

甜樱桃种间杂交胚培养及快繁研究

秦志华, 孙玉刚, 闫桂红, 魏国芹, 李芳东

(山东省果树研究所, 山东 泰安 271000)

摘 要: 以樱桃杂交果实为试材, 对樱桃的杂交种胚进行了培养研究。结果表明: 适合樱桃胚培养的最佳培养基为 MS+BA 1 mg/L+IAA 1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L; 适合甜樱桃继代增殖的培养基为 MS+BA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L; 适合樱桃生根的培养基为 1/2MS+IBA 0.4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L。

关键词: 樱桃; 胚培养; 继代增殖; 生根培养

中图分类号: S 662.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0116-03

甜樱桃(*Prunus avium* L.)属于蔷薇科、李属、樱桃亚属乔木^[1], 具有很高的营养价值和医药价值^[2]。作为北方落叶果树中经济效益最高的树种之一, 由于其存在缺少优良自交亲和品种、花期不耐低温、病毒病、流胶病危害严重等问题, 在一定程度上制约着樱桃产业的发展, 因此迫切需要选育新的优良品种, 以满足消费者的需求。

种间杂交是丰富遗传多样性和创造新种质的重要途径^[3], 但是由于品种间授粉不亲和及花后败育问题使得这一应用受到限制。Dubouzet 等^[4]报道通过胚挽救获得杂种后代是解决这一问题的唯一途径。该试验对甜樱桃杂种胚进行了培养研究, 建立了完善的胚培养技术体系和快繁、再生体系, 旨在为胚挽救的实施提供技术支持, 并借助于现代生物育种技术以期在杂交种后代中选育出优良的樱桃优系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2006~2009年山东省果树研究所分别在泰安、烟台和青岛农科院等试验基地进行了樱桃品种间的杂交育种工作。母本为早熟品种早大果、红灯等, 父本为自交亲和品种桑提娜、拉宾斯、斯坦勒、艳阳等。组合方式包括红灯×桑提娜等混合花粉、红灯自然授粉、早大果×桑提娜等混合花粉、早大果自然授粉、意大利早红×桑提娜等混合花粉、意大利早红自然授粉等。授粉后第

5周统计各组合坐果率分别为13.78%、32.34%、8.46%、33.01%、5.33%、27.91%。最终获得果实数量为5 000个左右。

1.2 试验方法

1.2.1 种胚培养 剥去果肉, 取出果核, 先用自来水冲洗干净, 再用70%酒精处理30 s, 于超净工作台上去掉外种皮取出种子。将种子置于无菌烧杯中, 用84消毒液灭菌8 min, 去内种皮后用0.1%升汞灭菌6 min, 最后用无菌水冲洗3~5次, 接种至不同培养基中(见表1)。培养基中蔗糖3%, 琼脂0.6%, pH 5.8。30 d后统计不同培养基对胚成活率的影响。培养条件: 光照强度2 000 lx, 光照时间16 h/d, 温度25℃。胚成活率(%)=形成植株数/接种总胚数×100%。

1.2.2 增殖培养 将试验获得的种胚新梢切成约1.5 cm长的茎段, 接种在不同继代培养基中(见表2), 培养基中蔗糖3%, 琼脂0.6%, pH 5.8。30 d后统计增殖系数, 比较不同培养基对茎段增殖的影响。培养条件: 光照强度2 000 lx, 光照时间16 h/d, 温度25℃。增殖系数=(增殖新梢数/接种外植体数)×100%。

1.2.3 生根培养 选择高度大于2 cm、长势良好、有4片以上展开叶的继代苗, 从基部切下, 转移至生根培养基上诱导生根。35 d后调查生根状况, 统计生根率和平均根数及根长。生根培养基以1/2 MS为基本培养基, 植物生长调节剂选用IAA、IBA和NAA(见表3)。培养条件: 光照强度2 000 lx, 光照时间16 h/d, 温度25℃。生根率=生根茎段数/接种茎段数×100%。平均根数=(生根总数/植株总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对胚成活率的影响

接种7 d后见子叶内胚芽逐渐转绿, 12 d后胚芽萌发, 20 d后形成丛生芽, 株高约2.0 cm, 30 d后株高约3.0 cm。结果表明, 不同培养基对胚的成活率影响显

第一作者简介: 秦志华(1982-), 男, 山东日照人, 本科, 研究实习员, 现主要从事樱桃育种及栽培研究工作。

通讯作者: 孙玉刚(1964-), 男, 山东诸城人, 硕士, 研究员, 现主要从事果树育种工作。E-mail: sds129@126.com。

基金项目: 国家行业科技专项子课题资助项目(200903019); 山东省农业良种工程项目子课题资助项目。

收稿日期: 2010-01-08

著。由表 1 可见适合胚培养的最佳培养基为 MS+BA 1 mg/L+IAA 1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L (pH 5.8), 在此培养基中胚的成活率最高, 植株生长状况最佳。单独使用 6-BA 或单独使用 IAA 时胚成活率最低; MS 基本培养基的培养效果优于 1/2MS 基本培养基; 6-BA 浓度在 0~1.0 mg/L 的范围内, 胚成活率随着 IAA 浓度的增加而提高; 同样, IAA 浓度在 0~1.0 mg/L 的范围内, 胚成活率亦随着 6-BA 浓度的增加而提高。

表 1 不同培养基对胚培养的影响

培养基	成活率/%	长势
MS+BA 1.0 mg/L	65.0 bc	叶绿, 茎较粗, 长势较弱
MS+IAA 1 mg/L	60.0 c	叶较绿, 茎较粗, 长势较弱
MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L	85.0 ab	叶较绿, 茎较粗, 长势居中
MS+BA 0.5 mg/L+IAA 1.0 mg/L	80.0 abc	叶绿, 茎较粗, 长势居中
MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L	87.5 ab	叶绿, 茎较粗, 长势较佳
MS+BA 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L	95.0 a	叶绿, 茎粗, 长势最佳
1/2 MS+BA 1 mg/L+IAA 1 mg/L	75.0 abc	叶较绿, 茎较粗, 长势居中

注: 小写字母为邓肯新复极差法显著性分析, 显著水平为 0.05, 下同。

2.2 不同培养基对试管苗增殖的影响

茎段接种至继代培养基中, 4~6 d 后开始抽出新叶, 11 d 左右开始从基部增殖新芽, 形成丛梢, 30 d 左右试管苗高约 3~3.5 cm。表 2 表明, 最适合樱桃继代增殖的培养基为 MS+BA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L (pH 5.8), 此培养基中苗的增殖系数最高, 生长速度快、苗健壮且玻璃化程度较轻。另外培养基中大量元素含量越高增殖系数越大, 对试管苗玻璃化率无显著影响。单独使用 BA 时茎段的增殖系数大于同时使用 BA 和 IBA 时的增殖系数。BA 的浓度在 0.5~2.0 mg/L 的范围内, 随着 BA 浓度的增加增殖系数逐渐下降, 但玻璃化率逐渐升高。另外, 该试验可以通过提高培养基中琼脂用量的方法来降低试管苗玻璃化率, 当培养基中琼脂的浓度为 0.75% 便可以较好的消除樱桃试管苗的玻璃化现象。

表 2 不同培养基对茎段增殖的影响

培养基	增殖系数	玻璃化率/%
MS+IBA 0.5 mg/L	4.3	0 c
MS+BA 0.5 mg/L	11.8	3.8 bc
MS+BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L	9.7	5.0 bc
MS+BA 1.0 mg/L	9.2	17.1 ab
MS+BA 2.0 mg/L	6.1	25.7 a
1/2MS+BA 0.5 mg/L	7.8	2.5 bc
3/4MS+BA 0.5 mg/L	9.6	2.9 bc

2.3 不同培养基对试管苗生根的影响

试管苗接种 7 d 后开始有乳白色根尖露出, 14 d 根长 0.5~1 cm, 40 d 后根长 4~5 cm。试管苗在生根培养基上抽新叶较慢, 主要是由于营养物质主要供根部生长的原因。表 3 表明, 最适合樱桃生根培养基为 1/2MS+IBA 0.4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L (pH 5.8)。此培养基诱导的试管苗生根率最高, 平均根数最多, 生根

最长。IBA 诱导生根的效果优于 IAA 和 NAA 诱导生根的效果, 随着 IBA 浓度的增加生根率逐渐提高。NAA 诱导的试管苗生根率也较高, 但是根基部易形成块状愈伤组织, 降低试管苗移栽成活率。

表 3 不同培养基对试管苗生根的影响

培养基	生根率/%	平均根数/个	平均根长/cm
1/2MS+IBA 0 mg/L	25.7 b	2.4	1.2
1/2MS+IBA 0.4 mg/L	91.4 a	12.3	4.3
1/2MS+IBA 1.0 mg/L	74.3 a	5.8	4.1
1/2MS+IAA 0.4 mg/L	85.7 a	7.4	3.0
1/2MS+NAA 0.4 mg/L	88.6 a	7.6	3.1

2.4 驯化移栽

选取株高 3 cm 以上、展开叶 5 片以上、生长健壮的生根苗进行移栽。移栽前要先逐渐打开组培瓶瓶盖进行练苗, 练苗 5~6 d 后将根部的培养基用无菌水冲洗干净, 然后移入上部基质为消毒沙、下部基质为营养土的苗穴中, 遮荫, 防风, 保持相对湿度 90% 左右, 以后逐渐降低湿度, 使小苗逐渐适应大田环境, 待小苗抽出新叶 3~4 片时便可移栽大田, 移栽成活率可达 90% 以上。

生根苗的苗龄对移栽成活率有较大影响。苗龄为 35 d 左右的生根苗移栽最容易成活, 此阶段根的活力和吸收能力均达到最强, 苗龄超过 45 d 时, 根部逐渐褐化, 其活力及吸收能力明显降低, 移栽时不易成活。另外生根条数多、根较粗的生根苗移栽后生长较快。

3 小结与讨论

胚培养所需的最佳培养基往往因植物材料而异, 该试验中甜樱桃杂种胚以培养基 MS+BA 1 mg/L+IAA 1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 的培养效果最佳, 此条件下胚的成活率最高。李文生等^[9]以 F14+6-BA 0.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L+GA 1.0 mg/L 作为甜樱桃杂种胚的培养基, 也获得了较高成活率, 刘焕芳等^[10]报道甜樱桃与中国樱桃的杂种胚以 1/2MS+BA 2.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L 培养效果最佳。另外胚的成活率与其发育程度密切相关^[7], 该试验显示胚发育程度越高、越饱满, 成活率越高, 反之成活率越低。

胚培养最重要的应用就是对败育的种子实施胚挽救^[7-8], 这是解决杂交育种中种子败育后导致实生播种不萌发或萌芽率低的唯一途径。胚挽救通过提高杂交种胚的萌芽率进而提高育种效率, 加速培育新品种的进程。据报道^[9-10], 实施胚挽救的时间十分关键, 应该选在胚珠败育以前进行抢救。

参考文献

[1] 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214-217.
[2] 李竹莹, 郑晓峰, 孙光英, 等. 樱桃组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 凯里学院学报, 2008, 26(6): 102-103.
[3] Chen J, Staub J, Qian Ch, et al. Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from *Cucumis hystrix* Chakr. × *Cucumis sativus* L. [J]. Theor Appl Genet, 2003 106: 688-695.

龙芽櫟木体细胞胚状体发生及成苗的调控研究

李正楠¹, 王 红¹, 张爱军¹, 胡益民², 姬惜珠¹

(1. 河北农业大学 山区研究所, 国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071001; 2. 保定市园林局, 河北 保定 071001)

摘 要: 利用龙芽櫟木叶片、叶柄、嫩茎及根为试材, 研究了 2,4-D、6-BA、NAA、糖种类对胚性愈伤组织及胚状体的诱导、芽分化和成苗的影响。以 2,4-D 1.0 mg/L 确定诱导胚性愈伤组织及胚状体的最适外植体为嫩茎, 诱导的胚性愈伤组织及胚状体质量、数量均高于叶片、叶柄和根; 经直观分析、方差分析和多重比较, 结合对比试验, 结果表明: 6-BA 是龙芽櫟木芽分化及成苗的主要因素。以蔗糖 30 g/L 作碳源, 芽分化最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L; 成苗最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.04 mg/L, 芽分化率和成苗率达 88.02% 和 79.62%。

关键词: 龙芽櫟木; 胚状体; 芽分化; 成苗

中图分类号: S 792.119 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)08-0118-04

龙芽櫟木 *Aralia elata* (Miq) Seem 系五加科櫟木属落叶小乔木。别名刺嫩芽、刺龙芽。原产东北, 多分布于东北、河北山区。生长于林缘、山谷阴坡等处, 树皮灰

色, 密生坚刺。龙芽櫟木不仅能防风固沙, 美化环境, 且含有较高的人参营养素, 具有强身健体、调节神经、祛风除邪的功效^[1]。其嫩芽是营养高、口感佳的山野菜。由于龙芽櫟木零星散生, 雌雄异株, 授粉机会较少, 天然繁殖率低, 限制了规模发展。随着山野菜销售价格提高, 利益驱使原产地人掠夺式采集, 造成野生资源濒临灭绝。利用组织培养技术对龙芽櫟木进行快速繁殖, 为其资源的保存、产业化工厂育苗奠定基础, 对龙芽櫟木新品种(例如无刺品种)的培育和改良有重要的作用。目前, 国内对龙芽櫟木的组织培养研究多集中于嫩茎和芽外植体不经愈伤组织阶段而直接培养成苗, 诱导胚性

第一作者简介: 李正楠(1964-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事农村与区域发展研究工作。

通讯作者: 姬惜珠(1956-), 女, 本科, 研究员, 现主要从事木本植物组织培养研究工作。E-mail: xuzhu555@126.com。

基金项目: 河北省科技厅科技攻关资助项目(00230108D)。

收稿日期: 2009-12-25

[4] Dubouzet J, Shinoda G K, Murata N. Interspecific hybridization of *Allium gigantum* Regel: production and early verification of putative hybrids[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 385-388.

[5] 李文生, 闫国华, 张晓明, 等. 樱桃种间杂交种胚培养及子叶植株再生[J]. *园艺学报*, 2004, 31(5): 690.

[6] 刘焕芳, 陈学森, 段成国. 甜樱桃与中国樱桃杂种胚抢救及杂种鉴定[J]. *园艺学报*, 2004, 31(3): 303-308.

[7] 赵艳华, 程和禾, 吴雅琴, 等. 早熟甜樱桃胚挽救研究[J]. *河北农业科*

学, 2008, 12(4): 69-72.

[8] 郭修武, 郭印山, 张海娥, 等. 接种时期和培养基对无核葡萄胚挽救的影响[J]. *园艺学报*, 2007, 34(2): 329-332.

[9] 贺佳玉, 李云, 姜金仲, 等. 植物胚败育机理及其离体培养挽救技术之研究进展[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(1): 141-146.

[10] 李桂荣, 王跃进, 唐冬梅, 等. 胚挽救无核葡萄新品种取样时期的研究[J]. *河北农业大学学报*, 2004, 27(5): 17-21.

Embryo Culture and Proliferation of Interspecies Hybrids of Sweet Cherry

QIN Zhi-hua, SUN Yu-gang, YAN Gui-hong, WEI Guo-qin, LI Fang-dong

(Shandong Institute of Pomology, Taian, Shandong 271000)

Abstract: The crossing fruits were used as explants in this paper to study the embryo culture of sweet cherry. The results indicated that the proper medium for embryo culture of sweet cherry was MS+BA 1 mg/L+IAA 1 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L and for proliferation was MS+BA 0.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L; The appropriate medium for roots induction was 1/2MS+IBA 0.4 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L.

Key words: sweet cherry; embryo culture; proliferation; roots induction