

山杏愈伤组织诱导及植株再生

何炎红, 吴高殷, 白玉娥, 田有亮, 金牧兰, 邹薇薇

(内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要:以山杏成熟胚和胚乳为外植体,以MS为基本培养基进行组织培养,研究了基于山杏经愈伤组织途径建立的再生植株技术。结果表明:以胚乳为外植体诱导愈伤组织的适宜培养基为MS+6-苄基腺嘌呤(6-BA) 1.0 mg/L+2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 3 g/L;愈伤组织的继代及分化培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+萘乙酸(NAA)0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 3 g/L;以成熟胚诱导愈伤组织和丛生芽增殖分化培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 3 g/L;生根培养基为1/2MS+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 3 g/L。

关键词:山杏;愈伤组织;植株再生

中图分类号:S 662.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)04-0101-06

山杏(*Armeniaca sibirica* (L.) Lam)主要分布于我国北方地区,是主要的经济树种和生态绿化树种,具有广泛应用和实际价值。山杏常用的繁殖方法是播种繁殖和嫁接繁殖,嫁接繁殖能够保持品种的优良特性,遗传性状稳定,但繁殖速度慢,严重阻碍优良品种的推广应用。播种繁殖需要层积等技术,种子处理时间长,要求高,且种子产量往往受到气候影响,限制了山杏播种

苗的培养。而植物组织培养技术,能够在较短时间内利用较少的材料,大量繁殖出具有统一优良性状的山杏苗木,不受地区、气候等影响,扩繁速度比常规方法近数万倍,已被广泛应用于多种植物^[1]。但迄今为止,山杏组培苗在生产中尚未应用,对山杏组织培养的研究报道较少。王鸿^[2]以山杏下胚轴、子叶、茎尖和无性系叶片作为外植体,研究不同外植体、外源植物生长调节剂、培养基类型、培养时间、接种方式等因素对增殖效率、愈伤组织诱导率、再生频率和试管苗生根的影响。刘小蕾^[3]通过对山杏的茎尖、叶片和下胚轴的组织培养初步建立了山杏再生体系。现以山杏胚乳、成熟胚为外植体,经愈伤组织途径诱导丛生芽,建立再生植株,以期如山杏快速繁殖和种质资源保护等提供参考依据。

第一作者简介:何炎红(1979-),女,内蒙古呼和浩特人,博士,副教授,研究方向为森林培育。E-mail:hyh20012008@imau.edu.cn.

责任作者:白玉娥(1968-),女,教授,研究方向为林木遗传育种。E-mail:bye666@163.com.

基金项目:国家科技支撑资助项目(2013BAD14B02)。

收稿日期:2015-10-28

Establishment of High Efficient Regeneration System of *Pyrus ussuriensis* Leaves

WANG Defen, ZHANG Mei, LI Dingli, WANG Ran, MA Chunhui, SONG Jiankun
(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: In this study, an efficient regeneration system of leaves of *Pyrus ussuriensis* was established by using the NN69 basic culture medium. The results showed that introduction effect of TDZ was better than that of 6-BA and KT, introduction effect of IBA and IAA was better than NAA and 2,4-D, in adventitious bud regeneration. The optimal culture medium of shoot regeneration whose efficiency was 100.0% and the number of shoots per plant was 8.47, was NN69+TDZ 3.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L. The optimal of root induction was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L, and the efficiency of it was 45.5% and root number was 2.24 per shoot.

Keywords: *Pyrus ussuriensis*; leaves; tissue culture; regeneration

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试山杏种子取自内蒙古呼和浩特内蒙古良种繁育基地山杏种植园区。

1.2 试验方法

1.2.1 消毒时间的选择 种子经温水浸泡 24~48 h,将种壳剥离后,滴加 2 滴吐温-20,自来水冲洗 30 min 后在超净工作台进行消毒。用 75%酒精处理 30 s 后用无菌水清洗 2 次,再用 2% NaClO 分别处理 4、6、8 min,统计污染率及愈伤组织生长状况。

1.2.2 愈伤组织诱导基本培养基的选择 以胚乳为外植体,将其分别接种到含 6-BA 1 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L 的 MS、1/2MS、N6 和 B5 4 种基本培养基中,在(25±2)℃、暗培养条件下诱导愈伤组织,统计诱导率及生长状况。

1.2.3 胚乳愈伤组织的诱导 将外植体接种至含不同浓度细胞分裂素 6-苄基腺嘌呤 6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L)、激动素 KT(0.5、1.0、2.0 mg/L)、生长素萘乙酸 NAA(0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L)、吲哚丁酸 IBA(0.1 mg/L)、吲哚乙酸 IAA(0.1 mg/L)、2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D(0.1、0.3、0.5、1.0 mg/L)的不同激素组合培养基中,在(25±2)℃、暗培养条件下诱导愈伤组织,统计诱导率及愈伤组织生长情况。

1.2.4 愈伤组织的继代及分化诱导 将培养 20 d 的

表 1 消毒时间的筛选

Table 1 The selection of sterilization time

处理 Treatment	污染率 Contamination rate/%	生长状况 Growth status
75%酒精 30 s+2%NaClO 4 min	6.67	接种 9 d,愈伤组织从伤口处长出愈伤,诱导率达 90%
75%酒精 30 s+2%NaClO 6 min	6.67	接种 9 d,部分长出愈伤组织,诱导率达 63.34%
75%酒精 30 s+2%NaClO 8 min	3.36	接种 9 d,愈伤诱导率低,极少部分长出愈伤,诱导率为 36.67%

2.2 愈伤组织诱导基本培养基的筛选

由表 2 可知,4 种培养基诱导愈伤组织的诱导率都大于 80%,愈伤组织呈白色颗粒状。诱导产生愈伤组织时间 MS 最快为 15 d。在相同诱导时间下,MS 培养基增殖量最大,其次为 1/2MS,N6 最小。4 种培养基可分为高盐、中盐和低盐^[4],MS 培养基为高盐培养基,诱导率、生长状况等最好,其次为中盐培养基(1/2MS、B5),低盐培养基(N6)最差。

表 2 基本培养基的筛选

Table 2 The selection of basic culture medium

培养基种类 Medium type	诱导率 Induction rate/%	生长状况 Growth status
MS	100.0	15 d 后愈伤组织颗粒状,增殖量大、成团,白色
1/2MS	100.0	20 d 后愈伤组织颗粒状,增殖量少、成团,白色
N6	82.5	20 d 后愈伤组织颗粒状,未增殖,白色
B5	92.5	20 d 后愈伤组织颗粒状,增殖量少、成团,白色

愈伤组织转接至含不同浓度细胞分裂素 6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L)+NAA(0.1、0.2、0.5 mg/L)组合的培养基中进行丛生芽诱导,统计愈伤组织增殖率及分化情况。

1.2.5 成熟胚芽的诱导及分化增殖 消毒后的种子切下成熟胚接种至含不同浓度细胞分裂素 6-BA(0.1、0.5、1.0、2.0 mg/L)和 NAA(0.5 mg/L)的培养基中,按照 2 种培养方法进行培养,第 1 组对成熟胚先进行暗培养 14 d,再进行光培养;第 2 组成熟胚不经暗培养直接进行光培养。统计愈伤组织诱导率及增殖分化情况。

1.2.6 丛生芽生根及移栽 选择叶片翠绿、生长良好、长约 2 cm 的芽,接种至以 1/2MS 为基本培养基、含不同浓度生长素 NAA 和 IBA 的培养基中,统计生根率。待试管苗根长至 2 cm 且有侧根时,进行驯苗,并统计试管苗成活率。

2 结果与分析

2.1 消毒时间的筛选

由表 1 可知,消毒时间长短对外植体的污染率无明显差异,外植体诱导愈伤组织诱导率与消毒时间长短有直接关系,消毒时间越长对外植体的损害越大,需诱导时间也越长,所以选取适宜消毒时间组合:75%酒精 30 s 和 2%NaClO 处理 4 min。

2.3 诱导愈伤组织的激素组合筛选

由表 3 可知,随着生长素 NAA 浓度的提高(S1~S4),愈伤组织诱导率逐渐提高,最高达 86.1%,高浓度的 NAA 利于愈伤组织的诱导(图 1);随着生长素 2,4-D 浓度的提高(S5~S8),愈伤组织诱导率逐渐提高,最高达 100%,但 2,4-D 浓度过高(1.0 mg/L)外植体极易褐化(图 2);细胞分裂素 6-BA 浓度的增加对外植体的诱导率无明显差异(L1~L3);激动素 KT 对外植体的愈伤组织诱导作用小(L4~L6);然而生长素 IBA 和 IAA 均不利于外植体愈伤组织的诱导(L7~L8)。综上所述,不同生长素诱导胚乳愈伤组织活性的大小依次为 2,4-D>NAA>IBA 和 IAA,诱导胚乳愈伤组织适宜培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 3 g/L。

表 3 不同激素组合对诱导愈伤组织的影响

Table 3 The effect of different hormone combinations on inducing callus

处理 Treatment	激素配比 Hormone combination/(mg · L ⁻¹)	诱导率 Induction rate/ %	愈伤生长情况 Callus growth
S1	6-BA 1.0+NAA 0.1	13.0	大部分外植体膨大弯曲,部分伤口有少许愈伤
S2	6-BA 1.0+NAA 0.2	19.4	大部分外植体膨大弯曲,部分伤口有少许愈伤
S3	6-BA 1.0+NAA 0.5	55.5	伤口处小团状愈伤,黄白色
S4	6-BA 1.0+NAA 1.0	86.1	外植体膨大弯曲,伤口四周均有颗粒状愈伤,白色
S5	6-BA 0.5+2,4-D 0.1	80.5	疏松颗粒状愈伤,白色
S6	6-BA 0.5+2,4-D 0.3	88.8	紧密成团状愈伤,黄白色
S7	6-BA 0.5+2,4-D 0.5	100.0	紧密成团状,大量愈伤,黄白色
S8	6-BA 0.5+2,4-D 1.0	100.0	疏松块状愈伤,褐黄色,愈伤褐化严重
L1	6-BA 0.2+2,4-D 0.5	94.2	团状,少量愈伤,白色
L2	6-BA 1.0+2,4-D 0.5	97.2	团状颗粒状,大量愈伤,白色
L3	6-BA 2.0+2,4-D 0.5	97.2	团状颗粒状,大量愈伤,黄白色轻微褐化
L4	KT 0.5+2,4-D 0.5	11.1	少量颗粒状愈伤,白色
L5	KT 1.0+2,4-D 0.5	27.7	少量颗粒状愈伤,白色,部分外植体从愈伤长出根
L6	KT 2.0+2,4-D 0.5	25.0	少量颗粒状愈伤,白色,部分外植体从愈伤长出根
L7	6-BA 1.0+IBA 0.1	0.0	外植体膨大,无愈伤组织
L8	6-BA 1.0+IAA 0.1	0.0	外植体膨大,无愈伤组织

(Y6~Y8),分化苗较弱并且伴随严重的玻璃化(图 3);生长素 NAA 浓度的增加主要影响愈伤组织的形成(图 4)。综上所述,适宜外植体分化的培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 3 g/L。

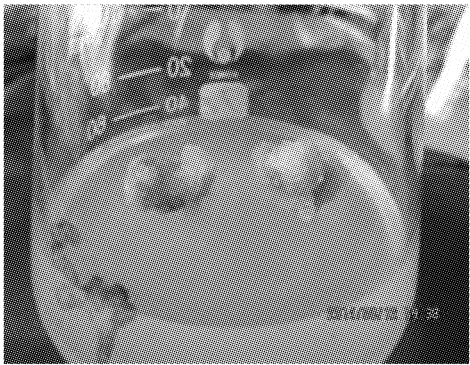


图 1 高浓度细胞分裂素诱导愈伤组织
Fig. 1 High concentrations of cytokinin induced callus

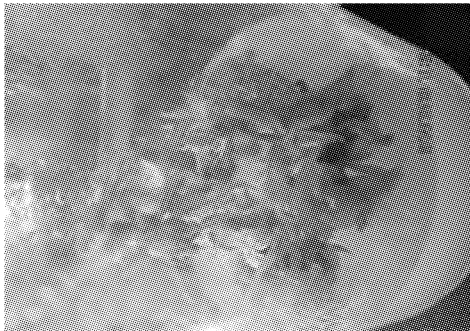


图 3 高浓度分裂素下愈伤的分化
Fig. 3 The callus differentiation under high concentration of cytokinin

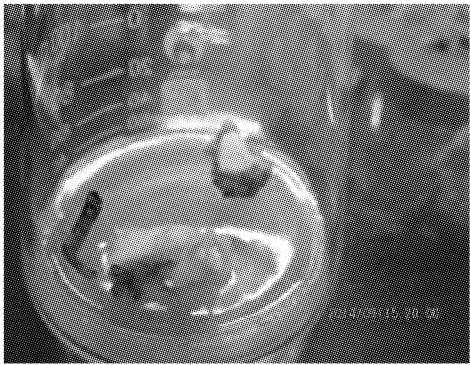


图 2 2,4-D 诱导愈伤组织
Fig. 2 2,4-D induced callus

2.4 愈伤组织的继代及分化诱导

由表 4 可知,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,丛生芽分化增殖率达 6.0 以上(Y3~Y5),但随着 6-BA 浓度的提高



图 4 适宜愈伤组织分化的培养基
Fig. 4 The suitable medium for differentiation of callus

表 4 不同激素配比对愈伤组织增殖分化影响

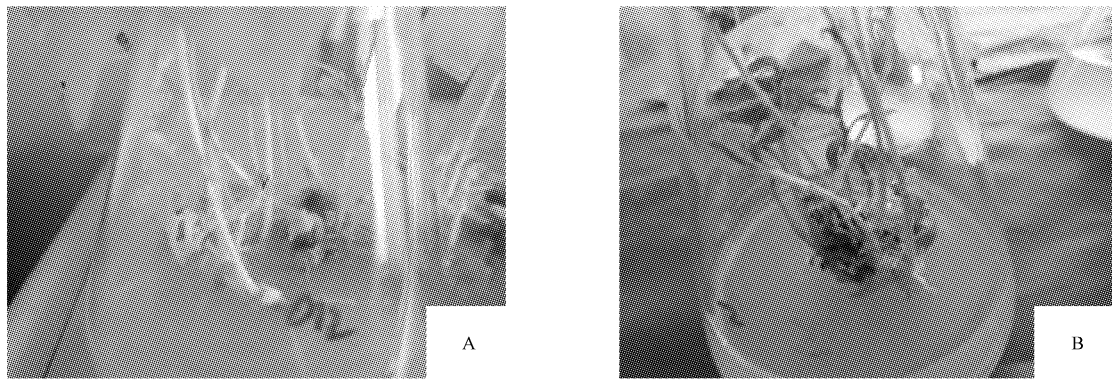
Table 4 The effect of different hormone combinations on proliferation and differentiation of callus

处理 Treatment	激素配比 Hormone combination/(mg·L ⁻¹)	增殖率 Proliferation rate	芽分化情况 Bud differentiation
Y1	6-BA 0.5+NAA 0.1	3.4	分化芽良好,部分叶片卷曲
Y2	6-BA 0.5+NAA 0.2	3.7	分化芽良好
Y3	6-BA 1.0+NAA 0.1	6.3	分化芽良好,快,部分叶片卷曲,轻微水渍状
Y4	6-BA 1.0+NAA 0.2	6.0	分化芽良好,快,部分叶片卷曲,轻微水渍状
Y5	6-BA 1.0+NAA 0.5	6.1	分化苗弱,基部有大量愈伤
Y6	6-BA 2.0+NAA 0.1	4.7	分化苗弱,玻璃化现象严重
Y7	6-BA 2.0+NAA 0.2	5.4	分化苗弱,玻璃化现象严重
Y8	6-BA 2.0+NAA 0.5	3.2	分化苗弱,玻璃化现象严重,基部有愈伤

2.5 成熟胚丛生芽诱导及增殖和分化

经第 1 组试验获得的丛生芽茎节段徒长且不整齐(图 5),而第 2 组试验获得的丛生芽壮实且生长一致(图 6)。由表 5 可知,随着 6-BA 浓度的提高,丛生芽分化诱导率也相对提高(A1~A4),当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L

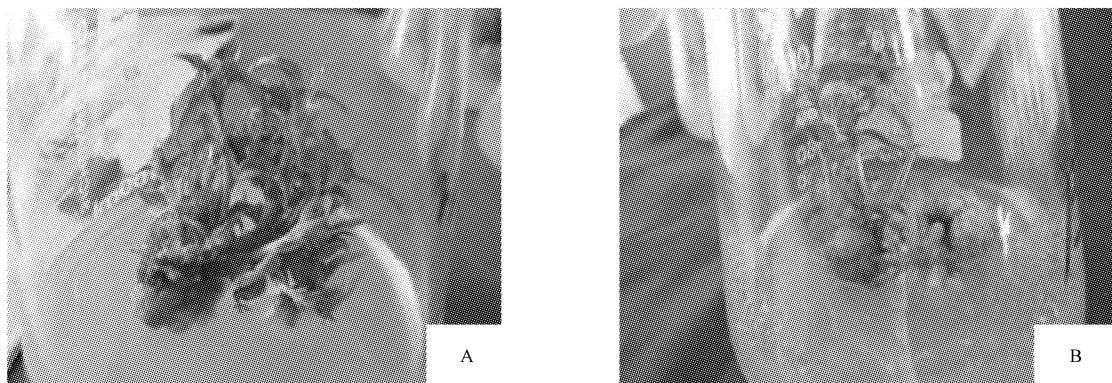
时,诱导率最大,为 82.5%,且丛生芽生长较好,低浓度 6-BA 不利于成熟胚丛生芽的诱导分化。虽然 A5 处理的诱导率低于 A4 处理,但 A5 处理可同时诱导根和丛生芽,且生长较好。



注:A,暗培养 14 d;B,光培养。
Note:A,cultured for 14 days in dark;B,cultured in light.

图 5 暗培养+光培养条件下丛生芽诱导和增殖

Fig.5 Induction and proliferation of multiple shoots under the condition of dark+light



注:A,附加 6-BA 2.0 mg/L 的培养基;B,附加 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的培养基。
Note: A,the medium with 2.0 mg/L 6-BA;B,the medium with 2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA.

图 6 成熟胚光培养下丛生芽诱导和增殖

Fig.6 Induction and proliferation of multiple shoots under the condition of light

表 5 不同激素组合对成熟胚丛生芽诱导和增殖的影响

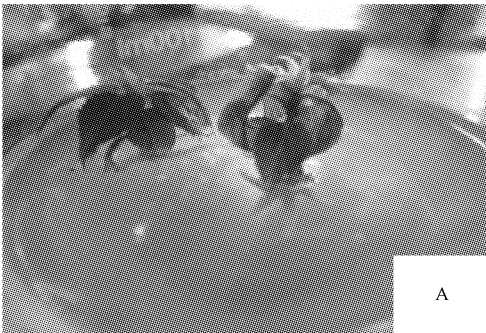
Table 5 The effect of different hormone combinations on induction and proliferation of mature embryo shoots

处理 Treatment	激素配比 Hormone combination/(mg · L ⁻¹)	诱导率 Induction rate/%	备注 Remark
A1	6-BA 0.1	0.0	未见芽丛,少量愈伤组织
A2	6-BA 0.5	30.0	愈伤组织继代后,从愈伤处长出芽丛,丛生芽数量较少
A3	6-BA 1.0	50.0	愈伤组织继代后,从愈伤处长出芽丛,丛生芽数量较多
A4	6-BA 2.0	82.5	愈伤组织继代后,从愈伤处长出芽丛,丛生芽数量较多,长势较 A3 好
A5	6-BA 2.0+NAA 0.5	75.0	愈伤组织继代后,从愈伤处长出芽丛且根从愈伤组织上分化部分长出须根;丛生芽数量较多,长势较 A3 好

2.6 丛生芽生根诱导及练苗

叶片翠绿,芽丛长至 2 cm 左右的芽,切下接种至 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 培

养基中,试管苗生根率可达 75%以上(图 7、8)。试管苗种植在蛭石:珍珠岩:腐殖土=1:1:2 混合土中,试管苗的成活率达 75%(图 9)。



注:A,上部;B,底部。
Note:A, up;B, bottom.

图 7 主根的分化

Fig. 7 Differentiation of the main root

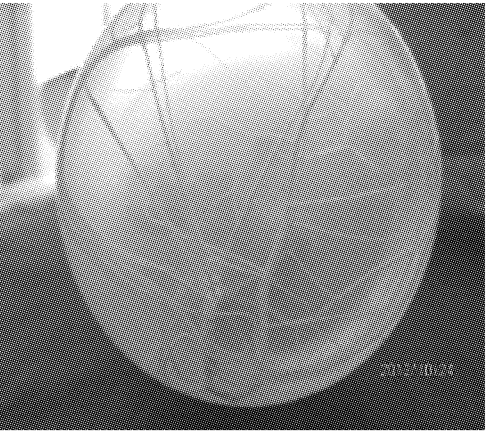


图 8 侧根的分化

Fig. 8 Differentiation of lateral root

3 结论与讨论

随着消毒时间的增加,种子感染率降低,但种子的受伤害程度较大,对外植体愈伤组织的诱导增加了诱导时间并降低了诱导率,消毒时间短,会增加外植体的污染率;适宜消毒方法为 75%酒精 30 s 和 2% NaClO 4 min。

以山杏胚乳为外植体研究 4 种基本培养基对愈伤



注:培养基成分蛭石:珍珠岩:腐殖土=1:1:2。
Note: Vermiculite: perlite: humus soil=1:1:2 in the medium.

图 9 试管苗的生长

Fig. 9 The growth of plant

组织诱导的影响,诱导愈伤组织使用高盐培养基较好。MS 培养基诱导时间短、增殖快,可作为诱导愈伤组织优选培养基。

愈伤组织的诱导研究得出细胞分裂素 6-BA 优于 KT;生长素诱导山杏愈伤组织活性的大小依次为 2,4-D>NAA>IBA 和 IAA,在 2,4-D 培养基中诱导出的愈伤组织为白色透明颗粒状且愈伤增殖量多,2,4-D 浓度的增

加,愈伤组织呈块状极易褐化死亡;所以胚乳愈伤组织诱导的适宜培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 3 g/L。

继代培养基不添加生长素 2,4-D,增加细胞分裂素浓度和降低生长素浓度利于丛生芽的分化,细胞分裂素的浓度过高丛生芽玻璃化的现象严重;该试验适宜愈伤组织分化培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 3 g/L。

成熟胚诱导丛生芽随着 6-BA 浓度的提高,芽丛的分化诱导率也相对提高至 82.5%,低浓度 6-BA 不利于丛生芽的分化并且愈伤组织较少;然而 6-BA 与 NAA 组合丛生芽的分化和根的分化可同步进行,但根的状况弱,不利于后期驯苗;适宜成熟胚增殖分化培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 3 g/L。

丛生芽诱导生根的培养基单独使用生长素更适合丛生芽根的分化,选取 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 为适宜培养基,生根率达 75%。移栽练苗基质选取蛭石:珍珠岩:腐殖土=1:1:2,成活率达 75%。

山杏成熟胚诱导愈伤组织的过程能在短期实现,愈伤组织诱导丛生芽的过程中分化率低,并且芽丛的质量不高,叶片有卷曲、玻璃化现象严重,原因可能是细胞分裂素浓度过高、培养基大量元素氮比例失衡、培养环境温度过高和湿度过大等因素所导致;主要因素是细胞分裂素使用浓度和培养瓶中湿度;细胞分裂素浓度过高促进细胞分裂极易引起试管苗的过度生长,加速玻璃化现象的发生,但当细胞分裂素浓度低时,丛生芽的增殖分化就会受到严重影响;在不透气的高湿培养瓶中,不利于气体的交换,苗的生长势快,玻璃化的发生频率也相

对较高。试验中应选取透气封口膜利于瓶内外气体的交换,从而降低试管苗玻璃化发生。

胚乳愈伤组织进行分化培养,分化率极低,愈伤组织不易分化,可能的原因其一是在愈伤组织诱导过程中使用生长素 2,4-D,2,4-D 的使用不利于愈伤组织的分化;其二,在分化培养基中添加的细胞分裂素和生长素浓度配比不适宜愈伤组织的分化。

试管苗在生根过程中,部分丛生芽叶片逐渐泛黄最后死亡,部分茎尖组织坏死,试管苗生根状况良好但生根苗不壮现象严重;可能与培养基的各成分有很大关系,山杏的分布在北方干旱地区,培养环境空气湿度过大也是原因之一;具体原因还需进一步的研究。

参考文献

- [1] 代丽,周宏宇,刘新云. 组织培养技术在果树方面的应用[C]//第五届全国干果生产、科研进展学术研讨会论文集,2007:200-202.
- [2] 王鸿. 杏的再生体系建立研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2005:1-20.
- [3] 刘小蕾. 山杏的再生体系建立研究[D]. 保定:河北农业大学,2008:1-6.
- [4] 巩振辉,申书兴. 植物组织培养[M]. 北京:化学工业出版社,2007:34-35.
- [5] 张献龙,唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京:科学出版社,2004:61-69.
- [6] 郭生武. 大扁杏组织培养的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2004:1-25.
- [7] 吴霞,上官小霞,李燕娥. 樱桃组织培养和快速繁殖技术体系的研究[J]. 山西农业科学,2002,30(2):49-51.
- [8] 陶秀东,吴春兰,王越铭. 巴旦杏组织培养快速繁殖技术研究[J]. 新疆农业科学,2005,46(6):415-417.
- [9] 吴延军. 桃组织培养及遗传转化的研究[D]. 杭州:浙江大学,2004.
- [10] 马锋旺,李嘉瑞. 山杏原生质体培养再生植株[J]. 园艺学报,1988,25(3):224-229.

Callus Induction and Plant Regeneration of *Armeniaca sibirica*

HE Yanhong, WU Gaoyin, BAI Yu'e, TIAN Youliang, JIN Mulan, ZOU Weiwei
(Forestry College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019)

Abstract: Taking mature embryo and endosperm of *Armeniaca sibirica* as explants, using MS media with different combinations of hormones, the regeneration plant of *Armeniaca sibirica* was established. The results showed that the formula of MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 3 g/L was better at the stage of inducing callus when endosperm was adopted as explant, and better medium of callus subculture and differentiation was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 3 g/L. MS+6-BA 2.0 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 3 g/L was the optimal medium for callus induction from mature embryo and the multiple shoots from callus, and during the proliferating period of clustered shoots, the rooting medium was 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 3 g/L.

Keywords: *Armeniaca sibirica*; callus; plant regeneration