

油桃子叶再生植株影响因子研究*

孙跃峰, 韩明玉, 范崇辉, 张满让, 王淑莉

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 以早熟油桃华光和曙光为材料, 研究了培养基(MS, G, WPM)、细胞分裂素(BA, TDZ, ZT, KT)、生长素(NAA)、子叶发育的不同时期(花后 30, 40, 50, 60 d 和采收期)等因子对早熟油桃子叶再生植株的影响。结果表明, 华光花后 60 d 为最佳取材时期, 其子叶在 MS+TDZ 2 mg/L+NAA 0.04 mg/L 培养基上的再生率为 75%; 而曙光的最佳取样时间为采收期, 其子叶在 MS+BA 8 mg/L+NAA 0.04 mg/L 培养基上的再生率为 66.7%。子叶暗培养 28 d 后转入光下进行光暗交替培养, 华光、曙光子叶再生率均达到最高。

[关键词] 油桃; 子叶; 再生植株; 影响因子

[中图分类号] S662.103.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)04-0066-05

桃(*Prunus persica*)以其丰富的营养、鲜美的味道而倍受人们喜欢, 长期以来, 人们一直采用常规育种如引种、杂交选种和芽变等手段来改良品种, 但常规育种周期长、工作量大, 且不易取得令人满意的结果。随着现代生物技术和基因工程的开展, 使桃品种通过基因工程加以改良成为可能, 而建立高效稳定的再生体系一直是桃基因工程发展所需要攻克的难题之一^[1]。国外对合子胚再生已有较多研究^[2-5], 以合子胚的各部分(包括胚轴和子叶)为外植体诱导器官生成^[3]和体细胞发生^[2, 4, 5], 但再生率低; 国内对栽培品种再生植株的研究较少, 且现有研究主要集中在中晚熟品种上^[6-8], 对早熟品种还未见相关报道, 并且还存在着再生率不稳定、再生效果不理想和未界定子叶再生的最佳取样时期等一系列问题。为此, 本试验进行了早熟油桃华光、曙光不同时期子叶再生植株的影响因子研究, 以期建立一个稳定的桃再生体系, 为以后通过基因工程改良桃的性状奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

果实取自陕西杨凌夏家沟村, 品种为华光、曙光油桃, 分别于花后 30, 40, 50, 60 d 和成熟期(68 d)采样。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 取各发育阶段(盛花后 30, 40, 50, 60 d 和成熟期)果实各 100 个, 在饱和漂白粉水

溶液中浸泡 20~30 min, 用灭过菌的剪子剪破果肉及果核, 用无菌镊子小心夹出种胚, 放入已灭菌的三角瓶中, 在超净工作台上先用体积分数 75% 的酒精灭菌 30 s, 倒去酒精, 用体积分数 0.1% 的升汞灭菌 6 min, 倒去升汞, 再用无菌水冲洗 5 次, 然后剥去内种皮, 取两片子叶作为外植体进行接种, 接种前先把子叶划伤, 每瓶接种 4 片子叶, 每处理 3 瓶。

除培养基筛选外, 其余基本培养基均为 MS; 细胞分裂素选 BA, TDZ, ZT, KT; 生长素为 NAA; 蔗糖 30 g/L; 琼脂 5.7 g/L; pH 值 5.8。

接种后先进行暗培养, 除暗培养试验外, 其余均为暗培养 28 d 后转入光下进行光、暗交替培养, 光、暗培养的温度均为 (25±2)℃, 光周期为 14 h。

1.2.2 培养基筛选 选用 MS, G, WPM 为基本培养基, 细胞分裂素 BA 5.0 mg/L, 生长素为 NAA 0.04 mg/L, 其余培养条件同 1.2.1, 确定子叶再生的最佳培养基。

1.2.3 细胞分裂素筛选 选用不同浓度的细胞分裂素 BA, TDZ, ZT, KT, 调查不同细胞分裂素及其质量浓度对子叶再生的影响。

1.2.4 采样时期筛选 从盛花后 30 d 开始, 每隔 10 d 采果 1 次, 直至成熟期采取成熟果结束, 调查最终结果, 以确定子叶再生的最佳时期。

1.2.5 暗培养时间筛选 暗培养天数分 14, 21, 28, 35 d 4 个处理, 基本培养基为 MS, 附加 BA 5.0 mg/L, NAA 0.04 mg/L, 每处理接种 15 瓶, 每瓶 4

* [收稿日期] 2003-09-16

[基金项目] 国家 863 计划项目(2001AA 241143); 国家科技“十五”攻关项目(2002BA 515B 10-4)

[作者简介] 孙跃峰(1979-), 男, 河南洛阳人, 在读硕士, 主要从事果树分子生物学研究。

[通讯作者] 韩明玉(1962-), 男, 陕西扶风人, 研究员, 主要从事果树遗传育种研究。

个子叶, 均在光下培养 40 d 后统计其不定芽再生数量, 以确定最佳暗培养时间。

1.2.6 不定芽增殖 子叶再生不定芽分别转至 WPM + BA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L, MS + BA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 和 G + BA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 上, 30 d 后统计结果, 调查增殖系数。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对子叶再生的影响

将花后 60 d 的子叶分别接种至 WPM, MS, G 3 种培养基, 30 d 后统计其子叶再生情况, 结果如表 1 所示。

表 1 不同培养基对子叶再生的影响

Table 1 Effects of different culture medium on cotyledon regeneration

培养基 Culture medium	华光(花后 60 d) Huaguang (60 days after flowering)			曙光(花后 60 d) Shuguang (60 days after flowering)		
	接种子叶数 Number of inoculated cotyledons	再生子叶数 Number of cotyledons' regeneration	再生率/% Rate of plant rege- neration	接种子叶数 Number of inoculated cotyledons	再生子叶数 Number of cotyledons' regeneration	再生率/% Rate of plant rege- neration
WPM	60	5	8.33	60	7	16.67
MS	60	24	40.00	60	19	31.67
G	60	17	28.33	60	12	20.00

由表 1 可知, 在 WPM, MS, G 3 种培养基上, 华光、曙光的子叶再生率不尽相同, 但其基本规律相似, 即在 MS 上最高, 分别为 40.00% 和 31.67%; 其次为 G, 分别为 28.33% 和 20.00%; 在 WPM 上子叶再生率最低, 仅为 8.33% 和 11.67%。此结果与孙清荣等^[6-8]和闫国华等^[11]所做子叶培养均以 MS 为基本培养基相吻合, 即在桃子叶再生植株的培养中, MS 为最适基本培养基。并且, 由于 G 培养基除了 KNO₃ 的含量较大外, 其余的大量元素和微量元素与 MS 培养基基本一致, 可能正是基于这一原因, G

培养基上的子叶再生率仅次于 MS, 而高于 WPM。另外, 可能是由于 G 培养基 KNO₃ 含量高, 其上的不定芽生长快, 苗高, 叶色浓绿; MS 居中; 而在 WPM 培养基上, 苗小且叶色较黄, 并有顶端枯死现象, 其具体原因还有待进一步的研究。

2.2 不同细胞分裂素对子叶再生的影响

花后 30, 40, 50 d, 华光、曙光子叶在各种细胞分裂素上均无子叶再生, 花后 60 和 68 d (成熟期) 子叶的再生统计结果如表 2 所示。

表 2 不同细胞分裂素对子叶再生的影响

Table 2 Effects of different hormones on cotyledon regeneration

细胞分裂素 Hormone	质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration	华光 Huaguang				曙光 Shuguang			
		花后 60 d 60 days after flowering		花后 68 d 68 days after flowering		花后 60 d 60 days after flowering		花后 68 d 68 days after flowering	
		再生率/% Rate of regeneration	平均 不定芽数 Average shoots						
BA	2	8.33	2.00	42.86	2.33	33.33	2.00	33.33	1.00
BA	4	25.00	4.00	41.67	1.00	25.00	1.00	40.00	2.33
BA	6	50.00	5.33	30.00	3.00	25.00	2.22	50.00	3.33
BA	8	8.33	1.00	20.00	4.00	50.00	4.00	66.67	4.00
TDZ	2	75.00	2.22	55.56	2.83	33.33	2.75	25.00	2.00
TDZ	4	58.33	2.29	50.00	2.75	16.67	1.00	16.67	1.00
TDZ	6	50.00	2.33	50.00	1.80	25.00	2.33	8.33	1.00
TDZ	8	41.67	1.20	40.00	2.00	33.33	2.00	8.33	1.00
ZT	2	0	0	16.67	1.00	0	0	16.67	1.00
ZT	5	0	0	25.00	1.00	0	0	16.67	1.00
ZT	8	16.67	1.00	33.33	1.00	16.67	1.22	41.67	1.80
KT	2	0	0	16.67	1.00	0	0	0	0
KT	5	16.67	1.00	25.00	1.00	0	0	16.67	1.00
KT	8	33.33	1.00	50.00	1.0	16.67	1.00	16.67	1.00

注: NAA 均为 0.04 mg/L。Note: NAA is 0.04 mg/L.

由表 2 可以看出: (1) 细胞分裂素 TDZ 对华光子叶再生的作用效果明显高于 BA, ZT 和 KT, 当

TDZ 质量浓度为 2 mg/L 时, 华光花后 60 d 子叶的再生率可高达 75.00%, 且最高子叶再生不定芽可高达 15 个。明显高于同一取样时期质量浓度为 6 mg/L BA 时的子叶再生率(50.00%)、质量浓度为 5 mg/L ZT 时的子叶再生率(16.67%)和浓度为 8 mg/L KT 时的子叶再生率(33.33%)。但是, 随着 TDZ 质量浓度的增加, 子叶再生率却逐渐降低。

(2) BA 对曙光的子叶再生作用效果显著高于 TDZ, ZT 和 KT, 花后 68 d 曙光子叶在 BA 质量浓度为 8 mg/L 时的子叶再生率为 66.67%, 最高子叶再生不定芽可达 17 个, 且不定芽生长快, 叶色鲜绿, 明显高于同一取样时期质量浓度为 2 mg/L TDZ 时的子叶再生率 25.00%、质量浓度为 8 mg/L ZT 时的子叶再生率 41.67% 和质量浓度为 8 mg/L KT 时的子叶再生率 16.67%, 且子叶再生率随 BA 质量浓度增加而升高。

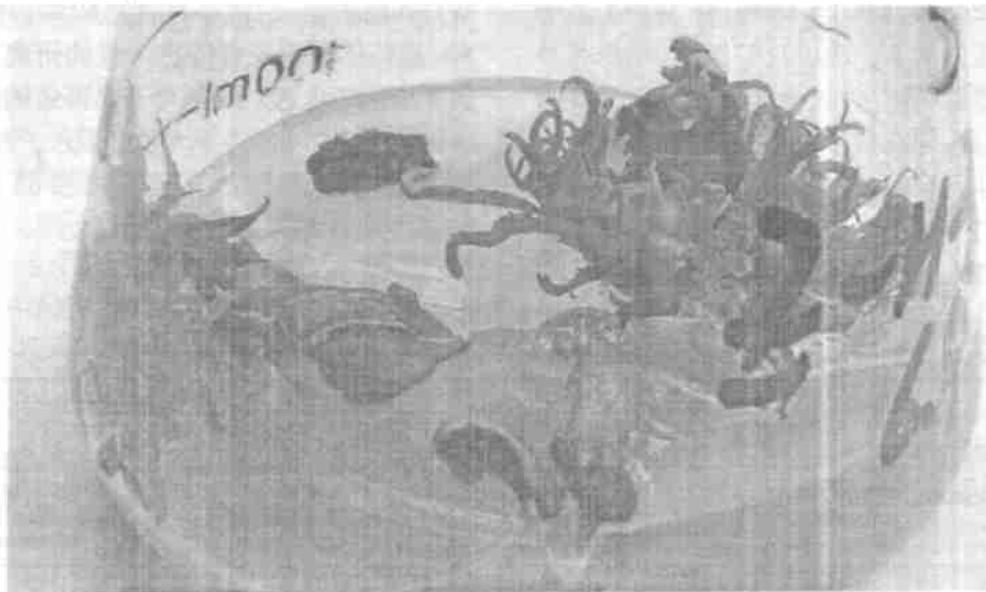
(3) 细胞分裂素为 TDZ 的处理中, 每个处理中都有子叶再生植株, 且再生率差别不大, 但是, 随着

TDZ 质量浓度的增加, 玻璃化苗增多, 且在子叶划伤处有深绿色类似叶片的组织大量出现, 但这些组织最终不能发育成苗。

(4) 在细胞分裂素为 BA 的处理中, 不定芽生长快, 暗培养 28 d 后, 放入光下培养 20 d 即有大量不定芽产生, 高度达 2 cm 左右; 而细胞分裂素为 TDZ 的处理中, 不定芽生长慢, 暗培养 28 d 后, 放入光下培养 40 d 高度才达 1 cm 左右。

(5) 细胞分裂素 ZT, KT 的效果明显不如 BA 和 TDZ, 在细胞分裂素为 ZT, KT 的处理中, 子叶再生率低, 不定芽发生少, 每片子叶仅有不定芽 1~2 个, 而在细胞分裂素为 BA 和 TDZ 的处理中, 许多子叶上再生的不定芽数可高达 8 个以上(图版 1)。

(6) 华光在 2 mg/L TDZ 培养基上的再生率最高, 但其平均不定芽再生数(2.22)却远低于 6 mg/L BA 处理的平均再生不定芽数(5.33); 而曙光在 8 mg/L BA 培养基上的再生率和平均不定芽数均为最高。



图版 1 子叶培养再生的不定芽(细胞分裂素为 TDZ)

Plate 1 The shoots regenerated from cotyledon culture (Homone is TDZ)

2.3 不同取样时期对子叶再生的影响

由表 2 可知, 不同取样时期对子叶再生有很大的影响, 可能是由于花后 30, 40, 50 d 果实种胚太小, 华光、曙光两个品种的子叶再生率均为 0; 花后 60 d, 华光在 2 mg/L TDZ 培养基上的子叶再生率最高可达 75.00%, 而曙光在 8 mg/L BA 培养基上的子叶再生率最高可达 50.00%; 花后 68 d, 华光在 2 mg/L TDZ 培养基上的子叶再生率最高可达 55.56%, 而曙光在 8 mg/L BA 培养基上的子叶再生率最高可达 66.67%。由此可以看出, 华光的最佳

取样时期是在花后 60 d, 此期子叶再生率最高, 成熟期子叶再生率反而降低; 曙光的最佳取样时期是花后 68 d, 即成熟果, 此时子叶再生率最高, 花后 60 d 的子叶再生率最高, 低于成熟期子叶的再生率。

2.4 不同品种子叶再生的比较

由表 2 可以看出, 品种不同, 其子叶再生率、适宜的激素和最佳的取样时期均不相同, 华光、曙光两个早熟油桃品种的花期、成熟期极为接近, 但由于其基因型不同, 最终其子叶再生所需的激素种类和最佳取样时期均不相同。

2.5 不同暗培养时间对子叶再生的影响

生的影响结果如表3所示。

花后60 d, 不同暗培养时间对华光、曙光子叶再

表3 不同暗培养时间对子叶再生的影响

Table 3 Effects of different days of cotyledons cultured in the dark on cotyledon regeneration

暗培养时间/d Days in the dark	华光 Huaguang			曙光 Shuguang		
	接种子叶数 Number of inoculated cotyledon	再生子叶数 Number of cotyledons' regeneration	再生率/% Rate of plant regeneration	接种子叶数 Number of inoculated cotyledon	再生子叶数 Number of cotyledons' regeneration	再生率/% Rate of plant regeneration
14	60	0	0	60	0	0
21	56	4	7.14	60	3	5.00
28	58	22	37.93	60	13	21.67
35	60	18	30.00	60	10	16.67

由表3可知, 暗培养28 d再生效果最佳, 华光、曙光的子叶再生率分别为37.93%和21.67%。暗培养14 d的子叶仅仅变黄、膨大, 子叶基部与划伤处未出现芽状突起, 放入光下光暗交替培养10 d后, 子叶转绿, 但最终无不定芽产生; 暗培养时间过长也不利于不定芽的产生, 暗培养35 d, 华光的子叶再生率为30.00%, 曙光的子叶再生率为16.67%, 分别低于各自暗培养28 d的子叶再生率。因此, 暗培养时间是影响桃子叶再生的一个重要因素, 培养时间过长或过短均不利于子叶再生。

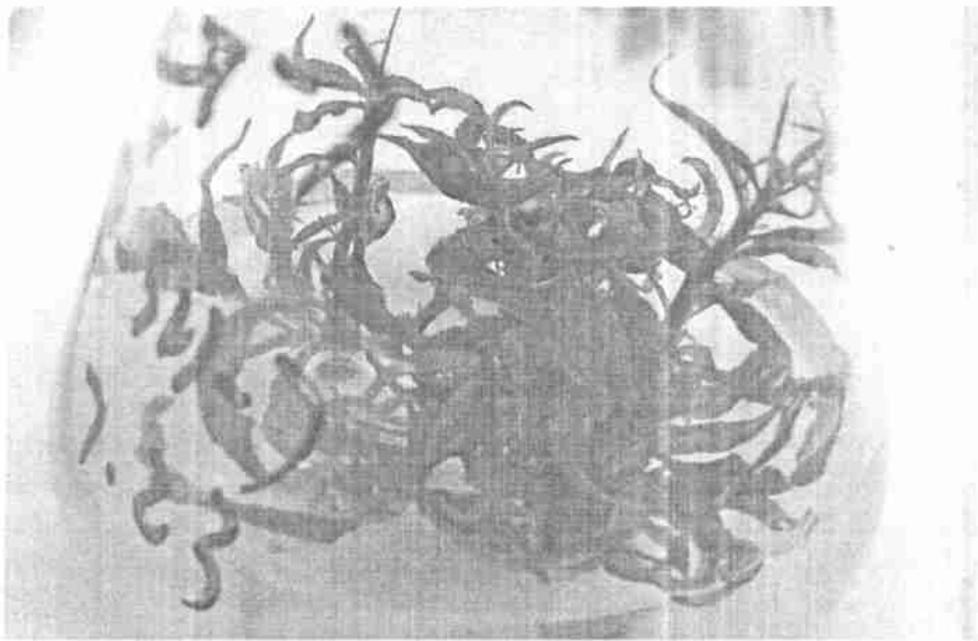
2.6 子叶再生不定芽的观察结果

接种后先进行暗培养, 暗培养10 d左右, 子叶开始膨大变黄, 至18 d时, 部分子叶基部和划伤处开始出现乳白色芽状突起, 随着暗培养时间的延长, 芽状突起不断增多, 至28 d时, 基本每个处理上都

有芽状突起。转入光下培养7 d后, 子叶转绿, 芽状突起开始萌发, 产生不定芽, 此后20 d之内是不定芽再生的高峰时期, 每片子叶上不定芽再生植株最高可达17个, 40 d后各处理均不再产生不定芽。

2.7 不定芽的增殖

把子叶再生的不定芽转至增殖培养基WPM + BA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L, MS + BA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 和 G + BA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L, 30 d以后统计其增殖效果。结果表明, 不定芽在 G + BA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 培养基上的增殖效果最好, 平均每个不定芽可增殖4~5个, 且叶色鲜绿, 部分苗高可达3 cm左右(图版2), 达到生根要求, 并可转入生根培养基进行生根试验。



图版2 子叶再生的不定芽在G培养基上的增殖

Plate 2 The proliferation of shoots regenerated from cotyledon culture in G medium

3 讨 论

1) 影响桃子叶再生不定植株的因素很多, 本试验仅从基本培养基、细胞分裂素、取样时期和暗培养时间等几个方面作了一些探讨, 由于孙清荣等^[6-8]和阎国华等^[1]均未对生长素种类、质量浓度作出详细的讨论与研究, 故生长素种类、质量浓度对桃子叶再生的影响可能不是很大, 因此本试验也仅使用了生长素 NAA。

2) 花后 30, 40, 50 d, 华光、曙光子叶均无植株再生, 可能是由于此时种胚太小, 不足以提供子叶再生所必需的营养, 如果调整培养基的成分或加入天然提取物如水解乳蛋白酵母提取液等等, 可能会取得令人满意的结果。

3) TDZ 是一种较强的细胞分裂素, 有研究^[9]指出, TDZ 的作用效果是 BA 的 10 倍。但本研究结果表明, TDZ 的作用效果是 BA 的 2~4 倍, 当然, 子叶再生中细胞分裂素的作用受多方面因素影响, 并

不是简单的倍数关系, 子叶再生不定芽的过程是子叶基因型、培养基、激素配比、暗培养时间等等一系列因子相互作用的复杂过程, 其中还有许多问题值得深入探讨。

4) 在细胞分裂素为 TDZ 的处理中, 子叶表面产生扭曲肥大的类似叶片的组织, 与阎国华等^[1]在子叶再生中报道的“肥厚、发育畸形的类叶片形态”应该是同一种物质, 这些组织可能是在高质量浓度细胞分裂素的强烈刺激下产生的, 如果及时地将其转入另外一种合适的培养基, 能否产生不定芽, 还需要进一步试验探讨。

5) 综合本试验结果可以认为, 对油桃子叶的再生而言, 细胞分裂素 BA 是一种较好的生长调节物质, 在其上子叶再生的不定植株生长快、叶色绿、苗壮; 细胞分裂素 TDZ 也是一种很好的生长调节物质, 其刺激作用远大于 BA, 深入研究其作用机理, 将会使其在组织培养上得到更加广泛的应用。

[参考文献]

- [1] 阎国华, 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.
- [2] Bhansali R R, Driver J A, Durzan D J. Rapid multiplication of adventitious somatic embryo in peach and nectarine by secondary embryogenesis[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 280-284.
- [3] Hammerschlag F A, Bauchan G, Scorza R. Regeneration of peach from callus derived from immature embryos[J]. Theor Appl Genet, 1985, 70: 248-251.
- [4] Scorza R, Cordts J M, Mante S. Long-term somatic embryo production and regeneration from embryo-derived peach callus[J]. Acta Horticulturae Plant Cell Reports, 1990, 280: 183-190.
- [5] Bhansali R R, Driver J A, Durzan D J. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Prunus persica* (L.) [J]. Journal of Horticultural Science, 1991, 66(5): 601-605.
- [6] 孙清荣, 石荫坪, 孙洪雁, 等. 肥城桃幼子叶不定植株再生[J]. 山东农业大学学报, 1999, 30(4): 395-397.
- [7] 孙清荣, 石荫坪, 赵红军, 等. 九月菊桃成熟胚诱导不定梢的研究[J]. 山东农业科学, 1999, (2): 18-19.
- [8] 孙清荣, 孙洪雁, 石荫坪, 等. 青州蜜桃冬桃成熟胚子叶再生不定植株的研究[J]. 山东农业科学, 2000, (2): 11-12.
- [9] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 第2版. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.

Influential factors for nectarine cotyledon regeneration

SUN Yue-feng, HAN Ming-yu, FAN Chong-hui, ZHANG Man-rang, WANG Shu-li

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

Abstract: Cotyledons in peaches (cv “Huaguang” and “Shuguang”) of different development stages (30, 40, 50, 60 days after flowering and mature cotyledons respectively) have been cultured on MS medium with BA, TDZ, ZT, KT and NAA to study plant regeneration. Results showed that the best harvest time for “Huaguang” was 60 days after flowering and plant regeneration percentage from its cotyledons was 75% when they were cultured on MS+TDZ 2 mg/L + NAA 0.04 mg/L, mature cotyledons were the best for “Shuguang” and plant regeneration percentage was 66.7% when the cotyledons were cultured on MS+BA 8 mg/L + NAA 0.04 mg/L. Both of the regeneration percentage of cotyledons of Huaguang peach and Shuguang peach cultured in dark for 28 days are higher than any other.

Key words: nectarines; cotyledons; plant regeneration; influential factors