

“鲁加 5 号”柱型苹果胚状体再生体系优化

周爱琴¹, 祝 军¹, 杨庆山², 王振猛², 李永涛², 魏海霞²

(1. 青岛农业大学, 山东 青岛 266109; 2. 山东省林业科学研究院, 山东 济南 250014)

摘 要:利用胚状体再生植株, 可以获得遗传稳定性好且数量多的再生植株, 这对于建立高频稳定的遗传转化体系具有重要意义。该试验以苹果新品种“鲁加 5 号”为试材, 采用叶片再生方法, 研究了其胚状体再生体系, 为建立遗传转化体系奠定了基础。结果表明: MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.20 mg·L⁻¹ 为“鲁加 5 号”最适宜的继代增殖培养基。叶片的最佳放置方式为近轴面接触培养基。胚胎发育阶段最佳暗培养时间为 10 d。最佳体细胞胚诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 5.0 mg·L⁻¹+TDZ 0.5 mg·L⁻¹。胚胎发育阶段, 通过胚状体不同时期形态学组织学观察, 显示胚状体发育时期经历原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚、子叶胚和成熟胚阶段。

关键词:胚状体; 再生; “鲁加 5 号”; 优化

中图分类号:S 661.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)10-0095-05

自 20 世纪 50 年代末, STEWARD 等^[1]利用胡萝卜根细胞通过体细胞胚胎发生成功形成再生植株以来, 研究人员在果树、农作物、林木和花卉的组织培养中都观察到体细胞胚胎发生^[2-6]。相比于器官发生途径, 体细胞胚胎发生具有数量多、速度快、结构完整、再生率高等优点。用于胚状体诱导的外植体有胚^[7]、叶片^[8]、胚轴^[9]、花药^[10]、花蕾^[11]、子房^[12-13]等, 前期研究发现在苹果上胚状体发生需要经历胚性细胞诱导期和胚胎发育期^[14]; 而不经芽发生途径只需一个不定芽诱导阶段^[15-16], 因此, 在苹果上诱导不定芽再生植株报道较多, 研究广泛; 而对苹果胚状体发生研究相对较少^[8, 17-18]。

第一作者简介:周爱琴(1964-), 女, 山东莱阳人, 本科, 副教授, 现主要从事果树育种与栽培等研究工作。E-mail: aqzhou@qau.edu.cn.

责任作者:魏海霞(1981-), 女, 山东东营人, 硕士研究生, 高级工程师, 现主要从事林木育种及盐碱地生态改良等研究工作。E-mail: weihaixia99@163.com.

基金项目:国家现代苹果产业技术体系资助项目(CARS-28-01-07); 国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2013BAD02B01); 山东省良种产业化工程资助项目; 青岛市民生科技计划资助项目(14-2-3-38-nsh); 青岛市现代果树产业技术体系资助项目(6622316107)。

收稿日期:2017-02-17

叶片直接发生体细胞胚的方法具有再生植株数量多、速度快、遗传稳定性好等优点, 可以减少转化体中的嵌合体发生率, 是一种可行的高效再生途径, 对苹果遗传转化具有重要意义。现以柱型苹果品种“鲁加 5 号”(Malus domestica cv. ‘Lujia No. 5’)为研究对象, 对影响其叶片胚状体发生的影响因子进行详细研究, 以期进一步优化高频稳定的再生体系, 为遗传转化工作打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用莱阳园艺试验站的“鲁加 5 号”柱型苹果茎尖培养, 获得的无菌组培苗为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 增殖培养基的筛选 分别取培养 30 d、苗高为 1.0~2.0 cm 的“鲁加 5 号”单芽, 接种于添加不同配比的 6-BA(1.0、2.0 mg·L⁻¹)和 NAA(0.05、0.10、0.20 mg·L⁻¹)的培养基(蔗糖 30 g·L⁻¹、琼脂 7.0 g·L⁻¹, pH 5.8)上。试验每处理 1 瓶, 每瓶接种 6 个单芽, 3 次重复。置温度(25±2)℃、光强 2 000~3 000 lx, 光照时间 16 h·d⁻¹下培养 30 d 后, 观察统计苗芽增殖情况。

1.2.2 叶片极性对胚状体发生的影响 以“鲁加 5 号”为试材, 取增殖培养 30 d 的幼嫩叶片切割后, 分

别将远轴面接触培养基(正放)和近轴面接触培养基(反放)置于体细胞胚诱导培养基上,暗培养 7 d 后,再转入胚胎发育培养基($MS+6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)中,培养方法及条件同 1.2.1,观察再生植株生长及再生状况,从而确定叶片的放置方式。

1.2.3 暗培养时间对胚状体再生的影响 以“鲁加 5 号”为试材,取增殖培养 30 d 的幼嫩叶片切割后,近轴面接触体细胞胚诱导培养基,先经 7 d 的前期暗培养,后转入含有少量生长素的的胚胎发育培养基上进行 0、5、10、15、20、25、30 d 的暗培养,30 d 后观察

统计胚状体再生情况。

1.2.4 激素对比对胚状体发生的影响 取继代培养 30 d 的“鲁加 5 号”无菌苗上部平展叶片,近轴面接触培养基置于体细胞胚诱导培养基(表 1)上暗培养 7 d,后转入胚胎发育培养基上,暗培养 10 d 后转到光下。30 d 后,统计再生芽数,计算叶片平均再生芽数和叶片再生率。每处理 1 个培养皿,每皿 10 个叶片,3 次重复。光培养:光周期为 16 h(光)/8 h(暗),光强 2 000~3 000 lx,温度 25 ℃(昼)/17 ℃(夜);暗培养:置暗箱中,温度 25 ℃(昼)/17 ℃(夜)。

表 1 各处理 6-BA、NAA、TDZ 及 2,4-D 浓度

处理 Treatments /(mg · L ⁻¹)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
6-BA	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0
NAA	2.5	2.5	5.0	5.0	2.5	2.5	5.0	5.0	2.5	2.5	5.0	5.0	2.5	2.5	5.0	5.0
TDZ	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—
2,4-D	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0

1.3 项目测定

平均增殖倍数=增殖芽个数/接种芽个数;叶片再生率(%)=再生芽叶片数/接种叶片数×100;叶片平均再生芽数(个)=再生不定芽总数/再生出不定芽的叶片数。

1.4 数据分析

采用 DPS 9.50 软件进行统计分析,采用 Duncan 法多重比较检验不同处理之间的差异性。

2 结果与分析

2.1 增殖培养基的筛选

试验结果表明,激素对比对苹果试管苗增殖效率有显著影响。由表 2 可知,处理 5 能最大限度地提高“鲁加 5 号”的单芽增殖倍数,高达 5.6。其增殖组培苗的叶片舒展,近椭圆形,节间较短,这可能与其柱型的生理特性有关。由统计结果可知,“鲁加

5 号”的单芽平均增殖倍数也存在显著差异。所以,确定 $MS+6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为“鲁加 5 号”最适宜的继代增殖培养基。

2.2 叶片极性对胚状体发生的作用

结果表明,叶片极性对“鲁加 5 号”叶片产生胚状体具有显著影响。“鲁加 5 号”叶片近轴面接触培养基(反放)(图 1-a)比远轴面接触培养基(正放)(图 1-b)叶片脱分化早,正放的叶片切口处易褐变,而反放的叶片培养 5~7 d 就有明显愈伤组织产生,发生不定芽时间也早。反放的叶片平均再生芽数也比正放要多。叶片正放时,部分芽进入培养基内部,有的甚至将叶托起,芽变得弯曲;叶片反放时,芽都能正常向上生长,而产生的根端能进入培养基,芽生长正常。

表 2 “鲁加 5 号”激素对比对离体单芽增殖的影响

处理 Treatment	激素组合 Combinations of hormone/(mg · L ⁻¹)		平均增殖倍数 Proliferation multiple
	NAA	6-BA	
1	0.05	1.0	1.3f
2	0.05	2.0	2.5d
3	0.10	1.0	3.6c
4	0.10	2.0	1.5e
5	0.20	1.0	5.6a
6	0.20	2.0	4.2b

注:不同小写字母表示经 LSD 测验达到 $P=0.05$ 差异显著水平。

Note: The significant difference ($P=0.05$) is indicated with different lowercase letters by LSD test.

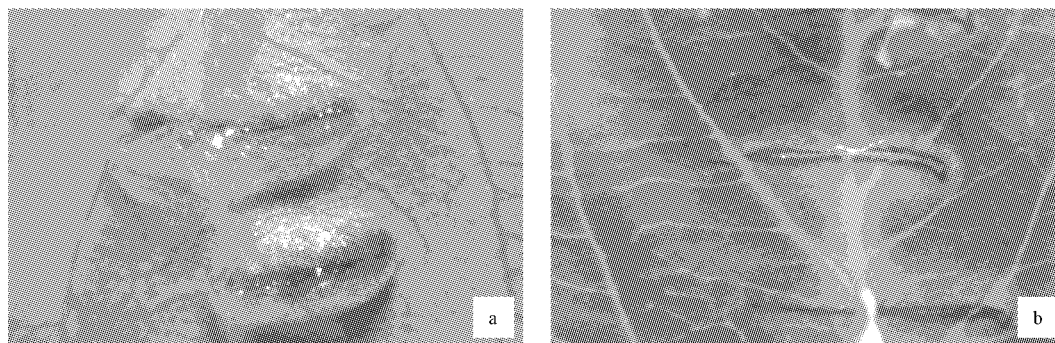


图1 “鲁加5号”近轴面接触培养基和远轴面接触培养基7 d后状况

Fig. 1 Situation for the leaves adxial surface touching medium(a) and abxial surface touching medium(b) 7 days later in ‘Lujia No. 5’

由表3可知,“鲁加5号”叶片正放时叶片再生率为90%,分别比叶片反放时再生率低10%。这可能是由于叶片正面的栅栏组织对培养基中的营养物质更敏感,而且它们也是叶片最后停止生长和分化

的组织。有些研究也发现有的苹果品种正放时,利于再生不定芽。所以叶片的极性也因基因型的不同而异。该试验研究确定,“鲁加5号”叶片的最佳放置方式是近轴面接触培养基(反放)。

表3

“鲁加5号”叶片极性对胚状体发生的影响

Table 3

Effects of leaf polarity on somatic embryogenesis in ‘Lujia No. 5’

叶片放置方式 Mode of leaf placement	接种数 No. of leaf/个	叶片平均再生芽数 No. of re-generation shoots/个	叶片再生率 Regeneration ratio/%
远轴面接触培养基 Abxial surface touch medium	30	5.3	90
近轴面接触培养基 Adxial surface touch medium	30	6.7	100

2.3 适宜暗培养时间的确定

当叶片放置在 $MS+6-BA\ 1.0\ mg \cdot L^{-1}+NAA\ 0.10\ mg \cdot L^{-1}$ 胚胎发育培养基中, $25\ ^\circ C$ 暗培养 10 d 时,叶片伤口处有淡黄色愈伤组织,后期光照条件下易分化植株,由图2可知,此时“鲁加5号”的叶片再生率高达96.7%;当叶片不经暗培养时,有大块愈伤组织产生,但不利于再生植株,胚状体发生率低;当暗培养时间过长时,叶片大都黄化,伤口处愈伤组织黄化,基本无再生植株。由不经暗培养到暗培养5 d,再生频率大幅提高,由方差分析可知暗培养不同处理间对胚状体再生频率具有极显著差异。因

此,确定“鲁加5号”胚胎发育阶段最佳暗培养时间为10 d。

2.4 不同激素比对胚状体发生的影响

表4结果表明,处理7“鲁加5号”叶片再生率可达到100.0%,而且单叶平均再生芽数可达到7.8个(图3)。处理1、2的再生率要高于处理3、4,而处理5、6的再生率又明显低于处理7、8,这说明6-BA和NAA的比例对胚状体的再生有重要作用。在诱导胚状体时,6-BA和NAA适宜的配比是关键因素,其

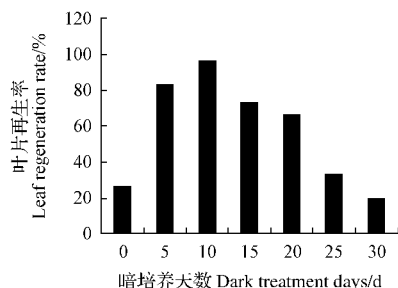


图2 暗培养天数对胚状体再生的影响

Fig. 2 Effect of dark treatment on somatic embryogenesis



图3 “鲁加5号”单叶再生胚状体植株

Fig. 3 Embryo plant from single leaf in ‘Lujia No. 5’

中需要较高的生长素 NAA 和相对较低的细胞分裂素 6-BA。经方差分析可知,培养基 MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为“鲁加 5 号”的体细胞胚诱导最佳培养基。

表 4 “鲁加 5 号”不同激素配比对
胚状体发生的影响

Table 4 Effects of different hormone composition on
somatic embryogenesis in ‘Lujia No. 5’

培养基代号 No. of medium	接种数 No. of leaf /个	叶片平均再生芽数 No. of re-generation shoots/个	叶片再生率 Regeneration ratio/%
1	30	4.0C	86.7
2	30	4.1C	93.3
3	30	2.0EF	73.3
4	30	2.8D	83.3
5	30	1.5GH	50.0
6	30	0.6I	40.0
7	30	7.8A	100.0
8	30	5.3B	80.0
9	30	2.4E	86.7
10	30	1.9EF	76.7
11	30	0.6I	43.3
12	30	0.6I	56.7
13	30	0.4I	43.3
14	30	0.2I	16.7
15	30	1.7FG	86.7
16	30	1.9EF	66.7

注:不同大写字母表示经 LSD 测验达到($P=0.01$)差异极显著。

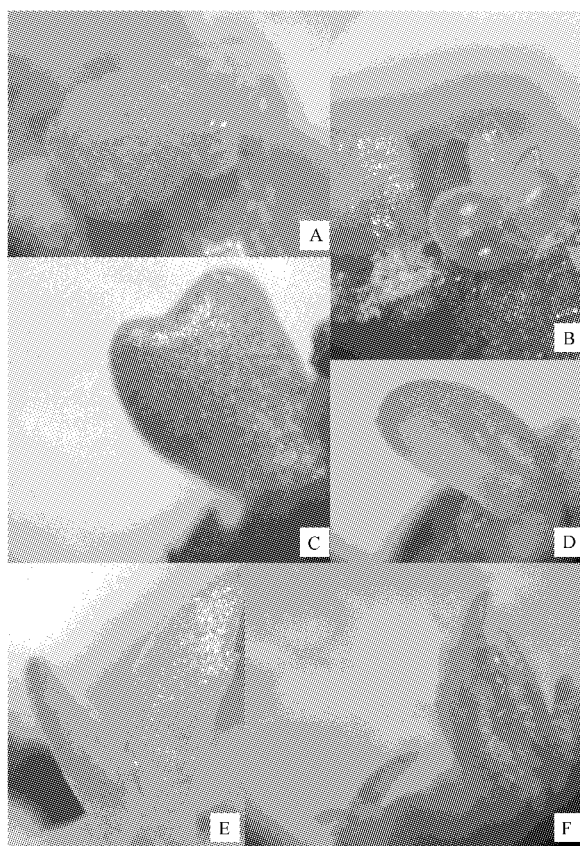
Note: The significant difference ($P=0.01$) is indicated with different capital letters by LSD test.

2.5 胚状体不同时期形态学观察

经胚性细胞诱导培养基诱导 7 d 后,形成胚性愈伤组织和原胚团。之后转入 MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胚胎发育培养基,使其进一步分化发育,当培养至 7 d 时,观察发现产生大量的原胚、球形胚(图 4-A、B),继续培养至 10 d,出现部分心形胚和鱼雷形胚(图 4-C、D),培养至 15~20 d,叶片上出现明显的子叶胚和成熟胚(图 4-E、F)。

3 讨论与结论

有的植物只要放在基本培养基上就可以发育体细胞胚,此时的外植体大多都含有胚胎预决定细胞(preembryogenic determined cells, PEDC),是以直接方式进行体细胞胚发生。有的植物需较复杂的培养基成分,这些外植体的细胞已分化,诱导处理主要是促进脱分化,形成诱导的胚胎决定细胞(induced embryogenic determined cells, IEDC),是以间接方式进行的。该试验的苹果即按照间接方式,先经胚性



注: A. 原胚($\times 40$); B. 球形胚($\times 40$); C. 心形胚($\times 40$); D. 鱼雷胚($\times 40$); E. 子叶胚($\times 40$); F. 成熟胚($\times 20$)。

Note: A. Proembryonal ($\times 40$); B. Globular embryo ($\times 40$); C. Cordiform embryo ($\times 40$); D. Torpedo-shaped embryo ($\times 40$); E. Cotyledonary embryo ($\times 40$); F. Mature embryo ($\times 20$).

图 4 “鲁加 5 号”不同胚胎发育阶段的胚和器官形态

Fig. 4 The morphology of embryos and organs in the stage of embryonic development in ‘Lujia No. 5’

细胞诱导培养基诱导形成原胚或原胚团。但此培养基中含有高浓度的生长素,不利于胚胎的进一步发育,所以下一步需要转入不含或含少量生长素的体胚发育培养基。

在以往研究中发现,原胚会进一步发育,经历球形胚、心形胚、鱼雷形胚及子叶形体细胞胚的发育阶段^[19-20]。支玉玺等^[4]通过添加较高浓度的细胞分裂素 6-BA 与低浓度的生长素来降低了畸形苗的产生。该试验中,在胚胎发育阶段,同样是降低了生长素。在同一培养时期,根据原胚团发育时间的先后,可见各种不同形态的胚状体。正常的分化、发育顺序通常是细胞分裂、细胞增大和分化,这种顺序对于形态发生的结果影响很大。在原胚发育的前期阶段如果持续地进行细胞分裂,会引起胚生长新中心的产生

而导致多胚或次生胚的形成。有多子叶胚及多形态胚的产生,这可能就是细胞分裂不正常引起,会影响子叶及植株的正常成熟发育。产生畸形胚的原因主要有蔗糖浓度、光照强度时间及激素水平等。还需进一步调控,减少畸形胚的发生。

苹果离体叶片再生培养过程中,前期暗处理可以显著提高叶片再生频率;而前期光照处理则明显抑制叶片再生,这可能是因为红光抑制不定芽形成,远红光促进不定芽形成,而白炽灯发出的红光要比远红光多,不定芽的形成受到红光抑制,导致再生频率大大降低^[21]。该试验中胚胎发育阶段,暗培养 10 d 胚状体再生率最高,暗培养 5 d 次之,时间太长时叶片大都黄化变褐,在以后的研究中可以尝试在降低光照强度的条件下诱导再生,在不经白炽灯照射的情况下,可以减少红光对芽分化的抑制,又能减轻叶片黄化程度,进而提高再生频率。

参考文献

- [1] STEWARD F C, MAPES M O, MEARS K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from suspended cells[J]. Amer f Bot, 1958, 45: 705-708.
- [2] 朱华国, 王红娟, 李鹏飞, 等. 绿色棉新彩棉 7 号体细胞胚胎发生及其植株再生[J]. 棉花学报, 2013, 25(2): 110-114.
- [3] 杨模华, 张冬林, 李志辉, 等. 马尾松幼胚体细胞胚胎发生研究[J]. 植物生理学报, 2011, 47(9): 904-912.
- [4] 支玉玺, 张剑侠, 王跃进. 华东葡萄广西-2 花药胚状体诱导与再生植株的研究[J]. 果树学报, 2010, 27(1): 18-23.
- [5] 程钰, 孟强, 董丽芬, 等. 长俊木瓜体细胞胚胎诱导的初步研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(6): 98-100.
- [6] 崔广荣, 侯喜林, 张子学, 等. 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体的发

- 生及组织学观察[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 431-436.
- [7] 姚进, 黄坚钦, 胡恒康, 等. 香榧体细胞胚发生的初步研究[J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(1): 129-135.
- [8] 魏海霞, 祝军, 刘德玺, 等. 2 苹果品种叶片胚状体再生体系的建立[J]. 西北林学院学报, 2014, 29(1): 84-88.
- [9] 雷海英, 武攀, 贾彦琼, 等. 大豆体细胞胚胎发生再生体系的建立与优化[J]. 华北农学报, 2012, 27(3): 29-34.
- [10] 张波, 罗青, 张曦, 等. 宁夏枸杞花药培养胚状体的诱导[J]. 北方园艺, 2016(9): 105-108.
- [11] 郭荣荣. 葡萄胚状体再生体系的建立及葡萄天冬氨酸蛋白酶家族基因功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [12] 陈小鹏, 刘拴桃, 孙晓雷, 等. 黄瓜未受精子房的胚状体诱导研究初报[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 148-151.
- [13] 王璐, 陈小燕, 张力, 等. 不同因素对黄瓜未受精子房胚状体诱导的影响[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4): 267-270.
- [14] 达克东, 张松, 李雅志. 苹果叶柄体细胞胚胎发生[J]. 核农学报, 1996, 10(2): 75-78.
- [15] TSUKAHARA K, KOZAKI I, OOMURA M. Adventitious bud formation on apple and quince leaves[J]. Japan Breed, 1985, 35: 2-3.
- [16] 魏爱民, 杜胜利, 赵晶, 等. 黄瓜子叶节离体体细胞再生体系研究[J]. 华北农学报, 2011, 26(增刊): 20-23.
- [17] 达克东, 张松, 李雅志. 苹果离体叶片培养直接体细胞胚胎发生研究[J]. 园艺学报, 1996, 23(3): 241-245.
- [18] 达克东, 张松, 米瑞英, 等. 创伤诱导苹果离体叶片高效直接体细胞胚胎发生[J]. 核农学报, 2001, 15(5): 290-293.
- [19] 项伟波. 香榧体胚发生体系优化及发育过程的显微观察[D]. 临安: 浙江农林大学, 2015.
- [20] 侯丙凯, 鲍雪珍, 于惠敏, 等. 葡萄离体培养中胚状体发生的研究 I. 胚状体发生的组织细胞学观察[J]. 山东大学学报(自然科学版), 1997, 32(2): 208-212.
- [21] PREDIERI S, MALAVASI F. High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26[J]. Plant Cell, 1989(17): 133-142.

Optimization of Embryoid Regeneration System From ‘Lujia No. 5’ Columnar Apple

ZHOU Aiqin¹, ZHU Jun¹, YANG Qingshan², WANG Zhenmeng², LI Yongtao², WEI Haixia²

(1. Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109; 2. Shandong Academy of Forestry, Jinan, Shandong 250014)

Abstract: It is very important to establish a stable genetic transformation system with high frequency stability, which can be used to regenerate plants with the somatic embryogenesis. In this experiment, new variety of apple ‘Lujia No. 5’ was used as test material, the regeneration system of embryoid bodies was studied, which laid the foundation for the establishment of genetic transformation system. The results showed that MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.20 mg · L⁻¹ was the most suitable subculture medium. It was considered that the best placed mode was adxial surface touching medium. The best time length of dark culture was 10 days. The best embryo cell media was MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 5.0 mg · L⁻¹+TDZ 0.5 mg · L⁻¹. During embryonic development, the embryos in different periods of morphological and histological observation, results showed that the embryoids experienced proembryonal, globular embryo, heart-shaped embryo, torpedo shaped embryo, cotyledonary embryo and mature embryos stages.

Keywords: embryoid; regeneration; ‘Lujia No. 5’; optimization