况 由表 3 可以看出,钙果 4 号欧李春季萌生的基生枝在 0.1%升汞中浸洗 6 min 的存活率最高,为 83%;随着在 0.1%升汞中浸洗时间的延长,外植体的存活率减小,其中主要是未萌芽率在升高。在 0.1%升汞中浸洗 6 min 和 9 min 的污染率均比较低,为 17%。秋季上部枝在相同消毒时间下污染率明显高于春季基生枝,且存活率明显低于后者。可见以春季萌生的基生枝为外植体材料更好,以 70%~75%酒精浸洗 10~30 s,0.1%升汞浸洗

表 1 芽诱导试验设计
Table 1 Test design for bud inducing

试验号 Test number	基本培养基 Basic medium	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	接种数(瓶)	
				No. of shoot inoculated	
				上部枝 Upper stem	基生枝 Basal stem
1	MS	0.02	0.2	15	15
2	MS	0.10	1.0	15	15
3	改良 MS Improved MS	0.02	0.2	15	15
4	改良 MS Improved MS	0.10	1.0	15	15

表 3 不同季节不同部位不同消毒时间对钙果 4 号欧李外植体存活率的影响
Table 3 Effect of different season, part and time on explant survival of *C. lumilis* variety Gaiguo 4

取材季节部位 Adapted season and part	0.1%升汞浸洗时间 0.1% mercuric chloride dipping time (min)	接种株数 No. of shoots	污染株数 No. of pollution	污染率 Pollution rate (%)	未萌芽株数 No. without embryo	未萌芽率 The rate without embryo (%)	存活数 No. of survival	存活率 Survival rate (%)
秋季上部枝 Autumn upper stems	6	18	12	67	0	0	6	33
	9	18	9	50	0	0	9	50
	12	18	7	39	4	22	7	39
春季基生枝 Spring basal stems	6	18	3	17	0	0	15	83
	9	18	3	17	1	6	14	77
	12	18	5	28	5	28	8	44

6 min 对外植体消毒灭菌效果最好(图版-1)。

2.1.2 芽诱导情况 接种于 1 号培养基的上部枝茎段在第 20 天时,萌发的腋芽很少,在第 30 天,生长势不佳;基生枝茎段在第 20 天时,单株萌发的腋芽有 1~3 个,在第 30 天,生长势比前者好。而接种于 2 号培养基的上部枝茎段在第 20 天时,部分茎段腋芽已萌发,但颜色很浅,在第 30 天,已形成多个芽,但有的芽趋向白化,生长势不好;基生枝茎段在第 20 天时,单株萌发的腋芽有 2~4 个,在第 30 天,生长势一般。而接种于 3 号培养基上的幼嫩基生枝茎段在 10 d 内顶芽萌发,而有顶芽的茎段腋芽萌发不明

显,在第 20 天时,单株萌发的腋芽不足 3 个,在第 30 天,不足 8 个,整个过程生长较慢;上部枝茎段在第 20 天时,单株萌发的腋芽 2~3 个,在第 30 天,3~5 个。接种于 4 号培养基的幼嫩基生枝茎段在 10 d 内顶芽与腋芽就开始萌发,然后迅速生长,在第 20 天时,萌发的腋芽有 4 个以上,在第 30 天,单株萌发的腋芽有 5~10 个,有的更多,并且这些芽的质量都正常;上部枝茎段在第 20 天时,单株萌发的腋芽有 3~4 个,在第 30 天,单株萌发的腋芽有 5~8 个。可见钙果 4 号欧李芽诱导采用春季萌生的幼嫩基生枝优于上部枝,采用 4 号培养基即改良 MS+NAA 0.1 mg/

L+6-BA1.0 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 7 g/L 较好。

2.2 芽增殖培养试验

在培养到第 10 天时各组试验, 植株生长正常, 每组芽都有所增殖, 其中芽增殖率最高与芽质量最优的分别是第 2 组与第 4 组, 并且多组茎段基部切口处出现少量绿色沙砾状或小米粒状愈伤组织。在培养到第 20 天时, 绝大部分植株生长正常, 每组腋芽都有所增殖, 其中芽增殖率最高与芽质量最优的分别是第 3、4、5、7 组, 愈伤组织变化不大。在培养到第 30 天时, 绝大部分植株生长良好(表 4)。

由表 4 可以看出各因素极差 R 的大小顺序 $3.07 > 2.40 > 2.14$, 对芽增殖率高低产生的效应由主到次的因素顺序依次是 6-BA、NAA、GA₃, 3 者引起平均芽增殖率高低的水平依次是第 3、1、2, 即改良 MS+6-BA2.0 mg/L+NAA0.02 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 7 g/L 就是最佳芽增殖培养基配方。对其进行方差分析, 得出 6-BA 表现差异显著,

表 4 钙果 4 号欧李芽增殖培养正交试验设计方案
与试验结果直观分析表

Table 4 Test design and visual multiplication analysis
of *C. lumilis* Bunge varitety Gaiguo 4

试验号 Test numbers	因素 Factor			平均芽增殖率 Average shoot multiplication rate (%)
	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	
1	0.02	0.20	0.00	2.8
2	0.02	1.00	0.20	9.4
3	0.02	2.00	0.50	9.2
4	0.10	0.20	0.20	5.0
5	0.10	1.00	0.50	5.6
6	0.10	2.00	0.00	5.6
7	0.50	0.20	0.50	3.4
8	0.50	1.00	0.00	5.2
9	0.50	2.00	0.20	5.6
水平均值 Level distance				
T ₁	7.13	3.73	4.53	
T ₂	5.40	6.73	6.67	
T ₃	4.73	6.80	6.07	
R	2.40	3.07	2.14	

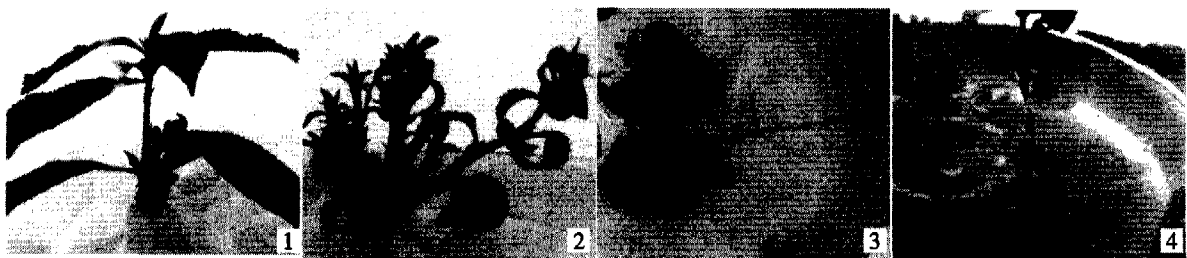
NAA 与 GA₃ 均不显著, 说明 6-BA 浓度的变化会引起芽增殖率的显著变化, 而 NAA 与 GA₃ 浓度的变化不会引起芽增殖率的显著变化。对试验结果验证的平均芽增殖率是 11.8, 且芽质量良好, 明显高于表 4 中平均芽增殖率的最高值 9.4, 说明改良 MS+6-BA2.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 7 g/L 就是钙果 4 号欧李最佳芽增殖培养基配方(图版-2)。

2.3 生根培养试验

含茎尖的钙果 4 号欧李茎段首先在基部切口处产生浅黄色或白色沙砾状愈伤组织, 接着产生白色不定根, 有的小根产生于培养基与空气交界的茎段基部, 有的小根产生于培养基与空气交界的茎段产生的愈伤组织内部(图版-3,4)。说明不定根的产生途径不是单一的, 可以直接产生也可以经脱分化再分化途径产生。由表 5 可以看出, 最适宜的生

表 5 不同培养基配方对钙果 4 号欧李生根的影响
Table 5 The effect of different medium on rooting of
C. lumilis Bunge varitety Gaiguo 4

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
MS	10	0	0.0
MS+IBA0.2 mg/L	10	0	0.0
MS+IBA1.0 mg/L	10	50	0.5
MS+IBA2.0 mg/L	10	40	0.4
MS+IBA0.2 mg/L+KTO.02 mg/L	10	30	0.3
MS+IBA1.0 mg/L+KTO.02 mg/L	10	60	0.7
MS+IBA2.0 mg/L+KTO.02 mg/L	10	40	0.6
MS+IBA0.2 mg/L+KTO.20 mg/L	10	10	0.1
MS+IBA1.0 mg/L+KTO.20 mg/L	10	70	0.9
MS+IBA2.0 mg/L+KTO.20 mg/L	10	70	0.8
1/2MS	10	30	0.3
1/2MS+IBA0.2 mg/L	10	50	0.5
1/2MS+IBA1.0 mg/L	10	90	1.5
1/2MS+IBA2.0 mg/L	10	80	1.1
1/2MS+IBA0.2 mg/L+KTO.02 mg/L	10	3	0.3
1/2MS+IBA1.0 mg/L+KTO.02 mg/L	10	100	2.3
1/2MS+IBA2.0 mg/L+KTO.02 mg/L	10	100	1.7
1/2MS+IBA0.2 mg/L+KTO.20 mg/L	10	50	0.5
1/2MS+IBA1.0 mg/L+KTO.20 mg/L	10	100	1.8
1/2MS+IBA2.0 mg/L+KTO.20 mg/L	10	90	1.6



图版说明

1. 初代培养; 2. 丛生芽苗生长情况; 3. 钙果 4 号欧李生根(由瓶底照相); 4. 钙果 4 号欧李生根

Explanation of plates

1. Initial culture; 2. Clump bud growing; 3. *Cerasus lumilis* Bunge varitety Gaiguo 4 root (photoed from bottle bottom);
4. *Cerasus lumilis* Bunge varitety Gaiguo 4 root

根培养基配方为 1/2 MS+IBA 1.0 mg/L+KT 0.02 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 7 g/L。

3 讨论

外植体的带菌状况直接影响着培养体系的建立, 木本植物组织培养中的困难之一是获得无菌材料^[12]。钱国珍等^[1]对欧李组培技术研究以来, 仅刘琳^[13]对外植体消毒进行了稍深入的研究, 发现用 0.1% 升汞处理 7 min 时污染率最低为 20%, 存活率最高为 78%。而笔者在试验中发现用 0.1% 的升汞对春季萌生的幼嫩基生枝处理 6 min 时污染率最低为 17%, 存活率最高为 83%。另外, 本试验还发现, 不同取材季节和部位消毒处理后的存活情况有较大差异。

同一树上的不同部位生理年龄不同: 离树干基部的距离越远, 生理年龄越老, 而靠近树干基部的先长出来的枝干, 表现幼态^[14]。本试验中利用钙果 4 号欧李幼嫩的基生枝与上部枝离体培养进行比较, 结果发现欧李同样具有这一特性。

植物生长调节物质, 在试管苗增殖中起决定性作用, 由于植物内源激素难以测定, 因此, 外源激素的加入靠一系列的试验来修正^[15]。在芽增殖试验中, 笔者筛选出的钙果 4 号欧李培养基配方有效芽增殖率高达 11.8, 远远高于钟士传等^[5]的 6.9 与庄丽娟等^[6]的 4.99。然而, 随着继代培养次数的增加, 部分芽出现玻璃化现象, 有效芽变少, 适当降低 6-BA 浓度与提高琼脂浓度来进一步培养这些已轻度玻璃化的植株, 发现这些植株又重新抽出正常的叶和茎来, 成为正常的植株。可见随着继代培养次数的增加, 要适当降低细胞分裂素和生长素比值, 即降低最佳培养基配方中 6-BA 的浓度, 才能保证欧李优良组培苗不断的培养出来。

4 结论

研究表明, 钙果 4 号欧李组织培养选春季萌生的幼嫩基生枝作外植体为佳; 芽增殖的最佳配方为改良 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 7 g/L; 最适宜的生根培养基配方为 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+KT 0.02 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 7 g/L。

参考文献 References:

- [1] TANG F C(唐俊宸). Savageness fill calcium fruit- *Cerasus lumilis* Bunge[J]. Forestry of China(中国林业), 2003, 53(1): 43. (in Chinese)
- [2] DU J J, CAO Q, DU J M(杜俊杰, 曹琴, 杜俊民). Wildness *Cerasus lumilis* Bunge manpower domestication growth[J]. China Wilding plant(中国野生植物), 1992(4): 40-42. (in Chinese)
- [3] QIAN G Z, SU F C, NIU W L(钱国珍, 苏福才, 牛文林). Callus induction and plant regeneration from shoot and leaf tissues of *Prunus humilis*[J]. Journal of Inner Mongola Inatitute of Agriculture and Animal Husbandry(内蒙古农牧学院学报), 1994, 15(4): 8-14. (in Chinese)
- [4] ZHAO Y J, DU J J, GUO H P, DU X M, HE X H(赵玉军, 杜俊杰, 郭黄萍, 杜学梅, 贺小红). Tissue culture of *Cerasus lumilis*[J]. Journal of Shanxi Agriculture Sciences(山西农业科学), 1997, 25(3): 65-67. (in Chinese)
- [5] ZHONG S C, WANG X L, YU J X, CAO B H(钟士传, 王侠礼, 于军香, 曹帮华). Effect of phytohormone on tissue culture of *Cerasus lumilis* Bunge[J]. Journal of Shandong Agricultural University(Natural Science Edition)(山东农业大学学报: 自然科学版), 2005, 36(1): 39-41. (in Chinese)
- [6] LIU L, ZHONG S C(刘琳, 钟士传). The influence *Cerasus lumilis* Bung epropagate for outside phytohormone [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences(安徽农业科学), 2005, 33(3): 428. (in Chinese)
- [7] ZHONG S C, WANG X L(钟士传, 王侠礼). Study on micropropagation of *Cerasus lumilis* Bunge[J]. China Seeds(中国种业), 2004, 11: 36. (in Chinese)
- [8] ZHUANG L J, SU F C(庄丽娟, 苏福才). Rapid propogation of *Prunus humilis in vitro*[J]. Journal of Inner Mongolia Institute of Agriculture and Animal Husbandry(内蒙古农业大学学报), 2005, 26(1): 16-19. (in Chinese)
- [9] REN Q S(任清盛). Study on organization training for Chinese dwarf cherry[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin(中国农学通报), 2005, 21(1): 53-54. (in Chinese)
- [10] CHAI K, WEN P F, DU J J(柴凯, 温鹏飞, 杜俊杰). The variety characteristic and growth tachtology for Nongda calcium-3 and calcium-4[J]. Shanxi Fruit(山西果树), 2006, 1: 20-21. (in Chinese)
- [11] XIAO X H, WANG S Z, ZANG L R(肖显华, 王顺珍, 藏林荣). Improvement on surface sterilization of plant materials[J]. Biotechnolog(生物技术), 1999, 9(1): 43-45. (in Chinese)
- [12] CHEN Z H(陈正华). Wood plant tissure culture and apply[M]. Beijing: Higher Education Press, 1986. (in Chinese)
- [13] LIU L(刘琳). Primary culture of *Cerasus lumilis* Bunge[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences(安徽农业科学), 2005, 33(2): 247. (in Chinese)
- [14] LI J M(李俊明). Plant tissure culture tutorial[M]. Beijing: China Agriculture University Press, 2002. (in Chinese)
- [15] CAO Z Y, LIU G M(曹孜义, 刘国民). Practicality plant tissure culture technology tutorial (实用植物组织培养技术教程)[M]. Gansu: Gansu Sciences Technolog Press, 1999. (in Chinese)