

山杏下胚轴再生植株的研究^{*}

王 鸿^{1,2}, 马锋旺¹, 郝 燕²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100;

2 甘肃省农科院 果树研究所, 甘肃 兰州 730070)

[摘 要] 研究了影响山杏下胚轴再生的有关因素, 首次获得了山杏下胚轴再生植株。结果表明, 经 15 d 的暗培养, 山杏下胚轴切段在附加 TDZ 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的改良 MS 培养基(1/2 NH₄NO₃) 上, 愈伤组织诱导率(100%) 和再生频率(37.5%) 均最高, 细胞分裂素用 TDZ 效果优于 6-BA, 再生获得的不定芽在改良 MS + BA 0.2 mg/L 培养基上生根率为 75.8%。

[关键词] 山杏; 下胚轴; 再生植株; 组织培养

[中图分类号] S662.204⁺.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)05-0127-03

山杏 [*Amniaca vulgaris* Lam. var. *ansu* (Maxin)] 是否属重要的果树资源之一, 不仅用作栽培杏的砧木, 而且还是生产杏仁的重要经济树种。自 Valerie 等^[1]首次报道杏离体叶片经胚状体培养获得再生植株以来, Maja 等^[2]、马锋旺等^[3]、孙清荣等^[4]也分别利用杏离体叶片、原生质体和幼胚子叶先后培养得到了再生植株。下胚轴再生植株已见于李^[5]、核桃^[6]、柿^[7]、枣^[8]等果树树种, 但目前尚未见杏下胚轴获得再生植株的报道。本试验对山杏离体下胚轴再生的有关因素进行了研究, 以期为进一步开展山杏的遗传转化提供再生体系。

1 材料与方法

1.1 下胚轴的获得

供试材料为山杏当年成熟种子。砸开核壳, 取出种仁, 用自来水冲洗 30 min 后, 用体积分数 75% 乙醇浸泡 30 s, 1 g/L 升汞表面消毒 7 min, 然后用无菌水冲洗 4~5 次, 装入盛有无菌水的三角瓶中浸泡 24 h, 在无菌条件下剥去种皮, 将种子接种在改良 MS 培养基(1/2 NH₄NO₃) 上, 放入 3~4 的冷藏柜中 30 d, 然后转至 25℃、1 500 lx、光暗周期 16 h/8 h 条件下培养 15 d, 得到生长健壮的下胚轴。

1.2 基本再生方法

本试验中基本培养基为改良 MS 培养基(1/2 NH₄NO₃) , 根据需要加入不同浓度的激素, 并附加蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L, 灭菌前将 pH 值调至 5.8,

121 (1.2 kg/cm²) 湿热灭菌 20 min。无菌条件下将下胚轴切成约 0.5 cm 的小段, 水平接种于再生培养基上, 每处理最少接种 5 瓶, 每瓶接种 5~7 段, 接种后置于 22℃左右黑暗条件下培养 15 d, 然后转至 (23±2)℃、1 500 lx、光暗周期 16 h/8 h 条件下培养, 并连续观察愈伤组织诱导率和再生频率。试验中对尚未产生再生不定芽的外植体进行多次继代培养, 观察继代次数对愈伤组织诱导和再生的影响。

1.3 激素种类及其浓度对再生的影响

再生培养基附加的细胞分裂素为 TDZ (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L) 和 6-BA (1.0, 2.0, 5.0 mg/L), 生长素为 NAA (0.25, 0.50, 1.00 mg/L) 和 2, 4-D (0.5, 1.0 mg/L), 激素组合及其浓度详见表 1。在研究不同激素组合及浓度对愈伤组织诱导率和再生频率的影响时, 各处理均经 15 d 暗培养后转至 23℃、2 000 lx、光暗周期 16 h/8 h 条件下培养, 每 20 d 继代 1 次至相同培养基。接种后连续观测愈伤组织生长状况及愈伤组织诱导率和再生频率。愈伤组织诱导率/% = (形成愈伤组织的轴段/总接种轴段数) × 100%, 再生频率/% = (分化出不定芽的轴段数/总接种轴段数) × 100%。

1.4 暗培养时间对再生的影响

在激素组合为 TDZ 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的再生培养基上, 设 5, 10, 15 和 20 d 暗培养时间处理, 然后转入 (23±2)℃、1 500 lx、光暗周期 16 h/8 h 条件下培养, 观察愈伤组织诱导率和再生

^{*} [收稿日期] 2004-08-17

[作者简介] 王 鸿(1973-), 男, 甘肃灵台人, 助理研究员, 在读硕士, 主要从事核果类果树生理与栽培育种技术研究。

[通讯作者] 马锋旺(1964-), 男, 山东汶上人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事果树生理及生物技术改良研究。

频率。

1.5 生长与生根

得到的再生不定芽在改良MS培养基(1/2 NH₄NO₃)上伸长生长后,取大于2 cm 长的健壮芽分别在附加0.1,0.2,0.4 mg/L BA 的改良MS培养基上进行生根培养。培养条件为25℃、1500 lx、光暗周期16 h/8 h。

2 结果与分析

2.1 激素种类与浓度对愈伤组织诱导和再生的影响

观察发现,下胚轴在再生培养基上培养3~5 d后轻度变褐,略有增粗和伸长。培养7 d后各处理开始产生乳白色及淡黄色愈伤组织,在第20~40天时

陆续获得再生不定芽。表1结果表明,山杏下胚轴在含TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的培养基上愈伤组织诱导率和再生频率均最高,分别达到100%和37.5%。在含6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的培养基上也获得了相对较高的愈伤组织诱导率(96.4%)和再生频率(28.6%)。TDZ 适宜浓度为2.0 mg/L,低浓度(0.5 mg/L)TDZ 易于诱导愈伤组织但再生频率较低。0.5 mg/L NAA 对提高愈伤组织诱导率及再生频率效果最佳,高浓度(1.0 mg/L)时愈伤组织诱导率及再生频率均下降,低浓度(0.25 mg/L)时诱导愈伤组织效果良好,但再生频率明显下降。高浓度(1.0 mg/L)2,4-D 不利于愈伤组织诱导,且没有不定芽再生。

表1 植物生长调节剂对山杏下胚轴再生植株的影响

Table 1 Effects of plant growth regulators on regeneration of hypocotyls of *Amniaca vulgaris* var. *ansu*

植物生长调节剂/(mg·L ⁻¹) Plant growth regulators				外植体数 No. of explants	愈伤组织诱导率/% Percentage of calli inducing hypocotyl	再生频率/% Percentage of regenerating hypocotyl
TDZ	NAA	6-BA	2,4-D			
1.0	0.5	0.0	0.0	27	96.3	3.7
2.0	0.25	0.0	0.0	33	97.0	12.2
2.0	0.5	0.0	0.0	32	100.0	37.5
2.0	1.0	0.0	0.0	27	72.2	18.5
3.0	0.5	0.0	0.0	31	90.3	13.0
0.0	0.0	5.0	0.5	35	94.3	11.4
0.0	0.0	5.0	1.0	26	76.9	0.0
0.0	0.0	2.0	1.0	34	88.2	0.0
0.0	0.0	2.0	0.5	34	97.1	14.7
0.0	0.5	1.0	0.0	28	96.4	28.6
0.0	0.5	2.0	0.0	35	94.3	20.0
0.5	0.5	0.0	0.0	25	100.0	16.0
0.5	0.25	0.0	0.0	27	88.9	14.8
0.0	0.0	1.0	0.5	26	96.2	0.0

2.2 暗培养对愈伤组织诱导和再生的影响

图1表明,在改良MS+TDZ 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L 培养基上,未进行暗培养时其愈伤组织诱导率和再生频率均为0;不同暗培养时间处理对愈伤组织的诱导率均超过90%,各处理间无明显差异;但不同暗培养时间处理的山杏下胚轴不定芽再生频率差异显著,其中以暗培养15 d效果最好。

2.3 继代次数对愈伤组织诱导和再生的影响

试验结果表明,山杏下胚轴愈伤组织诱导率及再生频率在接种后40 d内即可达到最高,多次继代并不能使之提高。

2.4 不定芽的生长和生根

山杏下胚轴抽生的不定芽转接到改良MS培养基上生长良好,生长至4~5片叶大于2 cm 长时,在附加不同浓度BA 的改良MS培养基上进行生根培养,结果发现在改良MS+BA 0.2 mg/L 培养基

上,15 d 即可诱导出不定根,进一步培养可形成完整植株,平均生根率达到75.8%。

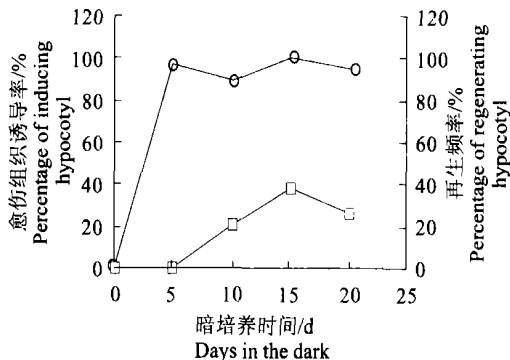


图1 暗培养时间对愈伤组织诱导率及再生频率的影响

-○- 愈伤组织诱导率; -□- 再生频率

Fig. 1 The effect of different days cultured in dark on calli inducing and bud regeneration

-○- Percentage of inducing hypocotyl;

-□- Percentage of regenerating hypocotyl

3 讨 论

本研究获得了山杏成熟胚下胚轴较高的不定芽再生率,且所需时间短,为山杏遗传转化提供了有效方法,并为杏的子叶、叶片高频再生提供了参考。

通常获得再生芽都需要切口造伤^[9,10],并且不定芽往往产生于愈伤组织暴露于空气中的部分^[11],这与本试验研究结果一致,不定芽的产生部位均在下胚轴切段的切口处,其起源有待进一步研究。

离体器官不定芽的形成在一定程度上受到光敏色素的控制,暗培养更有利于不定芽的形成。许多研究结果^[12~16]表明,暗培养时间依树种、品种的不同而异,一般在1~4周,山杏下胚轴再生所需暗培养

时间与Olaya Pérez-Tornero 等^[17]获得的Canino 杏叶片高频再生所需时间相同。

激素种类和浓度对山杏下胚轴不定芽再生有重要作用,对于同浓度的细胞分裂素,TDZ 的效果优于6-BA,这与对许多木本植物再生的研究结果相同^[13~15,18,19]。生长素则以NAA 效果优于2,4-D,这可能与NAA 抑制了酚类物质的分泌作用^[13]相关。在TDZ 与NAA 激素组合中,NAA 浓度主要影响愈伤组织诱导,TDZ 浓度主要影响不定芽再生;在BA 与2,4-D 激素组合中,BA 浓度过低或2,4-D 浓度过高都不利于不定芽的发生。为提高山杏下胚轴不定芽再生频率,不同的激素组合、浓度及其他相关因素需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Valerie E, Francoise D. *In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. [J]. *Plant Science*, 1993, 90(2): 201- 209
- [2] M iaja M L, V allaw ia R, Me G. Regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis in some fruit species[J]. *Italus Hortus*, 1997, 4(6): 8- 11.
- [3] 马锋旺, 李嘉瑞. 山杏原生质体培养再生植株[J]. *园艺学报*, 1998, 25(3): 224- 229
- [4] 孙清荣, 孙洪雁. 早熟杏幼胚子叶再生不定梢[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 37(1): 38- 39
- [5] 孙清荣, 孙洪雁. 李胚轴和子叶再生不定梢观察[J]. *落叶果树*, 1999, (3): 7- 8
- [6] 汤浩茹, 王永清. 德国核桃'No. 120'幼胚胚轴与子叶体细胞胚胎发生及其植株再生[J]. *园艺学报*, 2000, 27(1): 59- 61.
- [7] 孙清荣, 孙洪雁. 甜柿下胚轴再生不定植株的研究[J]. *落叶果树*, 2000, (5): 4- 5
- [8] 马 均. 枣胚轴组织培养的初步研究[J]. *林业科技*, 2001, 26(1): 55- 57.
- [9] M L aimer da Camara Machado, A da Camara M cchado, V Hanzer. Regeneration of shoots from leaf discs and stem microcuttings of fruit trees as a tool for transformation[J]. *Acta Hort*, 1998, 235: 85- 92
- [10] Yepes L M, A ldwinckle 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
- [11] M An tonelli, P Druart. The use of a brief 2, 4-D treatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens* Bois[J]. *Acta Hort*, 1990, 280: 45- 50
- [12] M iguel C M, Druart P, O liveira M M. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 1996, 32: 148- 153
- [13] O laya Perea-Tornero, Jose Egea, A licia V anooostende. A ssessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot[J]. *Plant Science*, 2000, 158: 61- 70
- [14] Leblay C, Chevreau E, Raboin L M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.) [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 1990, 25: 99- 105
- [15] Korban S S, O'Connor P A, Ellobeydy A. Effects of thidiazuron, naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves[J]. *J Hort Sci*, 1992, 67: 341- 349
- [16] Fasolo F, Zimmernan R H, Fordham I A. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars[J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 1989, 16: 75- 87.
- [17] O laya P éez-Tornero, Jos éEgea, A licia V anooostende, et al. A ssessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot[J]. *Plant Science*, 2000, 158: 61- 70
- [18] Escalettes V, Dosba F. *In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp[J]. *Plant Sci*, 1993, 90: 201- 209
- [19] De Bondt A, Eggemont K, Penninckx I A. Agrobacterium mediated transformation of apple (*Malus × Domestica* Borkh): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants[J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 549- 554

(下转第 134 页)

such as critical water saturation deficiency (CWSD), free proline content, electrical conductivity of leaves and shoot growth length were investigated and analysed after draught stress treatment. The result indicated that growth rate of five ground cover plants tended to decrease while the proline content and electrical conductivity would increase instead after the treatment. It seemed that the weaker draught resistance the plants had the greater increasing extent the electrical conductivity showed. When treated plants were watered as usual as CK they would resume to grow differently with different species. CWSD should be combined with the time during which the leaves tested became permanent wilting to represent the desiccation avoiding ability of the plants in place of CWSD application alone. Otherwise the value of CWSD would not correspond to the actual plant situation about draught resistance from time to time. According to multiple analysis, draught resistance order of five species are Buddhanail > Cottage pink > Betony > Thyme > Looses-trife.

Key words: ground cover plants; draught resistance; critical water saturation deficiency; free proline; electrical conductivity

(上接第 129 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)05-0127-EA

Plant regeneration from hypocotyls of *Amniaca vulgaris* Lam. var. *ansu* Maxim

WANG Hong^{1,2}, MA Feng-wang¹, HAO Yan²

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

2 The Institute of Pomology, Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Adventitious plants regenerated from mature hypocotyls of *Amniaca vulgaris* var. *ansu* have been obtained, with the rate of shoots regenerated being 37.8% when cultured on the half NH_4NO_3 of MS medium supplemented with TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L for 15 d in dark and then exposed to light. TDZ was better than 6-BA in plant regeneration. The rooting rate was 75.8% when the buds cultured on half NH_4^+ of MS + BA 0.2 mg/L.

Key words: *Amniaca vulgaris* var. *ansu*; hypocotyl; regeneration plant; tissue culture