

天山樱桃组织培养中初代培养物的建立

彭 妮, 李艳艳, 邵巧婷, 周 龙

(新疆农业大学, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:以濒危野生果树天山樱桃(*Cerasus tianschanica* Pojark)茎段为试材,在研究不同灭菌剂种类及灭菌时间对外植体材料的灭菌效果后,研究比较了不同培养基种类和不同生长调节剂浓度组合对天山樱桃茎段启动培养的影响,以建立天山樱桃茎段的初代培养体系。结果表明:外植体材料灭菌以酒精 20 s+HgCl₂ 12 min 为好,MS 培养基中腋芽的萌发率高于 B₅ 培养基,初代培养的配方为 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂粉为佳。

关键词:天山樱桃;初代培养;组织培养;建立

中图分类号:S 662.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)09-0116-03

天山樱桃(*Cerasus tianschanica* Pojark)属蔷薇科(Rosaceae)樱桃属(*Gerasus*)矮生樱亚属植物,又称野樱桃。哈萨克语称其牙,天山樱桃目前在我国仅分布在新疆西天山伊犁地区的霍城县、察布查尔县、新源县和塔城地区巴尔鲁克山等地,其花色绚丽,果实鲜艳,营养价值很高,既可供观赏,又可生食。自古就为当地少数民族所喜食,被誉为“雪域圣果”^[1]。野生状态下天山樱桃树体矮小、根系发达、抗寒、耐旱、耐瘠薄,且具有早果、矮化及抗病等优点,可以作为与李亚属种或樱亚属的种质资源杂

交,可为樱桃砧木的选育提供良好的亲本材料,为种间资源创新提供可能,是一种十分宝贵的野生果树资源。

樱桃一般以种子育苗和分蘖育苗为主,但是种子育苗存在沙藏困难、出苗率低、根系分布浅、易倒伏、易感染根癌病等缺点;分蘖育苗苗木不整齐,难以大规模繁育。采用组织培养不仅能克服常规育苗繁育时间长、技术性强、劳动强度大等方面的不足,而且还可以充分利用野生资源,提高品种纯度,加快该品种的繁育与推广速度,降低育苗成本,达到繁育规模化、工厂化的现代农业要求^[2]。而快速繁殖的第一步就是无菌培养物的建立,这对于多年生野生果树天山樱桃来说是一个较为棘手的问题,该研究针对此问题进行了探讨,以期能为天山樱桃的离体快繁体系建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

天山樱桃来源于新疆伊犁地区霍城县大西沟野果林,2010 年移栽于新疆农业大学试验基地,于 2011 年

第一作者简介:彭妮(1986-),女,硕士,现主要从事园艺植物生物技术方面的研究工作。E-mail:pengni0524@126.com.

责任作者:周龙(1976-),男,博士,副教授,现主要从事野生果树种质资源研究等工作。E-mail:zhoulong2004@126.com.

基金项目:教育厅青年教师科研培训基金资助项目(XJEDU2010S18);国家教育部重点资助项目(212199);新疆自治区果树学重点学科资助项目。

收稿日期:2013-01-28

Study on Factors Influencing Plant Regeneration of *Clivia miniata* Leaf

GUAN Li-xia

(Department of Biotech, Liaoning Agricultural Vocation-technical College, Yingkou, Liaoning 115009)

Abstract: Taking the leaf of *Clivia miniata* as material, the effects of different culture mediums, different leaf parts and multiplication algebra on the plant regeneration *in vitro* was studied. The results showed that the *in vitro* *Clivia miniata* leaf base regeneration capacity was the strongest, and the best differentiation medium was MS+ZT 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L; tissue culture proliferation 1~7 generation of the *in vitro* *Clivia miniata* leaf regeneration ability was stronger, then culture regeneration ability was abate, 10 generations after the regenerative capacity of the weakest; the best rooting medium for the *in vitro* plant was 1/2MS+IBA 1.0 mg/L, with rooting rate more than 98%.

Key words: *Clivia miniata*; leaf; plant regeneration

5~6月在树体进入旺盛生长时采集当年生幼嫩茎段,用湿毛巾包裹后带回实验室备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体灭菌处理 在实验室将试验材料进行预处理,在洗涤液中浸泡 15 min,然后用细毛刷轻刷后包裹于无菌纱布中在流水下冲洗 1 h,然后用蒸馏水冲洗 3 次,置于超净工作台待用。灭菌剂选择 70% 的酒精、0.1% 的 HgCl_2 和 10% 的 NaClO ,并设定不同的处理时间,酒精处理时间分别为 10、20 和 30 s; HgCl_2 处理时间分别为 4、6、8 和 12 min; NaClO 处理时间分别为 5、10 和 15 min;分别在接种后第 3、5、7 和 10 天统计污染瓶数。污染率(%)=污染瓶数/接种总瓶数 \times 100%。

1.2.2 基本培养基种类和激素浓度处理 基本培养基采用 MS 培养基和 B_5 培养基,各接种 30 瓶,每瓶 3 个茎段,琼脂粉 6 g/L,蔗糖 30 g/L,接种 30 d 后统计萌芽率;植物生长调节剂选择 6-BA 和 IBA,浓度梯度 6-BA 设为 0、0.5、1.0 和 1.5 mg/L,IBA 为 0、0.1、0.2 和 0.3 mg/L,接种 30 d 后统计增殖系数并记录腋芽的萌发和生长情况。萌芽率(%)=萌芽芽数/接种总芽数 \times 100%,增殖系数=出芽数/原有芽数。

1.2.3 培养条件 外植体茎段接种后置于培养室内培养,培养温度 23~28℃,光照强度 1 800~2 000 lx,光照时间 14~16 h/d,湿度 50%~60%。

2 结果与分析

2.1 初代培养灭菌剂种类及灭菌时间的筛选

不同灭菌剂和灭菌时间对外植体的影响较大。正确选择灭菌剂的种类和处理时间可以降低污染率,减少组织死亡,提高外植体的存活率和萌发率^[3]。从表 1 可以看出,不同灭菌剂种类和不同灭菌时间处理对天山樱桃外植体的污染率影响十分明显。其中污染率最高的是酒精 10 s+ HgCl_2 4 min,为 92%,污染率最低的是酒精 20 s+ HgCl_2 12 min 和酒精 30 s+ HgCl_2 12 min,均为 25%;各灭菌处理的污染最初出现在接种后 5 d,随后增加。酒精不同处理时间 10、20 和 30 s 之间灭菌效果差异不明显,采用 HgCl_2 和 NaClO 对比发现, HgCl_2 的灭菌效果要好于 NaClO ,不同处理时间研究发现,以 HgCl_2 处理时间 12 min 为好。

2.2 不同基础培养基种类对天山樱桃茎段腋芽萌发的影响

在植物组织培养过程中,选择合适的培养基对离体植物生长是极其重要的。MS 和 B_5 培养基是进行木本植物组织培养较常使用的 2 种培养基。尤其是 B_5 培养基适应于大部分木本植物。该试验通过比较这 2 种基本培养基发现,MS 培养基更有利于天山樱桃离体茎段上腋芽的萌发,从图 1 可以看出,接种 30 d 后,MS 培养

表 1 不同灭菌剂种类及处理时间对天山樱桃外植体灭菌效果的影响

Table 1 Effects of different sterilizations and different sterilization time on the explant of *Cerasus tianschanica* Pojark

灭菌剂种类及处理时间	接种瓶数	不同培养天数污染瓶数				污染率/%
		3 d	5 d	7 d	10 d	
酒精 10 s+ HgCl_2 4 min	12	0	8	11	11	92
酒精 10 s+ HgCl_2 6 min	12	0	3	7	8	67
酒精 10 s+ HgCl_2 8 min	12	0	2	3	6	50
酒精 10 s+ HgCl_2 12 min	12	0	0	2	5	42
酒精 20 s+ HgCl_2 4 min	12	0	4	8	10	83
酒精 20 s+ HgCl_2 6 min	12	0	3	7	8	67
酒精 20 s+ HgCl_2 8 min	12	0	4	5	6	50
酒精 20 s+ HgCl_2 12 min	12	0	0	2	3	25
酒精 30 s+ HgCl_2 4 min	12	0	0	3	6	50
酒精 30 s+ HgCl_2 6 min	12	0	0	3	5	42
酒精 30 s+ HgCl_2 8 min	12	0	0	3	4	33
酒精 30 s+ HgCl_2 12 min	12	0	0	1	3	25
酒精 30 s+ NaClO 5 min	15	0	5	7	9	60
酒精 30 s+ NaClO 10 min	15	0	4	8	8	53
酒精 30 s+ NaClO 15 min	15	0	2	6	7	47

基中天山樱桃离体茎段上腋芽的萌发率达到 93.4%; B_5 培养基中天山樱桃离体茎段上腋芽的萌发率为 72.1%,MS 培养基的萌芽率是 B_5 培养基的 1.3 倍。

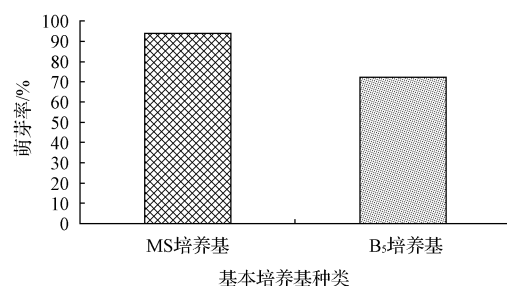


图 1 不同基本培养基种类对天山樱桃茎段腋芽萌芽率的影响

Fig. 1 Effect of different basic mediums on germination rate of *Cerasus tianschanica* Pojark axillary bud

2.3 不同生长调节剂浓度组合对天山樱桃茎段腋芽增殖的影响

生长调节剂对带芽茎段的再生起着至关重要的作用。在植物组织培养中,使用最多的生长调节剂是细胞分裂素类和生长素类,通过调节培养基中激素的含量,可以使不定芽分化速度大大加快,繁殖系数增加^[4]。从表 2 可以看出,不同浓度的 6-BA 和 IBA 组合均可以使天山樱桃的茎段发生增殖,但是增殖能力不同。其中增殖系数最大的是 1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA 的浓度组合,增殖系数为 3.06;是对照 0 mg/L 6-BA+0 mg/L IBA 增殖系数的 2.8 倍。

表2 不同生长调节剂浓度组合对
天山樱桃茎段腋芽增殖的影响

Table 2 Effects of different growth regulator composite concentrations on axillary bud proliferation of *Cerasus tianschanica* Pojark

6-BA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	芽总数	出芽数	增殖系数	生长情况
0	0	32	35	1.09	腋芽生长缓慢
0.5	0	35	48	1.37	腋芽生长缓慢
0.5	0.1	29	47	1.62	叶片淡绿色,生长势弱
0.5	0.2	36	64	1.78	生长势较强,叶色浓绿
0.5	0.3	38	61	1.61	生长势较强,叶色浓绿
1.0	0	27	42	1.56	叶片淡绿色,生长势弱
1.0	0.1	41	91	2.22	生长势较强,叶色浓绿
1.0	0.2	45	103	2.29	生长势较强,叶色浓绿
1.0	0.3	36	75	2.08	生长势强,叶色浓绿
1.5	0	35	56	1.60	叶片淡绿色,生长势弱
1.5	0.1	31	95	3.06	生长势强,叶色浓绿
1.5	0.2	39	99	2.54	生长势强,叶色浓绿
1.5	0.3	32	87	2.72	生长势强,叶色浓绿

3 讨论与结论

采自野外的试验材料,极易粘附细菌和真菌等,组织培养时不易消毒,因此,必须根据取材时间、材料幼嫩程度、材料类型等来决定消毒程序和确定消毒时间^[5]。天山樱桃组织培养过程中灭菌是一大难点,由于乌鲁木齐市春季多雨,其茎段表面被有绒毛,加大了灭菌的难度。培养材料灭菌不彻底是培养过程中遇到的最主要问题,提高灭菌剂的浓度和增加灭菌时间虽然可以降低材料的污染率,但同时会对植物材料造成严重伤害。该研究通过多次试验表明,以70%乙醇消毒20s后再经0.1%的HgCl₂溶液灭菌12min可以取得较好的效果。此外选择适宜的外植体、预处理方法及灭菌方法都对降低污染有重要作用。

培养基是植物组织培养的物质基础,也是组织培养能否成功的重要因素之一^[6]。该研究发现,MS培养基对于天山樱桃比较适宜,萌芽率远远高于B₅培养基,这

与侯修胜^[7]、唐晓杰等^[8]、刘翠兰等^[9]的研究结果一致。说明MS培养基对于樱桃属植物具有广泛的适应性。

植物细胞的分化是一个复杂的生理生化过程,植物激素和植物生长调节物质的种类、浓度以及它们之间的组合直接影响着不定芽的诱导^[10]。在组织培养过程中,愈伤组织的诱导、芽苗的发育程度受细胞分裂素与生长素的调控。细胞分裂素能诱导不定芽形成,削弱顶端优势,促进侧芽的萌发;生长素能促进细胞伸长,诱导愈伤组织和根的发生,增强顶端优势^[11]。该研究通过不同浓度6-BA和IBA的使用表明,单独使用6-BA也可以促进腋芽的增殖,但是增殖的效果不如和IBA的配合使用。有可能是2种生长调节剂协同作用的结果。

参考文献

- [1] 苏向辉,秦伟,刘立强,等.水分胁迫对两种野生果树几个生理指标的影响[J].北方园艺,2012,16(8):9-11.
- [2] 代红艳,张志宏,高秀岩,等.甜樱桃品种微繁体系的建立及优化[J].果树学报,2004,21(3):216-219.
- [3] 罗向东,戴亮芳,罗建林,等.濒危黄杜鹃的离体快速繁殖体系研究[J].西北植物学报,2010,30(4):645-651.
- [4] 苗玉青,李冠,吴松林,等.薄皮核桃组织培养与快速繁殖[J].新疆农业科学,2010,47(3):503-507.
- [5] Leifert C. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problem *in vitro* [J]. Critical Reviews in Plant Science, 1994, 13: 139-183.
- [6] 巩振辉,申书兴.植物组织培养[M].北京:化学工业出版社,2007:30.
- [7] 侯修胜.莫利甜樱桃试管快繁技术研究[J].落叶果树,2002(5):5-6.
- [8] 唐晓杰,孟庆繁.酸樱桃组织培养及快速繁殖技术研究[J].北华大学学报(自然科学版),2004(4):355-357.
- [9] 刘翠兰,钱泽民,徐凤军.乌克兰大樱桃的组培快繁试验[J].山东林业科技,2000(1):15-16.
- [10] 张智,刘建新,王炜勇.正交设计在根茎秋海棠'Helen Lewis'组织培养中的应用[J].浙江农业学报,2011,23(6):1119-1122.
- [11] 陈振光.园艺植物离体培养学[M].北京:中国农业出版社,1996:84-85.

Establishment of Initial Culture of *Cerasus tianschanica* Pojark

PENG Ni, LI Yan-yan, SHAO Qiao-ting, ZHOU Long
(Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052)

Abstract: Taking the stem of *Cerasus tianschanica* Pojark which was endangered plant as material, the effects of different sterilization and different sterilization time on the explants of *Cerasus tianschanica* Pojark were studied, and the influence of different basic medias and different growth regulator composite concentrations on axillary proliferation were investigated in order to establish the initial culture system of *Cerasus tianschanica* Pojark. The results showed that the best sterilization of the explants was Alcohol 20 s + HgCl₂ 12 min and the germination rate of axillary bud in MS basic media was higher than B₅ basic media. The initial culture system of *Cerasus tianschanica* Pojark was MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA + 30 g/L Sucrose + 6 g/L Agar powder.

Key words: *Cerasus tianschanica* Pojark; initial culture; tissue culture; establishment