

硝酸银对中国李原生质体分离和培养的影响^{*}

赵昌杰¹, 马锋旺², 徐凌飞²

(1 中央民族大学 生命与环境科学学院, 北京 100081; 2 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 以种胚愈伤组织为试材, 研究了硝酸银对中国李原生质体分离和培养效果的影响。结果表明, 在酶解液中加入 4~10 mg/L 质量浓度的硝酸银, 可提高原生质体的活力, 其中以 8 mg/L 的效果最好, 原生质体的活力比对照提高 21.1%, 但其对原生质体产量无明显作用。在培养基中加入 4~8 mg/L 质量浓度的硝酸银, 原生质体的分裂频率和植板率分别比对照增加 19.85%~38.24% 和 9.23%~36.53%。硝酸银对愈伤组织不定芽的再生能力也具有明显的促进作用。

[关键词] 中国李; 原生质体培养; 硝酸银

[中图分类号] S662.303.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)06-0100-03

近年来, 果树原生质体培养研究取得了很大进展^[1]。但大多数果树只有少数基因型的原生质体培养获得了再生植株, 如何提高原生质体的分裂频率和愈伤组织再生频率, 仍是需要解决的重要问题。培养基中的生长素会促进乙烯的产生, 密闭的培养容器会使乙烯逐渐累积, 累积的乙烯可使培养物的生长分化受到影响^[2]。据报道^[3,4], 硝酸银可抑制乙烯的合成, 从而促进愈伤组织再生芽的能力。在培养基中加入硝酸银, 可以明显提高青菜下胚轴和子叶的不定芽分化频率^[5]及梨叶片的再生频率^[6]。本试验通过在酶解液和培养基中加入硝酸银, 旨在研究硝酸银对中国李原生质体分离和培养效果的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为中国李 (*Prunus salicina* Lindl.) 品种“晚红李”的种胚愈伤组织, 继代培养基为改良 MS (1/2 NH_4NO_3) 附加 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L BA, 30 g/L 蔗糖和 6.0 g/L 琼脂, pH 为 5.8。

1.2 方法

参照马锋旺等^[7]的方法进行原生质体的分离和培养。酶液组成为 CPW 盐 + 10 mg/L Cellulase Onzuka R-10 + 50 mg/L Macerozyme R-10 + 10 mg/L Hemicellulase + 0.7 mol/L 甘露醇, 酶解 12

h。原生质体培养的培养基为改良 MS 基本培养基附加 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L BA 和 0.55 mol/L 葡萄糖, 在培养过程中每 10 d 以 3:1 (原生质体培养基: 无渗透压调节剂培养基) 比例加入无渗透压调节剂培养基, 逐步降低渗透压。原生质体培养的植板密度为 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。原生质体培养形成的微愈伤组织转入固体培养基中, 继代培养 4 次后, 转入附加 3.0 mg/L BA 和 0.05 mg/L IAA 的改良 MS 分化培养基上诱导不定芽。硝酸银溶液过滤灭菌后, 在培养基温度小于 60℃ 时加入。原生质体培养基只在开始培养时加入硝酸银, 添加的新鲜培养基不再加入。愈伤组织在含硝酸银的分化培养基中培养 15 d 后, 转入无硝酸银的新鲜培养基。培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 除愈伤组织的分化在 4 000 lx 光强和 15 h/d 光照的光周期下培养外, 其余过程均在黑暗条件下进行。

2 结果与分析

2.1 硝酸银对原生质体分离的影响

在酶解液中分别加入 0, 4, 6, 8, 10 mg/L 的硝酸银, 比较不同质量浓度硝酸银对中国李原生质体分离效果的影响。由表 1 可以看出, 硝酸银对原生质体的产量没有明显影响, 但对提高原生质体活力有明显效果, 其中以 8 mg/L 效果最好, 其原生质体活

* [收稿日期] 2003-03-10

[作者简介] 赵昌杰(1964—), 男, 山东聊城人, 讲师, 硕士, 主要从事生物技术研究。

力显著高于对照和 4, 6 mg/L 两种质量浓度的处理, 但与 10 mg/L 质量浓度处理无显著差异。

表 1 硝酸银对中国李原生质体分离的影响

Table 1 Effects of silver nitrate on protoplast isolation of *P. salicina*

硝酸银质量浓度/(mg · L ⁻¹) Silver nitrate concentration	原生质体产量/(10 ⁶ 个 · g ⁻¹) Yield	原生质体活力/% Viability
0	8 32 a	70 2 c
4	8 78 a	76 8 bc
6	8 38 a	85 4 bc
8	8 86 a	91 3 a
10	8 46 a	88 6 ab

注: 邓肯氏多重极差测验差异显著 ($P=0.05$), 同一栏字母不同者表示差异显著。

Note: Significant difference according to Duncan's multiple rang test ($P=0.05$).

2.2 硝酸银对原生质体培养的影响

在培养基中分别加入 0, 4, 6, 8, 10 mg/L 硝酸银, 测定不同质量浓度硝酸银对原生质体培养效果的影响。试验结果(表 2)表明, 硝酸银对提高原生质体初始分裂和持续分裂能力均有显著作用。其中, 对

分裂频率的影响效果以 8 mg/L 处理最为显著, 而对植板率的效果则以 4 和 6 mg/L 处理最好。由于衡量原生质体培养效果的最终指标是植板率(即形成细胞团的数量), 因此可以断定, 在中国李原生质体培养时, 加入 6~ 8 mg/L 硝酸银的效果最好。

表 2 硝酸银对中国李原生质体培养的影响

Table 2 Effects of silver nitrate on protoplast culture of *P. salicina*

硝酸银质量浓度/(mg · L ⁻¹) Silver nitrate concentration	分裂频率/% Division frequency	植板率/% Plating frequency
0	13 6 c	2 71 bc
4	16 3b	3 68 a
6	17 6 ab	3 70 a
8	18 8 a	2 96 b
10	17 1 ab	2 32 c

2.3 硝酸银对愈伤组织再生芽的影响

在愈伤组织分化培养基中分别加入 0, 2, 6, 10 mg/L 的硝酸银, 培养 15 d 后, 转入不含硝酸银的新鲜培养基中, 芽的再生率分别为 7. 5%, 12. 5%, 19. 5% 和 17. 1%, 这一结果说明, 硝酸银可明显促进芽的再生。

动细胞分裂, 而高的植板密度会加重乙烯的累积。因此, 在原生质体培养过程中, 应采取减少乙烯累积的措施。本试验在酶解液和培养基中加入硝酸银, 提高了原生质体活力和培养效果。同时, 对愈伤组织再生芽的能力也具有明显的促进作用。这种作用很可能是由于硝酸银减少了乙烯的累积, 防止了原生质体的老化所致。同时, 硝酸银的这种作用也可能与多胺的合成有关, 因为多胺可提高原生质体的分裂频率^[8]和器官的发生能力^[9], 而硝酸银的存在则使乙烯不能干扰多胺的合成, 从而提高了多胺的含量^[10]。

3 讨 论

离体培养过程中会产生乙烯并逐渐累积, 累积的乙烯可使培养物的生长分化受到影响。在原生质体培养时, 只有当植板密度达到一定程度后才能启

[参考文献]

[1] 马锋旺, 李嘉瑞. 落叶果树原生质体培养和融合研究进展[J]. 西北农业学报, 1998, 7(6): 122- 125

[2] Lentini Z, Mussel H, Mutschler M A, et al. Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development *in vitro* rapid-cycling *B. rassaica campestris* L. [J]. Plant Sci, 1981, 54(1): 75- 80

[3] Palmer C E. Enhanced shoot regeneration from *B. rassaica campestris* by silver nitrate[J]. Plant Cell Rep, 1992, 11: 541- 546

[4] Songstad D D, Duncan D R, Widholm J M. Effects of 1-aminocyclopropane carboxylic acid, silver nitrate and morbornadiene on plant regeneration[J]. Plant Cell Rep, 1988, 7: 262- 267

[5] 徐淑平, 卫志明, 黄健秋. 青菜的高效再生和农杆菌介导B. t 及CpTI基因的转化[J]. 植物生理与分子生物学报, 2002, 28(4): 253- 260

[6] 徐凌飞, 马锋旺, 王苗之, 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

[7] 马锋旺, 李嘉瑞. 中国李原生质体培养及植株再生[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(3): 61- 65

[8] Wu S C, Kumiyuki A H. Isolation and culture of almond protoplasts[J]. Plant Sci, 1985, 41(1): 55- 60

- [9] 崔凯荣, 陈克明, 王晓哲, 等. 植物体细胞胚胎发生研究的某些现状[J]. 植物学通报, 1993, 10(3): 14- 17.
- [10] 张 鹏, 傅爱根, 王爱国. AgNO_3 在植物离体培养中的作用及可能的机制[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(5): 376- 379.

Effects of silver nitrate on protoplast isolation and culture of *Prunus salicina*

ZHAO Chang-jie¹, MA Feng-wang², XU Ling-fei²

(1 College of Life and Environment Science, Central University for Nationalities, Beijing 100081, China;

2 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of silver nitrate on protoplast isolation and culture of *Prunus salicina* variety "Wanhongli" were studied by using calli derived from embryos. The results showed that the addition of silver nitrate to enzyme solution at the concentration of 4- 10 mg/L increased the viability of protoplasts, and the most effective concentration was 8 mg/L. At this concentration, the viability of protoplasts was 21. 1% higher than that of control. No effect of silver was found on the yield of protoplasts. The division frequency and plating frequency of protoplasts were increased 19. 85% - 38. 24% and 9. 23% - 36. 53% respectively by adding 4- 8 mg/L silver nitrate. Stimulation of shoot regeneration from calli was also found when silver nitrate was added to the culture medium.

Key words: *Prunus salicina*; protoplast culture; silver nitrate

· 简 讯 ·

西北农林科技大学主持完成的农业部科技跨越计划项目 “西部黄土高原生态农业模式示范”通过部级成果鉴定

由西北农林科技大学博士生导师杨改河教授主持完成的农业部科技跨越计划项目“西部黄土高原生态农业模式示范”, 日前通过了部级成果鉴定。该项目实施 3 年来, 首次研究和总结出适合黄土高原地区推广应用的以动态高效沼气技术为核心的“三位一体”(包括圈、厕、棚、沼“三结合”的生态庭院模式和畜牧小区生物净化与综合利用模式)、“四位一体”(圈、棚、沼、菜(果)“四位一体”生态温棚模式)和“五位一体”(圈、窑、灌、沼、果“五配套”生态果园模式)3 种能源生态农业模式。并对三种能源生态农业模式涉及的要素及其结构进行了优化, 形成了完善的能源生态农业模式设计、建设、运行和科学管理理论体系。针对静态发酵沼气池存在的技术问题, 该课题组研制了包含自动搅拌、循环、破壳、出料、增温、微生物成膜、消短除盲、两步发酵等八大动态沼气发酵新技术的 2 种动态高效沼气池, 并研究制订了户用动态发酵沼气池发酵工艺规程和施工操作规程, 为沼气生态农业模式的规范化、标准化推广应用提供了强有力的技术支撑, 形成了可操作性强的西北能源生态农业模式配套技术体系。

在陕西省陇县的 3 乡 5 村创建高效沼气生态示范户 482 户, 年增产粮食 5. 9 万 kg, 年新增存栏牲畜 4 980 头, 年新增总产值 412. 7 万元, 保护薪炭林面积 300 多 hm^2 。改善了农村生活环境, 提供了新的物质循环和能量流动渠道, 提高了土壤肥力, 取得了显著的经济、生态和社会效益。鉴定委员会一致认为, 该项目在实践和理论上均有较大发展, 为西部生态农业模式的推广应用奠定了坚实的基础, 对农业和农村经济的发展具有重要的理论和实践意义, 项目研究和应用总体达到国内领先水平, 部分核心技术达到国际领先水平。

(温晓平 供稿)