

DOI:10.11937/bfyy.201709019

# “嘎拉”苹果叶片愈伤组织的诱导

高 兵<sup>1,2</sup>, 孙 俊<sup>1,3</sup>

(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“嘎拉”苹果单芽系组培苗叶片为外植体诱导愈伤组织,研究了愈伤组织诱导过程中植物生长调节剂种类及浓度配比、光照和黑暗条件以及继代天数对其形成及生长的影响。结果表明:各组合均能比较高效地诱导愈伤组织的形成,以 MS+蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>+2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>诱导效率最佳;愈伤组织的形成需要14~21 d的暗培养,继代周期以15~30 d为宜。

**关键词:**苹果;叶片;愈伤组织;生长调节剂;暗培养;继代周期

**中图分类号:**S 661.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)09-0088-05

苹果(*Malus pumila* Mill.)属蔷薇科苹果属植物,作为当今世界栽培最广泛的落叶果树<sup>[1]</sup>,苹果在国内外无论栽培面积和产量都位居水果前列,中国已经成为世界最大的苹果生产国,其生产正朝着基地化、良种化、优质化的方向发展,但也存在许多亟待解决的问题,这些问题需要通过生产管理、更多是依靠培育新品种来解决<sup>[2]</sup>。当前,苹果组培快繁和原生质培养的报道较多<sup>[3-7]</sup>,其分子机理方面的研究,愈伤组织是常用的试验材料,同时也是基因工程中进行基因转化必需的试验材料<sup>[8-10]</sup>。因此,研究不同品种苹果愈伤组织的诱导培养,对于利用愈伤组织研究苹果遗传转化奠定基础,也为进一步研究苹果组培快繁、种质保存和品质改良提供参考和实践基础。

**第一作者简介:**高兵(1979-),女,山西太原人,硕士,讲师,现主要从事园艺教学等工作。E-mail:754025816@qq.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30200190)。

**收稿日期:**2017-02-07

愈伤组织的形成过程受植物基因型、外植体类型及理化状态、培养基成分、光照条件、糖源浓度等诸因素互动作用的影响<sup>[11]</sup>。其中,生长调节物质的种类、含量及组成比例是调控植物器官产生愈伤组织的主导因素。该试验以“嘎拉”苹果单芽系组培苗叶片为外植体诱导愈伤组织,对影响愈伤组织诱导的因素进行了探讨,以期可以根据需要培育目的愈伤组织。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试植物材料均选取“嘎拉”苹果单芽系组培苗的叶片,且叶片生长势好,大而舒展、翠绿。

供试培养基及试剂:以 MS 作为基本培养基,琼脂 6.5 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8~6.0,附加不同浓度的蔗糖和植物生长调节剂 BA、NAA、2,4-D。

培养室条件:培养室温度(25±1)℃;光照强度 2 000 lx;光照时间 12 h 光/12 h 暗。

**Abstract:** *Cucumis melon* L. cv. ‘Huangdanzi’ cotyledon were used as test materials, using the method of tissue culture, effects of the cotyledon day age, different concentrations of 6-BA, IAA and cefotaxime on adventitious buds were studies. The results showed that the cotyledon age played an important role in inducing adventitious buds, the optimal induction time was two days after cotyledon cultured under light, the regeneration rate was 80%. In addition, MS+6-BA 1.2 mg·L<sup>-1</sup> was the best induction medium, the regeneration rate was 67%. Furthermore, 500 mg·L<sup>-1</sup> cefotaxime was the best concentration that could be used to eradicate agrobacterium, 25 mg·L<sup>-1</sup> kanamycin was the best screening concentration.

**Keywords:** melon; ‘Huangdanzi’; tissue culture; adventitious buds; regeneration system

## 1.2 试验方法

1.2.1 外植体接种 在超净工作台上,将“嘎拉”组培苗叶片剪成大小约  $0.25\text{ cm}^2$ ,接种于已配制好的培养基上,每瓶接种 20 个叶块。

1.2.2 愈伤组织诱导 蔗糖及不同生长调节剂的配比:以 MS 为基本培养基,蔗糖(10、20、30、40、60  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、BA(0.2、0.5、1.0、2.0、4.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、NAA(0.1、0.2、0.5、0.8、1.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、2,4-D(0.05、0.1、0.5、1.0、2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )4 个因子,每因子 5 个水平作正交实验,共 25 个处理组合(表 1),每个组合接种 6 瓶。另外,以 MS 为基本培养基,蔗糖浓度为 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,设置了只附加 BA 与 NAA 及只附加 2,4-D 的 5 个处理(表 2),以便更好地探索不同种类的植物生长调节剂在愈伤组织诱导中所起的作用,其它条件一致。不同的暗培养天数:将叶片接种后分别暗培养 0、14、21、28 d,然后转入光照条件下,记录并确定适宜的暗培养时间。不同的继代培养天数:诱导形成的愈伤组织分别继代培养(14 $\pm$ 2)、(28 $\pm$ 2)、(42 $\pm$ 2)、(56 $\pm$ 2)d 时,观察并记录愈伤组织诱导情况。

表 1 苹果叶片愈伤组织诱导正交设计

处理 Treatment	BA /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NAA /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	2,4-D /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	蔗糖 Sucrose /( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
1	0.2	0.1	0.1	40
2	0.5	0.1	2.0	60
3	1.0	0.1	1.0	10
4	2.0	0.1	0.05	30
5	4.0	0.1	0.5	20
6	0.2	0.2	0.5	30
7	0.5	0.2	0.1	20
8	1.0	0.2	2.0	30
9	2.0	0.2	1.0	60
10	4.0	0.2	0.05	10
11	0.2	0.5	0.05	60
12	0.5	0.5	0.5	30
13	1.0	0.5	0.1	30
14	2.0	0.5	2.0	20
15	4.0	0.5	1.0	40
16	0.2	0.8	1.0	20
17	0.5	0.8	0.05	40
18	1.0	0.8	0.5	60
19	2.0	0.8	0.1	10
20	4.0	0.8	2.0	30
21	0.2	1.5	2.0	10
22	0.5	1.5	1.0	30
23	1.0	1.5	0.05	20
24	2.0	1.5	0.5	40
25	4.0	1.5	0.1	30

表 2 苹果叶片愈伤组织诱导组合

处理 Treatment	BA /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NAA /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	2,4-D /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	蔗糖 Sucrose /( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
26	4.0	0.2	0.0	30
27	8.0	0.4	0.0	30
28	0.0	0.0	0.1	30
29	0.0	0.0	1.0	30
30	0.0	0.0	2.0	30

## 2 结果与分析

## 2.1 蔗糖及不同生长调节剂配比的诱导效果

由表 3 可以看出,随着蔗糖浓度的增加,愈伤组织开始发生的时间逐渐稍晚,说明高浓度的蔗糖对愈伤组织形成有抑制作用。而 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的组合之所以更晚一些,可能是蔗糖浓度过低,无法提供充足的生长所需物质及合适的渗透压。蔗糖浓度较高时,愈伤组织质量好。同时,愈伤组织诱导率随蔗糖浓度的升高,呈现先升高后降低的趋势,最佳浓度为 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。另外,试验中诱导的愈伤组织依据特征可分为 3 类:一是致密型(图 1)。愈伤组织基本为绿色,块状或颗粒状,结构紧密,表面光滑;二是松软型(图 2)。愈伤组织基本为黄色,块状或堆状,结构松散,半透明;三是粘糊型(图 3)。愈伤组织为灰白色,呈水浸状或粘糊堆状,软散无结构,继代困难。通常认为黄色松软型是胚性愈伤组织,在继代培养基上能很快增殖,在分化培养基上能诱导出体胚,而非胚性愈伤组织则不能。因为胚性愈伤组织是转基因的理想受体,而组织培养的目的就在于获得较高转化率的此型愈伤组织。所以通过继代培养中培养条件的选择及人为挑选,可以提高胚性率,获得较多的胚性细胞作为转基因所需要的受体。当蔗糖浓度相同时,2,4-D 浓度高的组合愈伤组织偏黄而疏松,2,4-D 浓度低的偏绿而致密。因此,可以根据需要培育目的愈伤组织。



图 1 致密型愈伤组织

Fig. 1 Tight callus



图2 松软型愈伤组织

Fig. 2 Loose callus



图3 粘稠型愈伤组织

Fig. 3 Soggy callus

对表3试验结果中的愈伤组织诱导率进行极差分析(表4)可知,影响“嘎拉”叶片愈伤组织诱导率的主导因子为2,4-D,NAA和BA次之。所以,愈伤组织诱导率的较优组合为:2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA

0.5 mg·L<sup>-1</sup>+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>。由于蔗糖各水平的处理组合数不同,因此其各水平的极差用诱导率的平均值表示可以看出,蔗糖对愈伤组织的影响较大,其较优水平为30 g·L<sup>-1</sup>。

表3

愈伤组织诱导正交实验结果

Table 3

Result of orthogonal design of the callus induction

处理 Treatment	愈伤组织开始发生时间 Callus form date/d	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	愈伤组织特征 Callus characteristic
1	18	76.7	淡绿色,无褐变,较致密,生长快
2	19	73.1	绿黄相间、有零星红色,无褐变,疏松致密兼有,生长快
3	21	48.7	明黄色,无褐变,疏松而湿润,生长很慢
4	13	87.3	深绿色,底部变褐,致密而干燥,生长较快
5	15	72.5	黄偏淡褐色,疏松而湿润,生长较快
6	16	81.0	上部白间淡绿色、底部黄色,致密,生长较快
7	13	62.1	绿白相间,无褐变,致密干燥,生长慢
8	13	85.3	黄偏淡褐色,疏松湿润,生长快
9	18	76.1	黄带绿、有零星红色、偶有发白,无褐变,致密干燥,生长快
10	23	43.2	淡黄发白、有的淡褐,小颗粒状,致密湿润,生长很慢
11	20	63.5	绿色、偶有上部发黄、底部发黑,致密干燥,生长快
12	14	84.3	绿色、有的淡褐,致密湿润,生长较快
13	13	83.2	上部绿色、底部褐黄,致密湿润,生长较快
14	11	93.7	黄色、略有发褐小颗粒,疏松湿润,生长快
15	19	73.2	黄色、轻微变褐,疏松湿润,略微水浸状,生长慢
16	14	71.0	黄色、上部淡绿色,有发褐颗粒,疏松湿润,生长慢
17	15	75.2	黄中带绿、少许发白或发褐,致密干燥,生长快
18	19	71.1	淡绿色、少量发白发黄、有零星红色,致密干燥,生长快
19	20	50.8	黄偏淡褐,小颗粒状,疏松湿润,生长很慢
20	16	86.1	明黄色,无褐变,疏松湿润,生长快
21	21	58.8	黄且发白,无褐变,极度疏松湿润,生长很慢
22	13	90.3	上部淡绿,底部黄色,较疏松干燥,生长较快
23	11	64.3	深绿色,底部略淡褐,致密湿润,生长慢
24	15	82.2	上部绿,底部黄、少数淡褐,疏松致密间有,湿润,生长慢
25	16	88.5	淡黄色,少数有暗黄小颗粒,较疏松干燥,生长较快

由表5可知,只含BA和NAA的组合,都能比较高效地诱导愈伤组织,并且在其浓度加倍的情况下,诱导的愈伤组织特征基本一致,均为绿色致密组织,再生苗旺盛;只含2,4-D的组合,也能比较高效地诱导愈伤组织的形成,但随着2,4-D浓度的升高,

愈伤组织的特征从颜色、质地、生长速度都发生很大的变化。说明单独使用BA和NAA,在一定的浓度范围内可以诱导相近的愈伤组织,而单独使用2,4-D,则受浓度变化的影响,愈伤组织的变化也较大。

表 4 不同激素、蔗糖配比对叶片愈伤组织形成影响的试验结果极差分析

Table 4 Analysis of the effect of different concentration of hormones and sucrose on callus induction

水平 Level	因素 Factor			
	BA	NAA	2,4-D	蔗糖 Sucrose
T1	351.0	358.3	330.5	50.38
T2	385.0	347.7	391.1	72.72
T3	352.6	397.7	361.3	83.75
T4	390.1	354.2	340.1	76.83
T5	363.5	384.1	397.0	70.95
极差 R	39.1	50.0	66.5	35.38

表 5 愈伤组织诱导试验结果

Table 5 Result of blank design of the callus induction

处理 Treatment	愈伤组织开始发生时间 Callus form date/d	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	愈伤组织特征 Callus characteristic
26	17	78.3	深绿色,致密干燥,再生旺盛,再生苗绿色,生长快
27	17	72.5	暗绿色,有的略黑,致密,再生旺盛,再生苗淡绿色,生长快
28	18	75.7	淡绿色,上部有绒毛,无褐变,致密干燥,生长较快
29	29	61.5	灰白色,湿软呈糊状,发粘,有褐变,生长慢
30	18	79.0	灰白、黄色均有,有褐变,疏松湿润,生长较快

## 2.2 不同暗培养天数的诱导效果

选择愈伤组织诱导率较优组合:蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA  $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +BA  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基,分别以 0、14、21、28 d 进行暗培养,每种培养天数接种 6 瓶,每瓶 20 个叶块。由表 6 可知,“嘎拉”叶片愈伤组织以暗培养 14~21 d 为宜,不进行暗培养,或进行暗培养,但在愈伤组织形成前

将其置于光下,均没有愈伤组织的发生,叶片最终死亡;暗培养至愈伤组织发生后再将其置于光照下培养,愈伤组织快速增殖,颜色逐渐鲜艳而有光泽;暗培养产生愈伤组织后继续留在黑暗处培养,愈伤组织增殖慢,呈灰白色或白色的粘糊状,无光泽。由此说明,“嘎拉”叶片愈伤组织的产生需要黑暗条件的启动,但进一步生长分化需要在光照下进行。

表 6 不同暗培养天数的诱导效果

Table 6 Result of different dark days training on induction

暗培养天数 Dark training days/d	接种数 Inoculated number/个	愈伤化数 Callus number/个	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	愈伤组织特征 Callus characteristic
0	120	0	0	叶片变褐
14	120	112	93.3	黄绿色,致密,生长快
21	120	120	100	淡黄色,疏松,生长较快
28	120	120	100	淡黄或灰白,疏松湿润,生长慢

## 2.3 不同继代天数对愈伤组织的影响效果

蔗糖浓度为  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,在 $(14\pm 2)\text{d}$ 内继代,愈伤组织有光泽且没有褐变现象,但生长较慢,大于此时间,愈伤组织褐变速度和程度均加快;蔗糖浓度为  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,愈伤组织在 $(28\pm 2)\text{d}$ 内继代也能较好的生长,但已经出现轻微的变褐;蔗糖浓度为  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,以 $(28\pm 2)\text{d}$ 继代,能很好地生长,愈伤组织也无褐变,大于此时间继代会明显出现变褐,且生长减慢;蔗糖浓度为  $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,在 $(56\pm 2)\text{d}$ 内继代愈伤组织都保持绿色,无褐变现象,但随继代时间的延长,生长明显减慢,且变得更加干燥。试验结果表明,随着蔗糖浓度的增加,愈伤组织的继代周期变长,但从生长和褐变的情况看,愈伤组

织在 30 d 继代为宜,个别组合相应提前。

## 3 讨论

愈伤组织的诱导和培养是内源激素和外源激素共同作用的结果,通过附加外源激素可以调节总的激素水平,从而完成由外植体脱分化形成愈伤组织的过程。在这个过程中,培养物的内源激素处于变化当中,外源激素也随之不断变动,将总激素调至最适水平,能够促进各个阶段的完成。

研究结果表明,正交实验中蔗糖浓度是最主要的因素,很大程度上决定了愈伤组织开始发生的时间和诱导率,其最优水平为  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,其次是 2,4-D,最优水平为  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,然后是 NAA 和 BA,最优水平分别为  $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

不同的物种愈伤组织诱导中对光的反应是不同的,西瓜<sup>[12]</sup>花药培养中,光照条件下也可以诱导出大量的愈伤组织。但较多树种<sup>[13-15]</sup>接种于脱分化培养基后并不需要强光照,有些树种在黑暗条件下进行培养,反而有利于愈伤组织的形成。该试验中,暗培养不同的天数发现,“嘎拉”叶片能否形成愈伤组织,取决于叶块在黑暗条件下的保留时间。而叶片开始形成愈伤组织时作光照培养,则有利于愈伤组织的进一步生长和分化,也为再生植株奠定基础。如果愈伤组织未形成,应继续保留在黑暗条件下培养,直至形成愈伤组织。如果长时间不能形成愈伤组织,应调整植物生长调节剂的种类或浓度。

愈伤组织很容易褐变而死亡,导致不能长期继代保存<sup>[16-17]</sup>。因此,根据实际情况适时进行继代,不仅可以使愈伤组织不断增殖,还能提高愈伤组织的松散性,这对于愈伤组织的进一步分化是非常必要的。该试验结果表明,“嘎拉”叶片愈伤组织从生长与褐变、愈伤组织颜色和质地考虑,都以(28±2)d继代一次为宜,对于有些处理愈伤组织更易褐变和减缓生长,则要(14±2)d继代一次。

#### 参考文献

- [1] 高海秀. 苹果原生质体培养研究[J]. 现代农业科学, 2016(13): 105, 108.
- [2] 赵恺, 刘伟, 刘忠巍, 等. 苹果组织培养研究概况[J]. 河北果树, 2011(5): 1-3.

- [3] 崔美, 焦齐庆, 陈学森, 等. 苹果叶片愈伤组织的诱导培养[J]. 山东农业科学, 2012, 44(3): 17-20.
- [4] 于丽艳, 王志和, 周波, 等. 苹果离体叶片再生体系两步培养法的研究[J]. 落叶果树, 2005(2): 5-8.
- [5] 韩焱, 王光林, 邢卓, 等. 观赏性苹果“红霞”的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 188.
- [6] 潘增光, 邓秀新. 苹果原生质体分离培养及植株再生[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 95-101.
- [7] 魏国芹, 李鼎立, 梁美霞, 等. 苹果原生质体培养再生愈伤组织[J]. 中国农学通报, 2009, 25(20): 179-186.
- [8] 冯晓明. 苹果 *bHLH* 基因 *MdcmHLH1* 克隆及功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [9] 柴丽娟. 苹果叶片再生体系的建立与优化[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- [10] 焦齐庆, 陈学森, 郑巧娜, 等. 苹果周期蛋白依赖性蛋白激酶亚基基因 *MdCKS* 表达载体的构建[J]. 山东农业科学, 2011(8): 1-3.
- [11] 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: 329-397.
- [12] 范双喜. 芦笋花药培养中影响因素的研究[J]. 北京农业科学, 1993, 11(6): 23-25.
- [13] 王震星, 张磊. 枣花药培养再生植株及其染色体倍性研究[J]. 北方果树, 1998(2): 5-6.
- [14] 曹孜义, 李唯, 张利平. 三倍体葡萄花药植株的诱导[J]. 科学通报, 1993, 38(5): 451-454.
- [15] 季华译. 杨树单倍体的生产[J]. 国外林业, 1996, 26(2): 14-17.
- [16] 韩晓红, 李磊, 段春红. 不同激素对红豆杉愈伤组织诱导及增殖的影响[J]. 绿色科技, 2013(1): 173-174, 178.
- [17] 张文泉, 闫伟. 红花槐愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 内蒙古农业大学学报, 2013, 34(1): 34-41.

## ‘Gala’ Apple Leaf Callus Induction

GAO Bing<sup>1,2</sup>, SUN Jun<sup>1,3</sup>

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

**Abstract:** Apple as the ‘Gala’ single bud somaclone leaf as explant callus induction, callus induction were studied in the process of plant growth regulators types and concentration ratio, light and dark conditions and transgenerational days on its formation and growth. The results showed that the combination could be more efficiently induce the formation of callus, MS + sugar 30 g · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> + BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> induced efficient; the formation of callus needed 14—21 days of dark raise, transgenerational cycle with 15—30 days was advisable.

**Keywords:** apple; leaf blade; callus; growth regulator; darkness; transgenerational cycle