

# ‘宫藤’富士苹果叶片离体再生体系的建立

邢 倩, 李天红

(中国农业大学 农学与生物技术学院 果树系, 北京 100094)

**摘 要:**以‘宫藤’富士苹果组培苗为试材, 对叶片离体再生体系进行了研究。不同激素种类、浓度配比及叶片放置方式的试验结果表明: 以 MS 为基本培养基添加 5.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L NAA 叶片远轴面接触培养基(叶片反放)可得到最高的再生效率, 为 73.3%, 6-BA 对叶片再生效果要好于 TDZ, 且提高 NAA 浓度并不能提高 TDZ 对再生频率和再生叶片平均再生芽数的影响。再生植株在生根诱导培养基(1/2 MS+1.0 mg/L IBA)、生根培养基(1/2 MS)上进行培养后移入营养土成活率可达 100%。

**关键词:** 富士苹果; 叶片; 再生; 生根

**中图分类号:** S 661.103.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)11—0013—03

果树离体再生体系的研究是细胞突变和遗传转化研究的基础, 为果树品种改良提供了有效途径。国外自 20 世纪 80 年代中期就开始果树高频再生体系的研究。

我国从 20 世纪 80 年代起, 就开始了苹果快繁体系和高频再生体系的研究。影响苹果快繁和高频再生的内在因素包括: 外植体的基因型和外植体生理特性即外植体的状态、取材部位、取材时间以及取材大小等。外在因素包括: 培养基成分、生长调节剂以及培养方式、环境条件等。其中生长调节剂被认为在植物组织培养中具有重要作用, 也是苹果快繁和离体再生的研究重点。不同的生长调节剂组合可以调节细胞分裂、愈伤组织形成、芽增殖等。细胞分裂素以 6-BA、ZT、KT、TDZ 较为常用, 生长素多用 IAA、NAA 和 2,4-D<sup>[2,4,5]</sup>。研究以‘宫藤’富士苹果组培苗为试材, 建立了叶片离体再生体系并

**第一作者简介:** 邢倩(1982-), 女, 陕西人, 硕士研究生, 研究方向: 果树基因工程。E-mail: xingqian123@hotmail.com。  
**通讯作者:** 李天红(1966-), 女, 北京人, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向: 果树基因工程。E-mail: lth123430@sohu.com。  
**基金项目:** 新世纪人才支持计划资助项目(NCET-06-0108); 北京市教育委员会都市农业学科群建设资助项目(XK100190553)。  
**收稿日期:** 2007—06—21

[9] 龙凤, 梁宇, 马琛 等. 分光光度法测定薯果蔬菜中铁含量的研究[J]. 微量元素与健康研究, 2004 21(6): 50-51.

[10] 张复君 孟凡珍. 黄瓜微量元素缺乏症的对策[J]. 西北园艺, 2004 (3): 8-9.

## Effect of Film Mulch and Potash on the Uptake and Distribution of Fe in Potato

WANG Yu-hong GAO Bing-de, LIU Mei-ying WANG Hai-yan,

(College of Soil and Water Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** A field trial was conducted on the experimental farm of Inner Mongolia Agricultural University to study the effect of film mulch and potash on the uptake and distribution of Fe in potato during the growing period. Results showed that Fe concentration in the leaves, stems and tubers of potato witnessed a wavy change from the seedling period to mature period; Fe accumulation increased first and then decreased, and reached the peak value at the stage of rapid cell expansion of tubers; The distribution of Fe in potato in the first four periods was in the decreasing order of leaf > stem > tuber and it changed to be stem > leaf > tuber in the mature period. Film mulch decreased Fe distribution in the leaves of potato and increased that in the stems and tubers, and thus increased Fe uptake and accumulation in the tubers. Potash fertilizer increased the distribution of Fe in the tubers before the mature period. However, no significant difference was found as to the uptake and distribution of Fe in potato with film mulch and potash fertilizer.

**Key words:** Film mulch; Potash fertilizer; Iron

诱导再生植株生根,为农杆菌介导的‘宫藤’富士苹果遗传转化奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

所试叶片取自中国农业大学农学与生物技术学院果树系实验室‘宫藤’富士苹果无菌组培苗。

1.2 方法

1.2.1 培养基 以 MS 培养基为基本培养基,不同激素种类、浓度配比见表 1,pH 值 5.6。生根诱导培养基为 1/2 MS 培养基附加 1.0 mg/L IBA,pH 值 5.8。生根培养基为 1/2 MS 培养基,pH 值 5.8。

表 1 MS 基本培养基与不同植物生长调节剂组合

| 培养基编号 | 植物生长调节剂浓度/mg·L <sup>-1</sup> 及组合 |
|-------|----------------------------------|
| A1    | BA 2.5+ NAA 0.1                  |
| A2    | BA 5.0+ NAA 0.1                  |
| A3    | BA 7.5+ NAA 0.1                  |
| B1    | BA 2.5+ NAA 0.5                  |
| B2    | BA 5.0+ NAA 0.5                  |
| B3    | BA 7.5+ NAA 0.5                  |
| C1    | BA 10.0+ NAA 0.1                 |
| C2    | BA 10.0+ NAA 0.5                 |
| C3    | BA 10.0+ NAA 1.0                 |
| D1    | BA 2.5+ NAA 1.0                  |
| D2    | BA 5.0+ NAA 1.0                  |
| D3    | BA 7.5+ NAA 1.0                  |
| E1    | TDZ 0.1+ NAA 0.5                 |
| E2    | TDZ 0.5+ NAA 0.5                 |
| E3    | TDZ 1.0+ NAA 0.5                 |
| E4    | TDZ 0.1+ NAA 1.0                 |
| E5    | TDZ 0.5+ NAA 1.0                 |
| E6    | TDZ 1.0+ NAA 1.0                 |

1.2.2 接种 取‘宫藤’富士苹果继代 25~30 d 组培苗顶部刚刚展开的 3~5 片叶,用解剖刀垂直于主脉横切 2~3 刀,不切开叶缘。叶片放置方式:近轴面接触培养基(叶片正放);远轴面接触培养基(叶片反放)。

1.2.3 统计 叶片接种后暗培养 2 周移至光下培养,60 d 后统计再生频率和再生叶片平均再生芽数。计算公式:再生频率(%)=再生芽叶数/接种总叶数;再生叶片平均再生芽数=再生芽总数/再生芽叶数。

1.2.4 生根与驯化移栽 剪取 3~5 cm 再生幼苗接入生根诱导培养基,1~2 周后转入不含植物生长调节剂的 1/2 MS 培养基,将苗高 3~5 cm、茎粗大于 1.0 mm 且根系较多的组培苗经开瓶锻炼 7 d 后转入盛有蛭石:营养土为 1:1 的营养钵中,(25±2)℃保湿 15 d 再将营养钵转入温室中。

1.2.5 培养条件 光照:16 h;黑暗:8 h;温度:(25±2)℃;光照强度:2 500 lx。

2 结果与分析

2.1 不同 6-BA、NAA 浓度组合对‘宫藤’富士苹果叶片再生的影响

当暗培养结束后用肉眼即可观察到叶片切口处有白色或淡黄色愈伤组织,转移到光下培养后,愈伤组织颜色逐渐加深,约 2 周后部分叶片分化出不定芽。不同培养基上叶片再生效率与再生叶片平均再生芽数见表 2。由表 2 可看出,D2 培养基上叶片再生效率最高,可达 41.7%,再生叶片平均再生芽数最高为 2.5 个。

表 2 不同 6-BA、NAA 浓度组合对‘宫藤’富士苹果叶片再生的影响

| 培养基编号 | 接种总叶数 | 再生频率/% | 再生叶片平均再生芽数 |
|-------|-------|--------|------------|
| A1    | 70    | 14.3   | 2.4        |
| A2    | 62    | 14.5   | 2.5        |
| A3    | 56    | 16.1   | 1.4        |
| B1    | 70    | 17.1   | 1.5        |
| B2    | 70    | 12.9   | 1.6        |
| B3    | 68    | 23.5   | 1.8        |
| C1    | 85    | 14.1   | 1.8        |
| C2    | 84    | 15.4   | 1.2        |
| C3    | 84    | 10.7   | 1.0        |
| D1    | 91    | 14.3   | 1.5        |
| D2    | 84    | 41.7   | 2.5        |
| D3    | 84    | 21.4   | 2.1        |

2.2 不同 NAA、TDZ 浓度组合对‘宫藤’富士苹果叶片再生的影响

方差分析结果表明:不同浓度 TDZ 处理对再生叶片再生芽数具有显著效应(结果未列出)。NAA 浓度为 0.5 mg/L、TDZ 浓度为 1.0 mg/L 时再生频率最高为 37.9%,再生叶片平均再生芽数为 47.0 个;NAA 浓度为 0.5 mg/L、TDZ 浓度为 1.0 mg/L 时再生频率最高为 32.8%,再生叶片平均再生芽数为 6.8 个(表 3)。可见提高 NAA 浓度并不能提高再生频率和再生叶片平均再生芽数。

表 3 不同 NAA、TDZ 浓度组合对‘宫藤’富士叶片再生的影响

| NAA 浓度<br>/mg·L <sup>-1</sup> | 培养基<br>编号 | TDZ 浓度<br>/mg·L <sup>-1</sup> | 再生频率<br>/% | 再生叶片平均<br>再生芽数 |
|-------------------------------|-----------|-------------------------------|------------|----------------|
| 0.5                           | E1        | 0.1                           | 32.1       | 8.3b           |
|                               | E2        | 0.5                           | 26.3       | 11.3b          |
|                               | E3        | 1.0                           | 37.9       | 47.0a          |
| 1.0                           | E4        | 0.1                           | 11.7       | 3.4b           |
|                               | E5        | 0.5                           | 26.7       | 6.5a           |
|                               | E6        | 1.0                           | 32.8       | 6.8a           |

2.3 叶片放置方式对苹果叶片再生的影响

在表 2 中叶片再生频率最高的 D2 培养基上,T 检验表明: $t < t_{0.05}$ , $P > 0.05$  叶片远轴面接触培养基(叶片反放)的再生效率高于叶片近轴面接触培养基(叶片正放)的再生效率(表 4)。

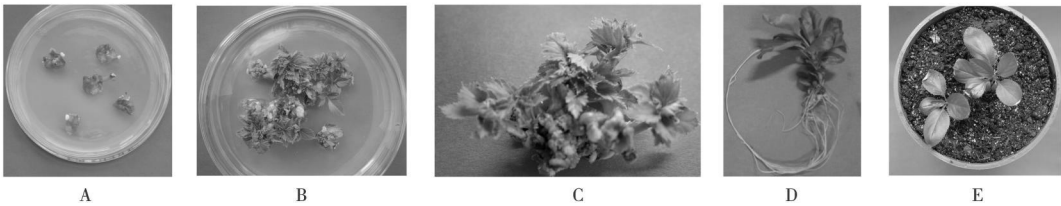
表 4 叶片放置方式对叶片再生频率的影响

| 重复 | 叶片反放(再生频率/%) | 叶片正放(再生频率/%) |
|----|--------------|--------------|
| 1  | 68.8         | 73.3         |
| 2  | 50.0         | 56.3         |
| 3  | 29.4         | 11.1         |

2.4 再生植株生根培养与驯化移栽

植株转入生根诱导培养基约 1 周后, 植株下部切口处出现白色愈伤组织 随后转入生根培养基约 2 ~ 3 周

后可以形成良好的根系, 每株小苗可诱导产生 3 ~ 5 条 3 cm 以上的根。移栽入温室后成活率可达 100 %。



‘ 宫藤 富士叶片离体再生与生根移栽图

注: A: 叶片远轴面向下接触培养基(叶片反放); B: 叶片再生; C: 再生丛芽; D: 诱导生根; E: 移栽到营养土。

3 讨论

裴东等(1997)<sup>[1]</sup> 认为培养基中激素类型、浓度和组合决定了组织、器官的发育和分化方向。孙爱君等(2000)<sup>[2]</sup> 研究发现: 八棱海棠、新乔纳金和嘎拉叶片, 均是在 BA 与 NAA 比值为 20 时的再生频率高, 而继续提高 BA 与 NAA 的比值叶片再生频率并没有明显增加, 因此 BA 与 NAA 比值在 20 时比较适合叶片不定芽分化。研究结果表明 BA 与 NAA 比值为 5 的培养基比 BA 与 NAA 比值为 20 的培养基更利于 ‘ 宫藤 ’ 富士苹果叶片再生。该研究与他人研究的差异也从另一方面证明基因型对外植体再生的影响。

自 1980 年以后, 一种新型细胞分裂素类物质—苯基脲衍生物 TDZ 被广泛应用于植物组织培养。在草莓 Tudla 上的研究表明, 在诱导叶片再生不定芽的试验中 TDZ 的效果明显优于 BA<sup>[3]</sup>。但以 M14 为试材诱导叶片再生不定芽时发现, TDZ 诱导的不定芽多呈丛状, 不易分离, “ 玻璃化 ” 较严重, 且芽成苗较困难<sup>[4]</sup>。秦玲等(2002)<sup>[5]</sup> 认为 TDZ 对 2001 富士苹果离体叶片再生效率的影响要优于 BA 和 CPPU。该研究结果显示: ‘ 宫藤 ’ 富士

苹果叶片在附加 BA 的培养基上再生效率要高于 TDZ。

叶片放置方式对叶片再生效率的影响, 不同的报道差异较大。师校欣等(1999)<sup>[6]</sup> 认为叶片远轴面向下接触培养基(叶片反放), 再生效率高, 试验结果与师校欣等(1999)<sup>[6]</sup> 的结果相同。王艳等(2004)<sup>[7]</sup> 认为叶片正放在培养基上的再生效果优于叶片反放的再生效果。

参考文献

[ 1 ] 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.  
[ 2 ] 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.  
[ 3 ] 张志宏, 吴禄平. 草莓主栽品种 Tudla 遗传转化因子对诱导草莓叶片再生芽的影响[ J ]. 农业生物技术学报, 1998, 6 ( 2 ): 200-204.  
[ 4 ] 于冬梅, 胡文玉, 王关林, 等. 基因型和培养因子对诱导草莓叶片再生芽的影响[ J ]. 沈阳农业大学学报, 1998, 29 ( 2 ): 138-143.  
[ 5 ] 秦玲, 李明, 王永熙, 等. 不同细胞分裂素对 2001 富士苹果离体叶片再生的影响[ J ]. 果树学报, 2002, 19 ( 4 ): 215-218.  
[ 6 ] 师校欣, 杜国强, 高仪, 等. 苹果离体叶片高效再生不定芽技术研究[ J ]. 果树科学, 1999, 16 ( 4 ): 255-258.  
[ 7 ] 王艳, 孙仲序, 夏阳. 苹果砧木品种试管苗叶片再生体系的建立[ J ]. 山东农业大学学报( 自然科学版 ), 2004, 35 ( 2 ): 196-200.

Setting up Apple (*Malus domestica* Borkh. ‘ Fuji ’ ) Leaf Regeneration System

XING Qian, LI Tianhong

(Department of Fruit Science, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Leaf in vitro regeneration system of apple (*Malus domestica* Borkh. ‘ Fuji ’ ) was studied. The results of different combinations of plant growth regulator sorts, concentrations and methods of placing leaves indicated that the highest regeneration frequency 73.3%, was obtained on MS medium supplemented with 5.0 mg/L 6-BA and 1.0 mg/L NAA and the leaves were placed with dorsal side contacting medium. Moreover, 6-BA had better effect on leaf regeneration frequency than TDZ did. Increasing the concentration of NAA could not enhance TDZ’s effect on leaf regeneration frequency. Roots of regenerated seedling were induced on 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/L IBA and 1/2 MS medium respectively. Seedlings with roots could be transferred to nutritional soil with surviving rate up to 100 %.

**Key words:** ‘ Fuji ’ apple; Leaf; Regeneration; Rooting