

平邑甜茶叶盘组培再生研究初报

S661.104.3

张军科¹, 沈向², 曹庆芹², 李英², 李嘉瑞¹

S661.103.6

(1 西北农林科技大学 园艺系, 陕西 杨陵 712100; 2 山东农业大学 园艺系, 山东 泰安 271018)

[摘要] 对平邑甜茶叶盘离体再生条件进行了研究, 结果表明, 平邑甜茶叶盘愈伤和分化适宜的 BA 和 IBA 质量浓度分别为 0.5~1.0 和 0.2 mg/L, 愈伤至少需黑暗培养 35 d; 茎尖分化的适宜培养基为 MS 附加 BA 0.5 mg/L, IBA 0.1~0.2 mg/L; 适宜的生根培养基为 1/2 MS 附加 IBA 0.1 mg/L。

[关键词] 平邑甜茶; 组织培养; 植株再生; 叶盘法 苹果砧木

[中图分类号] S571.103.53 **[文献标识码]** A

平邑甜茶 (*Malus hupehensis* Rehd.) 是三倍体苹果砧木, 具有高度无融合生殖能力。平邑甜茶引入外源基因后, 外源基因可通过无融合生殖稳定遗传, 转基因材料可通过种子大量繁殖; 另一方面, 平邑甜茶具有亲和性好、抗涝、抗盐、抗寒、抗腐烂病等优点, 遗传背景良好, 因而可作为外源基因的良好受体材料, 进行苹果抗旱、抗盐、抗根部病虫害的定向改良。但苹果砧木离体再生较为困难^[1,2], 是苹果遗传转化中的难点。本试验旨在建立平邑甜茶叶盘离体再生体系, 为遗传转化及快速繁殖奠定基础。

1 材料与方法

试验用平邑甜茶无菌苗取自山东农业大园艺系。平邑甜茶无菌苗叶片切去叶缘, 沿主脉横切成约 0.5 cm² 的小块接种; 接种茎尖长度约 1.5 cm。培养条件为 (25±1) °C, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 光强 2 000~3 000 lx。黑暗培养时, 用 3 层黑布人工遮光。每 35 d 继代培养 1 次, 每个处理接种数均在 50 个以上。

2 结果与分析

2.1 愈伤培养条件的选择

2.1.1 愈伤培养基筛选 叶盘在愈伤培养基中黑暗条件下培养 35 d 后, 出愈率结果见表 1。从表 1 可以看出, 1/2 MS 对诱导叶盘再生愈伤组织作用效果最好。0.2 mg/L 的 IBA 对平邑甜茶叶盘愈伤效果最好, 出愈率均在 60% 以上, 其中与 0.5 mg/L 的 BA 搭配效果最好, 其愈伤组织块大, 为白色或淡黄色。由此可见, 平邑甜茶叶盘愈伤的适宜培养基为 1/2 MS+BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L。

2.1.2 黑暗培养时间的确定 为了确定愈伤所需的最适黑暗培养时间, 采用 1/2 MS+

[收稿日期] 1999-10-08

[基金项目] 西北农业大学青年教师科研基金资助项目

[作者简介] 张军科 (1969—), 男, 讲师, 在读博士。

BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L 培养基,在培养室内分7组进行0,7,14,21,28,35,42 d 黑暗培养处理。结果表明,黑暗培养14 d 后,开始有愈伤组织长出,光下7 d 内逐渐褐变停长,14,21,28 和 35 d 各处理随着处理时间延长,出愈率逐渐升高,分别为10.2%,43.7%,72.5%和93.3%,但42 d 黑暗处理与35 d 黑暗处理的出愈率基本一致,为94.5%。说明愈伤培养时为了获得较高的愈伤率,35 d 的黑暗处理是必须的。这与嘎拉品种的报道^[3]不一致,平邑甜茶需要比嘎拉更长的黑暗培养时间。

表1 不同质量浓度MS、IBA、BA 对平邑甜茶叶盘愈伤组织诱导的效果

培养基代 号	培养基成分	质量浓度/(mg·L ⁻¹)		接种数	出愈数	出愈率/%
		IBA	BA			
A ₁	MS	0.20	2.0	60	42	70.0
A ₂	MS	0.10	1.0	60	8	13.3
A ₃	MS	0.05	0.5	60	10	16.7
A ₄	4/5 MS	0.20	1.0	52	32	61.5
A ₅	4/5 MS	0.10	0.5	60	32	53.3
A ₆	4/5 MS	0.05	2.0	60	28	46.7
A ₇	1/2 MS	0.20	0.5	59	55	93.2
A ₈	1/2 MS	0.10	2.0	56	43	76.7
A ₉	1/2 MS	0.05	1.0	51	34	66.6

2.2 分化培养基的筛选

2.2.1 叶盘分化培养基的筛选 叶片在愈伤培养基上黑暗培养35 d 后,或不经愈伤直接转入MS 附加不同质量浓度激素的分化培养基中,光下培养35 d 后统计分化率,结果见表2。

表2 平邑甜茶叶盘在不同培养基上的分化情况

培养基代号	质量浓度/(mg·L ⁻¹)			接种数	出愈数	分化率/%
	BA	IBA	NAA			
C ₁	1.0	0.05	—	62	7	11.2(经愈伤)
				70	7	10.0(未经愈伤)
C ₂	1.0	0.20	—	55	9	16.3(经愈伤)
				60	8	13.3(未经愈伤)
C ₃	1.0	—	0.2	56	4	7.1(经愈伤)
				57	4	7.0(未经愈伤)
C ₄	2.0	0.20	—	60	1	1.7(经愈伤)
				77	1	1.3(未经愈伤)
C ₅	2.0	—	0.2	55	2	3.6(经愈伤)
				58	2	3.4(未经愈伤)

表2 统计结果表明,各种激素和对比对平邑甜茶芽的分化效果较差,分化率普遍偏低,用ZT 代替BA 或部分取代BA 分化率均未能有所改善,寻求更有效的诱导芽的激素和配比是解决这一问题的关键。本试验中经愈伤后芽的分化率略有提高,但差异不大,这与已有的研究^[4~6]结果一致,说明芽的分化与愈伤与否没有必然联系。在已有的培养基中,BA 1.0 mg/L、IBA 0.20 mg/L 的激素配比对于叶片的分化较为适宜。

2.2.2 茎尖分化培养基的筛选 芽加长生长成茎尖后,以MS 培养基附加不同质量浓度

BA、IBA 及不同的吸附剂组成 9 种配方,培养 1 d 后,转入无吸附剂的相应培养基中,培养 35 d 后统计分化率,结果(如表 3 所示)发现,随着 BA 质量浓度升高,外植体玻璃化严重,含 1.5 mg/L BA 培养基上的外植体只具芽丛,叶片内卷,梢部呈水浸状,因而较适宜的 BA 质量浓度为 0.5 mg/L, D₁、D₂ 培养基具有中等偏高的增殖倍数,且植株生长正常,是茎尖分化的适宜培养基。试验结果表明,外植体在培养过程中褐变现象严重,加入吸附剂活性炭或 8-羟基喹啉可明显防止褐变。

表 3 平邑甜茶茎尖在不同培养基上的分化情况

培养基代号	BA 质量浓度/ (mg · L ⁻¹)	IBA 质量浓度/ (mg · L ⁻¹)	增殖倍数	生长状况
D ₁	0.5	0.1	5.13	正常
D ₂	0.5	0.2	3.40	正常
D ₃	0.5	0.5	1.76	少数玻璃化
D ₄	1.0	0.1	3.20	部分玻璃化
D ₅	1.0	0.2	4.76	部分玻璃化、基部褐变
D ₆	1.0	0.5	2.23	部分玻璃化
D ₇	1.5	0.1	5.40	80%以上玻璃化,褐变死亡
D ₈	1.5	0.2	4.50	80%以上玻璃化,基部褐变
D ₉	1.5	0.5	3.20	80%以上玻璃化,基部褐变

2.3 生根培养基的筛选

来源于同一培养基上的试管苗茎段,接种在 1/2 MS 附加 0.0.1,0.2 和 0.5 mg/L IBA 的培养基上,每种培养基接 50 个以上长度大于 1.5 cm 且生长健壮的茎段,35 d 后统计生根情况,结果见表 4。

表 4 不同质量浓度 IBA 对试管苗茎段生根的影响

培养基代号	IBA 质量浓度/ (mg · L ⁻¹)	接种数	生根茎尖数	生根率/%	平均根数	平均根长/cm
F ₁	0.1	56	50	89.2	5.4	1.53
F ₂	0.2	55	47	85.4	6.5	0.97
F ₃	0.5	58	49	84.5	7.1	0.79
F ₄	1.0	63	19	30.2	2.20	0.56

由表 4 可知,IBA 质量浓度为 0.1~0.5 mg/L 时,随着 IBA 质量浓度的上升,生根率和平均根长都明显下降,平均根数上升且都在 5 条以上。但 IBA 质量浓度高于 1.0 mg/L 时,生根率、平均根长、平均根数均较低。生根率和平均根长均以 F₁ 处理为最高,分别达到 89.6% 和 1.53 cm,平均根数较多,因而 F₁ 是最佳的生根培养基。

3 讨 论

由本研究结果可以看出,平邑甜茶叶盘分化较为困难。据研究发现,苹果砧木圆叶海棠的叶盘分化率达 60%~80%^[4],三倍体的乔纳金叶盘的再生频率达 100%^[7],富士品种叶片分化率则达 90% 以上^[5],本试验中平邑甜茶的叶片分化率仅为 16%,这可能与材料的基因型有关,还有待于进一步研究。用于遗传转化的组织培养再生系统,其外植体的再生频率至少要在 80%~90% 以上。因此,平邑甜茶茎尖比叶盘更适宜作为遗传转化的受

体材料。

[参考文献]

- [1] Ishisara A. Plant regeneration via leaf culture in apple rootstock *Malus prumifolia* Borkh[J]. Abstract of Japan Soc Hort Sci Autumn Meet, 1981, 42—43.
- [2] 吴国栗, 陈国秀. 苹果及其砧木茎尖培养研究进展[J]. 北方园艺, 1992, (5): 23—28.
- [3] 达克东, 李雅志, 束怀瑞. 苹果叶片愈伤组织植株再生研究[J]. 核农学报, 1995, 9(3): 139—143.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 赵政阳, 傅润民, 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.
- [7] 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.

Study on the regeneration of *Malus hupehensis* Rehd.

ZHANG Jun-ke¹, SHEN Xiang², CAO Qing-qin², LI Ying², LI Jia-rui¹

(1 Department of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Department of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Conditions influencing regeneration by leaf disk of Pingyitiancha (*Malus hupehensis* hd.) were studied. The result showed that the optimum concentrations of benzyladenine (BA) and Indole-3 butyric (IBA) for Pingyitiancha leaf disk callus inducing and differentiation were 0.5—1.0 mg/L and 0.2 mg/L respectively. 35-days dark culture was needed during callus inducing. The optimum medium for shoot-tip differentiation was MS supplemented with BA 0.5 mg/L and IBA 0.1—0.2 mg/L. The optimum medium for rooting was 1/2MS supplemented with IBA 0.1 mg/L.

Key words: *Malus hupehensis* Rehd.; tissue culture; plant regeneration; leaf disk method