

# 欧洲甜樱桃幼胚子叶离体培养再生植株研究

李明\*, 赵改荣, 韩礼星, 黄贞光, 齐秀娟, 李玉红

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

**摘要:** 以欧洲甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 幼胚子叶为试材, 研究不同品种、不同子叶发育时期、6-BA和 NAA 配比和培养条件等对其离体再生不定芽的影响。结果表明, 以 MS 为基本培养基, 附加 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 用 PF (子叶的长度/胚的长度  $\times 100$ ) = 50 ~ 80 发育阶段的子叶, ‘那翁’品种幼胚子叶再生不定芽效果最好, 再生率最高可达 79.2%。暗培养 2 周后再转入光照下培养, 对子叶再生不定芽具有一定的促进作用。‘雷尼尔’品种子叶再生率为 72.2%, ‘先锋’为 61.1%, ‘拉宾斯’为 33.3%。子叶再生不定芽全部发生于子叶正面近胚芽端切口处, 表现出明显的极性效应。

**关键词:** 樱桃; 欧洲甜樱桃; 子叶; 再生; 不定芽

中图分类号: S 662.5 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 01-0099-04

## Adventitious Shoot Regeneration in Vitro from Immature Cotyledon of the Sweet Cherry

LI Ming\*, ZHAO Gai-rong, HAN Li-xing, HUANG Zhen-guang, QI Xiu-juan, and LI Yu-hong

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China)

**Abstract:** The aim of this experiment was to examine the effects of the different development stage of cotyledon, 6-BA and NAA concentration, cultivar and culture condition on adventitious shoot regeneration from the immature cotyledon explants of the sweet cherry (*Prunus avium* L.). The results showed that MS culture medium with 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  was the optimal for the adventitious shoot regeneration in the cultivar ‘Napoleon’ and the optimal size of the immature cotyledon was PF (cotyledon length/embryo length  $\times 100$ ) = 50 - 80 and the regeneration rate reached to 79.2%. Dark culture for 2 weeks prior to light culture was helpful to adventitious shoot regeneration. Shoot regeneration rate also reached to 72.2% in ‘Rainier’, 61.1% in ‘Van’ and 33.3% in ‘Lapins’. Adventitious shoots were mainly regenerated at proximal cutting region of cotyledon adaxial surface.

**Key words:** cherry; sweet cherry; immature cotyledon; regeneration; adventitious shoot

欧洲甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 常规杂交育种困难, 一是结实率低, 得到杂交种子比较困难, 二是杂交种子自然播种出苗率低, 得到实生苗困难。因此, 利用子叶离体培养获得高效再生体系, 将有助于育种工作的有效开展。Lane 和 Cossio (1986) 利用甜樱桃栽培品种 ‘先锋’ 幼胚子叶离体培养获得了再生植株, 认为培养基中添加生长素对子叶诱导再生植株起抑制作用。在欧洲甜樱桃其他品种中, 如 ‘伯兰特’、‘雷妮娜’ 和 ‘萨姆’ 等, 利用子叶离体培养也获得一些再生植株 (Schmidt & Ketzel, 1996)。另外利用欧洲甜樱桃贮藏的成熟胚子叶为试材通过离体培养获得再生植株, 但不同品种间再生能力差异很大 (Canli & Tian, 2008)。目前很多影响再生的关键因素还不十分清楚。因此, 本试验中以欧洲甜樱桃栽培品种的幼胚子叶为试材, 从不同子叶发育期、6-BA 和 NAA 配比、品种基

收稿日期: 2008 - 08 - 18; 修回日期: 2008 - 10 - 14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571282)

\* E-mail: limingzhengzhou@hotmail.com

因型和培养条件等方面对影响幼胚子叶离体高效再生不定芽的关键因素进行研究。

## 1 材料与方法

试验于 2005 和 2006 年在中国农业科学院郑州果树研究所进行, 材料取自本所樱桃资源圃。清晨从田间取欧洲甜樱桃 ‘那翁’ 品种自然授粉不同发育时期的果实, 用自来水冲洗干净, 剖取果核, 取出种胚。在超净台上用 1% 次氯酸钠溶液对种胚浸泡消毒 15 min, 然后用无菌水清洗 4~5 遍, 剥去种皮取出两片子叶, 将子叶顶端胚芽切除, 另一端切去 1/2, 子叶外植体背面朝下放入再生培养基中。对 ‘雷尼尔’、‘先锋’ 和 ‘拉宾斯’ 品种在果实转色前的黄白期进行取材。

再生培养基用 MS 培养基, 添加不同浓度配比的 6-BA 和 NAA (表 1), 蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 琼脂  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 水解乳蛋白  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 5.6。在 90 mm 培养皿中装入 33 mL 培养基, 每皿放入 12 片子叶, 重复 3~4 次。暗培养 2 周后移入光照下培养, 光照时间为  $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 培养温度  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , 光照强度  $2\,000 \sim 2\,500 \text{ lx}$ 。3 周后继代更新再生培养基 1 次。诱导培养 8 周后调查统计子叶的再生率 (出芽子叶数/接种子叶数  $\times 100$ )。统计数据用 DPS 软件进行分析。

将再生不定芽切下转入继代增殖培养基 MS+6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + ZT  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每 4 周继代更新 1 次。将生长健壮的试管苗转入生根培养基 1/2MS (大量元素减半) + NAA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $100 \sim 200 \text{ lx}$  弱光下培养 10 d 后转入光照培养, 条件同前。试管苗生根后移栽到温室营养钵中长成植株。

## 2 结果与分析

### 2.1 不定芽的发生

接种后 14 d, 子叶明显膨大, 部分子叶的正面 (近轴面, adaxial surface) 近胚芽端切口处出现肉眼可见的不定芽雏形。转入光照培养条件下子叶很快转绿。接种后 5 周左右子叶近胚芽端切口处不定芽开始明显增多, 并陆续发育成小植株。7 周后子叶再生率达到最高。子叶再生的不定芽全部发生于近胚芽端 (近基端, proximal region) 切口处, 而另一端则没有; 同时, 在近胚芽端切口处也是发生在子叶的正面, 背面 (远轴面, abaxial surface) 则没有, 表现出明显的极性效应。

### 2.2 6-BA、NAA 浓度对欧洲甜樱桃子叶诱导再生不定芽的影响

试验结果 (表 1) 表明, 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时子叶再生不定芽效果最好, 再生率可达 79.2%。而高浓度 6-BA ( $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 则几乎完全抑制了不定芽再生, 再生率不到 10%。

表 1 6-BA、NAA 浓度对欧洲甜樱桃品种 ‘那翁’ 花后 31、39 和 46 d 的子叶诱导再生不定芽的影响

Table 1 Effect of the hormone 6-BA and NAA concentration on adventitious shoot regeneration from the immature cotyledon explants in 31, 39 and 46 days after full bloom of the sweet cherry cultivar ‘Napoleon’

花后天数 / d Days after full bloom	浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Concentration		接种数 Number of explants	发芽子叶数 Number of explants with shoots	再生率 / % Regeneration rate
31	6-BA	NAA			
	1.0	0.2	48	6	12.5 fg
	2.0	0.2	48	18	37.5 cd
	4.0	0.2	48	16	33.3 de
39	6.0	0.2	48	2	4.2 g
	1.0	0.2	48	30	62.5 b
	2.0	0.2	48	38	79.2 a
	4.0	0.2	48	30	62.5 b
46	6.0	0.2	48	2	4.2 g
	1.0	0.2	48	16	33.3 de
	2.0	0.2	48	24	50.0 bc
	4.0	0.2	48	10	20.8 ef
	6.0	0.2	48	4	8.3 fg

注: SSR 测验, 不同字母表示  $P \leq 0.05$  显著性差异。下同。

Note: SSR test, different letters indicate significant difference at  $P \leq 0.05$  level. The same below.

### 2.3 子叶不同发育期对欧洲甜樱桃子叶诱导再生不定芽的影响

子叶再生能力以花后 39 d 子叶发育 PF (子叶的长度/胚的长度  $\times 100$ ) = 50 ~ 80 时最强, 再生率最高可达 79.2% (表 1), 此时果实外观上处在转色前的黄白期 (图 1)。花后 31 d 子叶发育太嫩 (PF = 20 ~ 40, 果实外观绿色还未转白), 最高再生率仅为 37.5%, 花后 46 d 子叶发育太老 (PF = 90 ~ 100, 果实外观已开始着色), 再生率为 50.0%。

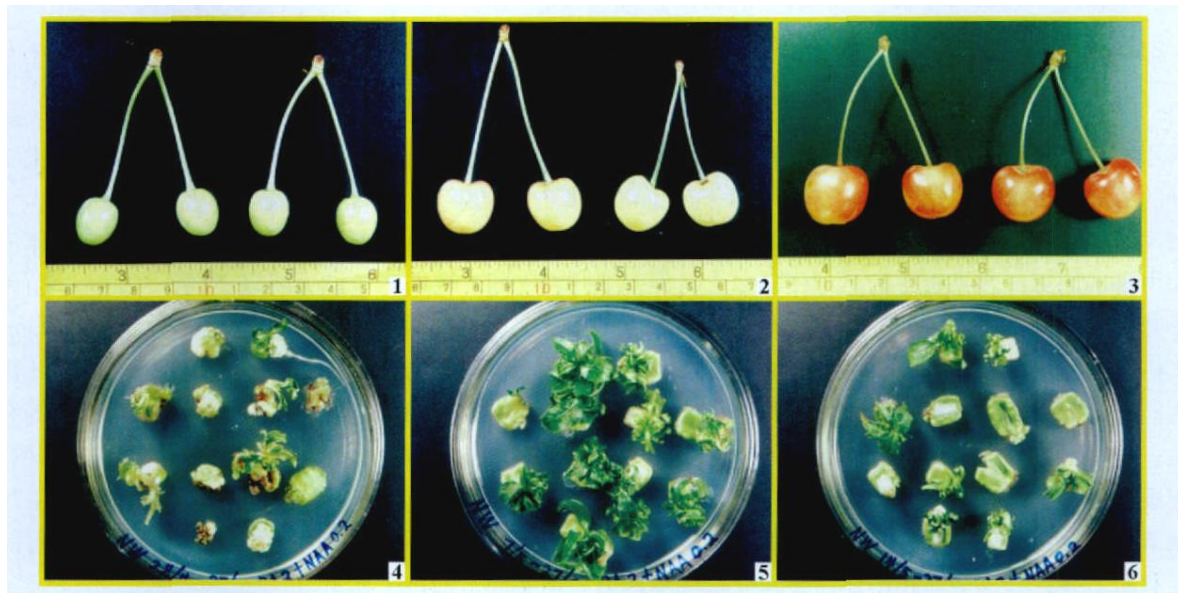


图 1 欧洲甜樱桃 ‘那翁’ 品种不同发育时期果实外观和子叶再生不定芽情况

1、4: 花后 31 d; 2、5: 花后 39 d; 3、6: 花后 46 d。培养基: MS+6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  +NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

图 1 Fruits and adventitious shoot regeneration from the immature cotyledon explants of the sweet cherry cultivar ‘Napoleon’

1, 4: 31 days after full bloom; 2, 5: 39 days after full bloom; 3, 6: 46 days after full bloom.

Medium: MS+6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  +NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### 2.4 前期暗培养对欧洲甜樱桃子叶诱导再生不定芽的影响

据报道, 莱阳矮樱桃成熟胚子叶离体诱导再生不定芽, 前期暗培养有抑制作用 (孙清荣 等, 2000)。樱桃砧木 CAB-6P 叶片离体诱导再生不定芽, 全光照是获得高效再生的关键技术之一 (杨海峰, 2001)。本研究表明, ‘那翁’ 品种前期暗培养 2 周后再转入光照下培养明显促进子叶再生不定芽, 再生率 79.2%, 而始终光照培养的再生率仅有 58.3% (表 2)。

### 2.5 欧洲甜樱桃品种子叶诱导再生不定芽情况

不同品种之间, 子叶再生不定芽能力有所差异 (表 3)。在 MS+6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  +NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上, PF = 70 ~ 90 的子叶 (果实处在转色前的黄白期) 不定芽诱导再生率, ‘雷尼尔’ 为 72.2%, ‘先锋’ 为 61.1%, ‘拉宾斯’ 为 33.3%。

表 2 前期暗培养对欧洲甜樱桃 ‘那翁’ 品种子叶诱导再生不定芽的影响

Table 2 Effect of dark culture on adventitious shoot regeneration from the immature cotyledon explants of the sweet cherry cultivar ‘Napoleon’

暗培养 时间/d	接种数 Number of explants	发芽子叶数 Number of explants with shoot	再生率/% Regeneration rate
Dark culture			
14	48	38	79.2 a
0	52	28	58.3 b

表 3 欧洲甜樱桃不同品种子叶诱导再生不定芽情况

Table 3 Adventitious shoot regeneration from the immature cotyledon explants of the different sweet cherry cultivars

品种 Cultivar	接种数 Number of explants	发芽子叶数 Number of explants with shoot	再生率/% Regeneration rate
雷尼尔 Rainier	36	26	72.2 a
先锋 Van	36	22	61.1 a
拉宾斯 Lapins	36	12	33.3 b

## 2.6 欧洲甜樱桃子叶诱导再生不定芽的增殖、生根和成苗

诱导培养 2 个月后, 将再生不定芽切下转入  $MS + 6-BA\ 1.0\ mg \cdot L^{-1} + ZT\ 0.2\ mg \cdot L^{-1}$  继代增殖培养基, 绝大部分不定芽能够增殖并逐渐长大成植株。将生长健壮的试管苗转入  $1/2MS + NAA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$  生根培养基, 前期暗培养 10 d 后转入光照培养, 2~3 周后试管苗生根, 生根率在 95% 以上, 每株生根 4 条以上。转入温室炼苗 1 周后, 移栽到营养钵中长成植株, 移栽成活率 90% 左右。

## 3 讨论

欧洲甜樱桃的杂交育种中, 由于结实率低及播种出苗率低, 限制了杂交育种工作的有效开展。而利用子叶离体培养获得再生植株, 则为获取大量杂交苗提供了一条新的技术途径。许多欧洲甜樱桃品种的子叶再生率可以达 50% 以上, 每片子叶可再生多个不定芽, 可以满足杂交育种工作的需要。

影响欧洲甜樱桃子叶离体高效再生的因素很多。首先, 不同品种子叶再生能力有高有低, 具体工作中可选用那些容易再生的品种作母本。另外, 子叶在不同发育期再生能力明显不同, ‘那翁’ 品种子叶发育  $PF = 50 \sim 80$  时最强。但也有研究发现, ‘先锋’ 品种子叶在  $PF = 50$  时再生能力最强 (Lane & Cossio, 1986)。而 Schmidt 和 Ketzel (1996) 研究认为, 甜樱桃品种的种子发育程度越大, 子叶再生能力越强。结论差异的原因可能与选用的品种、地域或物候不同以及植物生长调节剂配比不同等有关。即使对同一樱桃品种, 同一实验室在不同年份所得出的数据也有很大差异, 以 ‘雷侏娜’ 为例, 连续 3 年的子叶再生率分别为 50%、90% 和 12% (Schmidt & Ketzel, 1996)。筛选到适宜的植物生长调节剂配比也是获得子叶离体高效的关键技术之一, 但由于地域不同或个人操作等方面原因, 也可能会有所差异, 在实际应用中还需要建立适应本地域和本实验室的再生体系。

本项研究目前只是得出部分结论, 今后还需要选用更多的品种, 扩大评价范围; 扩大筛选植物生长调节剂配比的范围和优化培养条件, 许多品种再生能力低可能主要是还未筛选到适宜的植物生长调节剂配比和培养条件; 需获得多年的数据, 以减少不同年份数据波动可能造成的干扰。

## References

- Canli F A, Tian L. 2008. *In vitro* shoot regeneration from stored mature cotyledons of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 116: 34 - 40.
- Lane W D, Cossio F. 1986. Adventitious shoots from cotyledons of immature cherry and apricot embryos. *Canadian Journal of Plant Science*, 66: 953 - 959.
- Schmidt H, Ketzel A. 1996. *In vitro* culture techniques in sweet cherry breeding. *Acta Horticulturae*, 410: 111 - 114.
- Sun Qing-rong, Sun Hong-yan, Shi Yin-ping, Yang Jian-ming. 2000. Study of inducing shoot regeneration from matured cotyledons of Laiyang dwarf cherry. *Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science*, 31 (3): 291 - 293. (in Chinese)
- 孙清荣, 孙洪雁, 石荫坪, 杨建明. 2000. 莱阳矮樱桃成熟胚子叶不定梢诱导研究. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 31 (3): 291 - 293.
- Yang Hai-feng. 2001. Studies on the ways of regeneration from leaves pieces *in vitro* of *Prunus cerasus* [M. D. Dissertation]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University. (in Chinese)
- 杨海峰. 2001. 酸樱桃叶片离体再生方法的研究 [硕士论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学.