

# “红灯”大樱桃的组织培养与快速繁殖

李晓玲<sup>1</sup>, 边震<sup>2</sup>, 卢绪志<sup>1</sup>, 张金龙<sup>1</sup>

(1. 长春工业大学 化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012; 2. 长春工业大学 图书馆, 吉林 长春 130012)

**摘要:**以经引种驯化后的“红灯”大樱桃(*Cerasus avium* ‘Hongdeng’)耐寒植株的茎尖、腋芽和带腋芽的幼嫩茎段为外植体,对其组培快繁体系进行了比较系统的研究。结果表明:“红灯”大樱桃茎尖及茎段外植体在 MS+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.02 mg/L+3% Sucrose+AC 0.5 g/L+0.7% Agar(pH 5.8)培养基上,芽萌发、生长状况较好,萌发率高达 90.0%;其组培苗在 MS+6-BA 0.6 mg/L+NAA 0.02 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L+维生素 C 40 mg/L+3% Sucrose+0.7% Agar(pH 5.8)培养基上继代培养 25 d 左右,继代增殖系数均可达到 3.0 左右;将其中长势良好的组培苗在 1/2MS+NAA 0.8 mg/L+1.5% Sucrose+0.7% Agar(pH 5.8)培养基上生根壮苗培养后,移栽成活率可达 86.7%。

**关键词:**“红灯”大樱桃;组织培养;快速繁殖

**中图分类号:**S 662.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)20-0085-05

大樱桃是我国北方成熟最早的落叶果树,素有“春果第一枝”的美誉,在调节鲜果淡季和均衡周年供应方面有着特殊作用<sup>[1]</sup>,在我国栽培已有 200 多年的历史。“红灯”大樱桃(*Cerasus avium* ‘Hongdeng’)系大连市农业科学院果树研究所育成的早熟、优质大樱桃品种<sup>[2]</sup>。该品种果实个大,色泽艳丽,果肉肥厚,多汁味甜,成熟期较早,较耐储运,市场竞争力强,颇受果农及消费者欢迎。在辽宁大连及山东各地均有栽培,为甜樱桃的主栽品种之一。但由于气候等多方面的原因,在吉林省等寒冷地区露地栽培繁殖“红灯”大樱桃尚鲜见报道,规模栽培和繁殖大樱桃尚属空白。

课题组根据《环境影响》和《定向培育》的引种驯化理论,将生长在大连南部的大樱桃优良品种“红灯”逐步北移,现已培育出能适应吉林省通化、辉南及长春等地气候和生态环境、可露地栽培、无特殊防寒措施即可安全越冬的大樱桃优良植株,并摸索采用嫁接和扦插等常规繁殖方法对其进行快繁。但由于受到良种基数和技术成熟度的限制,这些方法繁殖速度较慢,难于规模栽培和工厂化生产,因而在一定程度上限制了该优良果树资源的推广和进一步开发利用。因此,研究建立比较成熟高效的耐寒大樱桃植株组培快繁体系,对该优良品系的保存、扩增、改良和品种选育等均具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料“红灯”大樱桃(*Cerasus avium* ‘Hongdeng’)采自吉林省通化金山农场,该研究分别于 2011 年 10 月初、2012 年 5 月初、2012 年 6 月中旬共取材 3 次。

**第一作者简介:**李晓玲(1971-),女,吉林舒兰人,博士,副教授,现主要从事植物生物技术与分子生物学等研究工作。E-mail:lixia-ling@mail.ccit.edu.cn.

**基金项目:**吉林省教育厅资助项目(2012121)。

**收稿日期:**2014-03-29

introduction of *Xanthoceras sorbifolia*, namely that annual average temperature, average temperature in January, average temperature in July, the maximum temperature, the minimum temperature, > 10°C annual accumulated temperature, annual precipitation, annual sunshine hours. The results showed that the most suitable distribution regions were the Loess Gully Region at low altitude of Lyuliang Mountains, Taihang Mountains, Hengshan Mountain, Taiyueshan Mountains and Zhongtiao Mountains, including 102 counties (districts) of the 10 prefecture-level cities of Shanxi province; the less suitable distribution regions of *Xanthoceras sorbifolia* were Zuoyun county, Youyu county and Wuzhai county in the northern, and Pinglu county and Yuanqu county in the southern and Lingchuan county in the southeastern of Shanxi province. The unsuitable distribution regions of *Xanthoceras sorbifolia* were Wutai Mountains and other mountains were the areas above an altitude of 1 500 meters in Shanxi province of China.

**Keywords:** Shanxi province; *Xanthoceras sorbifolia*; ecological regionalization

## 1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 剪取“红灯”大樱桃耐寒植株的幼嫩枝条,将其剪去叶片留下腋芽,然后将枝条在流水中冲洗 5~6 h,用皂液刷净表面,将芽(包括顶芽和腋芽)外部的鳞片剥去,露出 2~5 mm 大小的牙尖,切取茎尖、腋芽或带腋芽的茎段。将其置于含有 40 mg/L 维生素 C 的无菌水中浸泡数分钟,再用 70% 酒精表面灭菌 60 s,0.1%  $\text{HgCl}_2$  溶液振荡浸泡 10 min 后,用无菌水冲洗 5 次,备用。

1.2.2 接种与初代培养 将经灭菌处理后的外植体分别接种于以 MS、WPM 和 F14 为基本培养基的待筛选的

初代培养基上(见表 1),并置于温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间 15 h/d 条件下培养。每 2 d 观察 1 次,记录不定芽萌动时间,并于培养 25 d 观察其生长状态,据此选择初代培养基的组成和继代培养基的筛选范围。

1.2.3 继代培养 剪取在初代培养基上长至高约 2 cm 的无菌苗,分别将其转接到待筛选的继代培养基上(见表 1),培养条件同初代培养。于培养 25 d 开始观察,记录组培苗的生长状态,据此选择合适的继代培养基并确定继代周期。

表 1

待筛选培养基组分设计

Table 1

Media for different culture periods

培养阶段 Culture period	培养基编号 No. of medium	基本培养基 Basic medium	6-BA /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NAA /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\text{GA}_3$ /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	AC /( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	维生素 C Vitamin C/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	蔗糖 Sucrose/%
初代培养 Primary culture	P1	MS	0.2	0.05		0.5		3.0
	P2	MS	0.4	0.05		0.5		3.0
	P3	MS	0.6	0.05		0.5		3.0
	P4	MS	0.8	0.05		0.5		3.0
	P5	MS	1.0	0.05		0.5		3.0
	P6	MS	1.5	0.05		0.5		3.0
	P7	MS	0.6	0.02		0.5		3.0
	P8	MS	0.8	0.02		0.5		3.0
	P9	MS	1.0	0.02		0.5		3.0
	P10	MS	0.6			0.5		3.0
	P11	MS	0.8			0.5		3.0
	P12	MS	1.0			0.5		3.0
	P13	1/2MS	0.6	0.05		0.5		1.5
	P14	WPM	0.6	0.05		0.5		3.0
	P15	WPM	0.8	0.05		0.5		3.0
	P16	WPM	1.0	0.05		0.5		3.0
	P17	F14	0.6	0.05		0.5		3.0
	P18	F14	0.8	0.05		0.5		3.0
	P19	F14	1.0	0.05		0.5		3.0
	P20	F14	0.6	0.02		0.5		3.0
继代培养 Subculture	S1	MS	0.2	0.02			40	3.0
	S2	MS	0.4	0.02			40	3.0
	S3	MS	0.6	0.02			40	3.0
	S4	MS	0.8	0.02			40	3.0
	S5	MS	1.0	0.02			40	3.0
	S6	MS	0.4	0.02	0.1		40	3.0
	S7	MS	0.6	0.02	0.1		40	3.0
	S8	MS	0.8	0.02	0.1		40	3.0
	S9	MS	0.4	0.02	0.2		40	3.0
	S10	MS	0.6	0.02	0.2		40	3.0
	S11	MS	0.8	0.02	0.2		40	3.0

1.2.4 生根壮苗 选取在继代培养基上高达 3~4 cm、长势良好的无菌苗,将其转接至 1/2MS+NAA 0.8 mg/L+1.5% Sucrose+0.7% Agar(pH 5.8)培养基上培养,在同样条件下培养 20 d 统计组培苗生根情况。

1.2.5 移栽驯化 将叶片充分展开且已生根的组培苗在温室中练苗 5 d(最后 1~2 d 开瓶练苗),然后小心地将组培苗根部粘附的培养基漂洗掉,再将整株组培苗用

多菌灵溶液清洗 1 遍后,将其移栽入混有少量蛭石的花土中,置于室温  $20 \sim 26^\circ\text{C}$ 、湿度 50%~70% 条件下培养。根据组培苗生长状态,定期喷洒多菌灵溶液,培养 30 d 后统计其成活率。

## 2 结果与分析

## 2.1 初代培养

2.1.1 取材时间对不定芽诱导的影响 取材时间对“红

灯”大樱桃外植体的初代培养结果影响非常显著。2011年10月份采集的外植体,材料带菌量较大,不定芽近于休眠状态。虽然在操作过程中,尽量剥尽老的芽鳞,但外植体的污染率还是非常高。其中近90.0%以上的外植体在初代培养过程中先后长出白毛,少数未污染的顶芽和腋芽也因褐化而死亡;于2012年5月份采集的外植体,在初代培养过程中污染率明显降低。但其不定芽在培养基上或者不萌动,或者能萌动但不展叶,或者既能萌动也能展叶,但始终呈散叶状而不能抽出茎段,经继代1~2次后叶片枯黄、中间芽体呈现褐色坏死;而2012年6月中旬剪取的半木质化枝条,其顶芽及带腋芽的茎段在初代培养基上很少污染。芽体在培养大约10 d后开始萌动,并迅速展叶,长势良好(见图1-2)。表明处于此期的外植体生活力强,对外源激素的反应敏感,不定芽诱导效果好。因此,针对该“红灯”大樱桃耐寒植株的组培快繁体系,可在每年6—7月间剪取其植株的半木质化枝条、切取其顶芽和带腋芽的茎段作为外植体。

2.1.2 初代培养基的筛选 该研究结果表明,“红灯”大樱桃耐寒植株的茎尖或茎段腋芽在各种待筛选的初代培养基上均有萌发和生长,但不定芽萌发时间和萌发率

差异比较明显。在以MS为基本培养基成分的初代培养基上,不定芽萌发相对早一些,在接种8~15 d后开始萌动。在以WPM或F14为基本培养基成分的初代培养基上,不定芽萌发时间相对迟一些,萌发率及生长状况均一般。而在1/2MS培养基上,芽萌动的时间最迟,培养近1个月后才开始萌发,且生长非常缓慢。从表2可以看出,在MS培养基中适量添加细胞分裂素和生长素后,芽萌发率和生长状况均有所改善。其中,以含6-BA 0.8 mg/L和NAA 0.02 mg/L的P8培养基培养效果最理想,小芽在接种10 d左右开始萌发(见图1-1),萌发率可高达90.0%。萌动后的小芽生长10 d后,高达1~2 cm,淡绿色叶片逐渐展开,长势良好,适宜继代培养。随着培养基中6-BA含量进一步增至1.0 mg/L时,不定芽萌发率提高至95.0%以上,但接种的部分茎段从茎皮斑点处开始出现愈伤组织,茎段切口处的愈伤组织也明显增多,少数不定芽及展开的叶片不同程度地出现了水浸状玻璃化现象。因此,综合不定芽萌发率及其长势,建议选择P8培养基作为“红灯”大樱桃耐寒植株茎尖或茎段外植体的初代培养基,培养时间为30 d。



注:1-1,1-2:开始萌发、生长的腋芽;1-3:继代生长的丛生芽;1-4:组培苗生根状况;1-5:组培苗移栽成活。

Note:1-1,1-2:The germination of axillary buds;1-3:The growing axillary buds;1-4:The rooted shoots *in vitro*;1-5:The surviving shoots after being transplanted.

图1 “红灯”大樱桃茎段腋芽组织培养

Fig.1 Culture of stem sections with axillary buds from *Cerasus avium* 'Hongdeng' *in vitro*

2.2 继代培养

根据初代培养结果,选用含有 0.02 mg/L NAA 的 MS 培养基作为基本继代培养基,在此基础上逐步增加培养基中 6-BA 含量(见表 1),以促进“红灯”大樱桃不定芽在短期内的增殖与成苗。从表 3 可以看出,在较低 6-BA 含量的 S1 培养基上,组培苗的继代生长和增殖都很缓慢。继代培养 20 d 后小苗平均高度仅 3.0 cm,只有少数组培苗出现丛生侧芽。随着培养基中 6-BA 含量的升高,不定芽增殖率逐渐增加。在含有 1.0 mg/L

6-BA 的 S5 培养基上,不定芽增殖率可高达 352.5%。但是在该培养基上大部分新生小芽簇生在一起,叶片细小卷曲,成苗率极低。因此,为进一步促进小苗主茎伸长、提高成苗率,尝试在培养基中添加少量 GA<sub>3</sub>。结果表明,GA<sub>3</sub> 可明显促进小苗主茎伸长,提高成苗率。在含有 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> 的 S7 培养基上,组培苗继代增殖率和成苗率都比较高,分别为 287.5% 和 92.5%(见图 1-3)。培养 40 d 后,其中高达 4 cm 以上、可用于生根的小苗比例均在 80% 以上,可满足规模化繁殖的要求。

表 2 “红灯”大樱桃外植体在各种初代培养基上的生长状况

Table 2 The growth of explants from *Cerasus avium* ‘Hongdeng’ on the primary media

培养基编号 No. of medium	接种芽数 Number of buds inoculated/个	萌发芽数 Number of germinating buds/个	萌发率 Germination rate/%
P1	40	20	50.0
P2	40	21	52.5
P3	40	30	75.0
P4	40	35	87.5
P5	40	39	97.5
P6	40	34	85.0
P7	40	31	77.5
P8	40	36	90.0
P9	40	38	95.0
P10	40	20	50.0
P11	40	26	65.0
P12	40	27	67.5
P13	40	11	27.5
P14	40	22	55.0
P15	40	22	55.0
P16	40	25	62.5
P17	40	19	47.5
P18	40	24	60.0
P19	40	25	62.5
P20	40	17	42.5

表 3 “红灯”大樱桃组培苗继代培养结果

Table 3 The propagation of shoots *in vitro* of *Cerasus avium* ‘Hongdeng’ by subculture

培养基编号 No. of medium	接种芽数 Number of buds inoculated/个	增殖芽数 Number of buds propagated/个	增殖率 Multiplication rate/%	成苗率 Shoot formation rate/%	玻璃苗百分数 Percent of vitrification shoots/%
S1	40	13	32.5	27.5	0
S2	40	88	220.0	42.5	0
S3	40	123	307.5	65.0	2.5
S4	40	136	340.0	27.5	12.5
S5	40	141	352.5	17.5	12.5
S6	40	82	205.0	77.5	0
S7	40	115	287.5	92.5	0
S8	40	126	315.0	72.5	2.5
S9	40	81	202.5	87.5	0
S10	40	104	260.0	87.5	0
S11	40	119	297.5	85.0	10.0

2.3 生根壮苗和移栽驯化

将高达 4 cm 以上、长势良好的组培苗在生根培养基上培养后,生根率可达到 100.0%。平均每株组培苗长出 3~4 根不定根,且根系健壮、叶片充分舒展,适合移栽(见图 1-4)。

选取 30 株根系良好的健壮组培苗,在温室中进行

练苗后,将其移栽入混有少量蛭石的花土中培养。移栽 30 d 后观察并统计结果,其中 26 株长势良好(见图 1-5),移栽成活率为 86.7%,表明“红灯”大樱桃组培苗在该混合基质中移栽效果比较好。

3 讨论与结论

取材时间对“红灯”大樱桃耐寒植株不定芽的成功

诱导非常关键。新梢木质化程度低,含有的酚类物质少,带菌量相对较低,因而有助于降低材料的污染率和防止褐化。此时植株正处于旺盛生长期,顶芽和腋芽在初代培养基上更易成活、萌发。该研究结果表明,于2012年6月中旬左右剪取当年新抽出的半木质化枝条、切取其顶芽和带腋芽的茎段作为外植体,芽成活率高、生长迅速,这与成密红<sup>[3]</sup>、李晓玲等<sup>[4]</sup>的研究结果相近。

吉林省东部山区风沙较多,材料带菌量较大,获得无菌外植体相对比较困难,因而有效控制外植体的污染也是该组培快繁体系建立的一个比较关键环节。预试验结果表明,灭菌不彻底的外植体多在初代培养基上先后长出白毛,只有极少数的外植体在其周围长出细菌菌苔,因而判定该外植体主要是真菌污染。该真菌生命力非常顽强,延长表面灭菌时间或重复多次灭菌处理对灭菌效果的改善并不理想,同时还会造成材料褐化加速、成活率降低等不良后果。因此,为使外植体获得较理想的除菌效果,课题组参考并尝试采取了一些必要的措施<sup>[5-6]</sup>。首先,考虑到枝条经强烈阳光照射后,可以在一定程度上起到杀菌的作用,选择在2012年6月中旬晴天阳光照射最强的午间取材。其次,新发出的幼嫩枝条带菌量相对较少,因而选取当年新抽出的半木质化枝条为材料,将其剪去叶片、留下腋芽。最后,将枝条表面冲洗刷净后,小心将芽(包括顶芽和腋芽)外部的鳞片连同茎段上老的茎皮一起剥尽,并将外植体尽快置于一定浓度的维生素C溶液中浸泡以减轻褐化,再经表面灭菌后接种于含有0.5 g/L活性炭的初代培养基上培养。研究结

果表明,经过处理的外植体,不定芽污染率及褐化程度明显降低,其萌发率可高达90.0%。此外,“红灯”大樱桃组培苗在移栽过程中,也极易感染真菌而死亡。因此,在移栽过程中定期喷洒多菌灵溶液对提高其移栽成活率至关重要<sup>[7-8]</sup>。

该研究初步建立了比较成熟完整的耐寒大樱桃植株组培快繁体系,可为该优良品系的保存、扩增和品种改良等开辟新的途径、提供一定的参考依据和技术支撑。关于移栽驯化后的组培苗是否能够在上述地区安全过冬、是否还需要进行抗寒驯化及其后续的栽培管理技术等问题,还有待于进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] 宋宏峰,殷守防,许建兰,等. 大樱桃引种试验初报[J]. 江苏农业科学,2009(6):229-231.
- [2] 王凌. 大樱桃优良品种“红灯”在天津的表现[J]. 中国果树,1992(4):38-38.
- [3] 成密红. 樱桃组织培养及微型嫁接技术研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2006.
- [4] 李晓玲,李毅丹,于晓明. 红花金老梅组培快繁技术研究[J]. 北方园艺,2006(3):126-127.
- [5] 巩振辉,申书兴. 植物组织培养[M]. 北京:化学工业出版社,2009,51-52.
- [6] 唐罗忠,赵丹,诸葛强,等. 麻栎组织培养外植体选择与灭菌方法[J]. 江苏林业科技,2010,37(5):22-25,46.
- [7] 王计平,侯思宇,孙朝霞,等. 欧洲大樱桃的组织培养与快速繁殖[J]. 安徽农业科学,2007,35(16):4809-4810.
- [8] 张志勤,肖娅萍,王喆之. 马哈利樱桃茎尖培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004(1):70.

## Study on Rapid Propagation of *Cerasus avium* ‘Hongdeng’ by Tissue Culture

LI Xiao-ling<sup>1</sup>, BIAN Zhen<sup>2</sup>, LU Xu-zhi<sup>1</sup>, ZHANG Jin-long<sup>1</sup>

(1. School of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun, Jilin 130012; 2. Library, Changchun University of Technology, Changchun, Jilin 130012)

**Abstract:** Taking stem apex, axillary buds and young stems with axillary buds from the cold-tolerant plants of *Cerasus avium* ‘Hongdeng’ after acclimatization as explants, the protocol of rapid propagation by tissue culture was groped. The results showed that 90% of adventitious buds germinated on the primary medium contained MS basal salts and vitamins, 6-BA 0.8 mg/L, NAA 0.02 mg/L, AC 0.5 g/L and 3% sucrose which was solidified with 0.7% agar (pH 5.8). After the shoots *in vitro* were subcultured for 25 days and so on the subculture medium contained 6-BA 0.6 mg/L, NAA 0.02 mg/L, GA<sub>3</sub> 0.6 mg/L, vitamin C 40 mg/L, the propagation coefficient by subculture could be up to 3.0. The shoots were rooted and grew stronger the 1/2 MS medium contained NAA 0.8 mg/L, vitamin C 40 mg/L and 1.5% sucrose, and 86.7% of shoots with strong roots survived after they were transplanted to soil.

**Keywords:** *Cerasus avium* ‘Hongdeng’; tissue culture; rapid propagation