

富士苹果黄化茎段再生不定芽的研究^{*}

王贵章, 徐凌飞, 马锋旺, 梁 东

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以苹果主栽品种长富2号为试材, 研究了不同培养基及6-BA和NAA浓度对黄化且不带腋芽的节间茎段再生效率的影响。结果表明, 3个因子对长富2号黄化茎段再生的影响程度依次为基本培养基>6-BA>NAA; 最适培养基为MS+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+CH 200 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7 g/L, 再生频率可达83%, 最高平均再生芽数为3.03。

[关键词] 富士苹果; 长富2号; 黄化茎段; 再生体系

[中图分类号] S661.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0079-03

苹果是我国北方的主要果树品种, 由于存在童期长、自交不亲和、杂交程度高等问题, 通过常规育种对其进行改良比较困难, 因此遗传转化技术目前已成为苹果品种改良的有效手段, 而高效再生体系的建立是遗传转化的必要前提。近年来, 关于苹果的遗传转化研究日渐深入, 有关苹果叶片再生的报道也有很多^[1-3], 但由于基因型的不同而导致再生效率差异显著。据报道, 在适宜条件下, 乔纳金苹果的叶片再生效率可达100%^[2], 而金矮生仅为2.4%^[3], 富士苹果则普遍较低^[4]。富士是世界上第一主栽苹果品种, 长富2号则是富士系苹果中综合经济性状最为优异的品种之一, 因此对其进行遗传改良具有重大的实际意义。目前, 对苹果茎段再生的研究仅见于皇家嘎拉^[5], Liu Qing-zhong等^[6]已通过黄化茎段获得了皇家嘎拉的转化植株, 而有关长富2号黄化茎段再生的研究尚未见报道。为此, 本试验以长富2号为对象, 研究基本培养基、生长素和不同细胞分裂素浓度对其黄化茎段再生的影响, 以期筛选获得适于其黄化茎段再生的最佳培养基和激素浓度, 建立长富2号黄化茎段外植体的高频再生体系, 旨在为长富2号遗传转化的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试 材

试材为长富2号苹果试管苗, 继代培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.0 g/L, 灭菌前将培养基pH调为5.8。

1.2 方 法

为研究基本培养基、6-BA及NAA处理组合对长富2号黄化茎段再生的影响, 采用L₉(3⁴)试验设计进行3因子三水平的正交试验, 试验共设9个处理, 其因子水平见表1。各激素浓度是在预试验的基础上设定的。

表1 长富2号苹果黄化茎段再生的试验因子水平

Table 1 Factors and levels of etiolated internode segment regeneration of Nagafu No. 2 mg/L

因子水平 Level of factors	基本培养基 Basal medium	6-BA	NAA
1	MS	3.0	0.2
2	1/2 MS	5.0	0.4
3	N6	8.0	0.6

1.3 外植体接种培养

继代材料在正常条件下生长2周后, 再转入黑暗条件下培养2周左右^[5], 以获得黄化苗。取继代30~35 d的黄化试管苗顶部1~3节不带腋芽的茎段, 在其上垂直划伤2~3刀, 接种在分化培养基上。培养基中除激素外, 均附加水解酪蛋白(CH) 200 mg/L, 蔗糖30 g/L, 琼脂7.0 g/L。每处理重复3次, 接种外植体30个。

1.4 培养条件

继代材料接种后, 于人工智能气候箱内进行20 d的暗培养后转至光下培养。培养温度为(25±2), 光强为2 000 lx, 光周期为(光/暗)14 h/10 h。

* [收稿日期] 2005-08-31

[基金项目] 教育部优秀青年教师资助计划项目(2007); 西北农林科技大学“拔尖人才支持计划”项目

[作者简介] 王贵章(1978-), 女, 山东青岛人, 在读硕士, 主要从事果树生理与生物技术研究。

[通讯作者] 马锋旺(1964-), 男, 山东汶上人, 教授, 博士生导师, 主要从事果树抗性生理与生物技术研究。E-mail: fwm64@sina.com

1.5 结果调查与统计分析

外植体接种 50 d 后对再生效率进行调查, 计算再生芽频率(再生芽茎段数/接种茎段总数 $\times 100\%$)和茎段平均再生芽数(再生芽总数/接种茎段总数), 并对调查结果进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 茎段不定芽的再生

继代材料接种 20 d 后即出现粉红色芽点, 并伴有大量白色愈伤组织产生; 转至光下培养后, 愈伤组织由白色逐渐变成淡黄色至黄绿色; 转光下 2 周后, 便可见单芽或丛生芽, 由愈伤组织形成的不定芽着生在茎段的两端切口和中部伤口处。

2.2 各因素对不定芽形成的影响

由表 2 可知, 不同处理间茎段再生效率差异很大, 再生频率最高为 83%, 再生芽数最高可达 3.03。表 2 中的 R 值表示极差, 其值越大表明该因子越重要。由表 2 可见, 对黄化茎段再生不定芽影响最大的是基本培养基, 其次是 6-BA 和 NAA。3 种基本培养

基的 T 值以 MS 最大, 为 4.46, 说明 MS 培养基诱导不定芽的效果最好, 1/2 MS 次之, N6 最不适于长富 2 号茎段的再生。当 6-BA 浓度在 3.0~5.0 mg/L 时, 随着其浓度的升高, 茎段再生芽数增多; 当浓度达到 8.0 mg/L 时, 再生效率明显下降, 且玻璃化现象加重, 因此适宜长富 2 号茎段再生的 6-BA 浓度为 3.0~5.0 mg/L。当 NAA 浓度为 0.2~0.4 mg/L 时, 茎段再生芽数与浓度呈正相关关系, 当浓度增大到 0.6 mg/L 时, 虽然愈伤组织相应增多, 但出芽减少, 因此适宜的 NAA 浓度为 0.2~0.4 mg/L。

对 $L_9(3^4)$ 正交试验的方差分析结果表明, 当基本培养基为 MS, 6-BA 浓度为 5.0 mg/L, NAA 浓度为 0.4 mg/L 时, 茎段再生芽数最多, 再生频率也最高。而试验统计结果证明, 此处理组合确为最佳组合。因此长富 2 号黄化茎段再生芽的最佳培养基组合为 MS+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+CH₂000 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L。

表 2 长富 2 号苹果黄化茎段再生试验结果及方差分析

Table 2 ANOVA of experiment result of etiolated internode segment regeneration of Nagafu No. 2

编号 Code	基本培养基 Basal medium	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	再生芽平均数 Everage No. per leaf	再生频率/% Regeneration frequency
1	MS	3.0	0.2	0.83 b	40.3
2	MS	5.0	0.4	3.03 a	83
3	MS	8.0	0.6	0.60 b	27
4	1/2 MS	3.0	0.4	0.23 c	17
5	1/2 MS	5.0	0.6	0.13 c	13
6	1/2 MS	8.0	0.2	0.07 c	7
7	N6	3.0	0.6	0.03 c	3
8	N6	5.0	0.2	0.07 c	0.7
9	N6	8.0	0.4	0.00 c	0
T_1	4.46	1.09	0.97		
T_2	0.43	3.23	3.26		
T_3	0.10	0.67	0.76		
t_1	1.49	0.36	0.32		
t_2	0.14	1.08	1.09		
t_3	0.03	0.22	0.25		
R	1.46	0.86	0.84		

注: T 代表各处理水平上的再生芽之和; t 代表各处理水平上的再生芽均值; R 代表最高再生芽数与最低再生芽数之差; a, b, c 表示 $P \leq 0.05$ 时 LSD 检测的显著水平。

Note: T stands for the sum of No. Per segment in all deal; t stands for the average No. Per segment in all deal; R stands for the discrepancy between Max. average No. Per segment and Min. average No. Per segment; a, b and c show s Significance by LSD at $P \leq 0.05$

3 讨论

本试验通过正交试验设计确定了长富 2 号苹果黄化茎段再生的最佳基本培养基为 MS, 这与前人^[7]的研究结果一致。N6 不适于作富士苹果的再生培养基, 这也与前人的研究结果相吻合^[8]。基本培养基对外植体再生的影响, 主要在于其组成成分和浓

度是否适于外植体的再生^[9]。徐凌飞等^[9]发现, NN69 培养基可以很好地诱导八月红梨叶片的再生; 裴东等^[10]用 $(\text{BH}_4)_2\text{SO}_4$ 代替 MS 中的 NH_4NO_3 后, 也显著提高了苹果叶片不定芽的诱导频率。可见, 由于品种和基因型的差异, 对基本培养基的成分要求也不同, 估计是某些成分在培养过程中发生了变化, 从而影响了其再生效果, 其确切机理有待于进

一步研究。

吴禄平等^[2]发现,再生培养基中添加适量的水解乳蛋白可以提高富士苹果叶片的再生频率。张献龙等^[11]报道,水解酪蛋白有促进培养物器官形成的作用。本试验也在基本培养基中添加水解酪蛋白作为植物的生理活性物质,试验结果表明,其对长富2号再生体系的建立确实有效。

除基本培养基外,激素在苹果离体器官的再生过程中也具有决定性作用。细胞分裂素是苹果外植体再生不定芽的必需因子^[12-13],也是提高再生效率的重要因子。在苹果外植体再生不定芽的研究中,6-BA和NAA是最为常用的细胞分裂素和生长素^[12-13]。Thidiazuron(TDZ)是一种高活性的细胞分裂素类物质,据师校欣等^[4]报道,其可以高效诱导再

生较难的植物再生,作者在预试验中采用了TDZ,但发现其在诱导不定芽发生的同时,也会促进植物组织中乙烯的生成,且会加重玻璃化现象。

不同的外植体材料对再生有很大影响。目前在果树中应用最多的是叶片,这主要是由于叶片细胞间隙大,易由细胞诱导分化出不定芽。当然也可利用非叶片器官诱导再生不定芽^[14-15],如刘庆忠等^[5]用嘎拉的黄化茎段再生不定芽,并取得了良好的效果。长富2号叶片较难再生,这可能与其复杂的遗传背景有关,重要的是要通过改善试验条件和深入研究其再生机理来提高再生频率。本试验以不带腋芽的黄化茎段为材料,建立了长富2号的高频再生体系,为其遗传转化研究奠定了基础,但运用黄化茎段能够显著提高再生频率的机理还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Fasolo F M F, Predievi S. Cultivar dependent response to regeneration from leaves in apple[J]. Acta Horticulture, 1990, 280: 61-68
- [2] 吴禄平, 张智宏, 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
- [3] 赵政阳, 付润民, 税守歧, 等. 苹果试管苗叶片再生植株研究[J]. 陕西农业科学, 1992(6): 18-19
- [4] 师校欣, 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
- [5] 刘庆忠, Salih S, Hammerschlag F A. 茎段外植体白化处理促进“皇家嘎拉”苹果不定芽再生[J]. 落叶果树, 2001(1): 4-7
- [6] L U Qing-zhong, Salih S, Hammerschlag F A. Etiolated of 'RoyalGala' apple (*Malus domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced β glucuronidase expression from stem internodes[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 32-36
- [7] 秦 玲, 李 明, 王永熙, 等. 根癌农杆菌介导苹果遗传转化研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(4): 135-140
- [8] 时保华, 付润民, 赵政阳. 苹果叶片离体培养研究[J]. 西北植物学报, 1995, 15(1): 67-72
- [9] 徐凌飞, 马锋旺, 王喆之, 等. 八月红梨叶片不定芽诱导研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(4): 73-75
- [10] 裴 东, 田颖川, 刘禄群, 等. 苹果叶片再生的改进及抗虫基因植株的获得[J]. 河北农业大学学报, 1996, 19(4): 23-27
- [11] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004
- [12] James D J, Passey A J, Rugini E. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissue cultured *in vitro*[J]. Plant Physiol, 1988, 132: 148-154
- [13] Yepes L M, Aklonis H S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple and effect of antibiotics in morphogenesis[J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1994, 37: 257-269
- [14] 石荫坪. 果树试管苗诱导育种研究: 苹果、梨胚培不定梢及分枝的起源与诱导[J]. 山东农学院学报, 1982(1/2): 27-38
- [15] Liu J R, Sink D G. Plant regeneration from apple seedling explant and callus culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1983, 2: 293-304

Adventitious buds regeneration from etiolated internode segment of apple cultivar Nagafu No. 2

WANG Gui-zhang, XU Ling-fei, MA Feng-wang, LIANG Dong

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of different basal medium, level of 6-BA and NAA on adventitious bud regeneration from etiolated internode segment of Nagafu No. 2 were studied by using the orthogonal experiment design. The results showed that the effective order of three factors on regeneration was basal medium, 6-BA and NAA. The optimum culture medium was 6-BA 5.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + CH₂ 200 mg/L + Sucrose 30 g/L + Agar 7.0 g/L; and on this medium, the regeneration frequency and mean number of bud per segment were 83% and 3.03 respectively.

Key words: Fuji apple; Nagafu No. 2; etiolated internode segment; regeneration system