

蔷薇科果树组织培养研究进展

吴静妍, 葛新新*, 李海英, 窦树军 (吉林省农业科学院, 吉林长春 130033)

摘要 蔷薇科果树种类繁多, 是果品生产中的极佳选择。组织培养技术有利于果树的种苗繁育、培育新品种及缩短育种时间, 从而成为蔷薇科果树快速繁育的有效途径。从影响组织培养成败的几个重要因素(外植体的取材部位及时期、灭菌时间的控制、培养基及植物激素的选择), 归纳了蔷薇科果树组织培养技术的研究进展, 以为蔷薇科果树的组培快繁体系建立提供参考。

关键词 蔷薇科果树; 组织培养; 研究进展

中图分类号 S628 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)21-0010-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.21.003



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress on Tissue Culture of Rosaceae Fruit Trees

WU Jing-yan, GE Xin-xin, LI Hai-ying et al (Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033)

Abstract There are many varieties of Rosaceae fruit trees, which is an excellent choice for fruit production. Tissue culture technology is conducive to breeding fruit trees seedlings, cultivating new varieties and shortening the breeding time, thus becoming an effective way for the rapid propagation of Rosaceae fruit trees. This paper summarized the research progress of tissue culture techniques of Rosaceae fruit trees from several important factors affecting the success of tissue culture (the location and period of explants, the control of sterilization time, the selection of culture medium and plant hormones), in order to provide reference for the establishment of tissue culture and rapid propagation system of Rosaceae fruit trees.

Key words Rosaceae fruit trees; Tissue culture; Research progress

蔷薇科果树种类繁多、适应性强, 是果品生产中的极佳选择。随着市场需求的加大, 加快选育品质优良的果树品种及提高种苗繁育效率成为当务之急。传统的果树育种方法包括引种、实生选种、杂交育种、辐射诱变和芽变等, 但果树的生长周期长、杂合度高、自交不亲和等问题, 传统的育种方法存在一定局限性。

植物组织培养是一种无性繁殖方式, 是指在无菌条件下, 将离体的植物器官、组织、胚胎、细胞及原生质体在人工配制的培养基上给予一定的条件进行培养, 使其潜伏芽萌发或诱导愈伤组织形成, 最终获得完整植株^[1]。利用植物组织培养技术, 可生产大量的优良无性系, 有利于果树种苗繁育; 还可以通过细胞融合克服远缘不亲和性障碍, 有利于果树新品种的培育; 另外, 还可获得单倍体、二倍体、纯合二倍体和其他多倍体, 有利于缩短育种时间^[2-4]。近年来, 国内外已有一些果树组织培养相关的研究报道^[5-10], 但缺乏系统的比较和总结。笔者从影响组织培养成败的几个重要因素(外植体的取材部位及时期、灭菌时间的控制、培养基及植物激素的选择)归纳了近年来蔷薇科常见果树组织培养技术的研究进展, 以为蔷薇科果树的组培快繁体系建立提供参考。

1 外植体

在植物组织培养中, 离体培养的材料器官或组织片段称作外植体。幼芽、茎段是适合愈伤组织诱导的外植体材料。秦伟^[11]研究了新疆苹果以不同器官为外植体的愈伤组织诱导率, 其幼茎的诱导率高于叶、子叶, 而诱导根则无愈伤组织形成。韩沙沙等^[12]分别以油桃无菌苗的茎段、去皮茎段、幼芽及叶片进行愈伤组织诱导, 差异显著, 幼芽、茎段、去皮茎

段的诱导率分别为 65.8%、59.2%、50.0%, 而叶片诱导率仅为 27.5%。同时, 茎段也是适合诱导潜伏芽萌发的外植体材料, 王婷婷等^[13]以苹果接穗品种 SVM-05 扦插苗木茎段为外植体, 建立其组织培养体系。

组织培养的成功也受外植体取材时间的影响, 取材时间过早, 芽体刚开始萌动, 接种后生长缓慢, 取材时间过晚, 内部营养积累少且带菌多, 不利于灭菌处理且成活率低。对红花山楂茎段的诱导培养中发现, 3 月份取材为好, 而 6 月份取材所接种的外植体全部污染^[14]。对于杏扁品种“优一”, 5 月份为最佳取材时间, 3 月份取材接种后生长缓慢, 8—10 月份取材的外植体会出现严重褐化^[15]。另外, 外植体的长度也是影响成活率的一个因素, 山楂品种“蒙山红”以茎段为外植体时, 其长度以 1.2~1.5 cm 为宜^[16]。

2 灭菌

植物组织培养要求严格的无菌条件, 行之有效的灭菌方法有利于试管苗避免污染。针对外植体生长程度、表面带菌种类和内生菌等不同情况, 灭菌时应选择合适的消毒液种类。常用的灭菌剂有次氯酸钠、次氯酸钙、过氧化氢、升汞、抗生素和硝酸银等, 其中升汞被认为是目前消毒效果最好的。方庆等^[17]以桃茎段为外植体, 比较 75% 乙醇、升汞、次氯酸钠 3 种灭菌试剂的效果, 结果发现用 75% 乙醇浸泡后, 再用升汞处理的效果好于次氯酸钠, 0.15% 升汞灭菌 9 min 效果最好。但是, 升汞是一种剧毒试剂, 灭菌的同时对植物材料也有很强的伤害作用, 控制合适的灭菌时间极为重要, 一般升汞消毒时间在 4~9 min 为宜。刘小芳等^[18]以“库尔勒香梨”为试验材料研究 0.1% 升汞的浸泡灭菌时间, 结果发现灭菌 5 min 时成活率达 90%。江珊等^[19]进行了 0.1% 升汞灭菌处理时间梯度试验, 以桃“保佳俊”外植体为材料, 结果表明, 升汞灭菌 9 min 为最佳时间。冯莎莎等^[15]研究发现杏

作者简介 吴静妍(1991—), 女, 吉林公主岭人, 研究实习员, 硕士, 从事观赏果树育种研究。* 通信作者, 助理研究员, 硕士, 从事观赏果树栽培技术研究。

收稿日期 2020-04-28; **修回日期** 2020-06-18

扁品种“优一”的升汞灭菌最佳处理时间为 8 min, 污染率低且萌芽率最高。吴高殷等^[20]以山杏茎尖和当年生茎段为材料, 使用 75% 乙醇处理 30 s, 0.2% 升汞灭菌 6 min, 再用 2% NaClO 处理 4 min, 进行灭菌, 其诱导效果最佳。孔维龙等^[16]以山楂新品种“蒙山红”茎段为外植体, 经乙醇处理 30 s、升汞处理 4 min 时成活率达 100%, 污染率为 0。

贾海燕等^[21]在对欧李外植体消毒时, 在乙醇和升汞的处理中加入超声, 超声的空化作用使清洗和消毒更加彻底, 可有效降低污染率, 依此建立了“欧李快繁体系”。但是升汞的剧毒性, 不利于试验操作和废液处理。Araba 等^[22]对于 G×N15 (杏仁×桃) 杂交种的研究表明, NS (纳米银) 浸泡或添加到培养基中均可减少内部、外部污染, 且在培养基中添加 NS 的效果优于浸泡外植体。NS 溶液可以用作 G×N15 微繁殖的低风险杀菌剂, 未来可以作为升汞的合适替代品。

3 培养基

培养基是由不同营养物质配制而成的, 可以给微生物、植物或动物的生长繁殖提供营养的基质。目前, 在果树组织培养中常用的培养基有 MS、WPM、White、QL、B5 等。MS 培养基使用较为普遍, 其成分中钾、铵和硝酸盐的含量均较高; 相对于 MS 培养基, WPM 培养基用硫酸钾代替了硝酸钾, 硝酸铵的含量也变为 MS 培养基的 1/4; White 培养基中无机盐数量较低; WPS 培养基中钙离子含量高, 含有硝态氮, 无铵态氮和碘化钾; QL 培养基组分的主要差异是 NH_4^+ 含量和 NO_3^- 与 NH_4^+ 比例的不同; B5 培养基中铵含量较低, 而铵对不少植物材料的生长都有抑制作用。

蔷薇科果树初代培养基多选用 MS 或改良 MS 培养基效果较好, 如 MS 培养基为“金凯特”杏芽段、杏扁品种“优一”的外植体腋芽萌发的最佳培养基^[15, 23]。但不同树种间存在一定差异, 如以李品种“红美丽”的茎段为外植体, QL 培养基比 MS 培养基更利于腋芽萌发^[24]。

继代培养的培养基选择以 MS 培养基、QL 培养基、WPM 培养基为主。MS 适宜桃“保佳俊”组培苗的继代培养及欧洲李“红艳 1 号”茎段的增殖培养^[19, 25]。但苹果抗寒半矮化砧木“54-118”、矮化砧木“JM7”的试验结果均表明, 其试管苗虽然在 MS 培养基上增殖较好, 但 QL 培养基更有利于获得健壮生长的绿苗, 适合苹果砧木试管苗的继代培养^[26-27]。对于“金凯特”杏组织培养的研究发现 WPM 培养基更适合其芽段增殖快繁及新梢生长^[23]。孙浩元等^[28]建立了李杏砧木“St. JulienA”的无性繁殖技术体系, 发现 WPM 培养基对其外植体再生及芽增殖的影响好于其他类型的基本培养基。另外, 桃豫农矮化砧木 1 号叶片愈伤组织的继代培养需要添加 1.0 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基与 WPM 培养基交替使用^[29]。魏明杰等^[30]分别用 F14 培养基和 MS 培养基进行樱桃茎尖培养, F14 培养基处理条件下, 其增殖系数更高。赵剑波等^[31]以桃砧木 GF677 茎段为外植体, 在基本培养基 F14 上添加不同激素进行正交试验, 确立了桃砧木 GF677 的离体繁殖体系。

生根培养基多考虑降低无机盐浓度的 MS 培养基。1/2

MS 培养基利于李杏砧木“St. JulienA”的生根培养^[28], 1/4 MS 培养基对于光叶山楂的生根培养效果良好^[32]。生根培养基还可以通过分析植株器官、组织大量元素含量调配, 魏鹏等^[33]以“库尔勒香梨”茎叶为试验材料, 按照 Goncalves 提出的调配方法调配生根培养基中大量元素含量, 效果理想。

4 植物激素

基本培养基是保证外植体生存与生理活动的最基本物质, 而细胞分裂的启动、培养物的形态建成、芽的分化则离不开植物激素的诱导调节。试验证明, 当分裂素/生长素的比值较大时, 有利于诱导芽的形成; 当分裂素/生长素的比值较小时, 则有利于根的形成^[34]。常用的细胞分裂素有 CTK、KT、ZT、6-BA、BA、CPPU、TDZ 等, 生长素有 IAA、NAA、IBA 等。TDZ 被认为是木本植物组织培养中活性最强的类细胞分裂素物质, 4.5 $\mu\text{mol/L}$ TDZ 预培养可以增加供体枝条叶再生能力^[35]。

蔷薇科果树茎尖、茎段、芽的培养中常添加的激素有 6-BA、NAA、IBA。杨艳敏等^[36]研究发现 6-BA (1.5 mg/L 或 1.0 mg/L) 可提高 3 个苹果矮化品种外植体诱导率及促进试管苗增殖和生长。周春娜^[37]研究发现在巴旦杏的初始诱导和继代培养基中添加 6-BA、NAA, 效果良好; 冯莎莎等^[15]的试验也证明了 6-BA、NAA 协同作用有利于杏扁品种“优一”的茎芽增殖。宋健坤等^[38]认为梨砧木 OH×F51 茎尖离体培养的最佳培养基是 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA, 茎尖诱导成苗率最高。生根培养中, 单独使用低浓度的 IBA (0.2 mg/L) 时山杏生根率高^[20], 而杏扁品种“优一”生根率随着 IBA 浓度增加呈先增加后下降, 0.4 mg/L 为最适浓度^[15]。方明等^[39]研究了梨试管苗的两步生根法, 在 1/2 MS+0.2 mg/L IBA 上暗培养 7 d+光照培养 7 d 后, 在 IBA 0.2 mg/L 中蘸根 10 s (或 15 s), 再转移至仅含有 1/2 MS 培养基中培养, 4 种梨试管苗的生根率在 40%~90%。

愈伤组织诱导常添加的激素有 6-BA、2,4-D、NAA、TDZ。宋健坤等^[38]研究发现, 培养基 NN69+3.0 mg/L TDZ+1.0 mg/L IBA 梨砧木 OH×F51 叶片的出愈率达 98.33%。以油桃带芽茎段为外植体, 油桃愈伤组织的诱导率随 2,4-D 浓度的升高而升高, NAA、BA 影响不大^[40]。以桃豫农矮化砧木 1 号的叶片为外植体, 在 0~2 mg/L 时 2,4-D 浓度越高, 愈伤组织的诱导率也随之升高^[29]。吴高殷等^[20]研究了山杏茎尖愈伤组织的诱导, 结果表明当 6-BA 与 2,4-D 浓度低时诱导率高, 但是后期出现褐化现象。另外, NAA 可促进光叶山楂外植体的愈伤组织形成, CPPU 抑制其愈伤组织的形成但不抑制生长, 同时也证明了 CPPU 是一种非常有效的细胞分裂素^[32]。

5 其他因素

除以上主要因素与组织培养成功率有一定关系外, 光照条件、气态微环境也可产生影响。如黑暗条件能够促进愈伤组织的形成, “满园红”油桃果肉在黑暗条件下诱导出的愈伤组织呈松散状并生长良好^[40]。崔美等^[41]对以国光苹果和富士苹果的幼嫩叶片为外植体进行诱导培养, 发现暗培养 14 d

最有利于愈伤组织的形成。沙梨种子接种在培养基上暗培养7 d能促进种子萌发,苗健壮,叶片黄绿^[42]。柳金凤等^[43]研究了不同光质对红花山楂试管苗生长的影响,结果表明蓝光7:9光质条件下,最有利于红花山楂的分化、生根,且移栽后成活率最高。Cati等^[44]、Marino等^[45]研究杏组织培养中气态微环境的影响,不同类型的密封影响杏芽积累的乙烯和二氧化碳含量,进而影响增殖及生根。

6 讨论与展望

组织培养因其具有繁殖周期短、培养条件可以人为控制、可直接诱变和筛选出高抗优良品种等优点,已在苗木快繁、转基因、培养脱毒苗、花药培养、超低温种质保存等方面广泛应用。蔷薇科果树组织培养技术已发展多年并取得不少成就,但仍存在一些问题。污染、褐化、玻璃化等问题会直接影响组织培养的成败。因此,从外植体的选择、消毒时间的控制以及培养基、植物激素的选择,每一环节都至关重要。目前来看,果树组织培养多以茎段、茎尖、叶片为外植体,今后可以加大外植体的选择范围,同时进一步探索升汞的合适替代品,使植物组织培养安全、无污染。在解决污染、褐化、玻璃化等问题时,如何降低成本也是需要考虑的因素,高成本不利于商业化生产的发展。

今后应继续加大树种、品种的研究范围,为蔷薇科果树的育种和遗传转化打下坚实基础,蔷薇科果树的经济价值、生态价值及园林应用价值也得到更大程度的发挥。

参考文献

- [1] 陶阿丽,曹殿洁,华芳,等.植物组织培养技术研究进展[J].长江大学学报(自科版),2018,15(18):31-35.
- [2] 伊华林,邓秀新,付春华.胚抢救技术在果树上的应用[J].果树学报,2001,18(4):224-228.
- [3] RAMMING D W. The use of embryo culture in fruit breeding[J]. Hort-Science, 1990, 25(4):393-398.
- [4] 王玉柱,孙浩元,杨丽.核果类果树胚培养研究进展和育种成效[J].果树学报,2004,21(1):59-63.
- [5] 徐世彦,武凯翔,吴延军.樱桃组织培养及遗传转化研究进展[J].果树学报,2018,35(10):1277-1285.
- [6] 闫帅,徐锴,袁继存,等.梨组织培养及遗传转化研究进展[J].中国果树,2017(51):72-77.
- [7] 董晓民,刘伟,胡广波,等.桃组织培养及遗传转化研究进展[J].落叶果树,2017,49(4):17-19.
- [8] 冉昆,王宏伟,王少敏.梨组织培养与遗传转化研究进展[J].中国农学通报,2017,33(4):74-79.
- [9] 杨青,王光全,宋庆云.山楂组织培养研究进展[J].落叶果树,2016,48(1):19-22.
- [10] 赵恺,刘伟,刘忠巍,等.苹果组织培养研究概况[J].河北果树,2011(5):1-3.
- [11] 秦伟.新疆野苹果繁育特性及种质资源亲缘关系研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2010.
- [12] 韩少沙,张凌媛,何桥,等.油桃组织培养及再生材料的原生体制备研究[J].西南大学学报(自然科学版),2015,37(5):23-30.
- [13] 王婷婷,胡春宏,常苹,等.苹果接穗 SVM-015 的组织培养[J].贵州农业科学,2017,45(11):98-101.
- [14] 魏岩,金丽丽.红花山楂茎段诱导培养的研究[J].现代园艺,2016(7):28-29.
- [15] 冯莎莎,姚太梅,郑志新,等.杏扁品种“优一”组织培养再生体系建立的初步研究[J].河北北方学院学报(自然科学版),2018,34(5):41-46.

- [16] 孔维龙,王光全,孟庆杰,等.鲜食山楂新品种蒙山红组织培养初探[J].黑龙江农业科学,2014(8):28-31.
- [17] 方庆,熊明国,决超.桃组织培养外植体灭菌方法的筛选[J].中国园艺文摘,2015,31(7):36-37.
- [18] 刘小芳,冯建荣,梁晓桐,等.库尔勒香梨组织培养的研究[J].山东农业科学,2016,48(5):9-13.
- [19] 江珊,张玉,康同洋,等.桃新品系“保佳俊”茎尖培养再生体系建立的初步研究[J].河北林果研究,2017,32(Z1):250-254.
- [20] 吴高殷,田有亮,何炎红,等.山杏茎尖和茎段组织培养体系的建立[J].经济林研究,2017,35(2):151-156.
- [21] 贾海燕,孔德柱,张吉树,等.京欧1号、京欧2号欧李快繁技术[J].中国果树,2015(3):38-41.
- [22] ARABA M M, YADOLLAHI A, HOSSEINI-MAZINANI M, et al. Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of G×N15 (hybrid of almond×peach) rootstock[J]. Journal of genetic engineering and biotechnology, 2014, 12(2):103-110.
- [23] 孙清荣,王金政,薛晓敏,等.“金凯特”杏的组织培养与快繁[J].山东农业科学,2016,48(12):25-28.
- [24] 孙清荣,王金政,薛晓敏,等.极早熟李品种“红美丽”的组织培养与快速繁殖[J].安徽农业科学,2017,45(33):146-148.
- [25] 孙清荣,王金政,薛晓敏,等.欧洲李“红艳1号”的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学报,2015,51(7):1024-1028.
- [26] 孙清荣,关秋竹,孙洪雁,等.苹果抗寒半矮化砧木“54-118”的组织培养及其离体叶片不定梢再生[J].植物生理学报,2017,53(11):2007-2012.
- [27] 孙洪雁,孙清荣,李国田,等.苹果矮化砧木“JM7”的组织培养及其离体叶片不定梢再生[J].植物生理学报,2014,50(6):779-784.
- [28] 孙浩元,杨丽,张俊环,等.砧木“St. Julien A”组织培养快速繁殖技术[J].北方园艺,2018(21):80-84.
- [29] 方庆,熊明国.桃矮化砧木1号叶片愈伤组织的诱导及继代培养[J].中国园艺文摘,2016,32(12):27-29.
- [30] 魏明杰,姚振远,梅丹娜,等.樱桃组培快繁技术研究[J].落叶果树,2012,44(2):9-13.
- [31] 赵剑波,郭继英,姜全,等.桃抗重砧砧木 GF677 组培快繁技术[J].江苏农业科学,2016,44(5):60-61,68.
- [32] 武玉婷,石岭,张建中,等.光叶山楂高效再生体系的建立[J].安徽农业科学,2018,46(18):79-82.
- [33] 魏鹏,刘彤,张元杭.“库尔勒香梨”微繁生根培养基大量元素优化方法的比较[J].西北林学院学报,2014,29(4):127-131.
- [34] DOBRANSZKI J, MENDLER-DRIENYOVSKZI N. Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of *in vitro* apple leaves[J]. Journal of plant physiology, 2014, 171:1472-1478.
- [35] PODWYSZYŃSKA M, SOWIK I, MACHLAŃSKA A, et al. *In vitro* tetraploid induction of *Malus×domestica* Borkh. using leaf or shoot explants[J]. Scientia horticulturae, 2017, 226:379-388.
- [36] 杨艳敏,魏永祥,刘成,等.苹果矮化砧木组织培养及脱病毒技术[J].北方园艺,2016(4):107-112.
- [37] 周春娜.巴旦杏组织培养快速繁殖技术研究[J].河北果树,2012(4):3-4.
- [38] 宋健坤,黄曼娜,王然.梨砧木 OH×F51 的离体组织培养研究[J].北方园艺,2014(18):107-109.
- [39] 方明,欧春青,王斐,等.4种梨试管苗组织培养和生根体系的建立[J].中国南方果树,2019,48(5):74-78.
- [40] 潘海发,张金云,束冰,等.油桃果实愈伤组织诱导与继代培养研究[C]//中国园艺学会,中国农业科学院蔬菜花卉研究所.中国园艺学会2014年学术年会论文摘要集.北京:《园艺学报》编辑部,2014:1.
- [41] 崔美,焦其庆,陈学森,等.苹果叶片愈伤组织的诱导培养[J].山东农业科学,2012,44(3):17-20.
- [42] 涂俊凡,秦仲麒,李先明,等.沙梨种子组织培养技术研究[J].中国南方果树,2016,45(5):121-123.
- [43] 柳金凤,伍会萍,刘晓刚.不同光质对红花山楂试管苗生长的影响[J].中国农学通报,2012,28(25):162-166.
- [44] CATI M, GENNARI F, MARINO G. Effect of culture jar seal on *in vitro* rooting and subsequent acclimatization of three Italian apricot varieties[J]. Scientia horticulturae, 2014, 168:120-123.
- [45] MARINO G, NOFERINI M. Effect of the type of closure for culture bottles on micropropagation efficiency of apricot[J]. Scientia horticulturae, 2013, 161:306-313.