

乔纳金叶片培养胚状体发生体系的建立

臧运祥^{1,2} 郑伟尉^{1,3} 孙仲序¹ 达克东^{1*}

(¹ 山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018; ² 建国大学生命与环境科学学院,

韩国首尔特别市 143-701; ³ 安东国立大学生物资源学院, 韩国庆尚北道安山市 760-749)

摘要: 利用乔纳金无菌苗叶片培养, 成功地诱导出胚状体并获得再生植株。具体步骤如下: I. 在 MS + BA 2.0 mg · L⁻¹ + IAA 6.0 mg · L⁻¹ + 2,4-D 0.3 mg · L⁻¹ 培养基上预诱导 6d; II. 在 MS + BA 2.0 mg · L⁻¹ 培养基上胚性细胞发生胚状体; III. 在 MS + BA 0.5 mg · L⁻¹ + IAA 0.1 mg · L⁻¹ 上壮苗培养 20d; IV. 在 MS + IBA 0.8 mg · L⁻¹ + IAA 0.7 mg · L⁻¹ 培养基上小植株生根。

关键词: 乔纳金 组织培养 胚状体

Somatic Embryogenesis from in Vitro Leaves of Jonagold

Zang Yunxiang^{1,2} Zheng Weiwei^{1,3} Sun Zhongxu¹ Da Kedong^{1*}

(¹ College of Horticulture and engineering sciences, Shandong Agricultural University,

Tai'an 271018 China; ² College of Life and Environmental Sciences,

Konkuk University, Seoul 143-701, South Korea;

³ School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, South Korea)

Abstract: Somatic embryo formation was induced from leaves of Jonagold by a four-step-method: 1. Embryonic cells were preliminary induced on MS + BA 2.0mg/L + IAA 6.0mg/L + 2,4-D 0.3mg/L medium 6 days; 2. Somatic embryo formation was observed on MS + BA 2.0mg/L medium; 3. Regenerated buds grew strongly on MS + BA 0.5mg/L + IAA 0.1 mg/L for 20 days; 4. Roots were induced on MS + IBA 0.8 mg/L + IAA 0.7mg/L medium.

Key words: Jonagold (*Malus pumila* Mill.) Tissue culture Somatic embryo

乔纳金是一个重要的苹果三倍体栽培品种, 欧洲为主栽培品种, 它以个大、质优而深受人们的欢迎, 近几年在我国发展较快, 栽培面积也愈来愈大。国内已有学者以其叶片为试材建立了不定芽再生体系^[1], 并已获得转基因植株^[2], 但再生数量较少、转化效率也不高。本试验目的是建立稳定、高效的乔纳金叶片培养胚状体再生系统, 为苹果种质资源离体保存^[3]、多倍体育种^[4]及应用转基因技术定向改良苹果品种^[5]等研究奠定基础。

1 材料与方法

供试材料为山东农业大学园艺学院果树生物技术实验室提供的乔纳金无菌苗。胚状体诱导试验

中, 剪取继代生长 30d 左右的乔纳金无菌苗顶部前三片展开叶, 用无菌刀垂直于叶片中脉横切三刀, 然后接种于 MS 附加 BA、IAA 和 2,4-D 不同浓度水平的诱导培养基上(见表 1)。培养基按正交设计 L₉(3⁴) 配制, 每升附加蔗糖 30 g、琼脂 5g, 灭菌前 pH 调至 5.8, 培养温度 (25 ± 2) °C。除光照培养试验外, 各处理均为黑暗培养 6d 后转至 MS + BA 2.0 mg · L⁻¹ 培养基诱导胚状体发生。每处理 5 个培养皿, 一个培养皿接种 6 ~ 8 个叶片, 三次重复, 30d 后统计分化情况。数据采用 SAS 系统处理。壮苗和生根诱导试验均在光照下进行, 分别在 20d 和 30d 后统计数据。

作者简介: 臧运祥 (1978-), 男, 主要从事园艺植物组织培养研究, 现于韩国建国大学攻读博士学位。E-mail: yxzang78@163.com

* 通讯作者: 达克东

2 结果与分析

2.1 胚性细胞诱导阶段

2.1.1 胚性细胞诱导期不同激素对比对胚状体发生的影响 表 2 结果显示,BA 浓度为 1.0、2.0 与 3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,平均诱导率分别为 47.9%、83.5% 和 68.8%,以 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最适宜诱导浓度。随着 2,4-D 浓度由 0.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,平均诱导率逐渐降低;随 IAA 浓度增高,平均诱导率先升高而后降低。由此可知,理论上乔纳金胚性细胞诱导期的最佳诱导配方是 MS + BA 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA 4.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D 0.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。比较表 1 中各处理组合的诱导率,处理 6 最好,诱导率高达 95.4%,处理 3 最差,仅为 26.1%。一般诱导率高时,平均每叶诱导胚状体的数量也较高。经过

方差分析,BA、IAA、2,4-D 三因素对诱导胚状体发生的影响极显著 ($F = 23.73, P = 0.0001$);三者不同浓度之间也存在极显著差异 ($F = 31.26, P = 0.0001$; $F = 7.68, P = 0.0033$; $F = 32.25, P = 0.0001$)。LSR 多重比较结果(表 2)显示:BA 不同浓度之间差异极显著;IAA 4.0 和 6.0 与 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 差异均达极显著水平;2,4-D 0.3 和 0.5 与 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 差异极显著。从表 2 数据可以看出,三种诱导激素中以 IAA 的平均诱导率极差最小,仅为 16.8,即表明 IAA 浓度变化对胚性细胞的诱导影响相对较小,且 IAA 4.0 与 6.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 无显著差异。因此,可认为表 1 中的处理 6 即为乔纳金最佳胚性细胞诱导配方。

表 1 不同激素对比对胚状体发生的影响

处理 treatment	6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	2,4-D ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	诱导率 Induction rate (%)	平均每叶诱导胚状体的数量 Average No. of induction somatic embryos
1	1.0	2.0	0.3	61.6 ± 9.4	3.3 ± 0.8
2	1.0	4.0	0.5	56.0 ± 2.0	4.7 ± 0.7
3	1.0	6.0	1.0	26.1 ± 3.2	2.6 ± 0.4
4	2.0	2.0	0.5	75.6 ± 4.4	6.6 ± 0.6
5	2.0	4.0	1.0	79.6 ± 5.5	8.4 ± 0.6
6	2.0	6.0	0.3	95.4 ± 2.7	8.7 ± 0.2
7	3.0	2.0	1.0	32.8 ± 6.9	3.1 ± 0.9
8	3.0	4.0	0.3	84.9 ± 5.3	5.2 ± 0.4
9	3.0	6.0	0.5	88.7 ± 5.1	7.2 ± 0.3

注:表中数字为 3 次重复的算数平均值 ± 标准差(下同)

表 2 各激素不同浓度对胚状体发生影响的显著性比较

BA			IAA			2,4-D		
浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) combi nation	平均诱导率 Average induction rate (%)	显著性 Level of difference	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) combination	平均诱导率 Average induction rate (%)	显著性 Level of difference	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) combination	平均诱导率 Average induction rate (%)	显著性 Level of difference
1.0	47.9	cC	2.0	56.7	bB	0.3	80.6	aA
2.0	83.5	aA	4.0	73.5	aA	0.5	73.5	aA
3.0	68.9	bB	6.0	70.1	aA	1.0	46.2	bB

注:不同小写字母为差异显著($\alpha = 0.05$);不同大写字母为差异极显著($\alpha = 0.01$)。下同

2.1.2 胚性细胞诱导期光照对胚状体发生的影响

表 3 结果显示,叶片在 $MS + BA\ 2.0\ mg \cdot L^{-1} + IAA\ 6.0\ mg \cdot L^{-1} + 2,4-D\ 0.3\ mg \cdot L^{-1}$ 培养基、 $(25 \pm 2)^{\circ}C$ 培养箱中完全黑暗培养有利于胚状体发生,黑暗处理以 6d 为宜。时间短,胚状体发生率低,数量少;时间长,叶片伤口及其附近区域出现大量淡黄

色愈伤组织,至 20d 时已基本无胚状体发生。方差分析表明,不同的暗处理时间对胚状体诱导率存在极显著差异 ($F = 408.39, P = 0.0001$);对胚状体诱导数量亦存在极显著差异 ($F = 138.64, P = 0.0001$)。

表 3 暗处理对胚状体发生的影响

天数 Days	诱导率 Induction rate (%)	平均每叶诱导胚状体的数量 Average No. of induction somatic embryos
0	0 dD	0 fE
3	$78.5 \pm 5.4\ bB$	$6.5 \pm 0.4\ bB$
6	$95.2 \pm 1.8\ aA$	$8.8 \pm 0.7\ aA$
10	$73.5 \pm 4.7\ bB$	$5.0 \pm 0.7\ cC$
20	$5.1 \pm 1.6\ dD$	$1.8 \pm 0.3\ eD$

2.2 胚状体诱导阶段——BA 浓度对胚状体发生的影响

表 4 结果显示,经过胚性细胞诱导阶段的叶片,在诱导胚状体发生阶段单独使用 BA 可以有效诱导胚状体发生。BA 浓度以 $2.0\ mg \cdot L^{-1}$ 为宜,太低时

胚状体发生率低,再生量少,太高时再生胚状体有玻璃化现象。方差分析表明,培养基中 BA 浓度对胚状体诱导率存在极显著差异 ($F = 292.77, P = 0.0001$);对胚状体诱导数量亦有极显著差异 ($F = 165.01, P = 0.0001$)。

表 4 BA 浓度对胚状体发生的影响

BA ($mg \cdot L^{-1}$)	诱导率 Induction rate (%)	平均每叶诱导胚状体的数量 Average No. of induction somatic embryos
0	0 dC	0 eD
1.0	$75.5 \pm 5.3\ bcB$	$3.6 \pm 0.4\ dC$
2.0	$96.1 \pm 1.5\ aA$	$8.6 \pm 0.3\ aA$
3.0	$79.9 \pm 5.1\ bB$	$5.5 \pm 0.6\ bB$
4.0	$70.6 \pm 3.8\ cB$	$4.4 \pm 0.6\ cBC$

2.3 形态学观察

在附加有 $2.0\ mg \cdot L^{-1}$ BA、 $6.0\ mg \cdot L^{-1}$ IAA 和 $0.3\ mg \cdot L^{-1}$ 2,4-D 的 MS 培养基上,创伤叶片经过 6d 胚性细胞诱导后,大部分叶片基本形态无明显变化,伤口处无愈伤组织发生,伤口细胞呈淡褐色,伤口附近细胞呈淡黄色。转接至 MS 附加 $2\ mg \cdot L^{-1}$ BA 的胚状体发生培养基后,大部分叶片的伤口部位开始向上隆起,至第 9d 时,个别叶片上面有原胚发生(图 1,1),随后经过球形胚、心形胚、子叶胚和成熟胚诸阶段而形成一个新个体(图 1,2~5)。

胚状体发生诱导 20d 后外植体胚状体发生达最高峰(图 1,6)。

2.4 壮苗培养

胚状体诱导培养 30d 后,大部分已经发育成熟,需转入壮苗培养基进行壮苗培养,可以连带叶片一同转入。由表 5 可以看出,随 BA 浓度的升高,平均株高降低,茎粗度是先升后降,玻璃化率升高。无 BA 时苗较高但细弱,以 $BA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$ 为最适宜浓度,苗比较粗壮,且叶色浓绿。

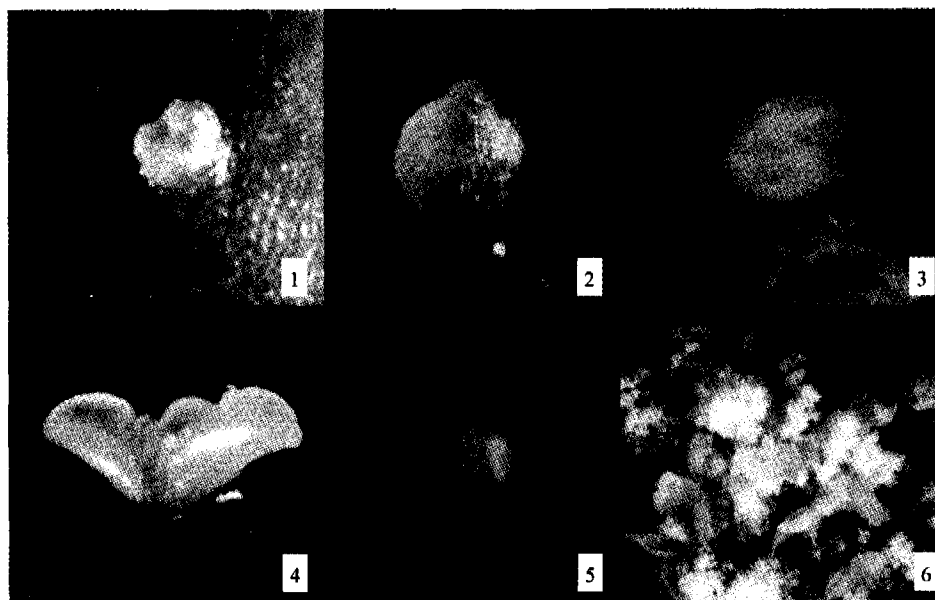


图1 太纳金叶片胚状体发生的形态学观察

说明:1. 原胚($\times 40$);2. 球形胚($\times 40$);3. 心形胚($\times 40$);4. 子叶胚($\times 40$);5. 成熟胚($\times 40$);
6. 诱导20d时达到胚状体发生高峰($\times 7$)

表5 不同激素比对试管苗生长的影响

IAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均株高 (cm)	平均茎粗 (mm)	玻璃化率 (%)	植株叶片状况
0.1	0	2.6	0.9	0	大,平展,淡绿
0.1	0.5	2.2	1.2	0	大,平展,绿
0.1	1	2.0	1.1	8	中等,平展,绿
0.1	2	1.6	0.9	20	小,边缘上翘,淡绿
0.1	4	1.1	0.7	48	极小,边缘上翘,微黄

2.5 生根诱导及完整植株的形成

壮苗培养20d后,即可进行生根诱导。由表6可以看出,随着IBA浓度从0.1mg/L上升到1.2mg/L,生根率、根粗和单株生根数均呈现低-高-

低的变化趋势,以0.8 mg/L为最好。从基部愈伤组织来看,对照基部稍有膨大,但无愈伤组织,IBA浓度较高时,基部出现少量的愈伤组织。

表 6 单种激素处理对乔纳金生根的影响

IBA (mg · L ⁻¹)	生根率 (%)	根长 (cm)	根粗 (mm)	单株生根条数	愈伤组织
0	0	0	0	0	无
0.1	26	5.2	0.6	1.1	不明显
0.3	42	5.3	0.9	1.3	不明显
0.5	46	5.2	1.1	1.4	不明显
0.8	54	5.5	1.2	1.8	不明显
1.2	38	4.7	0.9	1.5	稍明显

表 7 激素组合对乔纳金生根的影响

IBA (mg/l)	IAA (mg/l)	生根率 (%)	根长 (cm)	根粗 (mm)	单株生根条数	愈伤组织
0	0	0	0	0	0	无
0.8	0.1	60	3.5	0.6	1.8	不明显
0.8	0.3	66	4.1	0.8	2.6	不明显
0.8	0.5	78	4.9	1.1	3.3	不明显
0.8	0.7	92	5.7	1.2	3.6	不明显
0.8	1	72	4.2	0.9	4.2	稍明显

在单激素试验的基础上,设计了双激素试验。表 7 结果显示,当 IBA 为 0.8mg/l, IAA 浓度从 0.1mg/l 上升到 1.0mg/l 时,生根率先升后降,0.7mg/l 时高达 92%,在所有处理中居最高,且根较长、粗壮,基部无愈伤组织,为最佳处理组合。

总体来看,激素组合与单种激素处理相比,生根率显著提高,单株生根条数较多,根系质量也好。其中以 IBA0.8mg/L + IAA0.7mg/L 为较理想的生根激素组合。生根诱导激素浓度不可太高,一般高于 1.0mg/L 时,即抑制根系的生长,根表现细短,且根基部也会出现少量的愈伤组织。

3 结语

将乔纳金无菌苗叶片接种在 MS + BA 2.0 mg · L⁻¹ + IAA 6.0 mg · L⁻¹ + 2,4-D 0.3 mg · L⁻¹ 培养基上预诱导 6d, 获得胚性细胞, 然后转入 MS + BA

2.0 mg · L⁻¹ 培养基上诱导胚状体发生, 诱导率可达 96.1%。胚状体诱导培养 30d 后, 大部分已经发育成熟。此时, 宜将培养物转移至 MS + BA 0.5 + IAA 0.1 mg · L⁻¹ 培养基, 光照条件下进行壮苗培养。20d 后, 将壮苗培养生长至 2cm 左右的小植株转至 MS + IBA 0.8 mg · L⁻¹ + IAA 0.7 mg · L⁻¹ 培养基中诱导生根, 生根率可达 90%。一个月后长成健壮的完整植株, 炼苗后即可出瓶移栽。

参 考 文 献

- 1 吴禄平, 张志宏, 林丽华, 等. 沈阳农业大学学报, 1995, 26 (2): 131~135.
- 2 郭校欣, 王斌, 杜国强, 等. 园艺学报, 2000, 27(4): 282~284.
- 3 刘云国, 王晓云. 生命科学研究, 2001 (3): 227~232.
- 4 谢兆辉, 牟春红, 王彬, 等. 中国农学通报, 2002 (3): 70~76.
- 5 邵建柱, 马宝焜. 果树学报, 2003, 20(1): 49~53.