

文章编号: 1003-8701(2015)06-0098-03

欧李愈伤组织诱导及分化研究

胡延生¹, 姜继发², 建德锋^{1*}

(1. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101; 2. 吉林省镇赉县园林管理中心, 吉林 镇赉 137300)

摘要: 为了快速大量繁育欧李苗木, 尝试采用离体繁殖方法进行繁育。该试验以欧李茎尖为外植体, 研究了在诱导阶段不同培养基配方对其愈伤组织诱导及分化的影响。结果表明愈伤组织诱导培养基以 MS+KT 0.6 mg/L 配方较好, 诱导率可达 62%; 愈伤组织分化选用 MS+KT 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L 或 MS+KT 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 培养基均较好, 分化率可达 80%, 且能较早完成分化, 并且分化不定芽数量较多。

关键词: 欧李; 培养基; 愈伤组织; 诱导; 分化

中图分类号: S662.5

文献标识码: A

Studies on the Callus Induction and Differentiation of *Cerasus humilis* in Vitro

HU Yan-sheng¹, JIANG Ji-fa², JIAN De-feng^{1*}

(Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin Jilin 132101;

2. Center of Landscape Management, Zhenlai County, Jilin 137300, China)

Abstract: In order to propagate large amount of seedlings of *Cerasus humilis* rapidly, we try to using propagation methods in vitro. In the test, taking shoot-tips as explants, the effects of different media formulations on the callus induction and differentiation were researched in the induction phase. The results showed that MS + 0.6 mg/L KT was the best medium for callus induction, and the induction rate reached 62%. MS + 0.5 mg/L KT + 0.2 mg/L IBA or MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L IBA could be chosen as the medium for callus differentiation, the differentiation rate reached 80%, and the differentiation completed earlier, and larger number of adventitious buds differentiated.

Key words: *Cerasus humilis*; Media; Callus; Induction; Differentiation

欧李 (*Cerasus humilis*), 又称山梅子、小李仁等, 为蔷薇科樱属中的一种落叶灌木^[1]。该树木果实成熟于 5~6 月, 果近球形, 红色或紫红色, 果实中钙元素的含量比一般的水果高, 为了突出这一特点, 商品生产中称其为“钙果”。目前生产中栽培的欧李是我国果树专家杜俊杰教授历经十多年时间, 从野生植物欧李中发现并选育出来的水果优质新品种, 欧李果实中含有丰富的蛋白质、矿物质元素、维生素和氨基酸等。据检测每百克鲜果钙铁含量分别达到 80 mg 和 1.5 mg, 是苹果的 6 倍, 果实中含有 17 种氨基酸, 总量高达 338.3~451.7 mg/100 g, 特别是维生素 C、B₂ 和 E 的含量以及钾、磷、铁、锌、硒和赖氨酸的含量均高于现有

常见果树品种, 是儿童和老人、孕妇的高级保健水果^[2-3]。此外, 欧李果实具有浓郁的特殊香味, 可以加工成香料, 作为食品的高级添加剂, 还可制汁、造酒等。目前在欧李苗木的生产中主要通过扦插方法进行苗木培育, 但由于扦插繁殖需要大量的枝条, 规模化大量繁殖时材料采集有困难^[4]。本试验尝试采用离体培养的方法繁育欧李苗木, 目前已发表文献中关于欧李组培育苗方面的报道不多, 并且文献中主要强调欧李的整个组培过程, 而各阶段配方的选择并不详细^[5-6]。在植物的整个离体培养过程中, 初代培养过程中的诱导阶段最为重要, 能否诱导出大量的中间繁殖体是整个离体培养的关键^[7-8], 所以该试验仅针对欧李离体诱导阶段进行详细研究, 尝试得出欧李最佳的愈伤组织诱导和分化方案, 以便为欧李的离体快繁奠定基础, 具有一定的现实意义。

1 材料与方

收稿日期: 2015-06-26

基金项目: 吉林省科技厅自然科学基金项目(20130238)

作者简介: 胡延生(1974-), 男, 农艺师, 硕士, 研究方向: 园艺植物栽培繁育。

通讯作者: 建德锋, 男, 硕士, 副教授, E-mail: kzszyzb@163.com

1.1 试验材料

2014年10月于吉林农业科技学院欧李种植园中挑选生长良好、无病虫害的植株,采当年生完全木质化的带芽枝条若干,带回实验室备用。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基配制

愈伤组织诱导和分化培养基均以MS作为基本培养基,然后添加不同配比的激素,并均采用固体形态,添加琼脂量为6 g/L,蔗糖30 g/L,培养基pH调整为6.0。先在钢锅中进行煮制,煮制好后进行定容,然后调节pH值,待分装到各三角瓶中后进行高压灭菌,高压灭菌后带到接种室,待完全冷却凝固后方可使用。

愈伤组织诱导培养基采用5个配比,记作:J1:MS+KT 0.2 mg/L;J2:MS+KT 0.4 mg/L;J3:MS+KT 0.6 mg/L;J4:MS+KT 0.8 mg/L;J5:MS+KT 1.0 mg/L。愈伤组织分化培养基采用4个配比,记作:Y1:MS+KT 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L;Y2:MS+KT 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L;Y3:MS+KT 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L;Y4:MS+KT 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L。

1.2.2 材料处理

将采集回来的带芽枝条切成小段,每段带芽,先放入广口瓶中,在自来水龙头下用流水冲洗20 min,然后用0.5%的84消毒液浸泡15 min,用蒸馏水冲洗3~4次后,再放入0.05%次氯酸钠溶液(有效氯含量)中浸泡8 min,最后再次用蒸馏水冲洗3~4次,放入接种室的超净工作台备用。

1.2.3 接种与培养

在超净工作台内用刀片将芽从枝条段上切

下,用蘸有75%酒精的纱布对芽擦拭消毒,用蒸馏水冲洗3~4次后,再用消毒过的滤纸拭去芽上的水珠,然后进行接种。接种时将芽边的较大叶片去掉,芽尖大小为0.5 cm左右,接种插入时注意保持芽的极性。首次接种为了减少污染率,每个瓶中接1块原材料,每个处理接30瓶。接种后将瓶放入培养室中进行培养,定期观察茎尖的分化情况,记录每个瓶中愈伤组织出现的时间,培养25 d后计算各配方的愈伤组织诱导率。

得出最佳愈伤组织诱导方案后,依此进行愈伤组织繁育,从中挑选最佳愈伤组织块,在超净台内将其切割成0.3~0.5 cm小块,分别接种到4个分化培养基上,每处理接20瓶,每瓶接3小块。然后放入培养室中,定期观察愈伤组织分化情况,30 d后计算不同培养基分化出不定芽的情况,记录形成芽的时间,统计形成芽的平均数量。

1.2.4 培养条件

整个诱导与分化过程均在培养室进行,湿度保持在85%,诱导阶段温度保持在18~22℃,漫射光下培养;分化阶段温度控制在23~25℃,光照度2000~3000 lx,8~12 h/d^[10-11]。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导情况

茎尖接种到5种愈伤组织诱导培养基上后,均有不同程度的分化,且无褐变发生,记录每个配方出现愈伤组织的最早时间,在接种后第25 d,愈伤组织诱导基本完成,形成的愈伤组织开始由绿黄色变白,这时统计愈伤组织诱导率(见表1)。

表1 不同培养基愈伤组织诱导情况

培养基配方	KT添加量(mg/L)	愈伤组织最早出现时间(d)	愈伤组织诱导率(%)	愈伤组织生长情况
J1	0.2	18	9	生长老化,愈伤组织疏松,黄绿色
J2	0.4	17	45	生长较好,愈伤组织致密,部分黄色
J3	0.6	12	62	生长优良,愈伤组织致密,绿色
J4	0.8	11	49	生长较好,愈伤组织致密,部分黄色
J5	1.0	10	41	生长较好,愈伤组织疏松,部分黄色

注:愈伤组织诱导率(%)=[出现愈伤组织的瓶数/(接种总瓶数-污染瓶数)]×100%

由表1可知,茎尖在5种培养基上均可诱导出现愈伤组织,但诱导情况各有不同。J5第10 d开始出现愈伤组织,其次为J4、J3、J2、J1,分别在第11、12、17、18 d陆续出现,说明KT的添加量与愈伤组织诱导相关。第25 d进行统计的诱导率来看,5个配方随着KT添加量的增加,诱导率出现先增加后下降的现象,说明KT有利于愈伤组织诱导,但并非添加量越大越好,添加过多反而会抑制愈伤

组织诱导。在实际的定期观察中也会发现,J5虽然形成愈伤组织最早,但很多培养瓶中没有形成愈伤组织,反而J3配方的瓶中形成愈伤组织较多,且形成的愈伤组织质量较好,组织块致密且呈现绿色。综合比较,J3配方比其他配方适合。愈伤组织诱导阶段的主要目的是形成更多的愈伤组织,保持愈伤组织块致密结实,这样有利于切割后诱导不定芽,因此,5个配方中,欧李茎尖愈

伤组织诱导的最佳配方应该为MS+KT 0.6 mg/L。

2.2 愈伤组织分化情况

愈伤组织切成小块转接到4种不同分化培养

基中,定期观察每个处理的分化情况,计算分化率,统计最早分化出不定芽的时间及平均芽数(见表2)。

表2 不同培养基愈伤组织分化情况

分化培养基	转瓶瓶数(个)	成活瓶数(个)	分化不定芽瓶数(个)	分化率(%)	最早形成不定芽时间(d)	平均芽数(个/瓶)
Y1	20	20	12	60	26	3.2
Y2	20	20	16	80	21	4.5
Y3	20	19	13	68	25	3.6
Y4	20	19	15	79	20	4.2

注:分化率=分化出不定芽的瓶数/(转瓶总瓶数-污染瓶数)

由表2可知,4个培养基中分化率均大于50%,但分化情况有一定差异,其中Y2的分化率最高,达80%,其次Y4,达79%,Y1、Y3相对较低,均在70%以下,说明IBA 0.2 mg/L对不定芽诱导有促进作用;另Y2、Y4分化不定芽的时间较早,Y2形成在第21 d,Y4形成在第20 d,Y1、Y3出现在转接后的第26 d及第25 d;从平均芽数比较,Y2最多,为4.5个,其次为Y4,为4.2个。可以得出Y2、Y4配方分化率大于其他2个配方,另分化出不定芽的时间较早、分化不定芽的个数较多,所以4个培养基中Y2、Y4均适合欧李愈伤组织分化。

3 结论与讨论

通过不同配方对欧李愈伤组织诱导与分化情况的比较,得出MS+KT 0.6 mg/L为愈伤组织诱导的最佳配方,能诱导出较多较好的愈伤组织,愈伤组织分化阶段采用MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L或MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L均可,可以较早且较多地分化出不定芽,为进一步增殖扩繁培养奠定了基础。综合本试验结果,可得出欧李茎尖离体培养的培养方案:选用带芽茎段经过消毒后,切割芽转入J3:MS+KT 0.6 mg/L愈伤组织诱导培养基上,诱导出愈伤组织后,将愈伤组织切成0.3~0.5

cm小块转入Y2:MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L或Y4:MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L的分化培养基上,待分化出大量不定芽时,以这些不定芽作为中间繁殖体,再进一步扩繁、生根,进而形成再生植株。由于本试验仅针对欧李的诱导阶段进行研究,得出的仅为愈伤组织诱导及分化不定芽的方案,关于不定芽的扩繁过程及生根阶段的具体培养方案还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 任宪威. 树木学[M]. 北京:中国林业出版社,2006:334.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第72卷)[M]. 北京:科学技术出版社,1988:66-68.
- [3] 刘淑琴,常虹,周家华,等. 我国欧李的开发应用研究现状[J]. 食品研究与开发,2009(12):167-170.
- [4] 张鸿斌. 欧李的栽培与利用[J]. 内蒙古林业调查设计,2013(1):72-73.
- [5] 谢志亮,吴振旺. 木本植物组培褐化研究进展[J]. 中国南方果树,2013(5):42-46.
- [6] 郭劲鹏. 欧李组织培养快繁技术[J]. 中国林福特产,2012(5):83-84.
- [7] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1996:45.
- [8] 崔德才,徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社,2003:5.

(责任编辑:王昱)

(上接第83页)

- [8] 王节之,王根全,郝晓芬,等. 除草剂莠去津对谷子及谷田杂草的影响[J]. 山西农业科学,2008,36(9):57-59.
- [9] 王鑫,原向阳,郭平毅,等. 单嘧磺隆对谷子营养价值的影响[J]. 安徽农业科学,2006,34(3):516,518.
- [10] 郭青海,王宏富,赵晓玲,等. 扑草净不同处理对谷子幼苗过氧化物酶活力及同工酶的影响[J]. 山西农业科学,2009,37(7):11-13.
- [11] 张盼盼,王君杰,陈凌,等. 不同除草剂对糜子田杂草的防除效果[J]. 西北农业学报,2013,22(10):208-212.
- [12] 李亚卿,高丁石,陈红旗,等. 旱田杂草及其化学防除[M]. 北京:中国农业出版社,1999:22-25.
- [13] 赵禹凯,王显瑞,张立媛,等. 谷子产量与主要农艺性状的灰色关联度分析[J]. 吉林农业科学,2014,39(2):9-12.

(责任编辑:王昱)