

石榴田间愈伤组织诱导及芽再生体系的建立

牛娟, 骆翔, 陈利娜, 李好先, 刘贝贝, 王企, 曹尚银*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要:【目的】建立高效的石榴田间愈伤组织途径芽再生技术体系。【方法】以‘突尼斯’软籽石榴为材料, 研究不同激素浓度、激素组合和枝条粗度等对石榴田间愈伤组织形成及芽再生的影响。【结果】 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO₃+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃+ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 处理效果最佳, 出芽较早, 出芽数较多。另外, 枝条粗度对出芽影响不大。因此, 可在减少树体伤害的前提下, 选择茎粗 1.0~2.0 cm 的枝条诱导愈伤组织形成及芽再生。【结论】成功建立了石榴田间愈伤组织形成及芽再生技术体系, 为石榴嫁接扩繁、遗传转化、诱变育种等提供良好的材料基础。

关键词: 石榴; 在体诱导; 愈伤组织; 芽再生

中图分类号: S665.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)10-1225-10

Callus induction in the field and establishment of a bud regeneration system for pomegranate

NIU Juan, LUO Xiang, CHEN Lina, LI Haoxian, LIU Beibei, WANG Qi, CAO Shangyin*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: 【Objective】Pomegranate (*Punica granatum* L.) is one of the excellent small sundry fruits and has developed quickly in recent years in China, where pomegranate has been cultivated for more than two thousand years for its high economic, nutrition, medicinal and ornamental values. Soft-seeded pomegranate is highly admired by the consumers for its big fruit, sweetness, juiciness, and delicious soft seeds, and has a great development potential in China. However, most of the new soft-seeded cultivars have been obtained from bud mutation, radiation and hybrid breeding. Breeding for soft-seeded cultivars is difficult by conventional crossing and time-consuming. Biotechnology breeding is helpful to solve these problems. Bud regeneration is the precondition and key point of plant regeneration via *in vivo* callus induction. The goal of this study is to construct an *in vivo* system for bud regeneration from callus in order to provide solid foundation for expanding propagation, genetic transformation and mutation breeding of pomegranate. 【Methods】The effects of different hormone combinations, including TDZ+NAA+KT, TDZ+NAA+KT+6-BA, TDZ+NAA+KT+IBA, TDZ+NAA+KT+IBA+6-BA, TDZ+GA₃+KT+6-BA and TDZ+GA₃+KT+IBA+6-BA at different concentrations, AgNO₃ at different concentrations and branch diameter on callus induction and adventitious bud regeneration *in vivo* in ‘Tunisa’ soft-seeded pomegranate cultivar were investigated. Strong branches were randomly selected and cut with a branch shear or hand saw. Then the cut end of the branches was treated with 1.5 mL callus inducing agents, such as $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO₃ for 24 h. Wetted mud was used to seal the cut end and then covered with a white plastic bag to keep moisture. The wetted mud was replaced with fresh mud every 7 days. After the adventitious buds formed from the callus grew up to 2 cm long, the

收稿日期: 2018-02-09

接受日期: 2018-08-06

基金项目: 国家科技基础性工作专项重点项目“我国优势产区落叶果树农家品种资源调查与收集”(2012 FY110100); 中国农业科学院科技创新工程: 特色果树资源与育种(CAAS-ASTIP-201X-ZFRI)

作者简介: 牛娟, 女, 科研助理, 研究方向为果树遗传育种。E-mail: 18530982362@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0371—65330963, E-mail: 13937192127@163.com

mud was removed allowing the buds to grow naturally. The callus morphology formed from the cut end of the branches was observed 30 days after branch cutting. The ability of bud regeneration was represented by the average bud number of each branch. The effects of branch diameter and hormone combinations on *in vivo* bud regeneration were analyzed.【Results】The morphological characters of pomegranate callus were analyzed. Green callus was formed 10-20 d after cutting. The callus enlarged, growing vigorously. The callus underwent obvious changes into a slightly loose texture and from light green to milky white, or from the white transparent to green granular, and large buds appeared after 30-45 d. The adventitious buds had formed from the callus by day 60. The adventitious buds formed from the callus reached 2 cm long at day 75, and reached 3-6 cm in length and mostly lignified at day 90. The effects of different hormone combinations on bud regeneration were analyzed. The results indicated that there was no significant difference in the effect on the number of buds among the hormone combinations of TDZ, NAA and KT. The treatments of $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO₃+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO₃+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO₃+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA+ $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO₃+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃+ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO₃+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃+ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA improved the average bud number. Moreover, compared with the other treatments, the treatment of $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO₃+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃+ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA induced the earliest adventitious buds that appeared 30 days after treatment. But with the increase in the concentration of the hormone, the adventitious buds rate reduced. Higher concentrations of hormone promoted callus cell division, but inhibited the adventitious bud differentiation. The number of the regenerated buds had no significant difference among different branch diameters. Moreover, to balance minimizing number of branches to cut and minimizing the damage to trees, we suggested that 1.0-2.0 cm branches were suitable for adventitious bud induction. In addition, AgNO₃ had an impact on the formation of callus and the average bud number, and the best concentration was $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.【Conclusion】A callus induction and bud regeneration system in pomegranate was successfully constructed *in vivo*, which will promote pomegranate expanding and gene transformation.

Key words: Pomegranate; *In vivo* induction; Callus; Bud regeneration

石榴(*Punica granatum* L.)属石榴科(Punicaceae)石榴属(*Punica* L.)落叶灌木或小乔木果树,原产于伊朗、阿富汗和高加索等中亚地区,在我国已有2 000多年的栽培历史,是中国近年来发展迅速的优良小杂果类果树之一。它以较高的经济价值、营养价值、医药价值和保健功能,越来越受到消费者的青睐^[1]。经过长期的自然演化和人工筛选,在我国形成了以新疆叶城、陕西临潼、河南开封、安徽怀远、山东峄城、四川会理和云南蒙自等7大石榴主产区。其中软籽石榴以其果实硕大、汁液甘甜、汁多仁软、食之无渣等优点深受消费者的喜爱,其优良的经济性状堪称果中珍品,市场售价是普通品种的2~4倍,发展潜力非常大,是增加农民收入的重要途径之一^[2]。但目前生产中软籽石榴品种所占的比例不

高。据调查统计,截至到2016年底,我国软籽石榴现存面积约4 164.1 hm²,约占石榴总面积的5%,其中,‘突尼斯’软籽石榴高达3 850.2 hm²^[3],约占软籽石榴栽培总面积的92.5%。说明目前我国软籽石榴栽培面积较小,品种较为单一,抗性较差,尤其在抗寒性、抗病性等方面,严重影响了我国石榴产业的可持续发展。

为了有效解决这些问题,亟需对石榴进行遗传改良,培育综合性状优良的软籽石榴新品种。但目前我国石榴育种主要以传统的杂交育种为主,育种周期长,效率低,研究进展缓慢。而通过遗传转化将特定基因导入植物基因组中实现植物性状的定向改良,或者通过诱变方法进行性状改良是目前创制植物新种质的重要途径。但不论是通过遗传转化或诱

变进行性状改良,其重要前提条件是要具有一个良好的受体再生系统。因此,稳定、高效的芽再生体系的建立是开展性状改良的重要材料基础^[4]。但目前有关石榴再生体系建立的研究还不多,主要有陈延惠等^[5]以‘突尼斯’软籽石榴叶片为外植体,分析了不同灭菌时间和不同生长调节物质对离体叶片愈伤组织再生的影响。朱立武等^[6]比较分析了石榴休眠枝段、成熟叶片及当年生新梢离体培养对愈伤组织再生的影响。石榴再生体系对操作技术和环境要求较高,而且从分化、脱分化到大田移栽评价至少需3年以上,造成育种周期过长。与组织培养条件下的芽再生方法相比较,源于枝干截面愈伤诱变长出的不定芽具有适应性强,能快速进行繁殖。不仅减少了组培苗生根、炼苗、移栽等多个环节,还能直接获得接穗应用于生产中,缩短育种周期,提高育种效率。目前,在枣树、榆树、海棠、五角枫等植物中已成功建立田间愈伤组织途径芽的再生及多倍体变异材

料的报道^[7-11],但在石榴中的相关研究还不多,因此建立高效的田间愈伤组织诱导芽的再生对创造石榴新种质的意义重大。为此,笔者通过分析不同生长调节物质对石榴田间愈伤组织形成的影响,建立了石榴田间愈伤组织途径芽的再生技术体系,该技术不仅对操作环境要求低,而且不定芽当年可发育成木质化的枝条用于嫁接扩繁,可大大缩短育种年限^[12],为今后的石榴遗传转化及诱变育种提供良好的材料基础。

1 材料和方法

1.1 田间愈伤组织诱导和芽再生

参照李超^[10]的方法,于2017年5月份,以郑州果树研究所农家品种资源圃中的‘突尼斯’软籽石榴为材料,选择位于树体上部直径1.0~2.5 cm、直立健壮枝条进行截枝。将不同浓度、不同诱导剂(表1)滴于脱脂棉上,以浸湿脱脂棉为宜处理截面形成层24

表1 不同药剂对石榴愈伤组织形成和出芽影响的实验设计
Table 1 Treatment design for examination of the effects of different reagents on callus induction and bud regeneration in pomegranate

编号 No.	ρ (噻苯隆) TDZ/(mg·L ⁻¹)	ρ (硝酸银) AgNO ₃ /(mg·L ⁻¹)	ρ (1-萘乙酸) NAA/(mg·L ⁻¹)	ρ (氯吡脲) KT/(mg·L ⁻¹)	ρ (吲哚丁酸) IBA/(mg·L ⁻¹)	ρ (6-苄氨基腺嘌呤) 6-BA/(mg·L ⁻¹)	ρ (赤霉素) GA ₃ /(mg·L ⁻¹)
1	1.5	1	0	0	0	0	0
2	2	1.5	0	0	0	0	0
3	4	2	0	0	0	0	0
4	4	0	0	0	0	0	0
5	4	2	0.2	0.5	0	0	0
6	4	2	0.3	1.0	0	0	0
7	4	2	1.0	1.5	0	0	0
8	4	2	0.2	1.0	0	2	0
9	4	2	0.3	1.0	0	3	0
10	4	2	1.0	1.0	0	5	0
11	4	2	0.2	0.5	0.1	0	0
12	4	2	0.3	1.0	0.3	0	0
13	4	2	1.0	1.5	0.5	0	0
14	4	2	0.2	1.0	0.1	2	0
15	4	2	0.3	1.0	0.3	3	0
16	4	2	1.0	1.0	0.5	5	0
17	4	2	0	1.0	0	2	0.3
18	4	2	0	1.0	0	3	0.5
19	4	2	0	1.0	0	5	1.0
20	4	2	0	1.0	0.1	2	0.3
21	4	2	0	1.0	0.3	3	0.5
22	4	2	0	1.0	0.5	5	1.0

h,然后采用“黑塑料袋+泥+白塑料膜”覆盖泥土保湿,每隔7~10 d更换湿泥,保持泥的湿润,直至芽长度达2 cm。单枝6次重复。

1.2 愈伤组织状态和出芽数目调查

于截枝后30 d调查愈伤组织状态和出芽情

况。出愈率/%=(出愈伤枝条数量/处理总枝条数量)×100;愈伤等级划分(表2)参照李超^[10]的方法,芽再生能力用平均单枝截面出芽数表示。于截枝后90 d,对各类枝条的单枝截面出芽数进行调查,平均单枝截面出芽数=出芽总数/处理总枝条数量。

表 2 愈伤组织分级标准
Table 2 Grading standard of callus

愈伤等级 Callus grade	相应等级特点 The characteristics of corresponding grades of callus
0	无愈伤组织形成(图 1-A) No callus informed (Fig. 1-A)
1	肉眼可见绿色愈伤组织环(图 1-B) A green callus circle could be seen by naked-eye (Fig. 1-B)
2	愈伤组织环变粗(图 1-C) The callus circle became thicker (Fig. 1-C)
3	愈伤组织环继续加粗,其宽度约占截面半径的 1/5-1/2(图 1-D) The callus circle became much thicker and covered about 1/5-1/2 of the cut section radius (Fig. 1-D)
4	愈伤组织环约达截面半径的 1/2 (图 1-E) The width of callus circle covered about 1/2 of cut section radius (Fig. 1-E)
5	愈伤组织环大于截面半径的 1/2 (图 1-F) The width of callus circle covered over 1/2 of cut section radius (Fig. 1-F)



A. 0 级(处理 5 d); B. 1 级(处理 10 d); C. 2 级(处理 15 d); D. 3 级(处理 20 d); E. 4 级(处理 25 d); F. 5 级(处理 30 d)
A. Grade 0(Treatment for 5 d); B. Grade 1(Treatment for 10 d); C. Grade 2(Treatment for 15 d); D. Grade 3(Treatment for 20 d); E. Grade 4 (Treatment for 25 d); F. Grade 5(Treatment for 30 d)

图 1 石榴枝条截面的愈伤组织分级
Fig. 1 Grading of callus on branches in pomegranate

1.3 数据分析

采用 SPSS STATISTICS 17.0 软件进行统计分析,采用 Duncan(D)方法和 T 测验进行差异显著性分析,用小写字母表示其差异显著性($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 石榴田间愈伤组织诱导不定芽的形态分化过程

对枝条进行短截,滴加诱导剂 10~20 d 后,截面开始出现绿色的愈伤组织。20 d 后愈伤组织继续膨大,生长旺盛且均匀布满截面。30~45 d 后,截面愈伤颜色由黄绿色转变为白绿色,质地由紧密转变为略为疏松的状态。其后转变为绿色颗粒状、不透明的愈伤组织,并有大量芽眼出现。继续培养 60 d 后,

愈伤组织处开始分化出不定芽。75 d 后,愈伤组织继续分化成不定芽,且不定芽开始抽生出小叶片。随后长成高 1~2 cm 的幼梢。90 d 后,高 3~6 cm,且部分呈木质化状态(图 2)。

2.2 不同植物生长调节物质对石榴愈伤组织形成和出芽的影响

2.2.1 不同硝酸银(AgNO₃)和苯基脲衍生物(TDZ)浓度对愈伤形成和出芽的影响 从表 3 中可以看出,与仅加 TDZ 的处理相比,在同等条件下加入 AgNO₃后出芽数目相对较高。而且,AgNO₃质量浓度为 1.0~1.5 mg·L⁻¹时出芽数差异不大,而质量浓度为 2.0 mg·L⁻¹时出芽数目显著提高,说明高质量浓度的 AgNO₃对石榴田间愈伤组织的形成和单枝截面出芽数具有重要作用。



A. 处理 0 d; B. 处理 10 d; C. 处理 20 d; D. 处理 30 d; E. 处理 45 d; F. 处理 60 d; G. 处理 75 d; H. 处理 80 d; I. 处理 90 d。
A. Treatment for 0 d; B. Treatment for 10 d; C. Treatment for 20 d; D. Treatment for 30 d; E. Treatment for 45 d; F. Treatment for 60 d; G. Treatment for 75 d; H. Treatment for 80 d; I. Treatment for 90 d.

图 2 石榴枝条截面愈伤组织的生长状态
Fig. 2 Morphological character of pomegranate callus

表 3 不同 AgNO ₃ 和 TDZ 浓度对愈伤形成和出芽的影响							
Table 3 Effect of the concentration gradients of AgNO ₃ and TDZ on callus induction and bud regeneration							
编号 No.	质量浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)	处理数 Treatment No.	平均茎粗 Average diameter of branches/cm	出愈率 Callus ratio/%	愈伤等级(出芽数) Callus grade (Bud number)		
					30 d	60 d	90 d
1	1.5 TDZ+1 AgNO ₃	6	1.6 a	100	2	4	(1.7) a
2	2.0 TDZ+1.5 AgNO ₃	6	1.5 a	100	2	5	(2.0) a
3	4.0 TDZ+2 AgNO ₃	6	1.5 a	100	3	4	(4.8) b
4	4.0 TDZ	6	1.5 a	100	2	4	(1.4) a

注:不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 上差异显著。下同。
Note: Different small letters indicate significant difference at $p < 0.05$. The same below.

2.2.2 不同NAA和KT浓度对愈伤形成和出芽的影响 从表4中可以看出,在TDZ和AgNO₃浓度不变的条件下,与4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃相比,不同浓度的NAA和KT组合对愈伤形成、愈伤等级和单枝截面出芽数的影响无显著性差异。而且随着激素浓度的增加,单枝出芽数呈先升高后下降的趋势,并都低于对照的单枝截面出芽数,说明NAA和KT激素组合对石榴愈伤组织形成和出芽效果不佳。

表 4 NAA 和 KT 对愈伤形成和出芽的影响

Table 4 Effect of the concentration gradients of NAA and KT on callus induction and bud regeneration

编号 No.	质量浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)	处理数 Treatment No.	平均茎粗 Average diameter of branches/cm	出愈率 Callus ratio/%	愈伤等级(出芽数) Callus grade (Bud number)		
					30 d	60 d	90 d
1	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.2 NAA+0.5 KT	6	1.6 a	100	4	4	(1.7)a
2	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.3 NAA+1 KT	6	1.4 a	100	4	4	(4.3)b
3	4 TDZ+2 AgNO ₃ +1 NAA+1.5 KT	6	1.4 a	100	3	5	(3.7)ab
4	4 TDZ+2 AgNO ₃	6	1.5 a	100	3	4	(4.8)b

2.2.3 不同NAA、KT、6-BA 浓度对愈伤形成和出芽的影响 由表5可知,在TDZ和AgNO₃浓度不变的条件下,与4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃相比,不同浓度的NAA、KT和6-BA组合对愈伤形成、愈伤等级和单枝截面出芽数的影响无显著性差异。另

外,激素浓度过低或过高会降低单枝截面出芽数,而中浓度的4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃+0.3 mg·L⁻¹ NAA+1 mg·L⁻¹ KT+3 mg·L⁻¹ 6-BA处理诱导的单枝截面出芽数相对较高,说明激素浓度过高或过低都不利于诱导愈伤组织出芽。

表 5 NAA、KT 和 6-BA 对愈伤形成和出芽的影响

Table 5 Effect of the concentration gradients of NAA, KT and 6-BA on callus induction and bud regeneration

编号 No.	质量浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)	处理数 Treatment No.	平均茎粗 Average diameter of branches/cm	出愈率 Callus ratio/%	愈伤等级(出芽数) Callus grade (Bud number)		
					30 d	60 d	90 d
1	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.2 NAA+0.5 KT+2 6-BA	6	1.4 a	100	4	5	(3.0) a
2	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.3 NAA+1 KT+3 6-BA	6	1.4 a	100	3	5	(5.8) b
3	4 TDZ+2 AgNO ₃ +1 NAA+1.5 KT+5 6-BA	6	1.6 a	100	3	4	(4.0) ab
4	4 TDZ+2 AgNO ₃	6	1.5 a	100	3	4	(4.8) ab

2.2.4 不同NAA、KT、IBA 浓度对愈伤形成和出芽的影响 由表6可知,在TDZ和AgNO₃浓度不变的条件下,与4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃相比,不同浓度的NAA、KT和IBA组合对愈伤形成、愈伤等

级和单枝截面出芽数的影响无显著性差异。另外,高浓度激素诱导的单枝截面出芽数相对较低,低浓度激素能显著提高单枝截面出芽数,其中4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃+0.3 mg·L⁻¹ NAA+1 mg·L⁻¹

表 6 NAA、KT 和 IBA 对愈伤形成和出芽的影响

Table 6 Effect of NAA, KT and IBA on callus induction and bud regeneration

编号 No.	质量浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)	处理数 Treatment No.	平均茎粗 Average diameter of branches/cm	出愈率 Callus ratio/%	愈伤等级(出芽数) Callus grade (Bud number)		
					30 d	60 d	90 d
5	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.2 NAA+0.5 KT+0.1 IBA	6	1.3 a	100	4	5	(4.0) ab
6	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.3 NAA+1 KT+0.3 IBA	6	1.3 a	100	3	4	(5.4) b
7	4 TDZ+2 AgNO ₃ +1 NAA+1.5 KT+0.5 IBA	6	1.3 a	100	4	5	(1.7) a
8	4 TDZ+2 AgNO ₃	6	1.5 a	100	3	4	(4.8) ab

KT+0.3 mg·L⁻¹ IBA处理诱导的单枝截面出芽数相对较高,说明低浓度的激素组合有利于诱导愈伤组织出芽。

2.2.5 不同NAA、KT、6-BA 和 IBA 浓度对愈伤形成和出芽的影响 由表7可知,在TDZ和AgNO₃浓度不变的条件下,与4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃相比,不同浓度的NAA、KT、6-BA和IBA组合对愈伤

形成、愈伤等级和单枝截面出芽数的影响无显著性差异。另外,由表5~7可知,与NAA+KT组合相比,分别添加6-BA和IBA及同时加入2种激素的组合,单枝截面出芽数虽有一定程度的提高,但差异不显著,说明不同浓度的NAA、KT、6-BA和IBA组合对石榴田间愈伤组织形成及单枝截面出芽数的影响不大。

表 7 NAA、KT、IBA 和 6-BA 对愈伤形成和出芽的影响
Table 7 Effect of NAA, KT, IBA and 6-BA on callus induction and bud regeneration

编号 No.	质量浓度 concentration/(mg·L ⁻¹)	处理数 Treatment No.	平均茎粗 Average diameter of branches/cm	出愈率 Callus ratio/%	愈伤等级(出芽数) Callus grade (Bud number)		
					30 d	60 d	90 d
9	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.2 NAA+0.5 KT+0.1 IBA+2 6-BA	6	1.5 a	100	3	4	(3.5) a
10	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.3 NAA+1 KT+0.3 IBA+3 6-BA	6	1.4 a	100	4	5	(6.7) a
11	4 TDZ+2 AgNO ₃ +1 NAA+1.5 KT+0.5 IBA+5 6-BA	6	1.5 a	100	3	5	(4.8) a
12	4 TDZ+2 AgNO ₃	6	1.5 a	100	3	4	(4.8) a

2.2.6 不同 GA₃、KT 和 6-BA 浓度对愈伤形成和出芽的影响 由表 8 可知,在 TDZ 和 AgNO₃ 浓度不变的条件下,与 4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃ 相比,不同浓度的 GA₃、KT 和 6-BA 组合对愈伤形成、愈伤等级和单枝截面出芽数的影响无显著性差异。另外,高浓度激素诱导的单枝截面出芽数相对较低,而低浓度激素能相对提高单枝截面出芽数,其中 4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃+0.5 mg·L⁻¹ GA₃+1

表 8 GA₃、KT 和 6-BA 对愈伤形成和出芽的影响
Table 8 Effect of GA₃, KT and 6-BA on callus induction and bud regeneration

编号 No.	质量浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)	处理数 Treatment No.	平均茎粗 Average diameter of branches/cm	出愈率 Callus ratio/%	愈伤等级(出芽数) Callus grade (Bud number)		
					30 d	60 d	90 d
1	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.3 GA ₃ +0.5 KT+2 6-BA	6	1.5 a	100	4	5	(4.3) ab
2	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.5 GA ₃ +1 KT+3 6-BA	6	1.6 a	100	3	5	(5.7) b
3	4 TDZ+2 AgNO ₃ +1 GA ₃ + 1.5 KT+5 6-BA	6	1.6 a	100	4	4	(2.8) a
4	4 TDZ+2 AgNO ₃	6	1.5 a	100	3	4	(4.8) ab

mg·L⁻¹ KT+3 mg·L⁻¹ 6-BA 处理诱导的单枝截面出芽数相对较高,说明低浓度的激素组合有利于诱导愈伤组织出芽。
2.2.7 不同 GA₃、KT、6-BA 和 IBA 浓度对愈伤形成和出芽的影响 由表 9 可知,在 TDZ 和 AgNO₃ 浓度不变的条件下,与 4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃ 相比,不同浓度的 GA₃、KT、6-BA 和 IBA 组合对愈伤形成、愈伤等级和单枝截面出芽数的影响无显著性差异。而且高浓度激素诱导的单枝截面出芽数相对较低,而低浓度激素组合的出芽数相对较高。可能是因为激素浓度过高促进了愈伤组织细胞的分裂,而抑制了不定芽的分化。此外,由表 8~9 可知,在

表 9 GA₃、KT、6-BA 和 IBA 对愈伤形成和出芽的影响
Table 9 Effect of GA₃, KT, 6-BA and IBA on callus induction and bud regeneration

编号 No.	质量浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)	处理数 Treatment No.	平均茎粗 Average diameter of branches/cm	出愈率 Callus ratio/%	愈伤等级(出芽数) Callus grade (Bud number)		
					30 d	60 d	90 d
1	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.3 GA ₃ +0.5 KT+2 6-BA+0.1 IBA	6	1.5 a	100	4	5(1.7)	(6.5) ab
2	4 TDZ+2 AgNO ₃ +0.5 GA ₃ +1 KT+3 6-BA+0.3 IBA	6	1.5 a	100	4	5(5.0)	(12.0) b
3	4 TDZ+2 AgNO ₃ +1 GA ₃ + 1.5 KT+5 6-BA+0.5 IBA	6	1.6 a	100	4	5(1.5)	(3.7) a
4	4 TDZ+2 AgNO ₃	6	1.5 a	100	3	4	(4.8) ab

GA₃、KT、6-BA 浓度不变的条件下,加入低浓度的 IBA 能相对提高单枝截面出芽数。其中 4 mg·L⁻¹ TDZ+2 mg·L⁻¹ AgNO₃+0.5 mg·L⁻¹ GA₃+1 mg·L⁻¹ KT+3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ IBA 处理出芽较早,出芽数较多,是诱导石榴田间愈伤组织途径芽再生的理想组合。
2.3 枝条粗度对愈伤发生及芽再生的影响 为了明确枝条粗度对于芽再生的影响,分别对 1.00~2.50 cm 的枝条进行截枝,分析不同粗度枝条的愈伤等级、出愈率和出芽能力的差异。由表 3~9 可知,同一品种不同粗度枝条的愈伤等级、出愈率和出芽数没有显著差异。由于树体较粗的枝条数量不

多,且对树体伤害较大,因此,在选取枝条粗度时宜选取 1.0~2.0 cm 的枝条。

3 讨 论

通过基因工程、诱变技术等手段对植物性状进行定向改良,是目前创制植物新种质较快捷且有效的方式,而高效的芽再生体系是植物进行诱变育种及遗传转化研究的重要材料基础。芽的再生体系可通过活体(田间)和离体(组培)的方式获得,由于离体再生体系常存在再生困难,生长周期长,需要无菌的环境条件等问题,严重阻碍了遗传转化及诱变育种的研究进程。而活体再生体系融合了田间树体生长较快和离体再生培养的优点,再生系数高,生长快,且再生芽当年可发育为木质化枝条和开花,诱变后易获得纯合体^[11]。目前,田间愈伤组织途径芽再生和多倍体诱导技术已成功应用于多个枣和酸枣品种,并成功获得了枣和酸枣的纯合四倍体和三倍体^[11-15]。其次,对榆树截面处理 3 d 即可观察到愈伤组织,20 d 后单枝截面出芽数高达 20 个,并成功获得榆树多倍体^[11-15]。另外,李超^[10]对影响农杆菌遗传转化效果的因素进行了分析,获得了‘月光’枣的转 *API*、*Bt* 基因的再生芽。说明田间愈伤组织途径芽再生在诱变和遗传转化中具有很大的应用潜力。在石榴的再生体系研究中,由于次生代谢旺盛,离体再生较难,再生率不高、再生芽的数目和生长速度不高,其研究远远滞后于其他果树^[16]。由于石榴可通过压条、扦插、嫁接等多种方式进行扩繁,而这些方法均是细胞全能性在活体中的具体体现,为石榴田间愈伤组织芽再生体系的广泛应用提供了实践依据。在本研究中,我们分析了不同激素浓度、不同激素组合及枝条粗度等因素对石榴田间愈伤组织形成及芽再生的影响,成功建立了石榴田间愈伤组织形成及芽再生的技术体系,这对于木本植物来说,是一种开拓性的进步,为通过石榴倍性、诱变育种或遗传转化等方式快速高效获得纯的变异材料提供了良好的理论基础。

植物激素是细胞、组织、器官等培养过程中不可缺少的物质,激素的种类、浓度和配比是影响愈伤组织形成与再生成功与否的关键因素。在石榴离体再生体系研究中,应用较多的激素是 6-BA、NAA、TDZ、KT、IBA、GA₃ 等。如王菲等^[16]研究认为石榴带芽茎段的最佳增殖培养基为 B5 + IBA 0.5 mg·L⁻¹ +

6-BA 0.6 mg·L⁻¹ + AgNO₃ 0.3 mg·L⁻¹ + GA₃ 0.2 mg·L⁻¹。张全军等^[17]研究认为石榴茎段的最适增殖培养基为 MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹ + KT 0.3~0.4 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹。陈延惠等^[5]认为石榴叶片最佳不定芽分化培养基为 MS + NAA 0.3 mg·L⁻¹ + TDZ 1.5 mg·L⁻¹ + KT(1.5-2.0) mg·L⁻¹, 并且认为在分化阶段使用 TDZ 不定芽再生率可高达 92%。陈海燕等^[18]认为‘泰山红’石榴离体叶片再生的适宜培养基为 MS + KT 1.0 mg·L⁻¹ + 6-BA 2.0 mg·L⁻¹ + GA₃ 0.5 mg·L⁻¹。本研究发现仅有 TDZ 处理的单枝截面出芽率较低,而与其他激素相结合后再生芽显著提高,与在植物离体培养中若以 TDZ 为主或 TDZ 添加浓度较高时,难以成苗的结果基本一致^[19-20]。此外,在 TDZ、AgNO₃ 浓度不变的条件下,与 NAA+KT 组合相比,单加 6-BA、IBA 或两种激素都添加的情况下,均能相对提高石榴的单枝截面出芽数,而且同时添加两种激素的出芽数最高,说明 6-BA、IBA 对出芽影响较大,而 NAA 和 KT 的影响较小,其结果与前人在石榴离体培养中的研究相一致^[17]。另外,陈海燕等^[18]研究发现在‘泰山红’石榴离体叶片再生培养基中添加 6-BA 和 KT 后,叶片不定芽的再生率和再生芽数目均显著增加。而且在石榴不定芽诱导培养基中加入一定量的 GA₃, 不定芽生长和伸长速度加快,芽苗长势较好^[17], 能显著提高芽的分化质量和增殖系数。在本研究中发现 TDZ 和 AgNO₃ 浓度不变的条件下,低浓度的 GA₃ + KT + 6-BA、GA₃ + KT + IBA 和 GA₃ + KT + 6-BA + IBA 等组合均能提高单枝截面出芽数,而且 4 mg·L⁻¹ TDZ + 2 mg·L⁻¹ AgNO₃ + 0.5 mg·L⁻¹ GA₃ + 1 mg·L⁻¹ KT + 3 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.3 mg·L⁻¹ IBA 处理出芽最早,出芽数最多,是石榴田间诱导芽再生的理想组合。而且,研究发现不同激素浓度和组合多表现随着浓度的提高,出芽率反而降低的趋势,说明激素的用量并非越高越好,而是有一个适宜的使用范围^[16]。总体来说,生长调节剂之间并不是独立作用于愈伤组织诱导芽的再生,而是存在着交互作用,对这些交互作用还有待于进一步研究分析。

另外,愈伤组织的数量、发育状态、枝条粗度和 AgNO₃ 的浓度等对再生体系也有一定影响。随着愈伤等级的提高,出芽数呈增加的趋势。在本研究中,发现 5 级愈伤组织比 4 级愈伤组织出芽数相对较高。其次,直径在 1.0~2.0 cm 的枝条比较容易出芽,这与前人在枣中的研究结果相一致,这可能是由于

新梢的出愈能力更强的原因^[10-11]。其次,研究报道在石榴离体培养中加入 AgNO_3 具有抑止乙烯产生,促进器官发生和不定芽分化,提高增殖系数,防止愈伤组织产生褐化等作用^[21]。在本研究中,未加 AgNO_3 的截面愈伤出芽数相对较低,而在同等条件下加入了 AgNO_3 的处理较易形成愈伤和不定芽。但 AgNO_3 浓度过低,对愈伤的形成和单枝出芽数影响不大, AgNO_3 浓度过高对愈伤组织形成与出芽反而有抑制作用。因此, AgNO_3 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对愈伤的形成和单枝出芽效果最好^[12]。

4 结 论

‘突尼斯’软籽石榴田间愈伤组织形成及芽再生体系的研究结果表明:处理 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ TDZ} + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AgNO}_3 + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3 + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT} + 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA}$ 效果最佳,出芽最早,出芽数最多。其次,选择直径在 $1.0 \sim 2.0 \text{ cm}$ 的枝条比较容易出芽,并减少对树体的伤害。下一步在获得高效诱导枝干截面愈伤并发生不定芽的基础上,还应当进一步研究影响石榴遗传转化及诱变的措施,并最终通过此途径获得转化植株和多倍体,为石榴的遗传改良提供理论基础,也为其他木本植物的遗传转化和诱变提供参考。

参考文献 References:

- [1] 曹尚银,牛娟,曹达,李好先,薛辉,陈利娜,张富红,赵弟广. 石榴果实成熟期不同品种果皮蛋白质表达的双向电泳分析[J]. 果树学报,2015,32(6): 1062-1069.
CAO Shangyin, NIU Juan, CAO Da, LI Haoxian, XUE Hui, CHEN Lina, ZHANG Fuhong, ZHAO Diguang. Comparative proteomics analysis of pomegranate peel in fruit maturation period[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1062-1069.
- [2] 薛辉,曹尚银,牛娟,李好先,张富红,赵弟广. 花粉直感对‘突尼斯’石榴坐果及果实品质的影响[J]. 果树学报,2016,33(2): 196-201.
XUE Hui, CAO Shangyin, NIU Juan, LI Haoxian, ZHANG Fuhong, ZHAO Diguang. Effects of xenia on fruit setting and quality in ‘Tunisia’ pomegranate[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(2): 196-201.
- [3] 侯乐峰,郭祁,郝兆祥,罗华. 我国软籽石榴生产历史现状及其展望[J]. 北方园艺,2017,20:196-199.
HOU Lefeng, GUO Qi, HAO Zhaoxiang, LUO Hua. History, present situation and prospects of soft-seed pomegranate in China[J]. Northern Horticulture, 2017, 20: 196-199.
- [4] 赵宁,冯建灿,叶霞,谭彬,李继东,郑先波,齐贤,连晓东. 枣组
- 织培养及相关生物技术研究进展[J]. 果树学报,2015,32(6): 1241-1252.
- ZHAO Ning, FENG Jianchan, YE Xia, TAN Bin, LI Jidong, ZHENG Xianbo, QI Xian, LIAN Xiaodong. A review of tissue culture and biotechnology in Chinese jujube[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1241-1252.
- [5] 陈延惠,胡青霞,谭彬,连红可,马海旺,李洪涛,冯建灿. ‘突尼斯软籽’石榴叶片愈伤组织再生体系的建立[J]. 经济林研究, 2012, 30(2): 83-87.
CHEN Yanhui, HU Qingxia, TAN Bin, LIAN Hongke, MA Haiwang, LI Hongtao, FENG Jiancan. Establishing of callus regeneration system from leaf in Tunisia soft-seed pomegranate[J]. Nonwood Forest Research, 2012, 30(2): 83-87.
- [6] 朱立武,张水明,宋丰顺,巩雪梅,房文娟,孙俊,李绍稳. 石榴离体培养再生体系的研究[J]. 园艺学报,2003,30(2):207-208
ZHU Liwu, ZHANG Shuiming, SONG Fengshun, GONG Xuemei, FANG Wenjuan, SUN Jun, LI Shaowen. Regeneration system of pomegranate by *in vitro* culture[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30(2): 207-208.
- [7] 王利虎,胡兰,李登科,刘平,刘孟军. 枣和酸枣田间愈伤组织途径芽再生技术的应用与优化[J]. 果树学报,2016,33(10), 1307-1314.
WANG Lihu, HU Lan, LI Dengke, LIU Ping, LIU Mengjun. Application and optimization of *in vivo* bud regeneration technique via callus in Chinese jujube and sour jujube[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(10), 1307-1314.
- [8] 徐娟,王玖瑞,刘孟军,刘平,代丽. 田间枣树愈伤组织诱导及不定芽的发生[J]. 河北农业大学学报,2011,34(6): 40-44.
XU Juan, WANG Jiurui, LIU Mengjun, LIU Ping, DAI Li. Callus induction and adventitious bud occurrence from Chinese jujube in the field[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2011, 34(6): 40-44.
- [9] 王利虎. 枣和酸枣田间愈伤组织途径芽再生技术优化及其在多倍体诱变中的应用[D]. 保定:河北农业大学,2015.
WANG Lihu. Optimization of *in vivo* bud regeneration technique via callus and its application in polyploidy induction in Chinese jujube and sour jujube[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2015.
- [10] 李超. 枣树田间愈伤组织诱导及芽再生体系的应用[D]. 保定:河北农业大学,2014.
LI Chao. Application of *in planta* callus induction and bud regeneration system in Chinese jujube[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2014.
- [11] SHI Q H, LIU P, LIU M J, WANG J R, XU J. A novel method for rapid *in vivo* induction of homogeneous polyploids via calluses in a woody fruit tree (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 121(2): 423-433.
- [12] 宁强. 枣愈伤组织诱导及多倍体诱变研究[D]. 保定:河北农业大学,2003.
NING Qiang. Research of generating callus and induction of

- polyploid in *Ziziphus jujuba* Mill.[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2003.
- [13] 宁强,刘孟军,刘晓光,赵锦. 枣愈伤途径诱导多倍体[J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(1): 29-32.
- NING Qiang, LIU Mengjun, LIU Xiaoguang, ZHAO Jin. Induction of polyploid in *Ziziphus jujuba* Mill. by treating callus[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2008, 31(1): 29-32.
- [14] 王利虎, 胡兰, 李登科, 刘平, 刘孟军. 枣不同基因型在体愈伤芽再生能力评价与同质多倍体新种质创制[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 164-170.
- WANG Lihu, HU Lan, LI Dengke, LIU Ping, LIU Mengjun. *In vivo* bud regeneration ability and homogeneous polyploidy induction via callus of different jujube genotypes[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(1): 164-170.
- [15] 石庆华. 田间愈伤组织途径诱导枣和酸枣多倍体研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.
- SHI Qinghua. *In vivo* polyploidy induction via callus in Chinese jujube and sour jujube[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2013.
- [16] 王菲, 陶吉寒, 尹燕雷, 冯立娟, 杨雪梅. 4个优良石榴品种叶片高频再生体系的建立[J]. 中国农学通报, 2015, 31(13): 100-107.
- WANG Fei, TAO Jihan, YIN Yanlei, FENG Lijuan, YANG Xuemei. Establishment of adventitious shoot regeneration system from leaves of 4 pomegranate cultivars *in vitro*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(13): 100-107.
- [17] 张全军, 秦改花, 黄文江, 许天龙. 软籽石榴(*Punica granatum* L. cv. Yushizi) 叶片再生体系的研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(3): 1018-1022.
- ZHANG Quanjun, QIN Gaihua, HUANG Wenjiang, XU Tianlong. Adventitious shoots regeneration from leaves of soft-seeded pomegranate (*punica granatum* L. cv. Yushizi)[J]. Southeast China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(3): 1018-1022.
- [18] 陈海燕, 陈延惠, 李东伟, 李洪涛, 达龙珠. 不同激素和黑暗处理对‘泰山红’石榴离体叶片再生的影响[J]. 果树学报, 2009, 26(5): 725-728.
- CHEN Haiyan, CHEN Yanhui, LI Dongwei, LI Hongtao, DA Longzhu. Effects of different hormone content and dark treatment on adventitious bud regeneration of leaves *in vitro* from Taishanhong pomegranate cultivar[J]. Journal of Fruit Science, 2009, 26(5): 725-728.
- [19] 吴雪梅, 汤浩茹. 草莓叶片培养研究进展[J]. 果树学报, 2004, 21(6): 598-602.
- WU Xuemei, TANG Haoru. Advances on *in vitro* culture of strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves [J]. Journal of Fruit Science, 2004, 21(6): 598-602.
- [20] 欧春青, 李林光, 何平, 张志宏. 寒富苹果叶片离体再生及四倍体诱导[J]. 果树学报, 2008, 25(3): 293-297.
- OU Chunqing, LI Linguang, HE Ping, ZHANG Zhihong. *In vitro* adventitious shoot regeneration and induction of tetraploid from leaves of Hanfu apple[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(3): 293-297.
- [21] ULIAIE E D, FARSI M, GHREYAZIE B, IMANIJ A. Effects of genotype and AgNO₃ on shoot regeneration in winter cultivars of rapeseed (*Brassica napus*) [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2008, 11(16): 2040-2043.

欢迎订阅2019年《北方园艺》

《北方园艺》是由黑龙江省农业科学院主管, 黑龙江省园艺学会、黑龙江省农业科学院主办的园艺类综合性学术期刊。创刊以来, 《北方园艺》始终与时代同频, 策划新栏目, 报道行业热点, 不断推出具有创新价值、学术价值和实用价值的科研成果, 在全国园艺类核心期刊中排名第四; 在新时代背景下, 《北方园艺》积极推动传统媒体与新兴媒体的融合发展, 探索新型出版模式, 设有专属投稿网站和微信公众号, 学术传播力不断提升。《北方园艺》中文核心期刊(1992-2014)、中国农业核心期刊、美国化学文摘社(CAS)收录期刊、2015、2016年期刊数字影响力100强期刊

为增加文章的可读性和更好的体现研究成果, 本刊增加了内文和封二新品种彩版宣传; 作者也可将团队试验成果以音视频形式在本刊微信公众号传播, 具体事宜联系编辑部。

栏目设置: 研究论文、研究简报、设施园艺、园林花卉、资源环境生态、贮藏加工检测、中草药、食用菌、专题综述、产业

论坛、农业信息技术、农业经济、农业经纬、实用技术、新品种(彩版封二)。

国际标准刊号: ISSN 1001-0009

国内统一刊号: CN 23-1247/S

邮发代号: 14-150

半月刊, 每月15、30日出版

单价: 15.00元 全年: 360.00元

全国各地邮局均可订阅, 或直接向编辑部汇款订阅。

投稿网址: www.haasep.cn

地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路368号

《北方园艺》编辑部

邮编: 150086

电话: 0451-86674276

E-mail: bfyybjb@163.com

