

桃叶片再生不定芽的研究

田国栋,张荷芃,康卓慧,赵彩平,韩明玉,刘航空,田 英

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】研究桃叶片再生不定芽的影响因子,建立并优化叶片再生体系。【方法】以桃品种“布目早生”、“甜桃王”、“瑞江”和优系“97-8-4”组培苗叶片为试材,研究基因型、叶龄、叶片不同部位、基本培养基及生长调节剂对不定芽再生的影响。【结果】不同基因型叶片的不定芽再生率差异较大,“97-8-4”和“甜桃王”不定芽再生率均较高,“布目早生”次之,“瑞江”的叶片不能再生;叶片在不同培养基中再生不定芽的效果不同,以 LP 培养基的再生效果较好;不同成熟度的叶片再生不定芽的能力不同,完全展开幼嫩叶片的再生效果较好;叶片不同部位产生不定芽的能力不同,叶柄和叶片基部的再生效果较好;叶片暗培养时最适的生长调节剂组合为 2.0 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA,光培养时最适的 BA 质量浓度为 4.0~6.0 mg/L,BA 与 NAA 适宜的质量浓度比为 30:1~60:1。“97-8-4”、“甜桃王”和“布目早生”完全展开的幼嫩叶片在最适培养条件下的不定芽再生率分别为 18.33%,16.67%和 13.33%。【结论】桃叶片再生不定芽受内外因素的共同影响,基因型和叶片外植体的生理状态是不定芽再生的关键内在因素,培养基及附加的生长调节剂是不定芽再生的关键外在因素。

【关键词】 桃;叶片;离体再生;不定芽

【中图分类号】 S662.104+.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)02-0125-08

Study on shoot regeneration from leaf explants in peach

TIAN Guo-dong,ZHANG He-peng,KANG Zhuo-hui,ZHAO Cai-ping,

HAN Ming-yu,LIU Hang-kong,TIAN Ying

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

Abstract: 【Objective】 Factors affecting shoot regeneration from leaf explants *in vitro* were investigated in peach in order to establish and optimize shoot regeneration system. 【Method】 Experiment was conducted with “Bumenzaosheng”, “Tiantaowang”, “Ruijiang” and “97-8-4” as test materials to study the effects of different genotypes, and different leaf ages, different basic media, different growth regulators on shoot regeneration of leaf explants from tissue culture plantlets in peach. 【Result】 Shoot regenerating rate differed greatly from leaf explants in different genotypes. Leaf explants of “97-8-4” and “Tiantaowang” showed high shoot regeneration rate. Leaf explants of “Bumenzaosheng” were less efficient. Leaf explants of “Ruijiang” was unable to regenerate. Shoot regenerating rate was different in different basic media and LP was the optimum basic medium for shoot regeneration. Shoot regenerating rate differed from leaf explants in different maturity and the fully expanding young leaf was the optimum explant for shoot regeneration. Shoot regenerating rate was different from different parts of leaf explants. The petiole and the base of leaf were efficient for shoot regeneration. In dark culture the optimum growth regulators were 2.0 mg/L BA with 0.2 mg/L NAA for shoot regeneration. In dark-light culture, the optimum growth regulators were

* [收稿日期] 2010-06-19

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2008ZDKG-08);陕西省科技攻关项目(2008K01-11);西北农林科技大学唐仲英育种基金项目

[作者简介] 田国栋(1985—),男,山西太原人,在读硕士,主要从事桃组织培养和遗传育种研究。E-mail:313802776@qq.com

[通信作者] 韩明玉(1962—),男,陕西扶风人,教授,硕士生导师,主要从事果树遗传育种和生理研究。

E-mail:hanmy@nwsuaf.edu.cn

4.0—6.0 mg/L BA and the concentration of BA/NAA was 30 : 1—60 : 1. Shoot regenerating rate from fully expanding young leaf explants of “97-8-4”, “Tiantaowang” and “Bumuzaosheng” was 18. 33%, 16. 67% and 13. 33% under optimum culture condition, respectively. 【Conclusion】Shoot regeneration was affected by internal and external factors from leaf explants in peach. The genotype and the physiological state of leaf explants were the crucial internal factors for shoot regeneration. The basic medium and the growth regulators were the crucial external factors for shoot regeneration.

Key words: peach; leaf explant; regeneration *in vitro*; shoot

转基因及遗传转化技术是当今重要的一种遗传育种方法,其可以解决多年生果树育种周期长及耗时费力等问题,而高效稳定的再生体系是转基因技术的基础。目前,已有较多以桃幼胚、胚轴、子叶等为外植体的离体再生的研究和报道^[1-4],“京艳”和“97-8-4”的下胚轴再生率高达 90% 以上^[5-6]。但幼胚及各部分的取材时期较短,遗传背景不明确,会给转化后的检测带来困难。叶片来源广泛,取材受季节限制小,遗传背景相对明确,是遗传转化的良好受体,但对桃叶片再生的研究进展尚比较缓慢。2002 年,Gentile 等^[7]首次用桃叶片成功再生出不定芽,其利用“P16Cl5”、“842 Standard”、“Babygold 6”、“San Giorgio”和“Yumyeong”的微茎尖(2 mm)预培养 40 d 长成苗上的叶片再生出不定芽,再生率为 12.8%~22%;用“842 Standard”微茎尖长期预培养苗的叶片再生出不定芽,再生率达 28.3%。2006 年,刘航空等^[8]获得桃品种“华光”叶片的不定芽,再生率为 8%。2009 年,丛芳等^[9]发现“金童 5 号”和“曙光”叶片具有较强的再生能力,再生率分别为 21.8%和 14.5%。综观现有研究成果,目前报道的桃叶片再生率仍然较低,尚不能满足转基因技术的要求。为此,本试验以桃叶片为外植体进行不定芽再生的研究,以期探明影响桃叶片再生的关键因素,建立高频的叶片再生体系,旨在为今后桃转基因技术的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

以桃品种“布目早生”、“甜桃王”、“瑞江”和“97-8-4”(优系)继代培养的试管苗叶片为试材,继代培养基为 MS+1.0 mg/L BA + 0.03 mg/L NAA。

1.2 方 法

取组培苗继代 20 d 的叶片(带叶柄),在叶片的上、中、下部沿中脉方向垂直划伤 3 刀,正面向下(未展开和未完全展开叶片背面向下)接种于愈伤组织诱导培养基中进行暗培养,3 周后,将诱导出的愈伤

组织接种于不定芽分化培养基中,于光下进行培养。

1.2.1 基本培养基的筛选 基本培养基使用 MS、G 和 LP 3 种培养基。暗培养时将展开的幼嫩叶片接种于基本培养基中,其中附加 2.0 mg/L BA 和 0.2 mg/L NAA;光培养时在基本培养基中附加 6.0 mg/L BA 和 0.2 mg/L NAA,筛选适宜叶片再生的基本培养基。

1.2.2 叶龄对叶片再生的影响 分别取试管苗上部未展开幼嫩叶片、未完全展开幼嫩叶片、完全展开幼嫩叶片及中下部较成熟叶片(带叶柄)进行培养,暗培养时的培养基为 LP+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA,光培养时的培养基为 LP+6.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA,筛选适宜再生的叶片外植体。

1.2.3 叶片不同部位对不定芽再生的影响 将展开的幼嫩叶片接种于培养基中,暗培养和光培养的培养基同 1.2.2,比较叶片上部、中部、基部和叶柄再生不定芽的差异。

1.2.4 生长调节剂的筛选 (1)暗培养时生长调节剂的筛选。植物生长调节剂为细胞分裂素类 BA 和 TDZ 及生长素类 NAA 和 2,4-D。暗培养时将展开的幼嫩叶片接种于 LP 培养基中,附加不同质量浓度的 TDZ (0.5,1.0,2.0,3.0 mg/L)或 BA(0.5,1.0,2.0,3.0 mg/L),配合不同质量浓度的 NAA (0.05,0.1,0.2,0.3 mg/L)或 2,4-D(0.01,0.05,0.1,0.2,0.3 mg/L),其具体组合见表 1,光培养时的培养基为 LP+6.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA。观察不同植物生长调节剂配比对离体叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响。

(2)光培养时生长调节剂的筛选。暗培养的基本培养基为 LP+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA,光培养的基本培养基为 LP,附加不同质量浓度的 BA(2.0,4.0,6.0 mg/L)和 NAA(0,0.05,0.1,0.2 mg/L),其具体组合见表 2。观察生长调节剂配比对愈伤组织分化产生不定芽的影响。

表 1 暗培养时生长调节剂的组成

Table 1 Different type&-concotrations of growth regulators used in dark culture

处理编号 No. of treatment	细胞分裂素/(mg · L ⁻¹) Cytokinin		生长素/(mg · L ⁻¹) Auxin		处理编号 No. of treatment	细胞分裂素/(mg · L ⁻¹) Cytokinin		生长素/(mg · L ⁻¹) Auxin	
	BA	TDZ	NAA	2,4-D		BA	TDZ	NAA	2,4-D
1	0.5		0.05		9	0.5			0.05
2	1.0		0.1		10	1.0			0.1
3	2.0		0.2		11	2.0			0.2
4	3.0		0.3		12	3.0			0.3
5		2.0	0.05		13		0.5		0.2
6		2.0	0.1		14		1.0		0.1
7		2.0	0.2		15		2.0		0.05
8		2.0	0.3		16		3.0		0.01

1.2.5 不定芽的增殖培养 将再生的不定芽接种于 MS +1.0 mg/L BA + 0.03 mg/L NAA 的培养基中进行增殖培养,25 d 后统计增殖系数。

表 2 光培养时生长调节剂的组成

Table 2 Different types&-concetrations of growth regulators used in dark light culture

处理编号 No. of treatment	植物生长调节物质/(mg · L ⁻¹) Growth regulator		处理编号 No. of treatment	植物生长调节物质/(mg · L ⁻¹) Growth regulator	
	BA	NAA		BA	NAA
CK1	0	0	B6	4.0	0.05
CK2	0	0.1	B7	4.0	0.1
B1	2.0	0	B8	4.0	0.2
B2	2.0	0.05	B9	6.0	0
B3	2.0	0.1	B10	6.0	0.05
B4	2.0	0.2	B11	6.0	0.1
B5	4.0	0	B12	6.0	0.2

培养条件为:愈伤组织诱导培养基中含蔗糖 25 g/L,不定芽再生培养基中含蔗糖 30 g/L,培养基中加入琼脂 6.5 g/L。培养室温度 24~28 ℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

1.2.6 试验数据的处理与分析 每个处理至少取 60 个叶片,记录外植体的生长状态及愈伤组织形态,统计愈伤组织的诱导率及不定芽再生率。

愈伤组织诱导率=诱导愈伤组织的外植体个数/接种的外植体个数×100%;

不定芽再生率=再生出不定芽的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数×100%;

增殖率=可以增殖的不定芽数/接种的不定芽数×100%;

增殖系数=增殖后总的有效芽数(≥1 cm)/接种的芽数。

试验数据使用 DPS 7.05 软件进行单因子方差分析,采用 Duncan 氏新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 桃叶片不定芽的发生动态

接种 7 d 后,叶片膨大,划伤处向上隆起,叶柄

处开始形成浅黄色愈伤组织(图 1-A),随后渐渐在划伤处主要在中脉及附近形成愈伤组织,并不断扩增。暗培养 21 d 后转入光下培养,愈伤组织变绿(图 1-B);光培养约 14 d 后,叶柄和叶片中部、基部的致密颗粒状或球状的愈伤组织上开始产生不定芽(图 1-C~G);在光下培养 45 d 后大部分愈伤组织褐化较为严重(图 1-H),且不产生不定芽。

2.2 基因型对桃叶片再生的影响

由表 3 可以看出,基因型对桃叶片愈伤组织诱导和不定芽再生有很大影响,“97-8-4”和“甜桃王”叶片愈伤组织诱导率分别可达 96.67% 和 100.00%,不定芽再生率也较高,而“布目早生”的不定芽再生率较低,“瑞江”则不能再生出不定芽。

2.3 基本培养基对桃叶片再生的影响

表 4 表明,不同基本培养基对“97-8-4”叶片愈伤组织产生和不定芽再生有较大影响,叶片在 3 种培养基中均可诱导出愈伤组织,其中以 MS 的诱导率最高,LP 次之;但 LP 中不定芽再生率最高,可达 18.33%,显著高于 MS 和 G 培养基。该结果表明,最适于愈伤组织诱导的培养基不一定是 不定芽再生的最佳培养基。

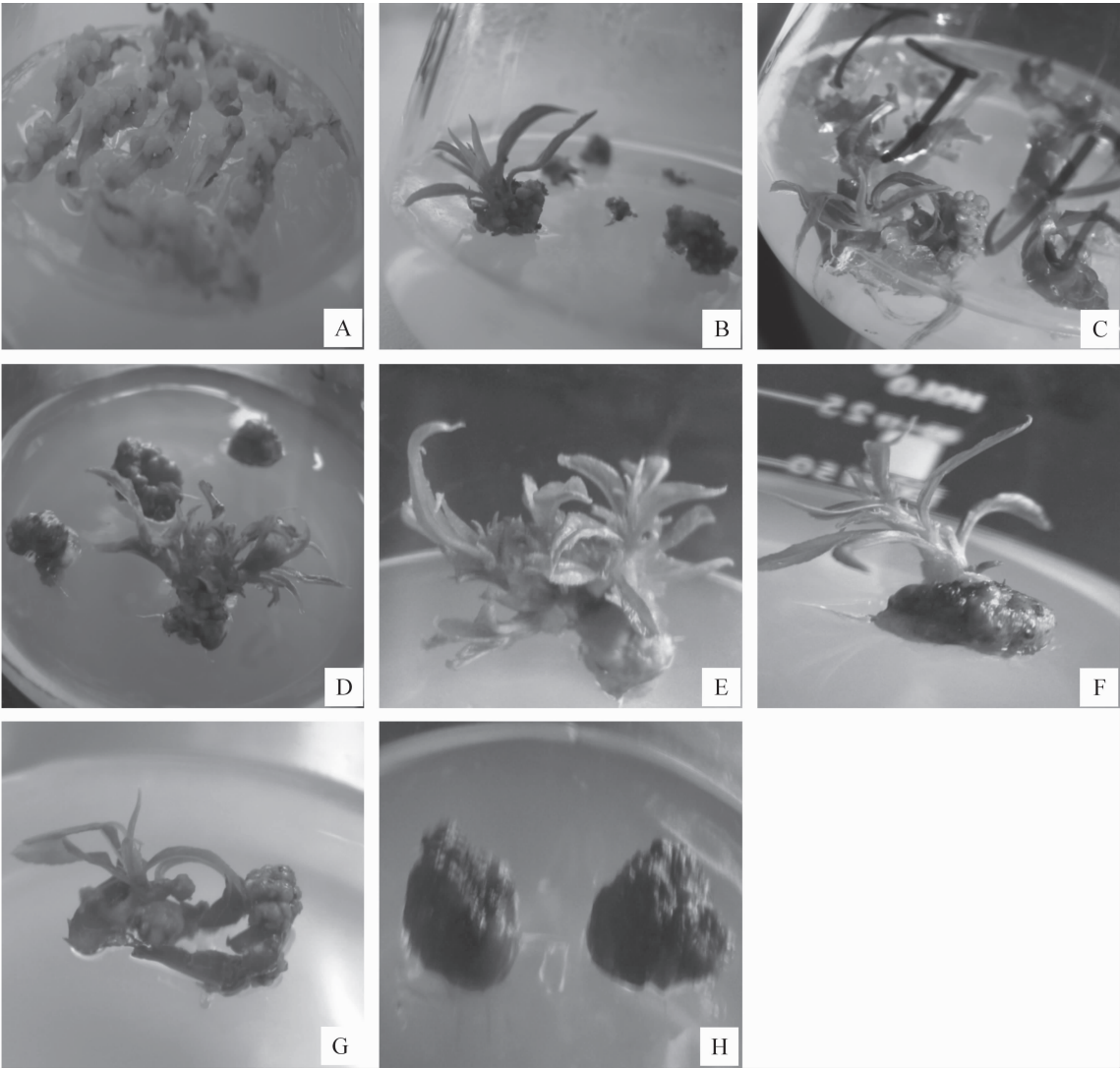


图 1 桃叶片不定芽的发生动态

A. 叶片暗培养阶段产生的愈伤组织;B. “布目早生”愈伤组织再生出的不定芽(光培养 13 d);C,D. “甜桃王”愈伤组织再生出的不定芽(光培养 6 d);E. “97-8-4”球粒状愈伤组织再生出的丛状不定芽(光培养 10 d);F. “97-8-4”球状愈伤组织再生出的单个不定芽(光培养 30 d);G. “97-8-4”颗粒状愈伤组织再生出的丛状不定芽(光培养 18 d);H. 严重褐化的愈伤组织

Fig. 1 Occurrence and developing process of adventitious shoots from peach leaf explants

A. Callus was induced from leaves *in vitro* in dark culture;B. Shoot regenerated from callus of “Bumzaosheng” on the 13rd day in dark-light culture;C,D. Shoot regenerated form callus of “Tiantaowang” on the 6th day in dark-light culture;E. Multiple shoots regenerated from spherulitic callus of “97-8-4” on the 10th day in dark-light culture;F. Shoot regenerated form globular callus of “97-8-4” on the 30th day in dark-light culture;G. Shoots regenerated from granular callus of “97-8-4” on the 18th day in dark-light culture;H. Callus turned brown seriously

表 3 基因型对桃离体叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响

Table 3 Effect of different genotypes on callus induction and shoots regeneration of peach leaves *in vitro* %

基因型 Genotype	愈伤组织诱导率 Callus inducing rate	不定芽再生率 Shoot regenerating rate	基因型 Genotype	愈伤组织诱导率 Callus inducing rate	不定芽再生率 Shoot regenerating rate
布目早生 Bumzaosheng	96.67 a	10.00 b	甜桃王 Tiantaowang	100.00 a	16.67 a
97-8-4	96.67 a	18.33 a	瑞江 Ruijiang	91.67 b	0.00 c

注:同列数据后标不同字母者表示邓肯氏新复极差测验在 0.05 水平差异显著。下表同。

Note:Different letters following the figures in the same columns mean significant differences based on the Duncan’s multiple range test ($P<0.05$). The same as below table.

表 4 基本培养基对桃离体叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响

Table 4 Effect of different media on callus induction and shoots regeneration of peach leaves <i>in vitro</i>						%		
培养基 Medium	愈伤组织诱导率 Callus inducing rate	不定芽再生率 Shoot regenerating rate	培养基 Medium	愈伤组织诱导率 Callus inducing rate	不定芽再生率 Shoot regenerating rate	培养基 Medium	愈伤组织诱导率 Callus inducing rate	不定芽再生率 Shoot regenerating rate
MS	100.00 a	11.67 b	LP	96.67 a	18.33 a	G	91.67 b	5.00 c

注：供试材料的基因型为“97-8-4”，表 5~7 同。
Note:The genotype of leaf explants was “97-8-4”. The same as table 5—7.

2.4 叶龄对桃叶片再生的影响

由表 5 可以看出，不同成熟度“97-8-4”叶片产生愈伤组织和分化不定芽的能力不同，完全展开幼嫩叶片的愈伤组织诱导率最高，不定芽再生率也最高；未完全展开幼嫩叶片的愈伤组织诱导率较高，可以再生出不定芽；未展开幼嫩叶片和较成熟叶片的愈伤组织诱导率均较低，且均不能再生出不定芽。

表 5 叶龄对桃离体叶片愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

Table 5 Effect of leaf age on callus induction and shoot regeneration of peach leaves <i>in vitro</i>			%		
叶 龄 Leaves in different ages		愈伤组织诱导率 Callus inducing rate	不定芽再生率 Shoot regenerating rate		
未展开幼嫩叶片 Un-expanding young leaves		71.67 c	0.00 b		
未完全展开幼嫩叶片 Un-fully expanding young leaves		83.33 b	3.33 b		
完全展开幼嫩叶片 Fully expanding young leaves		96.67 a	18.33 a		
较成熟叶片 Relatively mature leaves		75.00 c	0.00 b		

2.5 桃叶片不同部位产生愈伤组织和不定芽的差异

同一叶片的不同部位经诱导产生愈伤组织和不定芽的能力不同。由表 6 可见，叶柄的愈伤组织诱导率和不定芽再生率均最高；叶片基部和中部愈伤组织诱导率相同，但基部的不定芽再生率高于中部；叶片上部可以诱导出愈伤组织，但不能再生出不定芽。

表 6 桃叶片不同位置对愈伤组织产生和不定芽再生的影响

Table 6 Effect of leaf position on callus induction and shoot regeneration of peach leaves <i>in vitro</i>						%		
叶片位置 Position of the leaves		愈伤组织诱导率 Callus inducing rate	不定芽再生率 Shoot regenerating rate	叶片位置 Position of the leaves		愈伤组织诱导率 Callus inducing rate	不定芽再生率 Shoot regenerating rate	
叶片上部 Upper part of leaf		80.00 b	0.00 c	叶片基部 Basic part of leaf		93.33 a	10.00 b	
叶片中部 Middle part of leaf		93.33 a	8.33 b	叶柄 Petoile		96.67 a	16.67 a	

2.6 生长调节剂对桃叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响

不同生长调节剂组合对桃离体叶片愈伤组织诱导率、愈伤组织形态、愈伤量和不定芽再生率均有较大影响。

2.6.1 暗培养 表 7 表明，不论使用的细胞分素是 BA(处理 1~4)还是 TDZ(处理 5~8)，随着 NAA 质量浓度的升高，叶片愈伤组织诱导率和每个叶片产生的愈伤量总体呈上升趋势，且 NAA 质量浓度越高愈伤结构越致密。

NAA 易于诱导出较致密或致密的颗粒状、球状、球粒状的有效愈伤，而 2,4-D 易于诱导疏松和较疏松的无效愈伤。生长素为 NAA 的处理 2,3,4,6,7 诱导出的是较致密或致密的有效愈伤，并均可以诱导产生不定芽，其中处理 3 的不定芽再生率最高，可达 18.33%；处理 1 诱导出的是较疏松的颗粒状愈伤组织，在光培养的培养基中变成较致密的颗粒

状，可以产生少量不定芽；处理 8 诱导出的愈伤组织坚硬、过于致密，不能诱导产生不定芽，可能是由于 NAA 质量浓度过高时，其对愈伤组织中不定芽的分化有一定抑制作用。

使用生长素 2, 4-D 时，当细胞分裂素 BA 与 2,4-D 质量浓度比值一定(处理 9~12)时，随着 2, 4-D 质量浓度的升高，每个叶片的愈伤量总体呈上升趋势，且 2,4-D 质量浓度越高愈伤结构越疏松；细胞分裂素 TDZ 与 2,4-D 的质量浓度比值越小(处理 13~16)，叶片愈伤组织诱导率越高，每个叶片产生的愈伤组织越多，愈伤组织结构越疏松。

生长素为 2, 4-D 的处理中，只有处理 14 诱导出的较疏松愈伤组织在光下培养后，愈伤结构变得较为致密，可以产生少量不定芽，其余处理中疏松或较疏松的愈伤组织均不能产生不定芽。

2.6.2 光培养 将暗培养 21 d 获得的有效愈伤(表 7 中处理 3)转入光下培养，观察生长调节剂对比对愈

伤组织分化不定芽的影响,其结果如表 8 所示。

表 7 暗培养时生长调节剂对桃离体叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响

Table 7 Effect of growth regulators on callus induction and shoot regeneration of leaves in dark culture <i>in vitro</i>				
处理 Treatment	愈伤组织 诱导率/% Callus inducing rate	愈伤组织形态 Shape and density of callus	每外植体产生 的愈伤组织量 Quantity of callus per explant	不定芽再生率/% Shoot regenerating rate
1	90.00 bc	较疏松颗粒状及球粒状	较少	3.33 cd
2	95.00 ab	致密颗粒状及球粒状	较少	5.00 c
3	96.67 ab	致密颗粒状、球粒状及球状	较少	18.33 a
4	98.33 a	致密球粒状及球状	较多	5.00 c
5	85.00 cd	较疏松颗粒状	较少	0.00 e
6	96.67 ab	较致密球状及球粒状	较少	5.00 c
7	98.33 a	致密球粒状及颗粒状	较多	8.33 b
8	98.33 a	很致密、坚硬的颗粒状	较多	0.00 d
9	98.33 a	较疏松颗粒	较多	0.00 d
10	100.00 a	较疏松球状	较多	0.00 d
11	100.00 a	较疏松球状	很多	0.00 d
12	100.00 a	较疏松球状	很多	0.00 d
13	100.00 a	较疏松球状	很多	0.00 d
14	95.00 ab	较疏松颗粒状及球状	较多	5.00 c
15	81.67 d	较疏松颗粒状	较少	0.00 d
16	66.67 e	较致密颗粒状	少	0.00 d

表 8 光培养时生长调节剂对桃离体叶片愈伤组织分化不定芽的影响

Table 8 Effect of growth regulators on shoot regeneration of peach leaf callus in dark-light culture			
处理 Treatment	不定芽再生率/% Shoot regenerating rate		
	布目早生 Bumuzaosheng	97-8-4	甜桃王 Tiantaowang
CK1	0.00 e	0.00 h	0.00 d
CK2	0.00 e	0.00 h	0.00 d
B1	0.00 e	0.00 h	0.00 d
B2	8.33 cd	6.67 efg	10.00 bc
B3	5.00 d	15.00 ab	10.00 bc
B4	0.00 e	10.00 cde	6.67 c
B5	0.00 e	3.33 gh	0.00 d
处理 Treatment	不定芽再生率/% Shoot regenerating rate		
	布目早生 Bumuzaosheng	97-8-4	甜桃王 Tiantaowang
B6	5.00 d	5.00 fg	8.33 c
B7	11.67 ab	13.33 bc	13.33 ab
B8	5.00 d	10.00 cde	8.33 c
B9	0.00 e	0.00 h	0.00 d
B10	0.00 e	8.33 def	6.67 c
B11	13.33 a	11.67 bcd	15.00 a
B12	10.00 bc	18.33 a	16.67 a

由表 8 可以看出,不同质量浓度的 BA 和 NAA 组合对桃叶片愈伤组织再生不定芽有很大影响,3 个桃品种在不添加任何生长调节剂的处理(CK1)中,愈伤组织均不能再生出不定芽,只添加生长素的处理(CK2)也无不定芽再生,只添加细胞分裂素的处理(B1、B5、B9)不能再生出不定芽或再生率较低,而在细胞分裂素与生长素配合使用的处理中不定芽再生率较高。

表 8 还表明,对于同一品种,细胞分裂素质量浓度一定,生长素质量浓度不同时再生率不同;生长素质量浓度一定,细胞分裂素质量浓度不同时再生率亦不同。在 BA 质量浓度为 2.0、4.0 和 6.0 mg/L 的处理中,配合使用 NAA 的质量浓度分别为 0.05、0.1 和 0.1 mg/L 时,“布目早生”不定芽再生效果较好;分别配合使用 0.1、0.1 和 0.2 mg/L NAA 时,“97-8-4”不定芽再生效果较好;分别配合使用 0.05 或 0.1、0.1 和 0.2 mg/L NAA 时,“甜桃王”不定芽再生效果较

好。说明合适的细胞分裂素与生长素的质量浓度配比是再生不定芽的关键因素,在 BA 质量浓度为 4.0~6.0 mg/L,BA 与 NAA 质量浓度比值为 30:1~60:1 时,再生效果较好。NAA 质量浓度为 0.05 或 0.1 mg/L 时易诱导形成丛状不定芽,而其质量浓度为 0.2 mg/L 时多形成单个不定芽。

2.7 桃叶片不定芽的增殖培养

在 MS+1.0 mg/L BA+0.03 mg/L NAA 的增殖培养基中,“布目早生”、“97-8-4”和“甜桃王”的不定芽增殖率为 100%(图 2),增殖系数分别为 4.38、3.33 和 3.75。

3 讨论

植物细胞、组织具有全能性,在适宜的条件下可以脱分化形成愈伤组织,然后再分化形成不定芽。外植体离体再生受内因和外因的影响,基因型、叶片生理状态和合适的培养条件是不定芽再生的关键影

响因素。

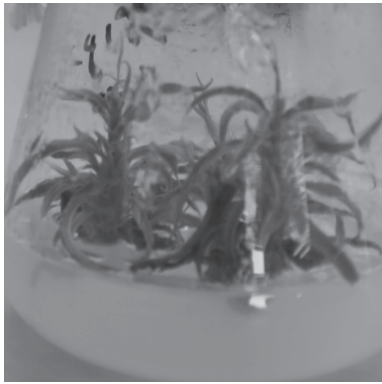


图2 桃叶片不定芽的增殖培养

Fig.2 Shoots proliferated in medium of peach leaf

本研究中,“布目早生”、“97-8-4”和“甜桃王”均可以通过愈伤组织再生出不定芽,但其再生能力存在一定的差异;“瑞江”仅能诱导愈伤组织,但不能再生出不定芽。这说明基因型的选择是桃叶片离体再生的关键因素。

叶片的生理状态也是影响再生的一个关键因素。Gentile等^[7]发现,2种叶片外植体的再生能力较强,其中一种来源于微茎尖长期培养的苗,另一种来源于从叶片上再生出的苗,但却并未在增殖叶片上获得再生不定芽,其认为增殖苗叶片失去了分化能力。本试验成功地诱导了增殖苗叶片的再生,可能是继代使用的植物生长调节物质或其他培养条件不同,使叶片的内源激素含量不同所致。叶片离体再生中一般使用完全展开的幼嫩叶片,但有在葡萄上使用前3片叶的报道^[10]。有研究认为,甜樱桃第1片合拢的极幼嫩叶的再生能力较强,而半展开的嫩叶的再生能力急剧下降,完全展开的幼嫩叶片不能诱导再生^[11]。在桃叶片的研究中一般使用完全展开的幼嫩叶片。本研究也发现,未展开的幼嫩叶片不能再生,且极易褐化,可能是叶片太小,自身营养水平低,或其叶脉尚未发育完全,而愈伤组织和不定芽往往产生于中脉附近;未完全展开幼嫩叶片的再生效果不如完全展开幼嫩叶片,可能是因为未完全展开幼嫩叶片不能完全接触培养基,不能很好地吸收营养,叶脉发育不好可能也是原因之一;完全展开幼嫩叶片既幼嫩且叶脉发育较好,能完全接触培养基,易于吸收营养产生愈伤组织和再生不定芽。在甜樱桃砧木“吉塞拉”上也有类似报道,即再生能力依次为完全展开嫩叶>未展开叶片>老叶^[12]。叶片不同位置的再生能力也有差异,一般认为叶片上部不具备再生能力,而叶片中部和基部的再生能力较强,叶柄

处也可再生出不定芽,而带叶柄是李属植物叶片再生的关键^[7,13-14]。本试验发现,桃叶片不同部位的再生能力表现为叶柄>叶片中部和基部>叶片上部。

基本培养基中添加的生长调节剂对离体再生十分关键,TDZ和BA是李属果树再生中常用的细胞分裂素^[1,15-17]。本试验中,桃叶片伤口处经诱导可产生不同类型的愈伤组织,较致密和致密的绿色有效愈伤组织可以产生不定芽,而半透明的绿色球状愈伤组织会产生玻璃化苗。Gentile等^[7]在暗培养阶段使用2.0 mg/L BA和0.2 mg/L NAA的生长调节剂组合,诱导产生了白色、光滑较疏松的愈伤组织。而本试验暗培养阶段使用相同的基本培养基和生长调节剂,诱导产生了较致密的愈伤组织,这种差异可能与桃品种和叶片内源激素不同有关。Gentile等^[7]的试验和本试验结果均表明,光培养阶段能再生出不定芽的愈伤组织均为结构致密的愈伤,为有效愈伤组织,有效愈伤组织可以在原生长调节剂水平或其他合适质量浓度的生长调节剂中再生出不定芽。而诱导出的较疏松愈伤组织必须通过调整生长调节剂水平,使其转变为致密的有效愈伤组织后才能再生出不定芽(表7中的处理1,14)。本试验中还出现了一类坚硬、致密的球粒状愈伤组织,但不能再生出不定芽,具体原因有待进一步研究。一般认为,分化培养基中较高质量浓度的细胞分裂素与生长素有利于再生不定芽,在桃胚轴和子叶的不定芽再生中,2.0~5.0 mg/L TDZ配合使用0.01~0.04 mg/L NAA时效果较好^[1,5]。Gentile等^[7]在诱导桃叶片愈伤组织分化的光培养阶段,仅使用细胞分裂素BA而不使用生长素NAA,也可诱导产生不定芽。本试验结果表明,NAA是桃愈伤组织再生不定芽的关键因子,不添加NAA时愈伤组织易褐化且不能再生出不定芽。细胞分裂素的质量浓度不同,配合使用的NAA质量浓度也不尽相同,较高质量浓度的BA有利于有效愈伤组织再生出不定芽。本试验发现,4.0~6.0 mg/L BA配合使用0.1或0.2 mg/L NAA,对桃叶片愈伤组织分化不定芽的效果较好。在甜樱桃叶片再生的研究中也有类似报道,即较高质量浓度(7.0 mg/L)BA配合使用较低质量浓度的IBA可以获得较好的再生效果^[12,18]。

不同基本培养基所含的基本化学元素的种类和比例相差较大,选择合适的基本培养基是进行再生培养的基础。在桃离体再生培养中,常用MS、LP和G作培养基^[2,7-8]。Gentile等^[7]发现,使用MS培养基的桃叶片不能再生,而使用LP培养基可以再

生。本研究发现,MS 和 LP 培养基中的愈伤组织均可再生出不定芽,但以 LP 的再生率较高。

刘航空等^[8]以“华光”叶片为外植体,先在 G+2.5 mg/L BA+0.5 mg/L IBA 中诱导产生愈伤组织,再转入 1/2MS+2.0 mg/L TDZ+2.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 的分化培养基中,光培养 3 代后转入 QL+1.0 mg/L BA+1.0 mg/L KT 培养基中,结果获得了 8% 的不定芽,其过程繁琐且诱导不定芽的时间较长。本试验叶片外植体再生不定芽的周期短,且在不同培养条件下获得了再生芽。

值得注意的是,本试验中叶片的再生率依然很低,今后需进一步研究不同植物生长调节剂组合及不同来源叶片对再生不定芽的影响,且需要扩大基因型范围,使获得的再生体系具有良好的通用性。

[参考文献]

- [1] 韩明玉,张满让,田增胜,等.早熟油桃子叶和胚轴离体培养再生植株的研究[J].园艺学报,2006,33(5):957-962.
Han M Y,Zhang M R,Tian Z S,et al. Plant regeneration with in vitro culture from cotyledons and hypocotyls of early ripen nectarines (*Prunus persica* var. nectarina) [J]. Acta Horticulturae Sinica,2006,33(5):957-962. (in Chinese)
- [2] 闫国华,周宇.桃幼胚离体培养再生植株的研究[J].园艺学报,2002,29(5):480-482.
Yan G H,Zhou Y. Plant regeneration from excised immature embryos of Peach (*Prunus persica* L.) [J]. Acta Horticulturae Sinica,2002,29(5):480-482. (in Chinese)
- [3] 张永庆,陈大明,金勇丰,等.桃离体组织分化再生植株的研究[J].园艺学报,2001,28(4):342-344.
Zhang Y Q,Chen D M,Jin Y F,et al. Regeneration of peach plantlet from callus derived from explant [J]. Acta Horticulturae Sinica,2001,28(4):342-344. (in Chinese)
- [4] Mante S,Scorza R,Cordts J M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1989,19(1):1-11.
- [5] 闫国华,周宇.桃幼胚下胚轴高频离体再生[J].果树学报,2002,19(4):231-234.
Yan G H,Zhou Y. High regeneration of adventitious shoots from hypocotyl of peach (*Prunus persica* L.) [J]. Journal of Fruit Science,2006,19(4):231-234. (in Chinese)
- [6] 康卓慧,田国栋,赵彩平,等.桃下胚轴高频离体再生体系的建立及优化[J].西北植物学报,2009,29(12):2564-2570.
Kang Z H,Tian G D,Zhao C P,et al. Establishment and optimization of efficient shoot regeneration system of Peach (*Prunus persica* L.) from hypocotyl explant *in vitro* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2009,29(12):2564-2570. (in Chinese)
- [7] Gentile A,Monticelli S,Damiano C. Adventitious shoot regeneration in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) [J]. Plant Cell Rep,2002,20:1011-1016.
- [8] 刘航空,韩明玉,禹婷,等.影响油桃叶片产生胚性愈伤组织的因素[J].果树学报,2006,23(3):370-374.
Liu H K,Han M Y,Yu T,et al. Factors affecting embryonic callus from leaves of early season nectarine cultivars [J]. Journal of Fruit Science,2006,23(3):370-374. (in Chinese)
- [9] 丛芳,韩明玉,赵彩平,等.桃叶片再生不定芽的研究[J].果树学报,2009,26(5):614-618.
Cong F,Han M Y,Zhao C P,et al. Adventitious bud regeneration in vitro from leaves of peach cultivars [J]. Journal of Fruit Science,2009,26(5):614-618. (in Chinese)
- [10] 李云,冯慧,田砚亭.‘红地球’葡萄叶片、叶柄不定芽再生体系的建立[J].园艺学报,2002,29(1):60-62.
Li Y,Feng H,Tian Y T. Study on ‘Red Globe’ grape leaf and petiole adventitious bud regenerating system [J]. Acta Horticulturae Sinica,2002,29(1):60-62. (in Chinese)
- [11] 高喜叶,李明,李晓燕,等.樱桃砧木 CAB-6p 离体叶片再生体系的优化[J].果树学报,2008,25(4):589-592.
Gao X Y,Li M,Li X Y,et al. Optimization of a high efficient regeneration system from leaves in vitro in cherry rootstock CAB-6p [J]. Journal of Fruit Science,2008,25(4):589-592. (in Chinese)
- [12] 黄文江,刘庆忠,樊圣华,等.甜樱桃砧木吉塞拉叶片再生体系研究[J].园艺学报,2004,31(2):221-223.
Huang W J,Liu Q Z,Fan S H,et al. Studies on system of plant regeneration from leaf explant of cherry rootstock [J]. Acta Horticulturae Sinica,2004,31(2):221-223. (in Chinese)
- [13] Escalettes V,Dosba F. *In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp [J]. Plant Sci,1993,90:201-209.
- [14] Miguel C M,Druart P,Oliveira M M. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explant [J]. *In Vitro* Developmental Biology-Plant,1996,32(3):148-153.
- [15] Bhagwat B,David Lane W. *In vitro* shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) ‘Lapins’ and ‘Sweetheart’ [J]. Tissue and Organ Culture,2004,78:173-181.
- [16] Rosa M,Perez-Clemente, Amparo Perez-Sanjuan,et al. Transgenic peach plants (*Prunus persica* L.) produced by genetic transformation of embryo sections using the green fluorescent protein (GFP) as an *in vivo* marker [J]. Molecular Breeding,2004,14:419-427.
- [17] Tian L,Wen Y,Jayasankar,et al. Regeneration of *Prunus salicina* Lindl (Japanese plum) from hypocotyls of mature seeds [J]. *In vitro* Developmental Biology-Plant,2007,43(4):343-347.
- [18] 师校欣,杜国强,马宝焜,等.甜樱桃砧木离体叶片愈伤组织诱导及不定芽再生[J].果树学报,2006,23(4):538-541.
Shi X X,Du G Q,Ma B K,et al. Callus induction and adventitious bud regeneration from leaves of rootstock of sweet cherry *in vitro* [J]. Journal of Fruit Science,2006,23(4):538-541. (in Chinese)