

嘎拉苹果单芽系组培苗的获得

高 兵^{1,2}, 孙 俊^{1,3}, 章 镇¹

(1. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 山西林业职业技术学院 园艺系 山西 太原 030009; 3. 安徽农业大学 园艺学院 安徽 合肥 230036)

摘 要:以皇家嘎拉苹果芽为外植体, 研究不同消毒方法、消毒时间、不同防褐化措施和不同激素配比对组培苗获得的影响。结果表明: 嘎拉芽消毒选择 0.1% HgCl₂ 消毒 7 min 为宜; 接种前使用 4 g/L PVP、接种后暗培养 10 d 左右可以较有效地减轻褐变; 诱导、增殖培养基是 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 继代、扩繁培养基是 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 继代周期以 28~30 d 为宜。

关键词:苹果; 组培苗; 消毒方法; 防褐措施; 激素配比

中图分类号: S 661.103.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)06-0005-03

植物组织培养技术不仅是植物体细胞遗传学的基础, 而且对理论研究和植物基因工程以及农作物品种改良和种苗快速繁育都有重大意义。应用组织培养实现苹果的快速繁殖、无病毒苹果苗的产生以及基因变异从而获得新品种苹果等具有重要的研究价值。前人在苹果组织培养中已经做了大量研究, 但对于苹果单芽系组培苗研究尚未报道。试验以嘎拉苹果为材料, 研究影响嘎拉苹果单芽系组培苗繁殖体系建立的因素, 主要针对组织培养中常遇到的外植体污染、褐化和玻璃化苗问题进行研究, 为实现嘎拉苹果的快速繁育和基因工程的应用提供有力的保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

“皇家嘎拉”苹果(*Malus domestica* Borkh CV. Royal Gala), 2003 年春天从徐州果园采集未萌芽的 1 a 生枝条, 保湿于 4℃冰箱。基本培养基为 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 从冰箱中取出枝条, 于恒温培养箱(25℃)中水培催芽, 直至芽萌发并露出 2~3 片叶。用手术刀将萌发的芽从枝条上取下, 流水冲洗 2~3 h 后, 在无菌超净台上利用不同方法对外植体消毒不同的时间, 每种处理接种 6 瓶, 每瓶 2 个芽, 重复 2 次。

1.2.2 防褐化处理 接种前, 采用培养基中附加 Vc、Ac、PVP 和对芽进行 4℃低温处理、Na₂S₂O₃ 浸泡的方法。每种处理接种 6 瓶, 每瓶 2 个芽, 重复 2 次。接种后, 采取间隔不同天数更换培养基, 以确定最佳的防褐措施。

1.2.3 组培苗的快繁与继代 以 MS 为基本培养基, 使用激素 BA 和 NAA 进行了 20 种浓度组合, 每个浓度组合接种 6 瓶, 每瓶选取生长势相对一致的 2 个顶芽, (30±2) d 继代 1 次, 统计每组处理芽增殖数量和生长情况, 重复 2 次。另外, 分别以 (16±2)、(26±2)、(34±2) d 为继代周期进行继代培养。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对外植体污染率与成活率的影响

由表 1 可知, 处理 2 比处理 1 的 70%酒精消毒时间长 5 s, 污染率少 30.34%, 同时成活率也少 39.67%; 处理 3、处理 4 和处理 5 相比, 随着 0.1%升汞+吐温时间的加长, 成活率降低。说明植物的芽对酒精比较敏感, 使用酒精消毒的时间较长时, 虽然污染率比较低, 但对外植体易造成伤害。处理 6 和处理 7 消毒方法中, 0.1%升汞+吐温消毒 7 s 的污染率是消毒 5 s 的 1.875 倍, 但是成活率却是消毒 5 s 的 78.92%; 处理 8 和处理 9 消毒方法中, 0.1%升汞+吐温消毒 7 s 的污染率是消毒 5 s 的 79.10%, 成活率是消毒 5 s 的 1.02 倍。说明尽管 HgCl₂ 杀毒效果很好, 但是对外植体却有很强的杀伤作用, 抑制外植体的萌芽生长, 尤其是随着处理时间的加长, 毒害的作用也加强。经 9 种处理后的统计数据值可以看出, 0.1% HgCl₂ 消毒 7 min 的试验结果好, 外植体的成活率高, 为 79.2%, 污染率较低, 为 22.5%。因此, 嘎拉芽消毒选择 0.1% HgCl₂ 消毒 7 min 为宜, 不需经酒精消毒。

第一作者简介:高兵(1979-), 女, 山西太原人, 硕士, 现从事园艺教学工作。

通讯作者:章镇(1947-), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 现从事果树学的科研与教学工作。E-mail: gbsusan.student@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200190)。

收稿日期: 2009-12-04

表1 不同消毒处理对外植体的影响

Table 1 Effects of different sterilizing methods on the explants

| 处理 Treatment | 无菌水 Aseptic water dipping/ min | 70%酒 精 70% Alcohol's | 0.1%升汞+ 吐温 0.1% HgCl ₂ + Tween/ min | 污染率 Percentage of contaminative explants/ % | 成活率 Percentage of surviving explants/ % |
|-----------------|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1 | 15 | 10 | 0 | 32.3 | 66.3 |
| 2 | 15 | 15 | 0 | 22.5 | 40 |
| 3 | 15 | 0 | 5 | 42.2 | 82.1 |
| 4 | 15 | 0 | 7 | 22.5 | 79.2 |
| 5 | 15 | 0 | 9 | 24.3 | 76.3 |
| 6 | 30 | 10 | 5 | 20 | 65 |
| 7 | 30 | 10 | 7 | 37.5 | 51.3 |
| 8 | 30 | 15 | 5 | 13.4 | 40.3 |
| 9 | 30 | 15 | 7 | 10.6 | 41.2 |

2.2 防褐化措施对褐化率的影响

2.2.1 接种前不同防褐化措施对褐化率的影响 由表2看出,在接种30 d统计褐变程度及褐变率,发现接种前采取不同的防褐措施后,都能比较明显地抑制外植体的褐变,减轻组织和培养基的褐变程度。抗褐变剂种类不同,其效果不同,其中PVP对于防止外植体褐变效果最好,外植体褐变度最小,褐变率最小的仅为36.7%,为对照76.7%的一半左右。Vc较差些,最小的为53.6%,活性炭的效果最差,为68.0%。抗褐变剂浓度不同,效果也不同,随着PVP浓度的增大,外植体的褐变度降低,浓度为4 g/L的效果最好,浓度为2 g/L效果较好;1 g/L的Vc比2 g/L效果更好,褐变率分别为53.6%和58.2%;对于Ac,与2 g/L和3 g/L相比,1 g/L防褐变的效果最差,褐变程度最大,褐变率最高,随着浓度的增加,褐变程度降低,褐变率变化较小。消毒前4℃处理芽的防褐效果较好,随处理时间的增加,褐变程度及褐变率都有所降低,但变化不大。2%Na₂S₂O₃浸泡20 min比30 min的褐变率低,可能是因为浸泡时间增加S离子对组织的伤害加重。结果表明接种前使用4 g/L PVP防褐化效果最好。

表2 接种前不同防褐化处理对褐变的影响

Table 2 Effect on browning by different methods before inoculation

| 抗褐变方法 Anti-browning method | 使用浓度 或时间 Treatment concentration or time | 褐变情况 Browning extent | 芽褐变率 Browning rate/ % |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 培养基附加 | 1 | +++ | 68 |
| Culture medium addition | 2 | +++ | 62.2 |
| Ac/g·L ⁻¹ | 3 | ++ | 58.6 |
| 培养基附加 | 0.5 | ++ | 63.7 |
| Culture medium addition | 1 | ++ | 53.6 |
| Vc/g·L ⁻¹ | 2 | ++ | 58.2 |
| 培养基附加 | 1 | + | 66.9 |
| Culture medium addition | 2 | + | 51.7 |
| PVP/g·L ⁻¹ | 4 | + | 36.7 |
| 消毒前芽4℃处理时间 | 2 | ++ | 60.8 |
| Time under 4℃ of bud before disinfection/h | 4 | + | 57.2 |
| | 6 | + | 53 |
| 2% Na ₂ S ₂ O ₃ 浸泡 | 10 | ++ | 65 |
| 时间 Soaking time/ min | 20 | ++ | 53.2 |
| | 30 | ++ | 59.6 |
| 对照 | 0 | +++ | 76.7 |

2.2.2 接种后不同防褐化措施对褐化率的影响 由表3可看出,接种后3 d更换培养基明显比9 d褐变程度、褐变率低,15 d才更换培养基的,褐变程度严重,而且褐变率达到100%;暗培养天数的多少会明显的影响芽的褐变程度,暗培养3 d不仅褐变情况较严重,而且褐变率均在60%以上,暗培养6 d的褐变率也较高,只有短时间内(3 d)更换培养基才会降低褐变率,当暗培养达到10 d时,褐变程度和褐变率都有明显下降,最低为12.5%。综上所述,芽接种后暗培养10 d左右可以有效地减轻褐变,结合每3 d更换培养基将能达到更理想的防褐效果。

表3 接种后不同防褐化处理对褐变的影响

Table 3 Effect on browning by different methods after inoculation

| 更换培养基天数 Changing medium day/ d | 暗培养天数 Dark culture day/ d | 培养基变褐情况 Browning medium | 芽褐变率 Browning rate/ % |
|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 3 | 3 | ++ | 60.6 |
| | 6 | + | 29.2 |
| | 10 | + | 12.5 |
| 9 | 3 | ++ | 87.4 |
| | 6 | ++ | 75 |
| | 10 | + | 50 |
| 15 | 3 | +++ | 100 |
| | 6 | +++ | 100 |
| | 10 | ++ | 66.7 |

注:接种前、后的防褐措施分别进行

Note: Method of lightening browning before inoculation or after it is respective

2.3 组培苗的快速繁殖

2.3.1 激素浓度对比对快繁的影响 由表4看出,就BA单因素来看,随着BA浓度的升高,芽的诱导率及每个外植体上的平均芽数基本也呈上升的趋势。BA为4.0 mg/L的组合,芽的增殖数平均约为接种时2个的近6倍,但同时植株的玻璃化现象也明显增加。一般认为,培养基中BA含量的高低,直接影响玻璃化苗的发生与否,只有细胞分裂素与生长素的合理搭配,才能达到理想的生长分化效果。试验中BA为0.5~1.0 mg/L时,玻璃化率为0,BA为4.0 mg/L时,玻璃化率高达33.3%,当BA浓度小于2.0 mg/L时,BA:NAA在(5:1)~(20:1),没有玻璃化现象。另有研究表明BA浓度高时,植株生长高度会受到抑制,该试验也可看出这一点,BA为4.0 mg/L时,植株的高度均明显下降。BA浓度在0.5~1.0 mg/L的组合,芽的分化数量较少,生长缓慢且叶片小而发黄,不利于快繁。综合以上各点,从芽的分化量、生长势及玻璃化程度考虑,组合BA/NAA为2.0/0.1最适合嘎拉苹果芽的快繁,芽平均增殖5倍,植株高2.03 cm,无玻璃化现象。

2.3.2 继代周期对芽增殖和生长的影响 据预备试验的观察,从芽的增殖数量、生长势和生长速度考虑,嘎拉苹果芽继代培养与扩大繁殖采用MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L最为适宜,这时芽的增殖数基本稳定在5倍左右,生长迅速,生长势强,芽苗深绿色。芽经过诱

表4 嘎拉快繁激素浓度对植株生长的影响

Table 4 Effect on plant growth of combinations of hormones in ‘Gala’

| 激素浓度组合 Combines of hormone BA/NAA | 培养 28 d 芽数 Number of shoots after twenty-eight days culture/ 个 | 植株平均高度 Average length of shoots/ cm | 玻璃化率 Percentage of glass shoot/ % |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0.5/0.05 | 5 | 1.45 | 0 |
| 1.0/0.05 | 7 | 1.51 | 0 |
| 2.0/0.05 | 8 | 1.93 | 8.3 |
| 4.0/0.05 | 10 | 1.44 | 33.3 |
| 0.5/0.1 | 6 | 1.51 | 0 |
| 1.0/0.1 | 7 | 2.02 | 0 |
| 2.0/0.1 | 9 | 2.03 | 0 |
| 4.0/0.1 | 11 | 1.45 | 29.1 |
| 0.5/0.2 | 4 | 1.47 | 0 |
| 1.0/0.2 | 5 | 1.58 | 0 |
| 2.0/0.2 | 8 | 1.51 | 0 |
| 4.0/0.2 | 10 | 1.48 | 16.7 |
| 0.5/0.4 | 3 | 1.56 | 0 |
| 1.0/0.4 | 4 | 1.63 | 0 |
| 2.0/0.4 | 6 | 1.51 | 0 |
| 4.0/0.4 | 7 | 1.49 | 25 |

导或增殖后在同一培养基上培养时间过长会使材料干枯,长势减弱,最终逐渐死亡。因此适时地对芽进行转接培养是十分必要的。嘎拉增殖培养中 14 d 左右才出现新的小芽,28 d 后每个新增殖的小芽有 1~2 片小叶产生,此时芽生长的较健壮,随着芽增殖数量及每个小芽上叶片数目的增多,芽的生长逐渐变慢,并有部分芽开始变枯,如果此时仍不进行转接,将严重影响芽的生长。因此,28~30 d 进行转接继代是比较合适的,此时转接,不但可使芽的增殖系数达到 5 倍左右,而且转接后,芽生长较健壮。如果转接的太早,如 18~22 d 不但会减少增殖的数量,而且后代的生长状况也不好。

3 结论与讨论

试验采用了在室内水培的方法,既避免了大范围的污染,又使消毒用的时间相对较短。褐变是植物组织培养过程中普遍存在的现象^[1],在外植体接种前,用抗氧化剂浸泡一定时间,能收到一定效果^[2],在培养基中加入吸附剂(Ac 和 PVP)可以抑制褐变。适当的暗培养

可促进试管苗的生长和酶物质的增加^[3-5]。试验中的嘎拉,接种前培养基添加 4 g/L PVP,接种后暗培养 10 d,3 d 更换 1 次培养基都能有效地减轻褐变程度,提高芽的成活率。

培养基的筛选是组织培养的基本内容之一,一般来说,在茎尖培养和芽诱导时主要用 MS 培养基^[6]。植物生长调节物质种类及浓度搭配的合理选择,是组织培养的初代芽诱导成功与否的关键。对诱导出的芽进行增殖及继代培养,是植物组织培养成功与否的关键。该试验发现,分化率及其生长量不仅取决于 BA、NAA 的浓度和外植体的质量,而且取决于激素的配比。在外植体质量相近的情况下,BA 和 NAA 达到设定的最低或最高浓度时,分化率较小;BA 2.0 mg/L、NAA 0.1 mg/L 时,分化率较高,且没有玻璃化苗现象。孙爱君等^[7]研究表明,BA 与 NAA 比值为 20 时,分化效果最好。继代培养则选择 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的培养基,继代周期以增殖培养后 28~30 d 为佳,太早或太迟均不利。

参考文献

[1] Yu U, Pmeredith C. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine[J]. J. Amer Soc Hort Sci. 1986; 456-466.
[2] 韩素英, 齐立旺, 张淑改, 等. 核桃组培中防止组织氧化褐变措施的研究[J]. 山西农业大学学报. 1995, 15(4): 339-341.
[3] 裴东, 郑均宝, 凌艳荣, 等. 红富士苹果试管培养中器官分化及其部分生理指标的研究[J]. 园艺学报. 1997, 24(3): 229-234.
[4] 裴东, 袁丽钗, 奚声珂. 核桃品种试管嫩茎生根的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(2): 32-38.
[5] 师校欣, 杜国强, 高仪, 等. 黑暗培养对苹果组培快繁及叶片再生的影响[J]. 河北农业大学学报. 2004, 27(4): 18-21.
[6] 袁巧平. 生物技术与林木试管微型选育[J]. 世界林业研究. 1990(3): 51-55.
[7] 孙爱君, 章镇, 姚泉洪, 等. 苹果与八棱海棠的试管苗外植体植株再生[J]. 上海农业学报. 2000, 16(2): 23-30.

Gala Apple Access to a Single Bud Tissue Culture System

GAO Bing^{1,2}, SUN Jun^{1,3}, ZHANG Zhen¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing Jiangsu 210095; 2. Department of Horticulture, Shanxi Forestry Vocational and Technical University, Taiyuan, Shanxi 030009; 3. College of Horticulture Anhui Agricultural University, Hefei Anhui 230036)

Abstract: The buds sprouted from the cutting shoots cultured in water in a greenhouse were applied to study the effects on tissue culture plant of Royal Gala apple of different sterilizing methods and times, different preventing browning methods and different combinations of hormones. The results showed that the optimal sterilizing method of buds was treating with 0.1% HgCl₂ for 7 min; the conditions of 4 g/L PVP, upper dark treatment for 10 days were beneficial to lightening browning; the most suitable medium for buds induction was MS supplemented with BA 2.0 mg/L and NAA 0.1 mg/L, for multiplication was MS supplemented with BA 0.5 mg/L and NAA 0.1 mg/L; the suited subculture time was 28~30 days.

Key words: apple; tissue culture seedling; sterilizing methods; preventing browning methods; combinations of hormones