

甜樱桃砧木吉塞拉 (Gisela) 叶片再生体系研究

黄文江^{1,2} 刘庆忠^{1*} 樊圣华¹ 赵红军¹ 马锋旺²

(¹ 山东省果树研究所, 泰安 271000; ² 西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100)

摘要: 以甜樱桃矮化砧木 ‘Gisela 5’ 和 ‘Gisela 6’ 的组培苗为试材, 研究建立叶片的离体再生体系。结果表明, Gisela 6 的再生能力高于 Gisela 5; 叶片正面接触培养基比背面接触培养基更有利于分化再生。用新梢顶端 1~3 节新展开的叶片制备外植体, 分别接种在 WPM + BA 7 mg/L + IBA 0.3 mg/L 和 WPM + BA 5 mg/L + IBA 0.5 mg/L 的培养基上, 黑暗处理 15 d, Gisela 5 的最高分化频率为 75.1%, Gisela 6 为 100%。再生芽苗在三角瓶中生根容易, 移入大田后生长正常。

关键词: 樱桃; 砧木; 矮化; 离体叶片; 再生体系; 组织培养

中图分类号: S 663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0221-03

Studies on System of Plant Regeneration from Leaf Explant of Cherry Rootstocks

Huang Wenjiang^{1,2}, Liu Qingzhong^{1*}, Fan Shenghua¹, Zhao Hongjun¹, and Ma Fengwang²

(¹ Shandong Institute of Pomology, Tai'an 271000, China; ² College of Horticulture, Northwestern Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: An efficient and simple method for shoots regeneration from in vitro leaves of ‘Gisela 5’ and ‘Gisela 6’ (*Prunus cerasus* × *P. canescens*) was developed. Factors influencing in vitro leaf regeneration were studied. The ability to regenerate shoot from in vitro leaves of ‘Gisela 6’ was much greater than that of ‘Gisela 5’; Optimal results were obtained by culturing leaves adaxial side down on WPM medium containing BA 5 mg/L + IBA 0.5 mg/L and BA 7 mg/L + IBA 0.3 mg/L respectively in the dark for 15 days. Shoot regeneration rate of ‘Gisela 6’ reached up to 100% and that of ‘Gisela 5’ was 75.1%. The regeneration shoot was easy to rooting and to transplant to the field.

Key words: Cherry; Rootstock; Dwarf; In vitro leaf; Regeneration; Tissue culture

1 目的、材料与方法

樱桃的离体再生较困难, 仅有个别品种能获得离体再生植株^[1~8]。本研究以甜樱桃矮化砧木 ‘Gisela 5’ 和 ‘Gisela 6’ 为试材, 研究了影响离体叶片再生的因素, 建立了完整的离体叶片再生体系。按刘庆忠等^[9]的方法建立 Gisela 无菌微繁体系。取生根试管苗顶端叶片制备外植体, 去掉叶柄后沿与中脉垂直的方向横切 3 刀, 分别按正面和背面接种在培养基上。离体再生培养基为 WPM 添加不同浓度的 BA 和 IBA, pH 5.6。培养环境的光照强度为 1500 lx, 光照 16 h/d, 温度 (25 ± 2) °C。

2 结果与分析

2.1 不定芽的发生动态

接种后 10 d, 叶片明显增大, 卷曲呈筒状。叶片基部叶柄切口处产生少量愈伤组织; 15 d 时叶片中脉及中脉附近的切口上形成绿色的瘤状愈伤组织, 其结构密实, 生长缓慢; 叶片的正面和背面接触培养基的形态变化无明显差异。接种后 4 周左右, 从愈伤组织中分化出绿色小芽 (图版, 1), 以后

收稿日期: 2003-06-30; 修回日期: 2003-08-12

基金项目: 山东省科技厅科技攻关项目 (991010306); 山东省农业良种产业化工程项目 (2000-3009)

* 通讯作者 Corresponding author

不定芽发生频率迅速上升, 平均再生不定芽数也迅速增加形成簇生芽, 8 周后个别处理的叶片再生率达 70% 以上, 平均再生不定芽数最高可达 30 个 (图版, 2)。

2.2 激素比对叶片再生的影响

试验结果表明, BA 是 Gisela 叶片再生所必需的, 不添加 BA 的培养基上叶片不能分化不定芽。BA 与生长素 (IAA 或 NAA) 配比显著提高了 Gisela 叶片的再生频率 (图 1)。在最适 BA 浓度时添加 IBA 使 Gisela 5 和 Gisela 6 的再生频率分别从 28.3% 和 37.1% 增至 75.1% 和 100%。图 1 也表明: IBA 和 NAA 对诱导 Gisela 离体叶片再生效果不同: 低浓度 (<0.3 mg/L) 时 NAA 的诱导活性较强, 而高浓度 (>0.5 mg/L) 时 IBA 的诱导活性强于 NAA。总的看来, IBA 更能促进 Gisela 系的离体叶片再生, IBA 可使 Gisela 6 的叶片再生频率高达 100%, 而 NAA 只有 83.3%。不同基因型所需适宜的植物生长调节剂配比有明显差异。Gisela 5 在 WPM + BA 7 mg/L + IBA 0.3 mg/L 的培养基上再生频率最高为 71.9%; 而 Gisela 6 则是在 WPM + BA 5 mg/L + IBA 0.5 mg/L 的培养基上再生频率最高为 100%。外植体平均再生不定芽数也随激素配比而变化, 再生频率低者, 外植体平均再生芽数也较低。

2.3 黑暗处理对离体叶片再生的影响

离体叶片接种后置黑暗处是叶片再生的关键。从表 1 可以看出, 接种后不经黑暗处理而直接在光下培养, 叶片的再生频率显著降低。Gisela 5 和 Gisela 6 的再生频率分别降至 21.3%、50.3%, 与最高的再生频率相比, 降低了近 50 个百分点。黑暗处理 15 d, 叶片的再生频率达到最高。

2.4 叶片放置方式对叶片再生的影响

叶片的正面接触培养基, Gisela 5 的离体叶片再生频率为 71.1%, Gisela 6 为 100%。而叶片背面接触培养基接种时二者的再生频率分别为 53.8% 和 63.1%, 可见再生频率有明显差异。接种方式对外植体分化不定芽数量的影响较小, 都有随再生频率升高而分化芽数增多的趋势。

2.5 叶龄对 Gisela 再生的影响

表 2 的结果表明, 外植体的叶龄极显著影响再生频率。完全展开的老叶外植体再生频率不到 30%, 而新梢顶端 1~3 节新展开的嫩叶外植体, Gisela 5 的再生率为 70.3%, Gisela 6 为 100%。未展开的幼叶介于二者之间 (表 2)。

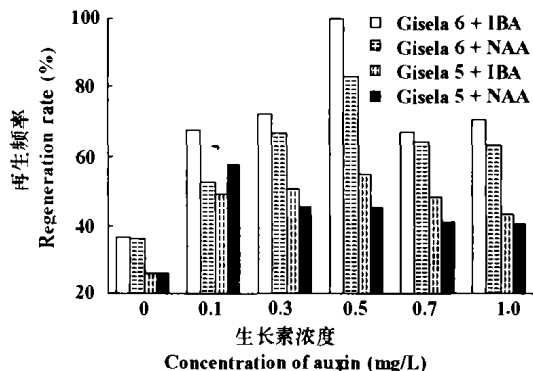


图 1 生长素对 Gisela 叶片再生频率的影响

Fig. 1 Effect of auxin on the regeneration rate from leaves of Gisela

表 1 黑暗时间处理对 Gisela 叶片离体再生的影响

Table 1 Effect of time in dark on the regeneration of adventitious shoot from leaves of Gisela

黑暗处理时间 Time in dark (d)	外植体数 No. of explant	Gisela 5		Gisela 6	
		再生频率 Regeneration rate (%)	平均再生不定芽数 Mean number of shoots per regenerating explant	再生频率 Regeneration rate (%)	平均再生不定芽数 Mean number of shoots per regenerating explant
0	48	21.3	1.4	50.3	3.6
10	48	64.7	4.7	73.9	4.8
15	48	75.1	4.5	100	6.5
20	49	69.4	5.9	100	5.7

表 2 叶龄对叶片再生的影响

Table 2 Effect of leaf age on the regeneration from in vitro leaves of Gisela

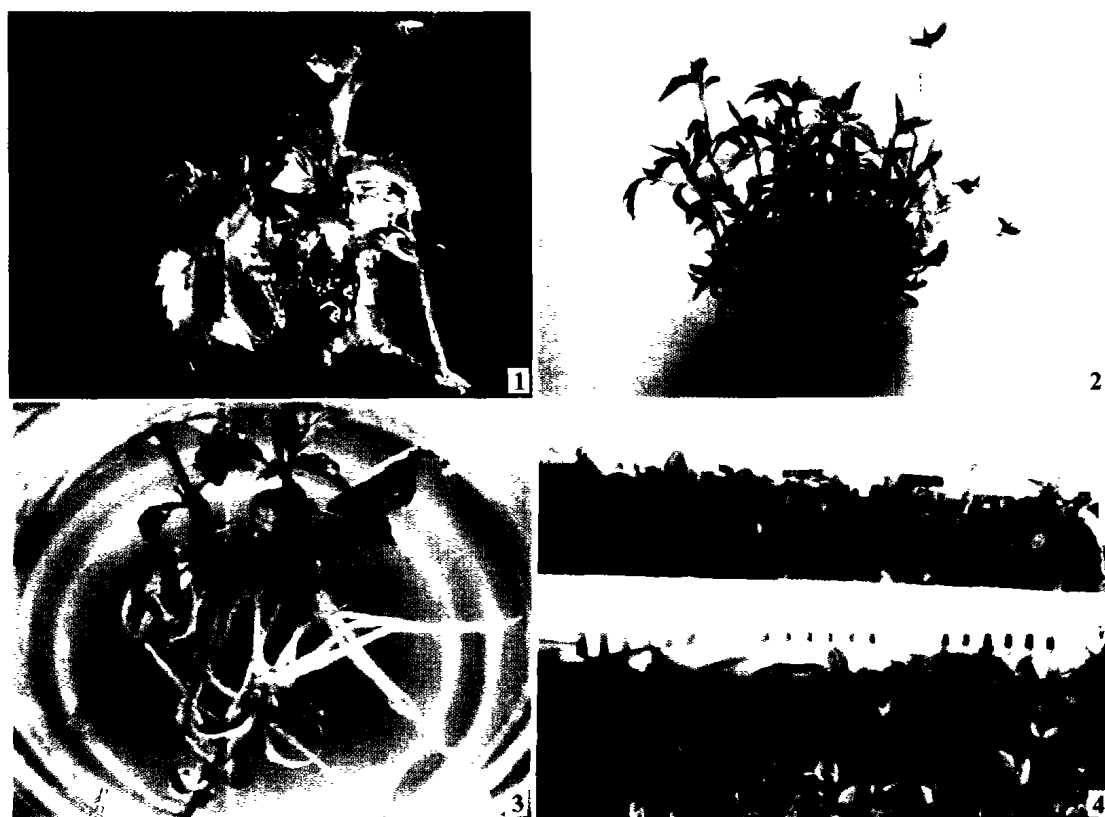
品种 Cultivars	培养基 Media (mg/L)	未展开叶 Fold leaves		新展开叶 Young expanding leaves		完全展开叶 Fully expanded leaves	
		再生频率 Regeneration rate (%)	平均再生不定芽数 Mean number of shoots per regenerating explant	再生频率 Regeneration rate (%)	平均再生不定芽数 Mean number of shoots per regenerating explant	再生频率 Regeneration rate (%)	平均再生不定芽数 Mean number of shoots per regenerating explant
Gisela 5	WPM + BA 7 + IBA 0.3	30.1	1.8	70.3	5.4	10.1	1.1
Gisela 6	WPM + BA 5 + IBA 0.5	54.1	2.4	100	6.1	23.3	1.6

2.6 试管苗生根及移栽

由叶片分化得到的不定梢,在增殖培养基上培养 3 周,剪取苗高约大于 1 cm 以上新梢接种在 $1/2$ MS + IBA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的生根培养基上,先进行 10 d 黑暗培养,然后转移到光下培养 3~4 周后,不定梢能形成良好的根系 (图版,3),生根率达 90%。Gisela 5 和 Gisela 6 在同一生根培养基上生根状况无明显差异。试管苗长出 2~3 条根后,及时开瓶炼苗并移栽到基质 (蛭石) 中,4~5 d 后小植株开始长出新叶,然后露天锻炼 3~10 d,再移栽于温室 (图版,4),成活率达 94.8%。

参考文献:

- 1 Mante S, Scorza R, Cordts J J. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1989, 19: 1~11
- 2 Lane W D, Cossio F. Adventitious shoot from cotyledons of immature cherry and apricot embryo. *Canadian Journal of Plant Science*, 1986, 66: 953~959
- 3 James D J, Mackenzie K A, Malhotra S B. The induction of hexaploidy in cherry rootstocks using in vitro regeneration techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 1987, 73: 589~594
- 4 Jones O P, Gayner J A, Watkins R. Plant regeneration from callus tissue cultures of the cherry rootstock colt (*Prunus avium* × *Prunus pseudocerasus*) and the apple rootstock M₂₅ (*Malus pumila*). *Journal of Horticultural Science*, 1984, 59: 463~467
- 5 方宏筠,王关林,王火旭. 抗菌肽基因转化樱桃矮化砧木获得抗根癌病的植株. *植物学报*, 1999, 11: 1192~1198
- 6 代红艳,张志宏,吴禄平,等. 甜樱桃茎尖培养及 PNRSV 的 RT-PCR 检测. *园艺学报*, 2003, 30 (1): 87~89
- 7 王关林,夏秀英,钟文田,等. 樱桃砧木叶片再生系统建立及抗菌肽基因转化. *园艺学报*, 2003, 30 (2): 209~211
- 8 陈君帆,李 青,孙 钊. 中国樱桃半野生种对樱的茎尖培养. *园艺学报*, 2003, 30 (3): 317~318
- 9 刘庆忠,赵红军. 大樱桃矮化砧木吉塞拉 (Gisela) 的微体繁殖. *植物生理学通讯*, 2001, 37 (3): 236~237



图版说明: 1. Gisela 叶片光培养 15 d, 形成绿色小芽; 2. WPM 添加 BA 5 mg/L + IBA 0.5 mg/L 培养基上 Gisela 6 分化形成簇生芽; 3. 再生小苗诱导不定根; 4. 再生植株移栽于温室。

Explanation of plates: 1. In vitro leaves of Gisela exposure under light for 15 days, shoot formation on excised leaves; 2. Leaf segment of Gisela 6 cultured on medium with BA 5 mg/L + IBA 0.5 mg/L differentiated shoot multiplication; 3. Induce of roots of Gisela shoots; 4. Regenerated plants were transplanted into the greenhouse.