

# “爱神玫瑰”葡萄杂交胚 胚性愈伤组织诱导与保持的研究

闫爱玲, 张国军, 孙磊, 徐海英

(北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

**摘 要:**以无核葡萄“爱神玫瑰”的杂交胚为试材,通过试验筛选出了胚性愈伤诱导基本培养基:NN<sub>69</sub>;胚性愈伤组织诱导培养基:NN<sub>69</sub>+TDZ 0.05 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L;胚性愈伤组织长期保持与增殖培养基:NN<sub>69</sub>+6-BA 0.2 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 和 NN<sub>69</sub>+2,4-D 0.2 mg/L+TDZ 0.1 mg/L 为“爱神玫瑰”较适宜的培养基。

**关键词:**无核葡萄;胚性愈伤诱导;保持

**中图分类号:**S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0154-03

近年来,随着生活水平的提高和社会的发展,人们对果品的要求越来越高,无核葡萄作为重要的鲜食和制干品种,深受人们的喜爱,其遗传改良、品种更新成为无核葡萄发展的主要方向。葡萄品种“爱神玫瑰”,北京地区陆地栽培条件下7月中旬浆果成熟,成熟期极早,而且果粒为红紫或紫黑色,具有较浓郁的玫瑰香

味,可溶性固形物含量也很高,为17%~19%,是优良的极早熟无核鲜食品种。但存在果粒偏小的问题,为了得到大粒无核品种,对其进行了杂交育种。但由于无核葡萄间杂交时合子胚未发育成熟就中途败育,无法得到杂交后代,给育种工作带来很大困难。为了解决败育问题,采用了未成熟合子胚胚性愈伤组织诱导及胚状体产生和植株再生的方法。该试验就是对该品种的杂交胚的胚性愈伤组织的诱导及保存进行了研究,为无核葡萄通过体胚发生途径再生的顺利进行奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试材取自北京市农林科学院林业果树研究所内生

第一作者简介:闫爱玲(1972-),女,硕士,副研究员,现从事葡萄育种与栽培研究工作。E-mail:lgsyal@sina.com。

责任作者:徐海英(1963-),女,硕士,研究员,研究方向为葡萄育种。E-mail:haiyingxu63@sina.com。

基金项目:北京市科技新星计划资助项目(2007B043)。

收稿日期:2011-05-04

## Establishment of Regeneration System of Cotyledon and Hypocotyl *in vitro* of Eggplant

GONG Jing<sup>1</sup>, CHU Yun-xia<sup>2,3</sup>, XU Shuang<sup>1</sup>, ZHA Ding-shi<sup>1</sup>

(1. Horticultural Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106; 2. Institute for Agri-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201403; 3. School of Agricultural and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

**Abstract:** The cotyledon and hypocotyl from three eggplant asepsis seedlings were cultured on the medium with different 6-BA and NAA concentrations to study their effects on the callus induction and shoot differentiation. The results indicated that some callus could be induced and adventitious buds could be differentiated in all kinds of medium, but there were obvious different in different medium. The optimum medium for eggplant callus formation and bud differentiation from hypocotyls was MS+6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L and the best medium for bud differentiation from cotyledon was different between different samples, there were MS+6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L for sample 1 (purple, long clavate eggplant), MS+6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L for sample 2 (mauve, line shape eggplant) and MS+6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L for sample 3 (modena, short clavate eggplant) respective.

**Key words:** eggplant; callus; bud differentiation; plant regeneration

长的 6 a 生“爱神玫瑰”与“无核白鸡心”葡萄品种的杂交果实。

1.2 试验方法

在杂交坐果后 35 d 取“爱神玫瑰”与“无核白鸡心”杂交果实,采集果穗中部均匀一致的果粒,流水冲净后先在 0.1% 的新洁尔灭(5%)溶液中浸泡 30 min,然后用 0.1% 的升汞消毒 6~8 min,再用无菌水洗 3~4 次,在无菌条件下取胚珠。将消毒好的果实用解剖刀剖离,取出胚珠,再切喙,在解剖镜下切开胚珠用解剖针取胚,接种于培养基上。每处理 8~10 瓶,每瓶 6~8 个胚。

1.2.1 培养基制备及培养条件 采用 NN<sub>69</sub>、B<sub>5</sub>、MS 等基本培养基,配制成含不同激素种类和浓度配比的培养瓶中装入 40 mL 培养基,高压灭菌锅在 121℃ 灭菌 20 min。愈伤组织诱导培养基诱导愈伤组织在黑暗条件下进行,温度为(25±1)℃,每 30 d 继代 1 次,愈伤组织诱导后转至保持和增殖培养基内。

1.2.2 基本培养基的筛选 以 MS、B<sub>5</sub>、NN<sub>69</sub> 为基本培养基,附加不同激素。即 MS+2,4-D 0.5 mg/L+TDZ 0.05 mg/L,B<sub>5</sub>+2,4-D 0.5 mg/L+TDZ 0.05 mg/L,NN<sub>69</sub>+2,4-D 0.5 mg/L+TDZ 0.05 mg/L,通过诱导的愈伤组织来筛选适宜的基本培养基。

1.2.3 胚性愈伤诱导 采用 NN<sub>69</sub> 为基本培养基,培养基中附加不同浓度的 2,4-D 和 6-BA 和 TDZ。浓度单位均为 mg/L。

1.2.4 胚性愈伤组织保持与增殖培养基 胚性愈伤组织保持与增殖培养基为 NN<sub>69</sub>+6-BA+2,4-D 和 NN<sub>69</sub>+2,4-D+TDZ,培养基中都加入蔗糖 30 g/L,水解酪蛋白 500 mg/L。试验设计为: B1: NN<sub>69</sub>+6-BA 1.0+2,4-D 0.5; B2: NN<sub>69</sub>+6-BA 0.5+2,4-D 0.5; B3: NN<sub>69</sub>+6-BA 0.5+2,4-D 1.0; B4: NN<sub>69</sub>+6-BA 0.2+2,4-D 0.1; B5: NN<sub>69</sub>+6-BA 0.2+2,4-D 0.2; B6: NN<sub>69</sub>+6-BA 0.2+2,4-D 0.5; B7: NN<sub>69</sub>+2,4-D 0.5+TDZ 0.05; B8: NN<sub>69</sub>+2,4-D 1.0+TDZ 0.1; B9: NN<sub>69</sub>+2,4-D 0.1+TDZ 0.2; B10: NN<sub>69</sub>+2,4-D 0.1+TDZ 0.1; B11: NN<sub>69</sub>+2,4-D 0.2+TDZ 0.1; B12: NN<sub>69</sub>+2,4-D 0.3+TDZ 0.1。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

不论是 MS、B<sub>5</sub> 还是 NN<sub>69</sub> 基本培养基,在附加一定浓度的 2,4-D 与 6-BA 时葡萄胚珠都能诱导愈伤组织产生。对“爱神玫瑰”的试验表明,在附加相同激素的情况下,MS、B<sub>5</sub> 和 NN<sub>69</sub> 3 种培养基的愈伤组织诱导频率分别为 45.2%、32.5% 和 63.4%,三者有一定的差异,但是愈伤组织出现的时间几乎没有差别,NN<sub>69</sub> 优于其它 2 种培养基。因此选 NN<sub>69</sub> 作为基本培养基。

表 1 不同培养基类型对“爱神玫瑰”愈伤组织诱导的影响

不同培养基类型	愈伤组织诱导率/%
MS+2,4-D 0.5 mg/L + TDZ 0.05 mg/L	45.2
B5+2,4-D 0.5 mg/L + TDZ 0.05 mg/L	32.5
NN <sub>69</sub> +2,4-D 0.5 mg/L + TDZ 0.05 mg/L	63.4

2.2 不同激素及浓度对比对愈伤组织生长的影响

由表 2 和图 1~3 可看出,只加入 2,4-D 愈伤组织特别疏松,大多为非胚性的。接种在 2,4-D 含量比较高的培养基上愈伤组织长得比较旺盛,结构也较疏松;而在 6-BA 与 TDZ 的组合的培养基上,产生的愈伤组织很少,有些就没有愈伤组织。只有在 NY11、NY3、NY6、NY14 等的培养基上,出现一些生长比较慢,且颜色为淡黄色或乳白色、较致密或呈现颗粒状的愈伤组织。这说明 2,4-D 与 6-BA 的组合及 2,4-D 与 TDZ 组合可以诱导出“爱神玫瑰”杂交胚产生胚性愈伤组织。且胚性愈伤与非胚性愈伤所占比例不同,只有二者适当组合,愈伤组织质量才较好。即在较高浓度的 BA 与相对较低浓度的 2,4-D(比例约为 1:2),及相对高浓度 2,4-D 的与低浓度 TDZ(比例约为 10:1)结合,才能产生胚性愈伤组织。而且 2,4-D、TDZ、6-BA 是在一定的浓度条件下才能得到较高的胚性愈伤组织诱导率。这个结果与杨德翠<sup>[1]</sup>在酿酒葡萄品种中胚性愈伤组织诱导结果一致。但是对于“爱神玫瑰”的杂交胚,胚性愈伤的诱导在 2,4-D 与 TDZ 组合的条件下结果更好。因此筛选出了“爱神玫瑰”品种胚性愈伤诱导较适宜的培养基是 NY3 (12.7%)、NY11 (33.4%)、NY14 (26.3%)。诱导出来的愈伤组织可分为 2 类,一类为白色到乳白色,结构松软及生长迅速的非胚性愈伤组织(图 1),另一类为乳白色,有时为金黄色到浅黄色,表面呈颗粒状结构,质地坚硬及增殖缓慢,表面多有光泽,为胚性愈伤组织,有很强的胚胎发生能力(图 2、3)。

表 2 不同激素浓度对比对“爱神玫瑰”愈伤组织生长的影响

培养基号	2,4-D	6-BA	TDZ	愈伤组织率/%	胚性愈伤组织率/%
NY1	0.5			42.8±3.02	0.00
NY2	1.0			57.7±1.11	0.00
NY3	0.5	1.0		52.1±3.50	12.7±2.32
NY4	1.0	0.5		61.9±2.36	1.02±1.34
NY5	2.0	0.5		78.3±0.58	0.00
NY6	0.5	2.0		26.4±2.13	8.6±1.56
NY7		1.0	0.05	5.2±0.3	1.20±0.5
NY8		2.0	0.05	3.00±1.01	0.05±2.4
NY9		1.0	0.1	0.00	0.00
NY10		2.0	0.1	0.00	0.00
NY11	0.5		0.05	46.5±2.52	33.4±3.42
NY12	1.0		0.05	57.1±1.23	1.4±0.42
NY13	0.5		0.1	25.7±3.02	5.7±1.38
NY14	1.0		0.1	37.3±1.2	26.3±4.31

2.3 胚性愈伤组织保持与增殖培养

基于在上面胚性愈伤组织的诱导试验中,在同一

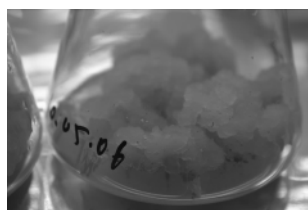


图1 非胚性愈伤



图2 胚性愈伤

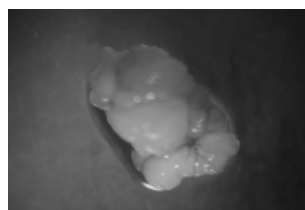


图3 胚性愈伤

组合中相对低浓度 2,4-D 与相对高浓度 6-BA 结合及相对高浓度 2,4-D 与相对低浓度 TDZ 的产生的愈伤组织多为胚性愈伤组织,进行了胚性愈伤组织的保持试验结果表明,具有分化能力的胚性愈伤组织,在长期继代培养中产生出大量能增殖的细胞群,但它们的分化能力发生了一定的变化。有的逐渐丧失分化能力,有的却长期保持较强的分化能力。在胚性愈伤组织保持与增殖选取了较高浓度的 6-BA(1.0、0.5 mg/L),但发现在 B1、B2、B3 培养基中长期(约 1 a)保存的愈伤组织,在后来诱导体胚时,未有体胚发生,只有 6-BA 0.2 mg/L 处理愈伤组织后来产生了成熟体胚。当 6-BA 为 0.2 mg/L 时,2,4-D 浓度为 0.1、0.2、0.5 mg/L 的 3 个处理,对胚性愈伤组织增殖效果,在后期成熟体细胞胚诱导中,只有浓度在 0.1 mg/L 2,4-D 的增殖培养基(即 B4 培养基)中保持的胚性愈伤组织才能诱导出较好的成熟体细胞胚。2,4-D 浓度 0.2 mg/L 处理虽然诱导出成熟体细胞胚,但为畸形胚。在长期继代培养中也采用了相对高浓度 2,4-D 与低浓度 TDZ 培养方式来保存已诱导出的胚性愈伤组织,发现 2,4-D 高浓度(1.0、0.5 mg/L)对胚性愈伤的保持没有促进作用,在长期的保持过程中要适当提高 TDZ 的浓度才能使胚性愈伤组织保持长期分化能力。而且要保持胚性愈伤组织的分化能力,在继代时要通过不断的分离和筛选,使增殖细胞群中保持分化的细胞得到大量增殖而被保留下来,淘汰细胞群中分化能力减弱的细胞群。试验结果表明,“爱神玫瑰”的胚性愈伤组织的长期保持和增殖采用 BA 0.2 mg/L 和适当 2,4-D 0.1 mg/L 即 B4 培养基,在 2,4-D 与 TDZ 的组合中与诱导胚性

愈伤时相比降低了 2,4-D 浓度、提高了 TDZ 的浓度,即 B11 培养基较好。

### 3 结论与讨论

无核葡萄品种“爱神玫瑰”的胚性愈伤组织诱导较适宜的培养基为  $NN_{69} + TDZ 0.05 \text{ mg/L} + 2,4-D 0.5 \text{ mg/L}$ ;在胚性愈伤组织的长期继代培养过程中,相对于生长素比较高浓度的细胞分裂素和较低水平的生长素,虽易导致愈伤组织变褐、早衰,但其表面产生的愈伤组织,仍能保持颗粒状结构,细胞质丰富,增殖迅速。Saxena 等<sup>[2]</sup>、Visser 等<sup>[3]</sup>发现在许多植物种类中 TDZ 能替代生长素和细胞分裂素促进体细胞胚胎发生,这在该试验中“爱神玫瑰”的胚性愈伤组织的诱导、胚性长期保持培养中得到了证实。NY11、NY14 及 B11 培养基中 TDZ 可能就替代了生长素和细胞分裂素的作用,只是它的活性更强些,比起 6-BA 等激素,TDZ 只需更低的浓度就起作用了。还需要今后更多的试验进一步证实。在该试验“爱神玫瑰”胚性愈伤组织长期保持与增殖较适宜的培养基为  $NN_{69} + 6-BA 0.2 \text{ mg/L} + 2,4-D 0.1 \text{ mg/L}$  和  $NN_{69} + 2,4-D 0.2 \text{ mg/L} + TDZ 0.1 \text{ mg/L}$ 。

### 参考文献

- [1] 杨德翠. 酿酒葡萄幼胚体细胞胚胎发生[D]. 兰州:甘肃农业大学,2001.
- [2] Saxena P K, Malik K A, Gill R. Induction by TDZ of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut[J]. *Planta*,1992,187:421-424.
- [3] Visser C, Quresni A, Gill R. Morphoregulatory role of TDZ. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyls cultures[J]. *Plant Physiol*,1992,99:1704-1707.

## Studies on the Initiation, Maintenance of Embryogenic Callus of Hybrid Embryo ‘Aishenmeigui’

YAN Ai-ling, ZHANG Guo-jun, SUN Lei, XU Hai-ying

(Institute of Forestry Pomology, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100093)

**Abstract:** This study was carried on immature zygotic embryos of seedless grapes ‘Aishenmeigui’ about callus induction and embryogenic callus maintenance. For ‘Aishenmeigui’ callus initiation media was solid  $NN_{69}$  media combinationed of 2,4-D 0.5 mg/L and TDZ 0.05 mg/L. Embryogenic callus maintain and proliferation media was  $NN_{69}$  supplemented with 6-BA 0.2 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L and  $NN_{69}$  supplemented with 2,4-D 0.2 mg/L + TDZ 0.1 mg/L.

**Key words:** seedless grape; embryogenic callus initiation; maintenance