

昌红苹果离体叶片不定芽的诱导及植株再生*

吴雅琴, 赵艳华, 李春敏

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600)

摘要: 以昌红苹果的组培苗为试材, 研究建立叶片的离体再生体系。用30~40 d继代的新梢顶部1~3节新展开的叶片作为外植体, 分别接种在分化的培养基上, 黑暗处理15 d, 昌红苹果叶片不定芽的最高再生率为100%。在6号培养基上, 昌红苹果叶片的再生能力最高; 诱导叶片不定芽适宜的培养基为MS + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5.5 g/L。

关键词: 苹果; 离体叶片; 再生体系; 组织培养

中图分类号: S 661.1.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)01-0032-04

Efficient Adventitious Bud Induction and Plant Regeneration from Leaves in Vitro of Apple (cv. Changhong)

WU Ya-qin, ZHAO Yan-hua, LI Chun-min

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Science, Changli 066600, China)

Abstract: Factors that influence the shoot regeneration of Apple (cv. Changhong) in vitro leaves were studied. With the first 1~3 new leaves of young shoots that 30~40 d after subculture as explant, about 100% bud regeneration rate was obtained. When the explant were cultured on the differentiation medium by 15 d dark treatment. The results showed that with No. 6 medium, the highest shoot regeneration ability was observed. The optimal medium for regeneration is MS + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + Sucrose 30 g/L + Agar 5.5 g/L.

Key words: apple; in vitro leaf; regeneration; tissue culture

果树外植体离体再生是遗传转化研究的基础, 转化频率低的主要原因之一是外植体再生困难。虽然, 苹果离体再生的研究已取得较大进展^[1,2], 但只有少数品种再生频率在80%以上^[3~5], 转化频率非常低, 限制了苹果转基因技术的发展和應用。提高离体叶片的再生效率是提高苹果基因转化频率的关键。富士的叶片再生能力最差^[6], 这是制约改良富士苹果的关键因素。本研究以河北农业科学院昌黎果树研究所最新选育并推广的优良富士品种昌红苹果的无菌试管苗为试材, 研究了影响昌红苹果离体叶片再生的因素, 建立了完整的离体叶片再生体系。

1 材料与方法

1.1 材料

取昌红苹果正常继代的无菌试管苗, 在MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L, 附加白砂糖 35 g/L, 琼脂 5.5 g/L, pH 5.8 的培养基上继代培养。

1.2 叶片接种培养

继代苗培养30~40 d后, 选取试管苗顶部完全展开的幼嫩叶片3~4片, 其形状色泽基本一致, 去掉叶柄后, 用手术刀片在叶片上横切, 切断中脉但保持叶片完整, 间距约1 mm左右, 除了比较叶片放置方式的试验中叶片近轴面向下接触培养基

收稿日期: 2005-05-27

* 基金项目: 河北省科学技术厅资助项目(03820178D)

作者简介: 吴雅琴(1969-), 女, 陕西澄城人, 主要从事果树生物技术与种质创新研究。

(简称反放)外,其余的叶片均远轴面向下接触培养基(简称正放),接种于再生培养基上。

1.3 不定芽诱导

基本培养基为 MS,添加不同浓度的 BA, NAA 和 TDZ。所有培养基均加蔗糖 30 g/L, 琼脂 5.5 g/L, pH 5.4。光照培养条件: 温度 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照 14 h/d, 光强 2 000 lx 左右。比较暗期长度的试验: 暗培养(23°C)天数分别为 0, 5, 10, 15, 20 和 30 d, 然后转移到培养架, 进行光照培养。其它试验的暗培养时间均为 15 d。

1.4 再生苗生根

切去原来外植体, 将再生芽接种于生根培养基, 置于培养架上, 温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照 12 h/d, 光强 2 000 lx 左右, 诱导其生根。

1.5 结果统计方法

叶片接种后, 45 d 调查接种的叶片数, 再生芽的叶片数, 再生芽总数。结果统计按照下列公式计算出叶片再生频率和再生叶片再生芽数。叶片再生频率($\%$) = 再生芽叶片数 / 接种叶片数 $\times 100\%$; 再生叶片平均再生芽数 = 再生芽总数(个) / 再生芽的叶片数(片)

2 结果与分析

2.1 不定芽发生动态

接种后 10 d, 叶片明显增大, 卷曲呈筒状。叶柄中脉及中脉附近的切口上形成绿色的瘤状愈伤组织(图 1); 叶片的正面和背面接触培养基的形态无明显差异; 黑暗处理 15 d 后, 放在光下培养, 尽管叶片有些发黄, 但生长很快, 接种 18 d 左右, 从愈伤组织中分化出绿色小芽(图 2), 以后不定芽发生频率迅速增加, 形成簇生芽(图 3)。1 个月后, 个别处理的叶片再生率达 100% 以上, 平均再生不定芽数可达 21.6。

2.2 激素对昌红苹果叶片再生的影响

不同激素的种类、浓度及配比对苹果叶片再生植株能力影响很大^[7,8]。一般细胞分裂素与生长素的浓度比值在 10 左右有利于叶片组培再生苗^[9,10]。由表 1 可以看出, 昌红苹果离体叶片在 5 号和 6 号培养基上叶片再生芽频率高于其它 4 个组合, 6 号培养基的再生叶片平均再生芽数达到最高 21.6 个/片叶; 同时还可以看出, TDZ 对昌红苹果叶片再生的效果明显好于 BA, 比较适宜其叶片再生。



图1. 昌红苹果叶片的切口上形成绿色的瘤状愈伤组织; 2, 3. 诱导不定芽

Fig. 1 Green hump callus induction from in vitro leaf explant; 2, 3 Adventitious bud induced from in vitro leaf

表1 激素对昌红苹果叶片再生的影响

Tab. 1 Effect of hormones on shoot regeneration of leaves of Apple leaves cv, Changhong

培养基 编号	激素种类及浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			叶片再生芽频率 / $\%$	再生叶平均再生芽数 /(个 $\cdot$ 片 $^{-1}$)
	BA	NAA	TDZ		
1	3.0	0.3	—	45.2	2.6
2	4.0	0.4	—	77.8	3.5
3	5.0	0.5	—	92.3	4.9
4	6.0	0.6	—	90.9	3.8
5	—	0.2	1.0	100	19
6	—	0.5	1.0	100	21.6

2.3 黑暗处理对苹果离体叶片再生的影响

苹果离体叶片接种后置黑暗处是叶片再生必需的条件^[11,12]。将叶片接种在 5 号培养基上,进行不同时间的黑暗处理,由表 2 可以看出,接种后不经黑暗处理而直接在光下培养,叶片不能直接再生。黑暗处理 15d 时叶片再生频率达到最高,不同黑暗处理时,叶片开始分化的时间基本一致。

表 2 不同黑暗处理时间对昌红苹果叶片不定芽再生率的影响

Tab. 2 Effect of time in dark on shoot regeneration from Apple leaves cv, Changhong

暗培养 时间/d	叶片再生 芽频率/%	再生叶片平均 再生芽数/个	叶片开始 分化时间/d
0	0	0	0
5	35.3	4.76	17
10	89.5	15.67	17
15	100	19.00	18
20	90.9	16.34	19
30	81.8	4.0	19

2.4 叶片不同接种方向对再生的影响

通过对叶片不同接种方向的处理结果表明(见表 3),叶片远轴面向下接触培养基(简称正放)与叶片近轴面向下接触培养基(简称反放)对不定芽的再生影响较大,叶片正放要比反放时再生效果好。叶片正放时与培养基接触,容易吸收更多的养分,所以接种时以叶片正放为宜。

表 3 叶片不同接种方向对再生的影响

Tab. 3 Effect of different lay on shoot regeneration from Apple leaves cv, Changhong

叶片放 置方式	接种叶 片数/个	再生叶 片数/个	叶片再生 芽频率/%	30 d 分化 芽数/个
正放	42	38	90.5	125
反放	40	9	22.5	32

2.5 不同激素组合对苹果再生芽高度的影响

叶片接种 1 个月后,芽的分化数不再增加,但在不同培养基中的生长状态有所不同。叶片再生 60 d 后(分化出的芽生长约 1 个月后),调查各培养基中再生苗的生长情况,发现不同的激素组合对昌红苹果再生苗的生长也有很大的影响(见图 4)。3 号培养基的再生芽生长最好,有利于进一步快繁;尽管 6 号培养基中再生叶片平均再生芽数最多,但再生苗的生长受到一定的限制,再生苗在培养基中生长很慢,必须换在 3 号培养基中才能长高,这也反映出适宜浓度的 TDZ 有利于苹果叶片再生,但不适宜进一步对再生芽进行继代培养,而适宜浓度的 BA 既可以进行叶片再生,也可以对再生芽进行继代培养。

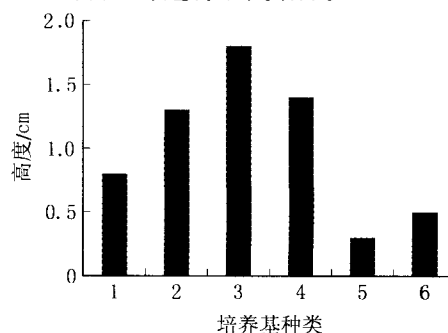


图 4 不同激素对昌红苹果再生芽生长高度的影响

Fig. 4 Effect of hormones on shoot regeneration height from Apple leaves cv, Changhong

2.6 再生苗生根培养

将增殖后正常继代(图 5)的再生芽长成的新梢切成 2 cm 左右长、带 3~4 片叶的新梢,接种到基本培养为 1/2 MS,附加 0.5 mg/L IAA 和 0.5 mg/L IBA 的生根培养基上,置于光照下培养。约经过 10~15 d,从不定梢的基部便生出不定根(图 6, 7)。新梢的平均生根率为 95%,每个新梢平均不定根 4~7 条。



图 5. 再生植株的增殖; 6, 7. 再生植株生根

Fig. 5 Elongated adventitious bud; 6, 7 Shoots of rooting

3 结论

培养基中的激素被认为是叶片再生的最重要的因素^[13-15]。本试验研究发现,与BA相比,TDZ更适于昌红苹果离体叶片再生,培养基中添加适宜浓度的TDZ,可获得较高的再生率。当TDZ浓度为1.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L时,再生效率显著提高,叶片平均再生率可达100%,再生叶片平均出芽率为21左右。但TDZ再生的芽呈簇状,茎难以伸长,不如BA再生的芽健壮,将TDZ再生的芽转入含BA的培养基中,芽的状态就恢复正常,这个结果与王关林的结论是一致的^[16]。同时也可以看出,在昌红苹果叶片不定芽体外再生时,进行一段时间的暗培养是必须的。一般13~16 d较为合适,时间过长,则导致大量的愈伤组织产生,而无暗培养的叶片其再生效率极低。

[参考文献]

- [1] 张玉萍. 苹果叶片愈伤组织诱导及其再分化植株的研究[J]. 山西农业科学, 1994, 22(4): 12-14.
- [2] 赵政阳, 傅润民. 苹果试管苗叶片再生植株研究[J]. 陕西农业科学, 1992, (6): 18-19.
- [3] 秦玲, 李明, 王永熙, 等. 不同细胞分裂素对2001富士苹果离体叶片再生的影响[J]. 果树学报, 2002, 19(4): 215-218.
- [4] 吴禄平, 张志宏, 林丽华, 等. 苹果品种试管苗叶片再生不定芽[J]. 沈阳农业大学学报, 1995, 26(2): 131-135.
- [5] DURHAM R E, KORBAN S S. High efficiency shoot regeneration from in vitro grown leaves of apple[J]. Hort Science, 1993, 28(5): 543.
- [6] 王艳, 孙仲序, 赵春芝, 等. 影响苹果离体叶片再生的因素分析[J]. 落叶果树, 2002, (6): 19-22.
- [7] 藏运祥, 郑伟尉, 孙仲序, 等. 苹果叶片组培再生体系研究进展[J]. 生物技术通报, 2004, (2): 15-18.
- [8] YEPES L M, ALDWINCKLEI H S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple and effect of antibiotics in morphogenesis[J]. Plant Cell Tis Org Cult, 1994, 37: 257-269.
- [9] 孙爱君, 章镇, 姚泉洪, 等. 苹果与八棱海棠的试管苗外植体植株再生[J]. 上海农业学报, 2000, 16(2): 23-30.
- [10] 王冬梅, 黄学林, 黄上志. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 373-377.
- [11] 师校欣, 杜国强, 高仪, 等. 黑暗培养对苹果组培快繁及叶片再生的影响[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(4): 18-21.
- [12] KORBAN S S, O-CONNOR P A, ELOBEIDY A. Effects of thidiazuron, naphthalene acetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from Malus leaves[J]. Journal of Horticultural Science, 1992, 67(3): 341-349.
- [13] JAMES DJ, PASSEY A J, RUGINI E. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissue cultured in vitro[J]. J Plant Physiol, 1988, 132: 148-154.
- [14] 丁爱萍, 王洪范. 影响苹果离体叶片分化不定芽的因素[J]. 中国果树, 1996, (4): 20-21.
- [15] 师效欣, 杜国强, 高仪, 等. 苹果离体叶片高效再生不定芽技术研究[J]. 果树科学, 1999, 16(4): 255-258.
- [16] 王关林, 方宏筠, 那杰. 高活性细胞激动素在组织培养中的作用[J]. 生物学通报, 1997, 32(3): 47-53.