

技术与方法 Techniques and Methods

锡金海棠子叶再生体系的建立

吴瑞刚, 杨洪强*, 冉昆, 张玮玮

山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 锡金海棠 [*Malus sikkimensis* (Wenz.) Koehne] 是我国稀有植物和优良苹果砧木种质资源。本研究探讨了影响锡金海棠离体再生的条件, 建立了锡金海棠子叶高效离体再生体系。结果表明, 子叶再生体系的最佳诱导培养基为 SC+0.1 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ TDZ, 最佳分化培养基为 SC+0.1 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ TDZ, 最佳继代增殖培养基为 SC+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA, 最佳生根培养基为 1/2 MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA。炼苗后, 移入珍珠岩、花生壳与草炭(1:1:1)的基质中, 20 d 移栽成活率高达90%。

关键词: 锡金海棠; 离体再生; 组织培养; 外植体

The Regeneration System Establishment of the Cotyledons of *Malus sikkimensis*

WU Rui-Gang, YANG Hong-Qiang*, RAN Kun, ZHANG Wei-Wei

College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: *Malus sikkimensis* are rare plants and excellent germplasm resources of apple rootstock in China. In this study, the cotyledons of *Malus sikkimensis* were used as explants in the investigation of the affective factors of *in vitro* regeneration conditions and the establishment of efficient regeneration system. The results showed that the best induced medium for callus induction was SC medium with 0.1 mg·L⁻¹ NAA, 2.0 mg·L⁻¹ Thidiazuron (TDZ); the best medium for bud differentiation was SC medium with 0.1 mg·L⁻¹ NAA, 1.5 mg·L⁻¹ TDZ. The best medium for root differentiation was 1/2 MS medium with 1.0 mg·L⁻¹ IBA. After acclimatization, the culture-bottle seedlings were transplanted into the matrix, which contains peanut, shells and peat (1:1:1). The survival rate was up to 90%.

Key words: *Malus sikkimensis*; *in vitro* regeneration; tissue culture; explants

锡金海棠为蔷薇科木瓜属落叶小乔木, 是我国稀有种、国家二级保护植物, 主要分布于云南西北部和西藏南部地区(傅立国1991)。锡金海棠是宝贵的苹果砧木资源, 生长发育整齐一致, 具有明显的无融合生殖特性和较高的利用价值(刘捍中等1989)。锡金海棠的组织培养目前尚未见报道, 建立其高效的离体再生体系, 可为锡金海棠的扩繁、利用和保护提供技术支撑。苹果属植物的离体再生主要以叶片和茎尖为外植体(韩静2005), 本研究则通过锡金海棠的子叶不定芽分化, 继代增殖和试管苗诱导生根和炼苗移栽, 获得再生植株, 建立了高效再生体系, 为锡金海棠的扩繁及其遗传转化体系的建立以及苹果砧木的转基因研究提供参考。

材料与方法

1 外植体来源

实验所用锡金海棠 [*Malus sikkimensis* (Wenz.)

Koehne] 种子由山东省青岛市农科院果茶研究所提供。2010年春季对种子进行4℃层积处理, 25 d后在温室播种培养。播种10 d后, 从生长健壮、无病虫害的子叶苗上剪取子叶作为外植体。

2 外植体处理

用洗洁精将子叶清洗后用流水冲洗30 min左右, 然后在超净工作台上用75%的酒精处理30 s, 再用1 g·L⁻¹的升汞溶液消毒8 min, 之后用无菌水冲洗3~5次, 然后将子叶放在无菌滤纸上, 用手术刀切除两端, 接种到培养基中。

收稿 2012-09-07 修定 2012-09-24

资助 国家自然科学基金(31171923)、国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08009-3)和高校博士学科点专项科研基金(20103702110003)。

* 通讯作者(E-mail: hqyang@sdau.edu.cn, labft@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8249304)。

3 培养基与培养方式

基本培养基为SC [以 $487 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 代替MS培养基中的 $330 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , NH_4NO_3 的浓度由 $1650 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降至 $282.837 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 微量元素、铁盐、有机成份同MS培养基]。愈伤组织诱导及不定芽分化培养基为SC+TDZ+NAA, 其中TDZ的浓度处理为 1.0 、 1.5 、 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA的浓度处理为 0.05 、 0.1 、 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在培养基上接种14 d后统计愈伤组织产生情况, 并将愈伤组织转入到不定芽诱导分化培养基中, 50 d以后统计不定芽的形成情况。

将再生芽转入继代增殖培养基, 继代增殖培养基为SC+6-BA+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, 其中6-BA的浓度为 1.0 、 2.0 、 $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。生根培养基为 $1/2$ MS+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (IAA、IBA)+ $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂(pH为5.8), 50 d以后统计试管苗的生根情况。

除特别注明外, 上述培养基均添加3%的蔗糖和 $6.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8, 在 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 下灭菌20 min。培养条件分别为光周期16 h/8 h, 光照强度 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度(24 ± 2) $^\circ\text{C}$; 在黑暗条件下进行愈伤组织诱导, 愈伤组织形成后选取长势良好的转移至不定芽诱导分化培养基上培养。不定芽形成后, 转接到继代增殖培养基中进行增殖培养, 20 d后剪取2 cm以上、带有3~4片叶的无根幼苗转移到生根培养基上诱导生根。

出愈率(%)=形成愈伤组织的子叶数/接种子叶数 $\times 100$ (培养20 d);

愈伤组织分化频率(%)=再生不定芽的愈伤组织数/接种的愈伤组织数 $\times 100$ (培养30 d);

增殖倍数=总芽数/起始接种芽数(培养30 d)。

4 炼苗与移栽

生根培养50 d后, 将完整试管苗带瓶转移到与培养温度相同、空气湿度较高的温室中, 打开瓶口, 使嫩苗逐渐与外界接触; 7 d后用镊子把苗从培养瓶中取出, 用流水将根部的培养基冲洗干净, 然后移栽到已消毒的基质中。基质分别为: (1)珍珠岩:花生壳:草炭=1:1:1 (体积比, 下同); (2)纯砂; (3)花生壳:草炭=1:1。移栽后每隔2~3 d向幼苗喷施一次营养液, 在移栽前7 d内保持适度遮荫及喷水保湿, 30 d后统计存活率。

实验结果

1 植物生长物质对子叶愈伤组织及其不定芽的诱导

如表1所示, 在含有NAA和TDZ的培养基中,

表1 植物生长物质对比对愈伤组织诱导与分化的影响

Table 1 Induction rate and differentiation rate of callus on mediums with different concentrations of plant growth substance

生长物质浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		出愈率/%	愈伤组织分化率/%
NAA	TDZ		
0.05	1.0	70	0
0.05	1.5	67.5	25
0.05	2.0	62.5	32
0.1	1.0	95	25
0.1	1.5	92.5	65
0.1	2.0	90	67.5
0.2	1.0	100	10
0.2	1.5	97.5	15
0.2	2.0	95	22.5

当NAA的浓度为 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织出愈率为 $62.5\%\sim 70\%$, 且生长比较缓慢; 当NAA浓度提高到 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织出愈率提高到 $90\%\sim 95\%$; 当浓度达到 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 出愈率达到 95% 以上, 并可形成大量的白色致密愈伤组织。当TDZ浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织的分化频率为 $0\sim 25\%$; 当TDZ浓度提高到 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织的分化率提高到 $10\%\sim 65\%$; 当浓度达到 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 分化率达到 $22.5\%\sim 67.5\%$, 但再生芽成簇状密集生长, 不利于后期的成苗, 且玻璃化程度比较严重。因此, $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ浓度配比是愈伤组织诱导的最适合浓度; 愈伤组织分化的最佳培养基为: SC+ $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA。14 d暗培养后, 在子叶切割的伤口处, 形成大量白色致密的愈伤组织(图1-A), 愈伤组织的形成率达 90% ; 将愈伤组织切割后转移至分化培养基上, 并放至光下培养10 d后出现绿色不定芽丛(图1-B)。

2 植物生长物质对比对子叶不定芽继代增殖的影响

本试验将诱导分化的不定芽放入不同继代增殖培养基中进行增殖培养, 如表2所示。研究表明, 不定芽在SC+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的培养基中继代增殖效果较好, 培养30 d的平均增殖倍数为3.2, 且玻璃化程度较低(图1-C)。

3 锡金海棠生根培养的生长素选择

从增殖培养基中剪取2 cm以上的植株, 分别转移至两种不同的生根培养基。其中, 在附加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA的培养基中, 25 d以后, 根原基开始形成; 35 d以后, 根系分布较均匀、分散。50 d时, 其

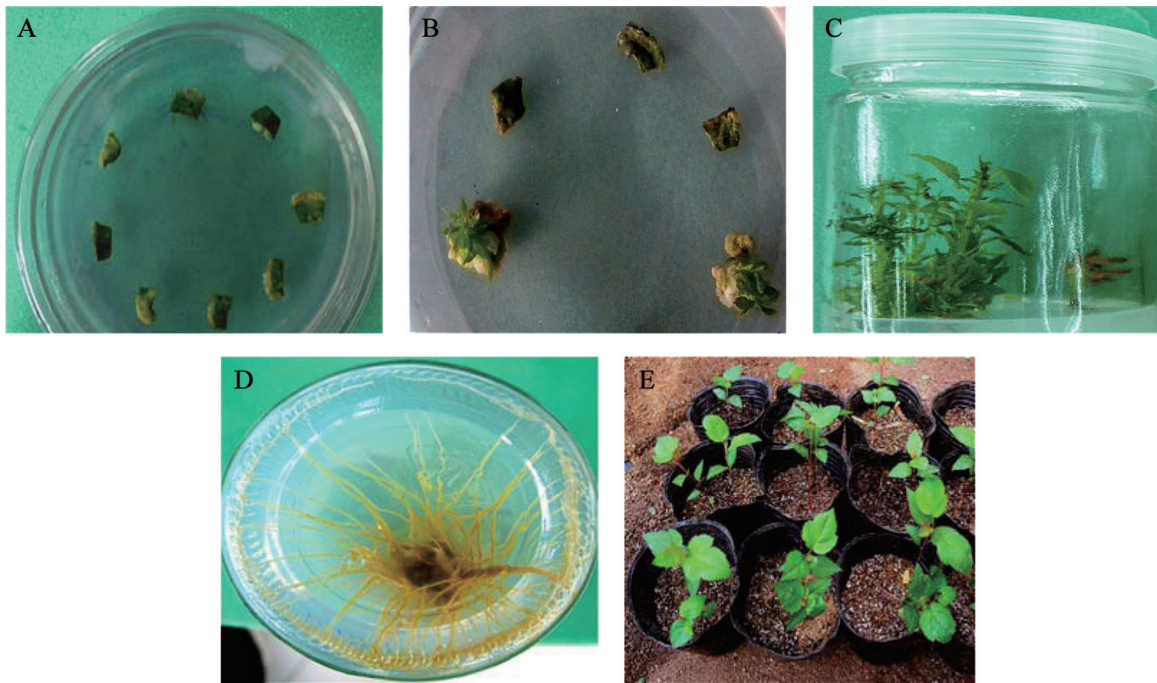


图1 锡金海棠子叶再生体系的建立

Fig.1 Establishment of plantlet regeneration system from cotyledons of *Malus sikkimensis*

A: 子叶愈伤组织的诱导14 d; B: 愈伤组织的分化培养10 d; C: 增殖培养20 d; D: 生根培养 60 d; E: 再生植株的移栽。

表2 植物生长物质配比对子叶不定芽继代增殖的影响

Table 2 The effects of the ratio of plant growth substances on the cotyledons of adventitious buds subculture proliferation

生长物质浓度/mg·L ⁻¹		增殖倍数
6-BA	NAA	
1.0	0.2	1.6
2.0	0.2	3.2
3.0	0.2	1.8

生根率可达65%，平均生根数为10.53。在附加1.0 mg·L⁻¹ IBA的生根培养基中，28 d时根原基开始形成，35 d以后，开始长出细长的根系。50 d时根系簇状密集生长且呈褐红色，生根率可达95%，平均生根数为14.95，结果如表3所示。据生根率、平均生

根数、根系的生长发育状况及分布等各种因素综合考虑，附加IBA培养基的生根效果较优(图1-D)。

4 锡金海棠试管苗移栽基质的选择

生根培养50 d后，将完整试管苗移到与培养温度接近的温室中，打开瓶盖炼苗2~3 d，1周后从培养瓶中取出试管苗，用流水将根部的培养基冲洗干净，然后移入已消毒处理的基质中。从表4可以看出，锡金海棠的试管苗在炼苗的过程中，随着时间的延长幼苗成活率不断降低。在纯砂基质中，30 d时间内下降了50%左右，在花生壳:草炭=1:1与珍珠岩:花生壳:草炭=1:1:1的基质中分别下降了26.7%、10%。因此，珍珠岩:花生壳:草炭=1:1:1是本试验的基质最佳配比，20 d移栽成活率达90%，30 d后移栽苗在常规条件下正常生长(图1-E)。

表3 生长素对再生植株生根的影响

Table 3 The impact of different media on the rooting of regenerated plants

不同生长素浓度/mg·L ⁻¹		植株数/个	生根的植株数/个	生根总数/条	生根率/%	平均根数/条
IAA	IBA					
1.0	0	20	13	137	65	10.53
0	1.0	20	19	284	95	14.95

表4 基质类型对试管苗移栽成活的影响

Table 4 Survival rate of the transplanting seedling on different base material

基质	成活率/%			
	5 d	10 d	15 d	20 d
砂	100	86.7	63.3	50
珍珠岩:花生壳:草炭=1:1:1	100	100	96.7	90
花生壳:草炭=1:1	100	93.3	83	73.3

讨 论

Thidiazuron (TDZ)是德国Sobering公司在1976年推出的一种新的棉花脱叶剂,是一种高活性的细胞分裂素,在近几年来,已广泛应用于苹果组培当中。大量研究表明,TDZ可诱导离体叶片再生大量不定芽,其效率要远高于BA (吴雅琴等2006; Perez-Tornero等2000)。但是以TDZ为主要激素进行不定芽再生时,再生苗的玻璃化程度比较高,所产生的芽通常呈簇状密集生长,不利于后期的成苗。将通过TDZ再生的芽转入附加BA的培养基中,芽的玻璃化程度就会有所抑制,从而恢复正常的状态(吴雅琴等2006)。本研究将SC+1.0 mg·L⁻¹ TDZ+0.2 mg·L⁻¹ NAA与SC+2.0 mg·L⁻¹ BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA两种培养基交替使用,不但使不定芽增殖的倍数有所提高,还有效抑制了玻璃化等问题发生,同时有效延长了愈伤组织分化不定芽的时间。

在苹果离体叶片再生不定芽的研究中,常用的基本培养基有MS、N₆、B₅、LS等几种。大量试验表明,MS的效果明显优于其他培养基,所以通常选用MS作为基本培养基(王艳等2002)。代红艳等(2004)的研究表明,培养基中无机氮含量和比例对于甜樱桃试管苗增殖继代培养具有重要影响,降低NH₄⁺与NO₃⁻比例有利于产生叶片形态正常、玻璃化程度较轻的试管苗植株。本研究中选用的

SC培养基是在MS的基础上,将NH₄⁺与NO₃⁻比例降低为1:8,锡金海棠子叶获得了较高的再生频率,且后期无菌苗的继代增殖效果好,玻璃化程度低。

苹果属植物离体再生通常以幼叶和茎段为外植体,而利用成熟种子的子叶诱导分化不定芽的报道还很少。诱导叶片直接再生不定芽获得再生植株周期短,操作简单,体细胞无性系变异小,能较好地保持受体植物的遗传稳定性,但出现较多的嵌合体(郝红梅等2011);采用幼苗或幼树的茎段作为外植体,由于材料内部的内生细菌不能被一般的表面消毒方法所清除,随着材料带入培养过程,从而导致其不定芽的污染率较高(韩小娇2008)。而利用苹果果实的种子子叶作为外植体,取材容易,不受季节和地点的限制,再生频率高,是简便、快速、大量获得苹果体细胞无性系的有效方法,也可作为无性繁殖及脱毒的一种方法。本研究以锡金海棠子叶为外植体,成功地建立了其高效离体再生体系,为苹果属植物离体再生的研究提供参考。

参考文献

- 代红艳, 张志宏, 高秀岩, 吴禄平(2004). 甜樱桃品种微繁体系的建立及优化. 果树学报, 21 (3): 216-219
- 傅立国(1992). 中国植物红皮书: 稀有濒危植物. 北京: 科学出版社
- 韩静(2005). 苹果离体叶片和茎段切片再生体系建立的研究[毕业论文]. 山西太谷: 山西农业大学
- 韩小娇(2008). 平邑甜茶*MhCDPK*基因克隆、表达、载体构建及其再生体系的建立[毕业论文]. 山东泰安: 山东农业大学
- 郝红梅, 田义, 丛佩华, 杨振英(2011). 苹果离体叶片植株再生研究进展. 中国果树, (1): 55-57
- 刘捍中, 蒲富慎, 任庆棉, 刘立军(1989). 无融合生殖苹果属植物的某些特性. 园艺学报, 16 (1): 1-4
- 王艳, 孙仲序, 赵春芝(2002). 影响苹果离体叶片再生的因素分析. 落叶果树, (6): 19-22
- 吴雅琴, 赵艳华, 李春敏(2006). 昌红苹果离体叶片不定芽的诱导及植株再生. 云南农业学报, 21 (1): 32-35
- Perez-Tornero O, Egea J, Vanoostende A, Burgos L (2000). Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. Plant Sci, 158: 61-70