

油桃下胚轴再生植株影响因素的研究

岳海英,韩明玉,张满让,田玉命

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了建立一个稳定的桃再生体系,以晚熟油桃秦光 2 号为试验材料,对影响其种胚萌发及下胚轴再生的不同激素质量浓度与组合、培养基、预培养时间、低温处理等因素进行了研究。结果表明,种皮对种胚萌发有抑制作用,在种胚培养中应剥去种皮培养;低温处理可以明显提高胚培养的萌发率,胚培养种胚以 5 ℃ 低温处理 70 d 萌发率最高,达到 93.33%,且经过 7 d 常温光培养所得下胚轴健壮、幼嫩,更适宜做下胚轴再生的外植体,诱导率达到 34.38%,在蔗糖质量浓度为 30 g/L 时萌发率最高,达到 75.66%,用 1 600 mg/L GA 浸泡 24 h,诱导率达到 62.3%;下胚轴能够再生植株,形态学上部再生率为 34.67%,下部为 18.67%,二者差异显著,下胚轴再生以 QL + TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 效果最好,再生率达到 38.67%,平均再生不定芽数为 2.50 个,晚熟油桃秦光 2 号下胚轴可以直接从未产生愈伤组织的切口部位产生不定芽。

[关键词] 油桃;胚轴培养;下胚轴;再生植株

[中图分类号] Q813.1⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)11-0156-05

Factors affecting regeneration from hypocotyls of nectarine (*Prunus persica* var. *nectarina*)

YUE Hai-ying, HAN Ming-yu, ZHANG Man-rang, TIAN Yu-ming

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

Abstract : In order to set up a stable regeneration system for peach, the nectarine cultivar Qingguang2[#] was used to study factors such as different hormone concentrations and combinations, culture mediums, beforehand train time, and low temperature that affected the germination and the regeneration of its hypocotyls. The results showed that the 70-day and 5 ℃ chilling treatment could increase the germination rate of embryos, accounting for 93.33%; and after 7 days, normal temperature and light beforehand train could get more stronger and younger hypocotyls, and the inducement rate could reach 34.38%; in the 30 g/L sugar concentration, the embryo germination rate was 75.66%; in the 1 600 mg/L GA after 24 hours, the germination rate was the highest, accounting for 62.3%; the hypocotyls could be used to regenerate the plantlets and their upper of morphology and lower morphology showed evident difference in this respect. The upper of morphology regenerate rate was 34.67%, while the lower was 0. The hypocotyls regeneration performed best on the medium of QL + TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L, accounting for 38.67%. By the trial result also, the hypocotyls of the late-maturing nectarine Qingguang2[#] could directly regenerate adventitious bud from the cut.

Key words : nectarine; embryonic culture; hypocotyls; regeneration plant

[收稿日期] 2006-10-18

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2002BA515B10); 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2001AA 241143)

[作者简介] 岳海英(1979-),女,宁夏平罗人,在读硕士,主要从事果树遗传育种研究。E-mail: yhyxxl@163.com

[通讯作者] 韩明玉(1962-),男,陕西扶风人,教授,主要从事果树遗传育种研究。E-mail: hmywsl@pub.xaonline.com

在桃育种工作中,常规育种周期长、工作量大,且很难取得令人满意的结果。随着现代生物技术和基因工程的发展,可有目的地改良某些优良品种的不良性状,在较短时间内获得新品种,从而提高育种效果。但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]。目前,有关下胚轴再生的报道已见于李^[2]、甜柿^[3]、核桃^[4]、枣^[5]、山杏^[6]等果树树种。对桃品种京艳和晚蜜^[7]、玉露^[8]、华光和曙光^[9]等也以合子胚为外植体进行了再生研究,并获得了再生不定芽。但这些试验均存在着再生率不稳定、再生效果不理想等问题,而且以晚熟油桃品种下胚轴为外植体获得再生的报道很少。因此,本研究进行了晚熟油桃秦光 2 号的种胚萌发试验,同时以该品种种胚的下胚轴为外植体进行离体培养,以期建立一个稳定的油桃再生体系,为通过基因工程改良油桃的性状奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

秦光 2 号果实采自西北农林科技大学园艺学院油桃品种资源圃,于果实硬熟期采样。果实采回后先用流水冲洗果面,然后用无菌剪剪开果肉及果核,用无菌镊子小心夹出种胚,放入三角瓶中,在超净工作台内用体积分数 75% 酒精消毒 1 min,然后用 1 g/L 升汞灭菌 5 min,再用饱和次氯酸钠溶液灭菌 8 min,最后用无菌水冲洗 5 次。

1.2 培养基的制备与培养条件

基本培养基 WPM 中加入蔗糖 30 g/L,琼脂 6.5 g/L。于 121 °C 高温灭菌 20 min,灭菌前 pH 调到 5.8。培养室温度 23 ~ 28 °C,光照强度 2 000 ~ 3 000 lx,光照时间 14 h/d。

1.3 秦光 2 号油桃种胚萌发试验

采取以下 4 组萌发试验比较秦光 2 号的种胚萌发率。

(1) 取消毒后的种胚不剥除内外种皮,光培养于 WPM + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.5 g/L 培养基上,培养后 12, 28, 42 和 56 d 时统计种胚萌发率。(2) 取消毒后的种胚剥除内外种皮,接种于 WPM + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.5 g/L 培养基中,置于 5 °C 低温冰柜中,暗处理 0, 30, 60, 70 d 后在常温下进行光培养,于培养后 14 d 统计种胚萌发率。(3) 取消毒后的种胚剥除内外种皮,接种于分别添加 20, 30, 40, 50 和 60 g/L 蔗糖的 WPM 培养基中,光下培养,于培养后 28 d 统计种胚萌发率。(4) 取消毒后的种胚剥除

内外种皮,分别浸泡于 400, 800, 1 200, 1 600 mg/L GA 溶液中 12, 24 h 后,接种于 WPM 培养基中,光下培养,于培养后 14 d 统计种胚萌发率。以上 4 组萌发试验,每组试验各处理 15 个种胚,各处理均重复 3 次。

1.4 秦光 2 号油桃下胚轴再生试验

采取以下 3 组试验,比较秦光 2 号油桃的种胚萌发率。

(1) 将萌发的下胚轴分切成上、中、下 3 部分,然后将 3 部分分别切成 5 mm 左右的小段,每小段中间用手术刀切成相连的 3 节,接种于诱导再生培养基中,在常温下光培养 28 d 后统计再生率。(2) 将萌发的下胚轴切成 5 mm 左右的小段,每小段中间用手术刀切成相连的 3 节,接种于诱导再生培养基中,常温下分别黑暗培养 0, 7, 14 和 28 d,然后进行光培养,28 d 后统计再生率。(3) 将经过低温处理 70 d 的种胚分别于光下培养 7, 11 和 15 d 后,将萌发的下胚轴切成 5 mm 左右的小段,每小段中间用手术刀切成相连的 3 节,接种于诱导再生培养基中,在常温下光培养 28 d 后统计再生率。以上 3 组再生试验,各处理均每个三角瓶接种 5 段,每处理重复 3 次。

选用 G、MS 和 QL 3 种培养基,细胞分裂素为 TDZ(1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L) 和 6-BA(2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg/L),生长素为 NAA(0.5 mg/L),研究细胞分裂素对胚轴再生的影响。

以上试验在每次进行数据记录的同时,观察记录外植体的生长状态、愈伤组织的形态等,并计算再生率和平均再生不定芽数。其中,再生率/% = (再生外植体数/接种外植体数) × 100%; 平均再生不定芽数 = 再生不定芽总数/再生外植体数。

1.5 数据处理

试验所有数据采用 DPS v3.0 统计分析软件进行。

2 结果与分析

2.1 秦光 2 号油桃种胚萌发试验结果

2.1.1 种皮对种胚萌发的影响 种皮对种胚萌发影响的试验结果显示,未剥除种皮的种胚均不能萌发,而剥除种皮后的种胚萌发率均在 70% 以上。由此说明种皮障碍是引起桃种子休眠的重要因素,这是由于种皮中存在抑制种子萌发的物质,种皮中的抑制物质和种皮机械阻力构成种皮障碍^[10],抑制了种胚的萌发。因此,在进行种胚的萌发培养时,应该

剥除种皮,以促进胚的萌发。

2.1.2 低温处理对种胚萌发的影响 试验结果表明,种胚在 5 ℃ 低温下,经过 0,30,60 和 70 d 低温处理后,能够不同程度地提高种胚的萌发率。随着低温处理时间的延长,萌发率呈上升趋势,其中低温处理 70 d 时,萌发率达到 93.33%,获得的下胚轴比较健壮,非正常苗少,之后萌发率保持稳定;而未经低温处理的萌发率仅为 66.67%。

2.1.3 蔗糖质量浓度对种胚萌发的影响 由图 1 可以看出,种胚在不同质量浓度蔗糖的 WPM 培养基中均能萌发,其中蔗糖质量浓度为 30 g/L 时萌发

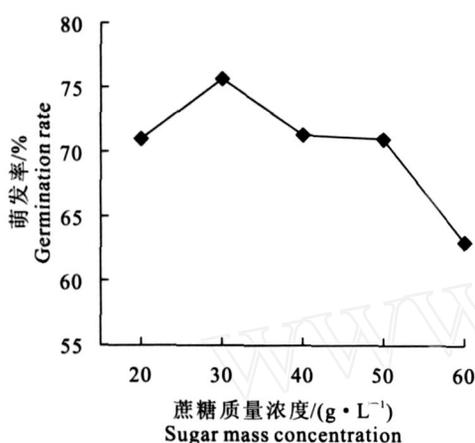


图 1 不同质量浓度蔗糖对秦光 2 号油桃种胚萌发的影响

Fig.1 Effect of different sugar concentration on embryo germination of the nectarine cultivar Qingguang2[#]

2.2 秦光 2 号油桃下胚轴再生试验结果

2.2.1 形态学位置对下胚轴再生不定芽的影响

试验发现,下胚轴的上、中、下各部分在再生能力上有显著差异,其下部没有再生能力,接种后很快褐化死亡。由表 1 可以看出,与中部相比,上部再生能力更强,达到 34.67%,而中部仅为 18.67%,二者差异显著。

2.2.2 暗培养时间对下胚轴再生不定芽的影响

试验发现,未进行暗培养的下胚轴愈伤组织诱导率明显低于经过暗培养处理的愈伤组织,但各处理间对下胚轴再生不定芽的影响无显著差异($P < 0.05$)。

2.2.3 预培养时间对下胚轴再生不定芽的影响

预培养时间越短,胚轴越嫩,在培养过程中较易形成愈伤组织,产生不定芽,但随着预培养时间的延长,胚轴变老,不易形成愈伤组织,逐渐褐化死亡,难产生不定芽。由表 2 可以看出,经过低温处理的种胚

率最高,达到 75.66%。随着蔗糖质量浓度的增加,萌发率有所下降,但各处理间无显著差异。

2.1.4 GA 质量浓度对种胚萌发的影响 由图 2 可以看出,用一定质量浓度的 GA 浸泡秦光 2 号种胚可以提高其萌发率,且随浸泡时间的延长和 GA 质量浓度的增加,萌发率均有所提高,其中,用 1600 mg/L GA 浸泡 12 h,萌发率可达到 45.33%,浸泡 24 h 时萌发率最高,达到 62.3%。说明应用外源生长调节剂能够解除种子的休眠,GA 可以部分替代低温处理打破休眠。

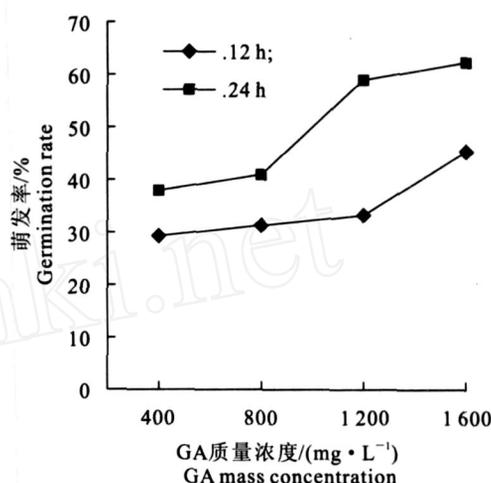


图 2 不同质量浓度 GA 对秦光 2 号油桃种胚萌发的影响

Fig.2 Effect of the different mass concentration GA on embryo germination of the nectarine cultivar Qingguang2[#]移至光下常温培养,7 d 时诱导率最高,达到 34.38%。

表 1 形态学位置对秦光 2 号油桃下胚轴再生不定芽的影响

Table 1 Effect of morphological positions on adventitious bud occurrences of hypocotyls of the nectarine variety Qingguang2[#]

形态学位置 Morphological position	再生率/% Regeneration rate	平均再生不定芽数 Mean bud number per regeneration explant
上部 Upper	34.67 ± 0.07 a	1.41 ± 0.19 a
中部 Middle	18.67 ± 0.05 b	1.55 ± 0.21 a
下部 Under	0	0

注:不同小写字母表示邓肯氏新复极差测验差异显著($P = 0.05$)。下表同。

Note: Different small letters in the same column indicate significant difference by Duncan's SSR Test ($P = 0.05$). The same as below.

2.2.4 培养基对下胚轴再生不定芽的影响 由表 3 可以看出,MS 不适合秦光 2 号油桃下胚轴的再生,再生率为 0。G 和 QL 培养基对秦光 2 号油桃下

胚轴再生的影响差异不显著 ($P < 0.05$), 在 QL 培养基中再生率为 31.0%, G 培养基中为 20.33%。

表 2 预培养时间对秦光 2 号油桃下胚轴再生不定芽的影响

Table 2 Effect of beforehand train days on adventitious bud occurrences of hypocotyls of the nectarine variety Qingguang2 #

预培养时间/ d Beforehand train time	接种时期 Inoculation time	接种量 Inoculum size	愈伤组织数 Callus	不定芽数 Adventitious bud	分化率/ % Polarization rate	诱导率/ % Inducement rate
7	胚根长出约 1 cm Radicle is about 1 cm	32	21	11	65.63	34.38
11	胚轴淡黄色 Radicle become straw yellow	35	17	6	48.57	17.14
15	胚轴淡黄绿色 Radicle become pistachio	36	11	0	30.56	0

表 3 培养基对秦光 2 号油桃下胚轴再生不定芽的影响

Table 3 Effect of different medium on adventitious bud occurrences of hypocotyls of the nectarine variety Qingguang2 #

培养基 Medium	再生率 % Regeneration rate	平均再生不定芽数 Mean bud number per regeneration explant
G	20.33 ± 0.66 a	1.50 ± 0.3
QL	31.00 ± 0.13 a	1.63 ± 0.5
MS	0	0

2.2.5 不同培养基激素组合对下胚轴再生不定芽的影响 由表 4 可以看出,秦光 2 号油桃在 QL 培养基上以 TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 激素组合的下胚轴再生率最高,达到 38.67%;在 G 培养基上也以 TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 激素组合的下胚轴再生率最高,达到 26.27%。平均再生不定芽数在 QL + TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 培养基上最多,为 2.50 个,在 G 培养基上,平均再生不定芽数以 TDZ 4.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 最多,为 1.35 个。

表 4 不同激素组合对秦光 2 号油桃下胚轴再生不定芽的影响

Table 4 Effect of different hormone combination on adventitious bud occurrences of hypocotyls of the nectarine variety Qingguang2 #

激素处理/ (mg · L ⁻¹) Hormone treatment			G		QL	
TDZ	6-BA	NAA	再生率/ % Regeneration rate	平均再生不定芽数 Mean bud number per regeneration explant	再生率/ % Regeneration rate	平均再生不定芽数 Mean bud number per regeneration explant
1.0	0	0.5	5.67 ± 0.10 b	0.33 ± 0.58 a	0	0
2.0	0	0.5	26.27 ± 0.0 a	1.31 ± 0.29 a	38.67 ± 0.10 a	2.50 ± 0.50 a
3.0	0	0.5	16.67 ± 0.17 ab	0.83 ± 0.76 a	31.33 ± 0.17 ab	1.67 ± 0.58 abc
4.0	0	0.5	11.33 ± 0.10 ab	1.35 ± 1.15 a	22.33 ± 0.17 abc	1.83 ± 0.29 ab
5.0	0	0.5	17.00 ± 0 ab	1.30 ± 0.58 a	17.00 ± 0 bcd	1.65 ± 0.57 abc
0	2.0	0.5	0	0	0	0
0	4.0	0.5	5.37 ± 0.1 b	0.67 ± 1.15 a	11.33 ± 0.10 cd	1.00 ± 1.00 bcd
0	6.0	0.5	11.33 ± 0.10 ab	1.00 ± 1.00 a	16.67 ± 0.17 bcd	0.83 ± 0.76 bc
0	8.0	0.5	3.67 ± 0.10 b	0.65 ± 1.15 a	5.67 ± 0.1 cd	0.63 ± 0.54 cd
0	10.0	0.5	5.43 ± 0.12 b	0.33 ± 0.58 a	11.32 ± 0.11 cd	0.67 ± 0.58 cd

3 讨论

目前,对桃种胚萌发诱导的研究较多,张满让等^[11]研究认为,WPM 是早熟油桃胚培养的最适培养基,其最高萌发率为 95.56%;Chopra^[12]将“Sharbati”品种桃种胚在 8℃ 低温下分别培养 4,7,10,13 周后发现,其萌发率随低温培养时间的延长呈上升趋势;田增胜等^[9]研究发现,低温处理能够提高华光和曙光油桃幼胚的萌发率,但在不同培养基中表现结果有差异,华光在 MS 培养基中低温处理 75 d 萌

发率达到 85.43%,曙光在 G 培养基中萌发率较高,达到 81.26%。从本试验结果可以看出,秦光 2 号油桃种胚低温处理 75 d,能够提高种胚萌发率,使其达到 93.33%,且所得下胚轴及幼苗较未低温处理健壮。同时,种胚经 GA 浸泡处理的萌发率随处理时间延长和 GA 质量浓度的增加而提高,在 1600 mg/L GA 溶液中处理 24 h 萌发率最高,可达到 62.3%。

建立稳定高效的再生体系是利用基因工程改良果树品种的一个重要前提。阎国华等^[7]以京艳和晚

蜜合子胚下胚轴为外植体直接再生不定芽,其中京艳再生率最高为 95.2%,晚蜜为 43.3%;田增胜等^[9]以华光和曙光油桃合子胚上胚轴为外植体直接再生不定芽,华光再生率最高为 23.43%,曙光为 17.47%。从本试验结果可以看出,晚熟油桃秦光 2 号下胚轴可以直接从未产生愈伤组织的切口部位产生不定芽,再生率最高为 38.67%。对下胚轴进行分段试验发现,只有下胚轴上端靠近子叶的部位能再生不定芽,再生率为 34.67%,中部产生不定芽较少,下部不产生,且容易褐化死亡。这可能是由于靠近子叶的胚轴部分细胞分生能力较强,极性表达强,在合适的培养条件下,可提高体细胞胚的诱导频率,产生不定芽^[13]。预培养时间长,可能导致细胞分化程度高,这也是分化率和诱导率降低的原因之一。激素种类及其质量浓度对油桃下胚轴不定芽的再生有重要作用,其中细胞分裂素 TDZ 的效果优于 6-BA,这与对一些木本植物再生的研究结果相同^[14-15]。但 TDZ 并不是质量浓度越高越好,试验发现,TDZ 质量浓度高于 4 mg/L 再生率反而下降,以 2~3 mg/L 较为适宜。6-BA 质量浓度过高或过低均不适于诱导不定芽的再生。在不同培养基和激素组合中,以 QL 为基本培养基,TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 组合最为适宜。为提高油桃下胚轴再生不定芽的再生频率,不同激素质量浓度与组合以及其他相关因素尚需进一步研究。

[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] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 马均. 枣胚轴组织培养的初步研究[J]. 林业科技,2001,26(1):55-57.
- [6] 王鸿,马锋旺,郝燕. 山杏下胚轴再生植株的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(5):127-129.
- [7] 阎国华,周宇. 桃幼胚下胚轴高频离体再生[J]. 果树学报,2002,19(4):231-234.
- [8] 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.
- [9] 田增胜,韩明玉,张满让,等. 影响早熟油桃胚轴培养及再生因素的研究[J]. 西北植物学报,2005,25(7):1452-1457.
- [10] Mehanna H T. The effect of testa on peach seed[J]. Scientia Horticulturae,1985,25(3):247-254.
- [11] 张满让,韩明玉,田玉命,等. 影响早熟油桃胚轴培养的几个因子[J]. 果树学报,2004,21(4):382-384.
- [12] Chopra H R. Effect of seed germination and seed coat on the germination of subtropical peach CV Sharbati [J]. Punjab Horticultural Journal,1987,27(1/2):42-45.
- [13] 崔凯荣,戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [14] Escalettes V, Dosba F. *In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus spp* [J]. Plant Sci,1993,90:201-209.
- [15] Olaya Perea-Tornero, Jose E, Alicia V. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot[J]. Plant Sci,2000,158:61-70.
- [1] 阎国华,周宇. 桃幼胚离体培养再生植株的研究[J]. 园艺学