

[2]姚晓玲,库汉生,宋卫江.不同载体固定化胰蛋白酶的条件下研究[J].生物技术,2007,17(2):75-77.
[3]王珊.游离酶和固定化胰蛋白酶的特性研究[D].武汉:湖北工业大学生物工程学院硕士学位论文,2006:11-12.

[4]徐秀兰.生物化学实验与指导[M].南京:中国医药科技出版社,1994:97-101.
[5]周蕊,余蓉,杨继虞.固定化胰蛋白酶的快速制备[J].生物技术,2004,14(3):26-27.

垂丝海棠组培再生体系建立的研究

张庆田¹,夏阳²,孙仲序¹,刘燕琴¹,陈兴彬¹

(1. 山东农业大学园艺科学与工程学院,山东 泰安 271018; 2. 山东省林业科学研究院,山东 济南 250014)

摘要:目的:通过对垂丝海棠(*Malus halliana koehne*)进行组织培养研究为木本观赏海棠提供技术支持。方法:采用常规组培手段及正交设计试验对外植体消毒时间、快繁培养、叶片愈伤诱导、再生、生根等进行研究。结果:外植体最佳消毒时间:75%酒精 30s + 0.1% 升汞 10min; 最适增殖培养基为:MS + 6-BA 0.7mg/L + NAA 0.3mg/L, 增殖系数可达 7; 正交设计结果显示激素对叶片愈伤组织诱导影响的因素大小为:2, 4 - D > 6-BA > NAA; 再生最佳配方为 6-BA 6.0mg/L + NAA 0.5mg/L 再生效率达 91.8%; 最适生根培养基为:1/2MS + IBA 0.3mg/L + 蔗糖 20g/L。结论:对垂丝海棠组培再生研究取得初步成功。

关键词:垂丝海棠; 组织培养; 再生; 观赏植物

中图分类号:S722.37 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2007)03-0073-03

Establishment of Regeneration System of *Malus halliana koehne* by Tissue Culture

ZHANG Qing-tian¹, XIA Yang², SUN Zhong-xu¹, LIU Yan-ling¹, CHEN Xing-bin¹

(1. Horticulture Department, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China; 2. Forestry Academy of Shandong, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective: Technical support would be provided to woody ornamental by tissue culture of *Malus halliana koehne*. Methods: Conventional tissue culture methods and orthogonal design had been researched for explants disinfection, rapid reproduction, leaves callus induction, regeneration, rooting. Results: The optimum sterilization times of explants were 75% alcohol 30s + 0.1% mercuric chloride 10min. The most suitable medium for the initiation of adventitious buds was MS medium supplemented with 0.7mg/L 6-BA and 0.3mg/L NAA, and the ratio of buds propagation is 7; The results showed hormone on the leaves orthogonal design factors affecting the size of the callus induction: 2, 4 - D > 6-BA > NAA; The best regeneration tissue culture was MS + 6-BA 6.0 mg/L + NAA 0.5mg/L; The regeneration efficiency was 91.8%. The best rootage culture medium is 1/2MS + IBA 0.3mg/L + sucrose 20g/L was most suitable for the rootage. Conclusion: Tissue culture of *Malus halliana koehne* was success.

Key words: *Malus halliana koehne*; tissue culture; regeneration; ornamental

垂丝海棠(*Malus halliana koehne*)是木本观赏植物,素有花中神仙之美称,是蔷薇科苹果属的著名庭园观赏树种。广泛分布于我国华东及西南地区,全国各地均有栽培。垂丝海棠还是盆栽和制作盆景的优良花木。其花入药能调经和药,治红崩;果实小,营养物质丰富,据分析,每 100g 成熟的果实可食用部分含胡萝卜素 0.386mg、硫胺素 0.008mg、核黄素 0.016mg、尼克酸 0.16mg、抗坏血酸 1.6mg、蛋白质 0.16g、脂肪 0.16g、糖 18.4g、粗纤维 1.42g、无机盐 0.5g。成熟的垂丝海棠为黄色,风味独特,香气浓郁幽雅,但果实个体小,单朵均重(0.4~0.5)g,内含种子 3~4 粒,可食用部分占 84.9%,是加工果汁饮料的理想原料^[1]。

目前多采用嫁接繁殖,而利用生物技术手段对木本观赏海棠进行组织培养及基因遗传转化的研究少有报道,作者以此为切入点进行垂丝海棠研究,采用常规组培方法操作研究,为木本海棠组织培养提供技术参考,同时建立垂丝海棠高效快繁再生体系,为其组培快繁以及遗传转化育种开辟一条有效可行的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

试材取自山东农业大学实验苗圃栽种的 4 年生垂丝海棠冬季休眠后的枝条。

1.1.2 试剂

试验试剂均为分析纯,植物激素购于上海稼丰园艺用品有限公司,琼脂粉购于济南普朗特生物科技有限公司。

1.1.3 培养基

基本培养基 MS 每升培养基中加入 30g 蔗糖,6.5g 琼脂,调整培养基 pH 值至 5.8,培养基在 11kg/cm² (121℃) 压力下消

毒 20~25min,激素为 6-BA、IBA、2,4-D、NAA。

1.2 方法

1.2.1 外植体处理

将垂丝海棠休眠后枝条水培催芽,待芽长 2cm 左右在无菌条件下用 75% 酒精和 0.1% 升汞(HgCl₂)消毒外植体,消毒后用无菌水冲洗 4~5 次,材料切成 0.8~1.0cm 长段,在无菌条件下接种于 MS 培养基上。

1.2.2 消毒时间

酒精 30s, HgCl₂ 5、10、15min 处理对垂丝海棠污染率和褐化率的影响。每一处理的茎段数为 30 个,为防止交叉污染每瓶装 1 个,共 30 瓶,每次处理设 3 次重复,20d 后调查试验结果。

1.2.3 激素配比

将外植体接种到含 6-BA 0.5、0.7、1.0mg/L, NAA 0.1、0.3mg/L 不同配比的培养基中对增殖进行研究每一处理 5 瓶,每瓶 1 株,3 次重复。组合及结果见表 3。

1.2.4 琼脂浓度

分别用含 6.5g、7.0g、7.5g、8.0g、8.5g 琼脂含量的培养基研究对玻璃化现象的影响每一处理 5 瓶,每瓶 1 株,3 次重复。结果见表 4。

1.2.5 愈伤组织的诱导

采用三因素三水平正交试验法对垂丝海棠叶片愈伤组织诱导率进行研究,各因素水平见表 1。每一处理 10 瓶,每瓶 4 片叶,3 次重复。结果见表 5。

表 1 正交试验因素水平表 L₉(3⁴)

Tab.1 Chart of factor and level

水平 level	A(NAA)(mg/L)	B(2,4-D)(mg/L)	C(6-BA)(mg/L)
1	0	0	1
2	0.1	1	2
3	0.3	2	3

1.2.6 生根

选取健壮苗接种到 1/2MS + IBA 0.3mg/L + 蔗糖 20g/L 上进行生根试验,重复 3 次,每次 30 瓶,每瓶 1 株。

1.2.7 统计分析

收稿日期:2006-12-09;修回日期:2007-01-15

作者简介:张庆田(1981-),男,硕士,从事植物生物技术研究, E-mail: xq123-1981@126.com; * 通讯作者:孙仲序(1946-),男,教授,从事树木遗传育种教学和植物生物技术研究,发表论文 50 多篇, E-mail: abode05@126.com, Tel: 0538-8242981。

愈伤组织诱导率(%) = (诱导出现愈伤组织的叶片数/接种叶片总数) × 100%

再生频率(%) = (再生出不定芽的叶片数/接种叶片总数) × 100%

对垂丝海棠叶片愈伤组织诱导率的影响采用直观分析和方差分析。

2 结果与分析

2.1 消毒时间对污染、褐化的影响

在植物正常的生长状态下,植物细胞中酚类物质水平较低。当细胞受伤或衰老时,在适当的条件(如 pH、温度等)下,细胞中的酚类物质和氧气在酚氧化酶的作用下发生氧化反应,形成大量有毒的醌类物质。在组织培养时,当外植体或培养物被切割和接种时,损伤的切面细胞中酚类物质被氧化成醌,使培养物的切面变成棕褐色或暗褐色而发生褐变。醌会逐渐扩散到培养基中,抑制其他酶的活性,毒害整个组织^[2]。此外,由于组织老化也能引起褐化,因此在愈伤组织培养^[3]细胞悬浮培养^[4]原生质体培养中也存在褐化现象。本实验中发现不同消毒时间对褐化程度影响不同。

由表2看,随着处理时间的延长污染率下降,但褐化率上升,可能是由于外植体随消毒时间的延长受到伤害加重,酚类物质形成造成的。褐化也是我们建立无菌外植体应予以避免的。(褐化现象在我们的另一种植物材料木瓜海棠中未发现)可见不同外植体基因型褐化程度也不一样。本实验 75%酒精 30s + 0.1% HgCl₂ 10min 效果最佳。

表2 不同处理时间对垂丝海棠污染率的影响

Tab.2 Effect of different treatment time on pollution of *Malus halliana* koehn

HgCl ₂ 处理时间(min)	污染率(%)	褐化、死亡率(%)	成功率(%)	备注
Treatment time(min)	Pollution(%)	Brownness, death(%)	Success(%)	Notes
5	70.0	12.5	17.5	褐化、死亡
10	42.5	35.5	35.0	中长菌的归
15	27.5	45.0	27.5	到污染中。

2.2 不同 6-BA 和 NAA 浓度组合对垂丝海棠增殖的影响

表3 6-BA 和 NAA 对垂丝海棠试管苗增殖的影响

Tab.3 Effect of multiplication of different hormone concentration

编号	基本培养基	BA	NAA	增殖系数	生长状况
Treatment	Medium	(mg/L)	(mg/L)	Multiplication modulus	Growth status
1	MS	0.5	0.1	2.5	良好
2	MS	0.5	0.3	3.4	良好
3	MS	0.7	0.1	5.2	良好
4	MS	0.7	0.3	7	良好
5	MS	1.0	0.3	9	玻璃化

由表3可见,5[#]培养基增殖系数最高,可达9,但出现玻璃化现象影响后期继续分化,因此选用4[#]配方 MS + 6-BA 0.7mg/L + NAA 0.3mg/L 为最适增殖培养基。

2.3 不同琼脂浓度对垂丝海棠玻璃化现象的影响

由于培养条件不当导致瓶苗出现玻璃化现象,试管苗叶片、嫩梢呈水晶透明或半透明、水浸状;试管苗矮小肿胀、失绿;叶片皱缩成纵向卷曲,脆弱易碎,叶表面缺少角质层蜡质。因此对减少玻璃化现象做了如下研究:将玻璃化苗转入增殖培养基 MS + 6-BA 0.7mg/L + NAA 0.3mg/L + 不同琼脂浓度。调整琼脂浓度后分化率见表4。

从表中显示出随着琼脂浓度的提高,玻璃化从 15.42% 降低到 12.85%,所以增加琼脂浓度起到了一定的作用,但是其分化率却从 6.35% 下降到 3.21%,这可能因为琼脂用量低时,培养基内水势过高,培养器皿内空气湿度大,有利于玻璃苗的形成;其次则由于琼脂浓度越低,组培苗在相同时间内吸收的激素越多,也造成玻璃苗的出现。

2.4 不同 6-BA、2,4-D 和 NAA 浓度对比对垂丝海棠叶片愈伤组织诱导及再生的影响

每处理用外植体 20 个重复 3 次,接种 30d 后调查愈伤组织诱导率各组合对垂丝海棠叶片愈伤组织的影响,进行极差分析见表 5,6-BA、2,4-D 和 NAA 对垂丝海棠叶片愈伤组织的影响大小为:2,4-D > 6-BA > NAA,进一步方差分析结果显示 2,4-D 和 6-BA 对叶片愈伤组织的诱导达到显著水平。

表4 琼脂浓度对玻璃化现象的影响

Tab.4 Effect of different agar concentration on vitrification

琼脂浓度(g/L)	分化率(%)	玻璃化程度(%)
Concentration	Multiplication(%)	Vitrification(%)
6.5(CK)	6.35	15.42
7.0	5.16	15.13
7.5	4.89	13.28
8.0	3.74	13.03
8.5	3.21	12.85

表5 试验结果直观分析

Tab.5 Test result visual analysis

组合	愈伤诱导率(%)			平均(%)	
Treatment	NAA	2,4-D	BA	Callus(%)	Average(%)
1	1	1	1	0.00	0.00
2	1	2	2	100.00	100.00
3	1	3	3	100.00	100.00
4	2	1	2	73.00	72.00
5	2	2	3	88.00	84.00
6	2	3	1	75.00	79.00
7	3	1	3	69.00	68.00
8	3	2	1	78.00	87.00
9	3	3	2	86.00	94.00
K1	200.00	142.67	156.67		
K2	238.33	268.00	265.67		
K3	241.00	268.67	257.00		
k1	66.67	47.56	52.22		
k2	79.44	89.33	88.56		
k3	80.33	89.56	85.67		
R	13.67	42.00	36.33		

表6 试验结果方差分析

Tab.6 Test result equation analysis

影响因素	方差	自由度	标准差	F 值	显著性
Factors	SS	DF	MS	F value	Notability
A	350.83951	2	175.4198	2.898941	
B	3509.4321	2	1754.716	28.99798	显著
C	2446.9877	2	1223.494	20.21914	显著
误差	1089.2099	18	60.51166		

$$F_{0.95}(2, 18) = 3.55, F_{0.99}(2, 18) = 6.01$$

将上述诱导的愈伤组织转入 6-BA 6.0mg/L + NAA 0.5mg/L 中进行两步诱导法得到叶片再生率仅为 45.8%, 远低于 6-BA 和 NAA 组合的直接诱导再生法。

利用 6-BA 和 NAA 的不同组合对垂丝海棠叶片再生进行一步诱导研究,暗培 15d 后见光,3d 后即可见到部分叶片出现芽点,培养 30d 后统计结果。结果见表 7。

表7 不同 6-BA 和 NAA 浓度对比对垂丝海棠叶片再生率的影响

Tab.7 Effect of different 6-BA and NAA to adventitious bud inducing

配方(mg/L)	再生率(%)
Treatment	Regeneration(%)
6-BA 6.0 + NAA 0.2	75
6-BA 4.0 + NAA 0.2	83
6-BA 6.0 + NAA 0.5	91.8

由表7可见一步诱导法在MS+6-BA 6.0mg/L+NAA 0.5mg/L上再生率可达91.8%。

2.6 生根及移栽

再生的丛生芽从愈伤上切下,转移到生根培养基1/2MS+IBA 0.3mg/L+蔗糖20g/L上,15d左右就会有根的产生30d后生根率可达95%以上,挑选苗龄40d以上,叶片达4片以上叶柄较长,高度在2cm以上的健壮试管苗,放入温室进行10~15d闭瓶炼苗,再进行1~10d开瓶炼苗,成活率可达95.8%。



图1 垂丝海棠再生苗
Fig.1 Regeneration plants



图2 垂丝海棠快繁苗
Fig.2 Proliferation plants



图3 垂丝海棠生根苗
Fig.3 Vitrification plants



图4 垂丝海棠生根苗
Fig.4 Rootage plants

3 讨论

植物组织培养过程中,外植体的褐变程度受取材时期、外植体类型和消毒时间的影响,由于不同植物中酚氧化酶的活性不同,所含酚类物质的含量和种类不同,不同植物褐变发生的程度差异较大。不同植物材料合适的取材时期不尽相同。灭菌时间对外植体的褐变率也有重要影响,本试验随着灭菌时间的延长,所受药害越重,褐变死亡率增加,而存活率降低的结果与刘艳芬等^[5]的研究结果一致。

许多研究表明,培养材料的种类和外植体类型培养基成分和培养条件如光照、温度、湿度、pH值等各种内外因素都影响玻璃苗的发生^[6]。选择较高的琼脂浓度可以显著地降低玻璃化。张燕玲等^[7]研究表明,琼脂作为固体培养基的凝固剂,它能影响培养体系的水分状况,从而影响试管苗的玻璃化。在MS+BA 0.5mg/L的培养基上,分别加入5, 7, 9g/L的琼脂,丝石竹的玻璃苗率分别为95%、85%和65%,即玻璃苗率与琼脂用量呈明显的负相关关系。杜启兰^[8]在丽佳秋海棠, Leshem B^[9]在香石竹离体培养中也得到了类似的结果;本实验也得到了同样的结论。本试验琼脂用量由6.5g增加到8.5g时玻璃化率由15.42%降低到12.85%。因此,适当增加培养基中的琼脂用量可有效地减少玻璃苗数量。

植物叶片分化不定芽通常有两种途径:一种途径为先形成愈伤组织,然后再诱导愈伤组织再生不定芽;另一种为叶片直接再生不定芽。从已有的文献看,诱导叶片直接再生不定芽的研究占了相当大的比例。叶片直接再生不定芽可以减少或避免因组织培养引起的遗传突变,有助于转基因的成功。影响叶片再生体系建立的因素很多,非常复杂。如受试品种的基因型、试管苗苗龄、培养基条件、外植体生理状态及暗处

理等。

许多学者的研究表明,暗培养能促进苹果叶片再生,而前期光照处理则明显抑制叶片再生^[10]。这可能是因为红光抑制不定芽形成,远红光促进不定芽的形成,而白炽灯发出的红光要比远红光多,直接在光照下培养,不定芽的形成受到红光抑制,导致再生频率大大降低^[11]。暗培养时间会因品种不同而有所不同,苹果千秋的离体叶片一般需要暗处理35d左右;但有些苹果主栽品种的叶片再生以暗15d为最好^[12]。因此,为得到较高的再生效率,需通过黑暗培养试验,找出最适宜的暗培养时间,本试验以暗15d为标准进行研究,不同黑暗天数对再生效率的影响有待进一步研究。

在再生培养基中,植物激素的种类和浓度是影响苹果离体叶片再生最主要因素之一,细胞分裂素和生长素对苹果离体叶片的再生是必需的,不同基因型品种所用最适浓度不同。吴雅琴等^[13]在研究指出与BA相比,TDZ更适于昌红苹果离体叶片再生。当TDZ浓度为1.0mg/L、NAA 0.5mg/L时叶片平均再生率可达100%,但TDZ再生的芽呈簇状,茎难以伸长,不如BA再生的芽健壮,本试验一步诱导法MS+6-BA 6.0mg/L+NAA 0.5mg/L上再生率可达91.8%。其它激素的组合对垂丝海棠叶片再生的影响有待进一步研究。

总之,木本植物植株再生的研究起步较晚而且影响因素众多,本试验只是以几个因素为切入点其它众多因素对组织培养再生的影响有待进一步研究,建立起更多木本植物尤其是观赏类植物的高效稳定的不同方式的再生体系,为基因工程育种和诱变育种奠定基础;进一步扩展研究对象,以便加强种质资源的离体保存。建立同烟草、拟南芥、苜蓿等草本植物一样的木本植物植株再生的模式体系,系统的研究木本植物植株再生的发生及其调控机制,从而更好地利用植物细胞的全能性;深入开展再生植株遗传变异性的研究。

参考文献:

- [1]余梅,尹艺林,闵运江.垂丝海棠保健饮料的加工工艺[J].安庆师范学院学报:自然科学版,2003,9(3):50-51.
- [2]陈正华.木本植物组织培养[M].北京:高等教育出版社,1986:34-36,408-419,456-465,466-480.
- [3]Pindel A, Miczynski K. Regeneration of *Cymbidium orchids* from leaf and root explants[J]. *Floria Horticulture*, 1996, 8(2):95-105.
- [4]Kikkert J R, Hebert Soule D, Wallace P G, et al. Transgenic plantlets of 'Chancellor' grapevine (*Vitis* sp.) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(5):311-316.
- [5]刘艳芬,田春雨,孙晓梅,等.防止紫叶黄栌组织培养中外植体褐变的研究[J].辽宁林业科技,2006,(4):14-15,20.
- [6]王艳,曾幼玲,贺宾,等.油菜试管苗玻璃化发生机理的研究初探[J].生物技术,2006,16(1):75-77.
- [7]张燕玲,姚军,王润珍,等.满天星组织培养中克服玻璃化现象的初探[J].广西植物,1997,17(3):246-248.
- [8]杜启兰.丽佳秋海棠试管苗玻璃化现象的控制研究[J].安徽农业科学,2006,34(7):1337-1339.
- [9]Leshem B. Growth of carnation meristems in vitro; anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation[J]. *Ann Bot*, 1983, 52: 413-415.
- [10]师校欣,杜国强,高仪,等.黑暗培养对苹果组培快繁及叶片再生的影响[J].河北农业大学学报,2004,27(4):18-21.
- [11]Swartz H J, Bors R, Mohamed F, et al. The effect of in vitro pre treatment on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Mulus* leaf [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1990, 179-184.
- [12]张军科,沈向,曹庆芹,等.平邑甜茶叶盘组培再生研究初报[J].西北农业大学学报,2000,28(4):94-97.
- [13]吴雅琴,赵艳华,李春敏.昌红苹果离体叶片不定芽的诱导及植株再生[J].云南农业大学学报,2006,21(1):32-35.