

# 不同基因型苹果的离体再生特性 及其对 $\text{NaN}_3$ 的反应

何道一 李雅志 王其会

(山东农业大学 泰安 271018)

不同基因型苹果叶片培养物再生特性不同,主要表现在再生频率的高低和再生类型的差异。通过培养基中的激素和培养过程的光照调节,可以有效地提高各基因型品种的再生频率。不同基因型苹果叶片培养物对  $\text{NaN}_3$  诱变处理的反应不同,总体而言,其存活率和再生频率均随  $\text{NaN}_3$  浓度的提高而下降。不同基因型苹果的适宜  $\text{NaN}_3$  浓度应有所不同,以 30% 存活率为标准,对  $M_{26}$ 、嘎拉、首红、长富 2 及岩富 10 进行诱变处理的适宜浓度分别为 3mmol/L、3mmol/L、3mmol/L、2mmol/L 和 2mmol/L。

关键词:苹果 离体诱变  $\text{NaN}_3$

## 前 言

许多苹果品种都能通过叶片、茎等离体培养再生完整植株<sup>[1,5,7,8]</sup>,但在各品种间存在明显的再生能力差异<sup>[6]</sup>。苹果离体培养物再生频率的高低影响它的应用潜力,苹果的转基因和离体诱变的研究都需要有高频率的体细胞胚发生或植株再生能力。影响苹果外植体培养再生的因素有许多<sup>[7]</sup>,基因型差异则是重要因素之一,苹果基因型对再生频率的影响有多大?能否通过物理和化学因素予以调节?这些都是值得关注的问题。本文旨在研究分析不同基因型外植体再生特性的差异,及其对  $\text{NaN}_3$  诱变的反应,并探讨提高其离体诱变的方法。

## 材 料 与 方 法

**材料来源** 砧木  $M_{26}$ 、嘎拉、首红、长富 2 和岩富 10 试管苗叶片。

**培养方法** 培养基为 MS + NAA 0.1ppm + BA 2.0ppm + 精氨酸 510ppm, pH5.18。接种后在黑暗条件下培养 1 周,再在 1000lx 正常光照或 200lx 弱光下培养。接种 50 天后调查存活率和再生频率等,各试验重复 3 次。

**诱变处理** 用 0.12mol/L、pH3 的 HCl2 甘氨酸缓冲液配制  $\text{NaN}_3$ ,加数滴二甲亚砜,过滤灭菌,处理接种后在黑暗中培养 1 周的材料,处理时间 30min,以无菌水清洗 3 次,再接种到同样的培养基上培养,40 天后调查各项指标,重复 3 次。

**切片制作** 按常规石蜡切片法<sup>[3]</sup>,以苏木精染色,在 Olympus 显微镜下观察并摄影。

此文于 1995 年 10 月 25 日收到。

## 结果与分析

### (一) 不同基因型材料对激素的反应

NAA 浓度从 0105 到 012ppm 时,基本上不影响各基因型品种的叶片再生能力,当 NAA 在 015ppm 以上时,叶片培养物主要形成愈伤组织,没有或很少有再生植株生成。不同浓度的 BA 明显影响各基因型品种的再生能力。从表 1 可看出,  $M_{26}$ 、嘎拉叶片培养物的最适 BA 浓度为 2ppm,首红为 3ppm,长富 2 和岩富 10 则为 1ppm。从表 1 还可看出,不同基因型材料的最高再生能力确实存在差异,如  $M_{26}$  的最高再生频率为 95%,嘎拉为 90%,首红为 92%,而长富 2 和岩富 10 则分别为 40%和 43%。说明不同基因型品种对 BA 的反应存有明显差异,而且遗传背景相同的材料(如长富 2 和岩富 10),对 BA 的反应存在明显的相似性。

表 1 不同 BA 浓度下培养材料的再生频率

Table 1 Rate of regeneration of cultures at different level of BA (%)

基因型 Genotype	BA 浓度 Level of BA(ppm)			
	015	110	210	310
砧木 $M_{26}$ Root stock $M_{26}$	45 ±1	70 ±3	95 ±2	78 ±3
嘎拉 Gala	40 ±1	55 ±2	90 ±1	60 ±2
首红 Red chief	43 ±2	57 ±2	78 ±4	92 ±4
长富 2 Changfu No. 2	15 ±2	40 ±2	31 ±3	26 ±2
岩富 10 Yanfu No. 10	17 ±2	43 ±3	35 ±3	28 ±3

### (二) 不同基因型材料对光的反应

从表 2 可看出,不同基因型材料在不同光照条件下培养,其再生能力明显不同。 $M_{26}$ 和嘎拉在正常光照(1000 lx)条件下都有较高的再生频率,黑暗条件下愈伤组织生长旺盛。而首红、长富 2 和岩富 10 只有在弱光(200 lx)条件下才有较高的再生能力,在 1000 lx 光照条件下,长富 2 和岩富 10 的再生能力很低,说明长富 2 和岩富 10 对光的反应也表现出明显的相似性。

表 2 不同光照条件下培养材料的再生频率

Table 2 Rate of regeneration of cultures under different intensity of illumination (%)

基因型 Genotype	光照强度 Intensity of illumination		
	正常光照 Normal intensity of illumination (1000lx)	弱光照 Low intensity of illumination (200lx)	黑暗 Dark
砧木 $M_{26}$ Root stock $M_{26}$	93 ±2	96 ±3	60 ±3
嘎拉 Gala	91 ±3	94 ±2	64 ±2
首红 Red chief	76 ±3	93 ±2	51 ±2
长富 2 Changfu No. 2	33 ±3	94 ±4	87 ±2
岩富 10 Yanfu No. 10	34 ±3	97 ±2	81 ±3

### (三) 不同基因型材料再生方式的差异

不同基因型材料的再生方式不尽相同。 $M_{26}$ 主要以3种方式再生植株:11 从外植体叶片或叶柄直接再生不定芽,包括次生不定芽(图版 21);2. 从愈伤组织上产生不定芽;31 以体细胞胚的形式再生植株(图版 22),尤以后两种方式的再生植株频率最高。嘎拉叶片培养物主要以愈伤组织上再生不定芽的方式再生植株,也有少量体细胞胚发生,很少见到从叶片上直接产生不定芽。首红叶片培养物主要是从叶片或叶脉处直接产生不定芽(图版 123),也有少量体细胞胚产生。长富2和岩富10表现十分相似,均从叶柄断裂处产生愈伤组织(图版 124),然后再产生不定芽,没有直接产生不定芽现象,也可看到大量类似体细胞胚的结构,但并没有体细胞胚的产生。不同的再生方式,在叶外植体接种后发生的时间不同。培养约15天左右,可看见叶片上直接产生不定芽,接种3周后,愈伤组织上有不定芽产生,体细胞胚产生的时间最晚约在接种后40天。

#### 图版

11  $M_{26}$ 叶柄上直接产生不定芽和次生不定芽;21  $M_{26}$ 叶片培养物产生的体细胞胚;31 首红叶片直接产生不定芽;41 岩富10叶柄上产生的愈伤组织。

#### Plate

11 The adventitious and subadventitious buds regenerating directly on leaf stalk of  $M_{26}$ . 21 The somatic embryoid of leaf cultures of  $M_{26}$ . 31 The adventitious buds regenerating directly on leaf of Red chief. 41 The callus induced from leaf stalk of Yanfu No. 10.

### (四) 不同基因型材料对 $NaNO_3$ 处理的反应

从表4可以看出,随着  $NaNO_3$  浓度的提高,各基因型材料的存活率和再生频率都明显降低。常用的半致死剂量在苹果离体诱变中并不合适,这是由于再生植株量较大。然而以较低存活率作为诱变指标,不仅可以提高选择突变体的效率,而且有可能增加变异幅度。若以30%存活率作为适宜诱变浓度的指标,各品种的再生频率可在20%以上,仍能进行有效地选择。

表 3  $\text{NaN}_3$  处理后培养材料的存活率Table 3 The survival rate of cultures treated with  $\text{NaN}_3$  (%)

基因型 Genotype	$\text{NaN}_3$ 浓度 Level of $\text{NaN}_3$ (mmol/L)			
	对照 Control	1	2	3
砧木 $M_{26}$ Root stock $M_{26}$	94 $\pm$ 2	81 $\pm$ 3	62 $\pm$ 3	43 $\pm$ 2
嘎拉 Gala	93 $\pm$ 2	71 $\pm$ 3	53 $\pm$ 3	38 $\pm$ 2
首红 Red chief	91 $\pm$ 2	62 $\pm$ 2	42 $\pm$ 3	32 $\pm$ 3
长富 2 Changfu No. 2	92 $\pm$ 3	54 $\pm$ 3	32 $\pm$ 1	17 $\pm$ 2
岩富 10 Yanfu No. 10	94 $\pm$ 2	56 $\pm$ 3	37 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3

表 4  $\text{NaN}_3$  处理后培养材料的再生频率Table 4 Rate of regeneration of cultures treated with  $\text{NaN}_3$  (%)

基因型 Genotype	$\text{NaN}_3$ 浓度 Level of $\text{NaN}_3$ (mmol/L)			
	对照 Control	1	2	3
砧木 $M_{26}$ Root stock $M_{26}$	90 $\pm$ 2	73 $\pm$ 2	42 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3
嘎拉 Gala	92 $\pm$ 2	65 $\pm$ 2	38 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2
首红 Red chief	89 $\pm$ 3	54 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2	15 $\pm$ 3
长富 2 Changfu No. 2	90 $\pm$ 2	52 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2	10 $\pm$ 3
岩富 10 Yanfu No. 10	91 $\pm$ 4	55 $\pm$ 2	28 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2

## 讨 论

11 不同基因型材料再生能力存在差异。本试验仅通过激素调节和光照控制即可有效地提高各基因型材料的再生频率。事实上,在许多其它植物材料的培养中,也是通过不断摸索培养条件或培养基才得以提高再生频率的<sup>[4]</sup>。我们还注意到,具有相同基因型背景的材料,培养中表现极为相似,这给我们一个启示,苹果再生能力是否受某一个和几个基因控制,且可以通过外界条件对它们进行调节,值得进一步研究。

21 不同基因型材料再生方式有差异。一种基因型材料以一种再生方式为主,而且不同的再生方式的时间也不相同。在苹果离体诱变育种中,以前述 3 种方式中的第一种及第三种方式为好,因为从叶片或叶柄上直接产生不定芽或由体细胞胚长成的植株,其起源多系单细胞,在诱变处理中不会形成嵌合体。第二种方式是由愈伤组织产生不定芽,其起源系多细胞,不能排除嵌合现象的干扰,影响离体诱变的效率。因此,在苹果离体诱变研究中,不仅要考虑到基因型的差异,同时要重点研究叶外植体直接产生不定芽或体细胞胚长成植株的技术,这样才能提高诱变和选择效率。

31  $\text{NaN}_3$  的处理时间及其浓度是重要的诱变参数。本试验发现,处理时间超过 1 小时,大多数品种的存活率很低,这并不仅是  $\text{NaN}_3$  的作用,而且还有缓冲液 pH 较低之故,因此可以通过提高  $\text{NaN}_3$  浓度和添加渗透物质(如二甲亚砜)来弥补处理时间的不足。由于离体培养材料再生植株数量较多, $\text{NaN}_3$  的适宜浓度应根据品种而定,可以处理试材的 30% 存活率作为适宜

浓度指标。

$41\text{NaN}_3$  通常被认为是能够诱发单个基因突变的诱变剂<sup>[2]</sup>, 然而诱变产生的变异体或突变体的早期选择鉴定是一个十分棘手的难题。常用作突变体早期鉴定的方法有细胞学鉴定和同功酶分析等, 但在  $\text{NaN}_3$  诱发的突变体的鉴定上效果不佳, 因此, 目前仅依赖于植株性状的观察及生化分析。目前 PCR 技术广泛用于分子遗传学的多方面研究, 若将这一技术应用于突变体的选择鉴定上, 则可有效地进行突变体的早期鉴定, 这也是今后一个时期的研究方向。

## 参 考 文 献

- 1 赵政阳等 1 苹果试管苗叶片再生植株的研究 1 陕西农业科学, 1992, (6) : 18 ~ 19
- 2 许耀奎等 1 作物诱变育种 1 上海: 上海科技出版社, 1985
- 3 王心钗 1 植物显微技术 1 福州: 福建教育出版社, 1996
- 4 隋德志 1 大豆体细胞组织培养再生植株的研究 1 大豆科学, 1989, 8(2) : 145 ~ 152
- 5 Fasolo F et al. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1989, 16: 75 ~ 87
- 6 Fasolo F et al. Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. Acta Horticulturae, 1990, 280: 61 ~ 68
- 7 James D J et al. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro*. J Plant Physiol, 1988, 132: 148 ~ 154
- 8 Nagali Dufor. Improving yield of adventitious shoots in apple. Acta Horticulturae, 1990, 280: 51 ~ 58

## EFFECT OF GENOTYPE OF APPLE ON *in vitro* REGENERATING CHARACTERISTICS AND ITS *in vitro* INDUCING MUTATION WITH $\text{NaN}_3$

He Daoyi Li Yazhi Wang Qihui

(Shandong Agricultural University, Taian 271018)

### ABSTRACT

Different genotypes of apple varieties were found to have different rates and types of regeneration. The rate of regeneration can be efficiently raised by adjustment of level of plant hormones in media and intensity of illumination in culturing period. When treating with different levels of  $\text{NaN}_3$ , the survival rates of all 5 varieties decreased with rising level of  $\text{NaN}_3$ . The moderate level of  $\text{NaN}_3$  for M<sub>26</sub>, Gala, Red chief, Changfu No. 2 and Yanfu No. 10 is 3mmol/L, 3mmol/L, 3mmol/L, 2mmol/L and 2mmol/L, respectively.

**Key words:** Apple, *in vitro* inducing mutation,  $\text{NaN}_3$