

# AgNO<sub>3</sub>对苹果叶片培养的影响及其与乙烯产生的关系

陈喜文\* 范 晖 裘立群 王其会

(山东农业大学作物遗传育种研究所 泰安 271018)

在附加 6-BA 3.0mg/L、IBA 0.05mg/L 的 MS 再生培养基中加入 1~100μmol/L AgNO<sub>3</sub>,均显著促进苹果叶片再生不定芽,但以 1μmol/L 浓度效果最好。与对照相比,在培养早期(2~5d),1μmol/L AgNO<sub>3</sub>对乙烯的抑制率为 16%~20%,在培养中后期则为 25%~40%,因而显著降低了各培养时期,特别是中后期(芽分化期)培养容器中乙烯的浓度,降低了乙烯对芽发生的抑制,从而促进不定芽的发生。

关键词:AgNO<sub>3</sub> 叶片培养 苹果 乙烯

## 前 言

苹果为多年生木本植物,其现有品种都是高度杂合的,遗传基础极为复杂,常规育种所需年限长,占据空间大,要保持原品种优良特性难度极大。植物组织培养和诱变技术相结合为苹果育种开辟了途径,而高效、稳定植株再生系统的建立则是其中关键的技术之一。

苹果的组织培养国内外已有报道<sup>[1,2]</sup>,但大多仅限于外植体选择、培养条件及基因型等方面的研究,而 AgNO<sub>3</sub>作为一种乙烯生成与作用抑制剂,可显著促进愈伤组织再生不定芽,这在小麦、玉米、油菜、烟草中已有报道<sup>[3-6]</sup>,但对苹果叶片培养的影响,因内外尚未见报道。本文研究 AgNO<sub>3</sub>对苹果叶片培养的影响及其与乙烯产生的关系。

## 材 料 与 方 法

**材料** 用于离体培养研究的叶片取自苹果 Gala 品种的试管苗,其扩繁培养基为 MS 附加 3.0mg/L 6-BA,0.1mg/L NAA。

**叶片培养** 试管苗在培养基上生长 30d 后,取其顶端完全展开的叶片,去除叶柄,以下面 3 种方式切割:1. 完整叶片;2. 沿主脉横向均匀地在叶上轻划 2 条切痕;3. 沿主脉横向将叶等分成 3 个独立小块。以远轴面着培养基的方式接种在附加 3.0mg/L 6-BA-0.05mg/L IBA 的 MS 再生培养基上,先在黑暗下培养 20d,然后转入 1000lx 光照下培养,培养温度为 25℃。

**AgNO<sub>3</sub>处理** 将 AgNO<sub>3</sub>过滤灭菌后分别以 0、1、10、100μmol/L 浓度加入到再生培养基中,充分混匀后,以 20ml 的等分倒入直径 90mm 培养皿中。选择大小相似的叶片,分别以上

此文于 1995 年 12 月 18 日收到。

\* 现通信地址:南开大学生命科学学院 300071。

述 3 种切割方式接种于培养皿中,每皿接种叶片 9 块,Paraffin 封口,45d 统计叶片培养结果,并测定乙烯的产生。

**乙烯的测定** 在上述条件下测定乙烯的产生:1. 培养不同时间后,取出叶片,放入 50ml 三角瓶中,加入 5mol 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)后密封,于 25℃ 黑暗条件下保温 6h 后,抽出 1ml 气样,测定不同培养时期每克鲜重样品每小时产生乙烯的量;2. 于不同培养时期,从培养皿中抽出 1ml 气样,测定培养皿中乙烯的浓度。乙烯的测定在 GC-9A 型气相色谱仪中进行,每处理重复 2 次。

## 结 果 与 分 析

### (一)不同切割方式下叶片培养的效果

将叶片接种在培养基上,3~5d 始见叶片的膨大,8~10d 叶基和切口处可见少量淡黄色颗粒状愈伤组织,16~18d 从愈伤组织上产生肉眼可见的不定芽。不同切割方式下叶片变化基本相似。主要差异见表 1。划痕切割的叶面膨大非常明显,叶面积约增加 30%,而整叶和切块的叶面膨大不明显;愈伤组织发生部位不同,整叶培养的,愈伤组织仅见于叶基处,划痕和切块培养的,除叶基外,大量愈伤组织发生于切口和伤口处;划痕和切块培养的,叶片再生百分率分别为 85%和 86%,显著高于整叶培养的 57%;平均每叶再生芽数则以划痕切割最高,平均每叶再生 3.4 个芽,整叶培养的最低,平均每叶再生 1 个芽,切块培养的则居于两者之间,平均每叶再生 2.0 个芽。

表 1 不同切割方式下叶片培养的效果

Table 1 Effects of leaf culture under different cut methods

切割方式 Cut methods	叶面膨大 Leaf enlarging	愈伤组织(芽)发生部位 Calli position (shoots) produced	再生百分率 Regeneration percentage (%)	平均每叶再生芽数 No. of shoots produced from each leaf
整叶 Whole leaf	不明显 Not distinct	叶基 Leaf base	57b *	1.0c
划痕 Trace cut	明显,约 30% Distinct, about 30%	叶基和切口 Leaf base and cut area	85a	3.4a
切块 Piece cut	不明显 Not distinct	叶基和切口 Leaf base and cut area	86 a	2.0 b

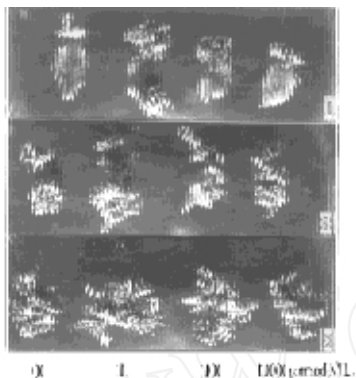
\* 表中数值经 Duncan s 测验,  $P=0.05$ , 以下同。

\* Numbers in the table is measured through Duncan s test,  $P=0.05$ , the same as the follows.

### (二)不同浓度 $\text{AgNO}_3$ 对叶片培养的影响

在培养基中加入 0、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$   $\text{AgNO}_3$ , 苹果叶片分化不定芽的结果见图版 和表 2。1~100 $\mu\text{mol/L}$   $\text{AgNO}_3$  对 3 种切割方式的叶片再生不定芽均有显著的促进作用,且均以 1 $\mu\text{mol/L}$  效果最好,其叶片再生百分率均达到 100%,平均每叶再生芽数最高 15.2 个(划痕),最低 8.5 个(整叶);10 $\mu\text{mol/L}$  次之,叶片再生百分率在 93%~100%,平均每叶再生芽数最高 10.2 个(划痕),最低 4.6 个(整叶);该两种处理与对照相比均达极显著水平;100 $\mu\text{mol/L}$  再次,其叶片再生百分率与对照相比没有显著差异,只显著提高了每叶再生芽数。

在相同 AgNO<sub>3</sub>浓度的培养基中,3种切割方式均以划痕的叶片再生频率最高,平均每叶再生芽数最多,切块次之,整叶最低,AgNO<sub>3</sub>处理并不改变这一趋势。



图版 不同切割方式下不同浓度 AgNO<sub>3</sub>的处理叶片培养效果

1. 整叶,2. 划痕,3. 切块。

Plate Effect of leaf culture treated with different concentrations of AgNO<sub>3</sub> and cut methods

1. Whole leaf,2. Trace cut,  
3. Pieces cut.

### (三) AgNO<sub>3</sub>对叶片培养过程中乙烯释放量的影响

1. AgNO<sub>3</sub>对不同培养时期叶片乙烯释放量的影响:叶片培养过程中乙烯释放量的结果见表3。不同培养时期叶片乙烯释放量均以2d达最高(峰)值,以后逐渐下降,10d后基本上达到稳定。3种叶片切割方式及AgNO<sub>3</sub>处理下,其变化趋势相同。

3种切割方式中,划痕和切块的叶片,培养2d和5d时乙烯释放量显著高于整叶的,但培养10d以后,三者之间乙烯释放量没有显著差异。培养基中加入AgNO<sub>3</sub>并不改变这一变化趋势。这也许就是划痕、切块叶片培养再生频率和每叶再生芽数显著高于整叶培养的原因。

AgNO<sub>3</sub>对不同培养时期叶片乙烯释放量均有一定的抑制作用。培养早期(2~5d),乙烯抑制率在16%~20%之间,在培养中、后期,乙烯抑制率在25%~40%之间,三种切割方式之间没有显著差异。

2. AgNO<sub>3</sub>对不同培养时期容器中乙烯浓度的影响:不同培养时期容器中乙烯的浓度见表4。由于培养容器是一相对密闭的系统,外植体释放的乙烯在环境中积累,因而随着培养时间的延长,容器中的乙烯浓度逐渐达最高值,20d时略有下降。3种叶片切割方式和AgNO<sub>3</sub>处理均呈现相同的乙烯积累趋势。

AgNO<sub>3</sub>对不同培养时期容器中乙烯的积累均有一定的抑制作用。处理与对照相比,各时期乙烯浓度的差异均达显著水平。因而降低了乙烯对分化的抑制,促进了不定芽的发生。

表 2 不同浓度 AgNO<sub>3</sub>对苹果叶片培养的影响

Table 2 Effects of different concentrations of AgNO<sub>3</sub> on apple leaf culture

AgNO <sub>3</sub> 浓度 AgNO <sub>3</sub> concentration (μmol/L)	叶片切割方式 Leaf cut method	叶片再生百分率 Leaf regeneration percentage ( % )	平均每叶再生芽数 No. of shoots produced from each leaf
0	整叶	57 d	1.0 f
	Whole leaf		
	划痕	85 c	3.4 e
	Trace cut		
	切块	86 c	2.0 f
1	Piece cut		
	整叶	100 a	8.5 c
	Whole leaf		
	划痕	100 a	15.2 a
	Trace cut		
10	切块	100 a	11.2 b
	Piece cut		
	整叶	93 b	4.6 de
	Whole leaf		
	划痕	95 b	10.2 b
100	Trace cut		
	切块	100 a	7.6 c
	Piece cut		
	整叶	69 d	3.1 e
	Whole leaf		
	划痕	88 c	5.9 d
	Trace cut		
	切块	87 c	3.0 e
	Piece cut		

表 3 AgNO<sub>3</sub>对不同培养时期叶片乙烯释放量的影响

Table 3 Effects of AgNO<sub>3</sub> on ethylene releasing from leaves during different culture stages

AgNO <sub>3</sub> 浓度 AgNO <sub>3</sub> concentration (μmol/L)	叶片切割方式 Leaf cut method	乙烯释放量 Ethylene released(nl/h gFW)				
		2d	5d	10d	15d	20d
0	整叶	9.07	7.32	5.98	4.72	4.51
	Whole leaf					
	划痕	14.82	10.68	6.08	5.63	5.08
	Trace cut					
	切块	13.75	10.76	5.94	5.42	5.22
1	Piece cut					
	整叶	7.25(20) *	5.99(18)	4.28(28)	3.02(36)	3.15(40)
	Whole leaf					
	划痕	11.84(20)	8.96(16)	4.52(26)	3.47(38)	3.12(39)
	Trace cut					
	切块	10.75(19)	8.72(19)	4.46(25)	3.39(37)	3.25(38)
	Piece cut					

\* 括号中数字为与对照相比的乙烯抑制百分率( % )。  
\* Numbers in brackets are the ethylene suppressing percentage in contrast to the control( % ) .

表 4 AgNO<sub>3</sub>对不同培养时期容器中乙烯浓度的影响  
Table 4 Effects of AgNO<sub>3</sub> on ethylene concentration in the container during different culture periods

AgNO <sub>3</sub> 浓度 AgNO <sub>3</sub> concentration (μmol/L)	不同切割方式 Different cut method	乙烯浓度 Ethylene concentration(ppm)				
		2d	5d	10d	15d	20d
0	整叶	0. 23b	0. 42a	0. 62a	0. 81a	0. 69a
	Whole leaf					
	划痕	0. 28a	0. 45a	0. 66a	0. 89a	0. 72a
	Trace cut					
	切块	0. 26a	0. 45a	0. 65a	0. 87a	0. 70a
1	Piece cut					
	整叶	0. 18c	0. 29b	0. 43b	0. 61b	0. 50b
	Whole leaf					
	划痕	0. 22b	0. 35b	0. 45b	0. 65b	0. 52b
	Trace cut					
	切块	0. 21b	0. 33b	0. 47b	0. 66b	0. 49b
	Piece cut					

讨 论

尽管不少研究已证实 Ag<sup>+</sup> 显著促进芽的发生,但有关 Ag<sup>+</sup> 的作用机理研究并不多。Beyer 认为, Ag<sup>+</sup> 干扰乙烯与其受体的结合,是一种乙烯作用抑制剂<sup>[7]</sup>。Yang 则认为, Ag<sup>+</sup> 是一种乙烯合成抑制剂,在 ACC 乙烯中起抑制作用<sup>[8]</sup>。本研究也证实, Ag<sup>+</sup> 对不同培养时期的叶片乙烯产生有一定的抑制作用。尽管培养早期即细胞脱分化期间,乙烯对诱导细胞分裂有利<sup>[9]</sup>,但由于此期 AgNO<sub>3</sub> 处理的乙烯抑制率相对较低,而由机械切割产生的乙烯使得此期乙烯释放量最高,因而培养早期叶片所释放的乙烯足以启动细胞的分裂。相反,尽管培养后期叶片的乙烯释放量逐渐降低,但由于培养容器是一相对密闭的系统,外植体所释放的乙烯在培养容器中积累,使得培养中、后期容器中乙烯浓度逐渐升高, AgNO<sub>3</sub> 则显著降低了培养容器中乙烯的浓度,部分解除了乙烯对分化的抑制作用,促进了不定芽的发生。当然,是否 AgNO<sub>3</sub> 在抑制乙烯产生的同时,竞争性地抑制乙烯的作用有待进一步研究。

尽管如此,在培养基中加入 AgNO<sub>3</sub> 显著促进苹果叶片不定芽的再生已得到证实。这一高效苹果叶片直接再生不定芽的实验系统可大大提高诱变育种的效率,因为大量不定芽的发生可以为直接分离出更多单个突变细胞提供机会,从而为避免嵌合体的形成,加速突变育种进程展现了更广阔的前景。

## 参 考 文 献

- 1 Fasolo F, Malavasi F, Predieri S. Cultivar dependent response to regeneration from leaves in apple. *Acta Horticulturae*, 1990, 280:61~68
- 2 Dufour M. Improving yield of adventitious shoots in apple. *Acta Horticulturae*, 1990, 280:51~58
- 3 Purnhauser L, Gyulai G. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1993, 35:131~139
- 4 Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M et al. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue culture using the ethylene inhibitor  $\text{AgNO}_3$ . *Plant Cell Reports*, 1987, 6:1~4
- 5 Songstad DD, Duncan DR, Widholm JM. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and nonbornadiene on plant regeneration from maize callus culture. *Plant Cell Reports*, 1988, 7:262~265
- 6 Sethi U, Basu A, Gaha-Mukherjee S. Control of cell proliferation and differentiation by modulators of ethylene biosynthesis and action in *Brassica hypocotyl* explants. *Plant Science*, 1990, 69:225~229
- 7 Beyer EM. A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology*, 1976, 58:268~271
- 8 Yang SF. Regulation of ethylene synthesis. *Hortscience*, 1980, 15:238~243
- 9 中国科学院上海植物生理研究所细胞室. 植物组织和细胞培养. 上海:上海科技出版社, 1978, 58~72

## EFFECT OF $\text{AgNO}_3$ ON APPLE LEAF CULTURE AND ITS RELATION TO ETHYLENE PRODUCTION

Chen Xiwen   Fan Hui   Qiu Liquan   Wang Qihui

( Institute of Crop Genetics and Breeding, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

### ABSTRACT

When  $\text{AgNO}_3$  (1 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$ ) was added to MS regeneration medium containing 6-BA 3.0  $\text{mg/L}$ , IBA 0.05  $\text{mg/L}$ , the shoot regeneration from apple leaf significantly enhanced. And the optimum concentration of  $\text{AgNO}_3$  tested was 1  $\mu\text{mol/L}$ . In contrast to the control, the suppression rate to ethylene with 1  $\mu\text{mol/L}$  of  $\text{AgNO}_3$  was 16 %~20 % in early culture stage (2~5 days) while the rate was 25 %~40 % in middle and late stages. Therefore, the ethylene concentration in the container throughout the culture period especially at the middle and late stages (known as differentiation stage) decreased, thus lessening the ethylenes inhibition on shoot regeneration and promoting shoot formation.

**Key words:**  $\text{AgNO}_3$ , apple, leaf culture, ethylene