

‘红灯’樱桃微茎尖培养体系的建立与优化

李望望 文晓鹏 乔 光

贵州大学贵州省农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025

摘要 以‘红灯’樱桃为材料,对微茎尖培养最适条件进行了筛选。结果表明:在解剖显微镜下,取1.0~1.5 mm的茎尖在MS附加0.3 mg/L TDZ和0.1 mg/L IBA的培养基上成活率较高,培养30 d后成活率达78.3%;在相同培养基上继代培养50 d后,增殖系数达3.9,试管苗高8.9 mm,长势较好。

关键词 甜樱桃;微茎尖;离体培养;脱毒

中图分类号 S 662.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)04-0019-04

病毒病是樱桃生产迫切需要解决的问题^[1]。李矮缩病毒(prune dwarf virus, PDV)、苹果褪绿叶斑病毒(apple chlorotic leafspot virus, ACLSV)和李坏死环斑病毒(prunus necrotic ringspot virus, PNRSV)是危害核果类果树的三大主要病毒^[2],也给甜樱桃产业带来巨大损失。近年来,西南地区正大力发展甜樱桃产业,经济效益显著,但生产中也出现了这些病毒病的危害,因此培养樱桃的脱毒种苗具有重要的现实意义。微茎尖培养是脱除果树病毒的有效方法^[3]。甜樱桃组织培养研究始于1980年代^[4],有关樱桃微茎尖培养条件的优化鲜有报道,导致脱毒效果不理想。本研究以‘红灯’微茎尖为材料,建立和优化微茎尖培养条件,以保证较高的成活率和成苗率,旨在为甜樱桃茎尖脱毒奠定技术和材料基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

取自贵州大学农业生物工程重点实验室保存3年的‘红灯’组培苗,试管苗保存培养基为MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L IBA+3%蔗糖+7 g琼脂。

1.2 微茎尖大小对成苗的影响

选取生长健壮的试管苗,在解剖显微镜下剥离带1~2个叶原基茎尖,长度为0.5~1.0 mm和1.0~1.5 mm,然后迅速接种到MS+0.3 mg/L TDZ+0.1 mg/L IBA+3%蔗糖+7 g琼脂培养基上,每处理接种60个茎尖。30 d后统计成苗率和生

长状况,以确定适宜的茎尖大小。

1.3 植物生长调节剂对成活率和生长的影响

对生长健壮的‘红灯’试管苗,取长度约1.0~1.5 mm微茎尖,接种到以MS+3%蔗糖+7 g琼脂为基本培养基,分别添加不同质量浓度BA、KT、TDZ、IBA、IAA、NAA的培养基上(表1),每处理接种5个茎尖苗,重复4次。50 d后统计苗高、增殖系数和成活率和生长状况。

表 1 不同激素对‘红灯’茎尖培养的影响

Table 1 Effects of different hormone combinations on *in vitro* culture of ‘Hongdeng’ shoot-tips

处理 Treatment	BA	KT	TDZ	IAA	NAA	IBA	备注 Remark ¹⁾
1	0.3					0.1	CTT
2		0.3				0.1	CTT
3			0.3			0.1	CTT
CK1			0.0			0.1	TCT
3			0.3			0.1	TCT
4			0.6			0.1	TCT
5			0.9			0.1	TCT
6			1.2			0.1	TCT
3			0.3			0.1	ATT
7			0.3	0.1			ATT
8			0.3		0.1		ATT
CK2			0.3			0.0	ICT
3			0.3			0.1	ICT
10			0.3			0.2	ICT
11			0.3			0.3	ICT

1) CTT: 分裂素种类试验 Cytokinin-type treatment; TCT: TDZ 质量浓度试验 TDZ concentration treatment; ATT: 生长素种类试验 Auxin-type treatment; ICT: IBA 质量浓度试验 IBA concentration treatment.

收稿日期: 2012-12-09

基金项目: 贵州省科技攻关项目(黔科合字 NY[2010]3033)

李望望, 硕士研究生, 研究方向: 分子细胞生物学. E-mail: wangwang6587@163.com

通讯作者: 文晓鹏, 博士, 教授. 研究方向: 果树生物技术及遗传育种. E-mail: xpwen0121@yahoo.com.cn

1.4 数据统计分析

通过 DPS 对分裂素和生长素处理下的苗高和增殖系数进行方差分析,各处理的平均值采用 Duncan's 多重比较进行检验。茎尖成活率为成活茎尖数与接种茎尖数之比,并用 SPSS 18.0 的 *t* 检验进行茎尖成活率的显著性分析。

2 结果与分析

2.1 ‘红灯’樱桃的微茎尖培养

切取带 1~2 个叶原基的茎尖(图 1-A)接种在 MS+0.3 mg/L BA +0.1 mg/L IBA +30% 蔗糖+7 g 琼脂培养基上(图 1-B),10 d 开始萌动,15 d 后茎尖已开始分化出小叶片(图 1-C),叶原基

伸长约 5 mm。接着继续培养,微茎尖苗高平均 12 mm,叶片数增加,每株平均叶片数为 8,苗健壮(图 1-D)。培养 40 d 后,更换茎尖苗培养基,在相同培养基上进行第 1 次继代(图 1-E),约 30 d 后得到生长较好的组培苗,苗有增殖,叶片数增多,并且苗生长健壮(图 1-F),可进行试管微芽嫁接,50 d 后生长强健的组培苗可用于诱导生根(图 1-G)。打开培养瓶,炼苗 2~3 d,镊子取出组培苗,洗净根部培养基,移栽入已灭菌的基质中,移栽完毕,喷淋足够的水,用塑料薄膜覆盖。每 5~6 d 浇 1 次水,20 d 后植株呈现较好的生长势(图 1-H),10 d 后将植株带土移入大田,移栽 40 d 后的‘红灯’樱桃成活率可达 70%。

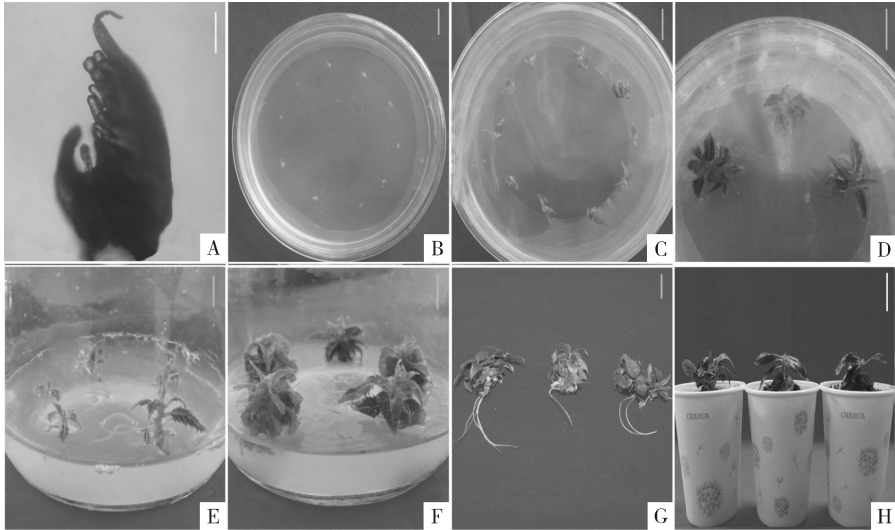


图 1 ‘红灯’樱桃的微茎尖培养
A. ‘红灯’微茎尖 Micro shoot-tips of ‘Hongdeng’; B. 微茎尖接种 Inoculation of micro shoot-tips; C. 微茎尖生长 15 d Micro shoot-tips grow to 15 days; D. 微茎尖生长 26 d Micro shoot-tips grow to 26 days; E. 微茎尖继代 Subculture of micro shoot-tips; F. 继代后 26 d Twenty-six days after subculture; G. 试管苗诱导生根 Inducing root on medium; H. 组培苗的驯化 The domestication of tissue culture. 图中标尺除 A(0.2 cm)外其余表示 1 cm Vertical bars except A (0.2 cm) in each pane is 1 cm.

图 1 ‘红灯’樱桃的微茎尖培养

Fig. 1 The *in vitro* culture of micro shoot-tips on ‘Hongdeng’ cherry

2.2 微茎尖大小对成苗的影响

试验结果表明,茎尖大小在 0.5~1.0 mm 范围内,成活率很低(3.3%);茎尖大小在 1.0~1.5 mm 范围内,成活率较高,达到 78.3%。茎尖苗越小,成活率越低;茎尖苗越大,成活率越高。本研究切取较大茎尖苗(1.0~1.5 mm),在保证成活率的基础上,对茎尖苗最适条件进行筛选及优化。

2.3 细胞分裂素对微茎尖培养的影响

试验结果表明,细胞分裂素种类和质量浓度对‘红灯’微茎尖培养有很大影响(表 2)。从分裂素种类来看,BA、KT 处理下的苗高平均数分别为 3.7、

5.6 mm,而 TDZ 处理下的微茎尖苗 8.6 mm,显著高于前两者;TDZ 处理的茎尖苗增殖系数(3.9)和成活率(95%)都显著高于 BA、KT 处理下的茎尖苗,TDZ 对微茎尖培养有较大促进作用。随着 TDZ 质量浓度增高,苗高和增殖系数并没有随之增加,TDZ 质量浓度为 0.3 和 0.9 mg/L 时,苗高增加突出,成活率较高,但前者的增殖系数(3.9)显著高于后者(2.3);TDZ 质量浓度为 0.9 mg/L 时,虽然成活率达 100%,但丛生芽多而有效苗少,导致丛生芽后期会因营养不足而抑制生长。因此,TDZ 质量浓度以 0.3 mg/L 为宜。

表 2 细胞分裂素对茎尖培养的影响¹⁾

Table 2 The effect of cytokinins on the *in vitro* culture of micro shoot-tips

细胞分裂素种类 Cytokinin	质量浓度/(mg/L) Mass concentration	苗高/mm Shoot height	增殖系数 Propagation ratio	成活率/% Survival rate	生长状况 Growth characterization
BA	0.3	3.7±0.6 b	2.0±0.5 b	55.0 c	叶黄绿 Yellowish green leaves
KT	0.3	5.6±0.7 b	1.5±0.1 b	85.0 b	叶绿,增殖系数小 Green leaves, low propagation ratio
	0.3	8.6±0.9 a	3.9±0.4 a	95.0 ab	叶绿,增殖系数较高 Green leaves, higher propagation ratio
TDZ	0.6	7.5±0.6 ab	2.0±0.1 bc	90.0 b	叶绿,有丛生芽 Green leaves, multiple shoots
	0.9	9.1±0.3 a	2.3±0.2 b	100 a	叶绿,有丛生芽 Green leaves, multiple shoots
	1.2	5.7±0.5 b	1.3±0.1 c	90.0 b	叶黄,长势不好 Yellow leaves, poor growth
CK	0.0	8.1±0.6 ab	1.1±0.1 c	95.0 ab	叶绿,增殖系数最小 Green leaves, lowest propagation ratio

1) 同列内相同字母表示经邓肯氏多重极差检验在 0.05 水平上差异不显著,下同 Values followed by the different normal letters within a column indicate significant differences among materials at 5% levels. The same as follows.

2.4 生长素对微茎尖培养的影响

在相同质量浓度下,不同种类的生长素对株高、成活率有一定影响(表 3)。在供试生长素中,以 IBA 效果最好,苗高和成活率分别达到 9.9 mm 和 95%。对 IBA 的使用效果进一步进行试验,在对照中茎尖苗出现丛生芽,丛生芽可直接形成小植株,成

苗率高,但是后期丛生芽可能营养不足,有效苗少。IBA 质量浓度为 0.1 mg/L 时,苗高最高(9.9 mm),增殖系数最大(2.5),成活率也最大(95%),而 IBA 质量浓度为 0.2 和 0.3 mg/L 时茎尖苗长势不好且有丛生芽。因此选择 IBA 质量浓度为 0.1 mg/L。

表 3 生长素对茎尖培养的影响

Table 3 The effect of auxins on the *in vitro* culture of micro shoot-tips

细胞分裂素种类 Cytokinin	质量浓度/(mg/L) Mass concentration	苗高/mm Shoot height	增殖系数 Propagation ratio	成活率/% Survival rate	生长状况 Growth characterization
IAA	0.1	6.5±0.6 b	1.4±0.2 a	70.0 c	叶黄绿 Yellowish green leaves
NAA	0.1	8.5±0.6 ab	1.8±0.3 a	80.0 b	叶黄绿 Yellowish green leaves
	0.1	9.9±0.8 a	2.5±0.5 a	95.0 a	叶绿,增殖系数高 Green leaves, higher propagation ratio
IBA	0.2	5.8±0.9 b	1.1±0.1 b	70.0 c	长势不好 Poor growth
	0.3	5.9±0.6 b	1.4±0.1 ab	85.0 b	丛生芽 Multiple shoots
CK	0.0	5.7±0.78 b	1.4±0.1 ab	75.0 c	叶绿,有丛生芽 Green leaves, multiple shoots

3 讨论

病毒病是影响樱桃生长发育的重要病害。应对病毒病的主要措施是培育无毒苗,脱毒苗比普通苗长势强、根系发达、分布深、抗逆性强、进入结果期提早、座果率高、果实品质好,苗木的脱毒成为无毒苗培育的关键^[5-6]。

细胞分裂素对不定芽的形成能力有很大影响,几乎所有植物的离体再生都使用了此类物质,它对不定芽的发生频率、侧芽的萌发情况及生长势起决定作用^[7]。综合考虑,选择分裂素 TDZ 和生长素 IBA 进行激素配比,数据显示,TDZ 质量浓度为 0.3 mg/L,IBA 质量浓度为 0.1 mg/L 时,茎尖生长较好,表现为叶色常绿、增殖倍数高、死亡率低、苗较高。

很多证据表明,芽尖的分生组织含病毒量少或不含病毒。导致这一现象的原因可能是下列之一^[8]:(1)分生组织旺盛的新陈代谢活动:病毒的复制需利用寄主的代谢过程,因而无法与分生组织旺盛的代谢活动竞争;(2)分生组织缺乏真正的维管组织:大多数病毒在植株内通过韧皮部进行迁移,或在细胞间通过胞间连丝传输。因为细胞与细胞间的移动速度较慢,在快速分裂的组织中病毒浓度高峰被推迟;(3)高质量浓度的生长素。分生组织的生长素质量浓度通常很高,可能影响病毒的复制。因此,通过微茎尖培养是脱除植物病毒的有效方法。

茎尖大小是影响茎尖培养成活和脱毒效果的重要因素。一般来说,茎尖越大,成苗率越高,但病毒越难去除;茎尖越小,成苗率越低,病毒较易脱除。

曹冬煦等^[9]在“巨峰”葡萄茎尖培养上切取 0.5 mm 大小的茎尖进行培养。在草莓茎尖培养快繁体系中,何欢乐等^[10]研究发现 0.3~0.5 mm 大小的茎尖,成活率较高。而对于蔷薇科梨茎尖培养脱毒研究中,张虹^[11]研究发现,当切取的茎尖 ≥ 0.5 mm 时,茎尖新芽分化率高,而脱毒率相对降低。本研究在预试验中切取的茎尖大小为 0.5~1.0 mm 时,死亡率较高,很难存活,因此,在保证成活率的条件下增大茎尖进行培养基筛选,以期保存更多的茎尖苗。

但对大多数植物来说,叶原基是茎尖成活必不可少的因素。一般说来,带 1~2 个叶原基的茎尖为培养材料可去除病毒^[11]。Manganaris 等^[12]在油桃培养中采取的茎尖含有 1~2 个叶原基。蒲艳吉^[13]研究发现欧洲李和樱桃李携带 2 个叶原基的茎尖成苗率较高。故本试验中切取带 1~2 个叶原基的茎尖为培养材料,有可能获得脱毒苗。

综上所述,适合‘红灯’甜樱桃微茎尖培养的流程为:取生长健壮的试管苗,切取带 1~2 个叶原基的微茎尖,接种于 MS+0.3 mg/L TDZ+0.1 mg/L IBA+3% 蔗糖+7 g 琼脂培养基上,50 d 后在相同培养基上进行第 1 次继代。可进行试管微芽嫁接,50 d 后生长强健的组培苗可用于诱导生根。我们下一步的工作将在‘红灯’微茎尖培养的基础上对微茎尖培养所得试管苗进行病毒检测,以培育出‘红灯’的脱毒组培苗原原种。

Establishment and optimization of microshoot-tip culture system *in vitro* of sweet cherry cultivar ‘Hongdeng’

LI Wang-wang WEN Xiao-peng QIAO Guang

Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract Using cultivar ‘Hongdeng’ *in vitro* shoots as material, the *in vitro* regeneration system from micro shoot-tip of sweet cherry were established via optimizing the corresponding factors. The result showed that Murashige and Skoog macro-elements (MS) supplemented with the combination of 0.3 mg/L TDZ and 0.1 mg/L IBA had the best regeneration effect from the micro shoot-tips with the size of 1.0-1.5 mm, and the survival rate of the shoot-tips could reach to 78.3% after 30 days culture. Fifty days after the subculture under the same media, the multiplication efficiency was as high as 3.9, and the shoot height might get to 8.9 mm. The newly established system may facilitate the culture of virus-free plant in sweet cherry.

Key words sweet cherry; micro shoot-tips; *in vitro* culture; etoxification

参 考 文 献

- [1] 李平. 甜樱桃病毒病的发生与防治[J]. 西北园艺, 2011(4): 8.
- [2] 傅润民, 阮小凤, 赵正阳. 果树无病毒苗木与无病毒栽培技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [3] 代红艳, 张志宏, 吴禄平, 等. 甜樱桃茎尖培养及 PNRSV 的 RT-PCR 检测[J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 87-89.
- [4] SNIR I. *In vitro* propagation of sweet cherry cultivars[J]. Hort Science, 1982, 17: 192-193.
- [5] 付红歧, 吴云峰, 王睿, 等. 甜樱桃茎尖培养脱毒研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 33(6): 101-106.
- [6] 乔芬, 祁鹏志, 伏卉, 等. 柑橘衰退病和碎叶病复合感染病原的脱毒研究[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 416-421.
- [7] NOBRE J, SANTOS C, ROMANO A. Micropropagation of the mediterranean species *Viburnum tinus*[J]. Plant Cell, Tiss Org Cult, 2000, 60: 75-78.
- [8] LUIS F S. 马铃薯病毒及其防治[M]. 阎文昭, 张勇飞, 译. 北京: 中国农业出版社, 2001: 183-184.
- [9] 曹冬煦, 周海峰, 于生成, 等. “巨峰”葡萄热处理茎尖培养技术研究[J]. 北方园艺, 2012(9): 116-118.
- [10] 何欢乐, 阳静, 蔡润, 等. 草莓茎尖培养快繁体系研究[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2003, 21(1): 61-65.
- [11] 张虹. 梨树茎尖培养及其在病毒脱出中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学植物科技学院, 2004.
- [12] MANGANARIS G A, ECONOMOU A S, BOUBOURAKAS I N, et al. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine[J]. Plant Cell Rep, 2003, 22: 195-200.
- [13] 蒲艳吉. 李茎尖离体培养与植株再生[D]. 武汉: 华中农业大学园艺林学院, 2008.