

中国樱桃‘对樱桃’不定根离体再生植株的研究

闫国华 张开春 周宇 张晓明 牛爱国 李文生

(北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093)

摘要: 采用中国樱桃‘对樱桃’(*Prunus pseudocerasus*) 无菌生根苗的不定根作为外植体, 成功诱导了胚性愈伤组织, 实现了通过分化不定芽和诱导初生体细胞胚两种方式再生植株。根切段在 MS + NAA 1.0 mg/L + BA 0.05 mg/L + IBA 0.05 mg/L 培养基诱导获得胚性愈伤组织, 诱导频率达 54.2%, 该愈伤组织在 MS + NAA 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 培养基上不定芽分化率为 100%, 不定芽在 MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L 培养基上生长发育良好, 转入 MS + NAA 0.02 mg/L + IBA 0.02 mg/L 生根培养基生根率达 100%; 整体不定根系统在 MS 附加 2,4-D 1.0 ~ 3.0 mg/L 和 BA 0.5 mg/L 的培养基上同时诱导初生体细胞胚发生和单极不定芽发生, 每外植体上平均体细胞胚数 5 ~ 25 个, 不定芽 3 ~ 22 个。体细胞胚转到 MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L 培养基上发育为完整植株, 植株再生率 100%。

关键词: 樱桃; 不定根; 胚性愈伤组织; 初生体细胞胚; 不定芽; 再生

中图分类号: S 662.1; Q 813 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0583-03

1 目的、材料与方法

‘对樱桃’(*Prunus pseudocerasus*) 别名红樱桃, 属中国樱桃, 是北京庭院栽培的地方品种, 可以作为甜樱桃砧木。国外已有以杂种樱桃砧木 colt 根为外植体诱导再生不定芽^[1]; 以樱桃砧木 *Prunus subhirtella autumnosa* 无菌苗叶柄为外植体诱导体细胞胚发生并再生植株^[2], 以品种‘Inmil Gm 9’根外植体诱导愈伤组织发生和不定芽形成^[3]的报道。我们以‘对樱桃’的无菌试管苗不定根为外植体, 成功地诱导了胚性愈伤组织, 并实现了不定芽分化和体细胞胚发生, 获得了高频率的再生植株。

‘对樱桃’试管苗置于 F14^[4]附加 BA 0.5 mg/L、IBA 0.2 mg/L、GA₃ 0.2 mg/L 的培养基, 每 21 d 继代 1 次; 取生长健壮的 2 ~ 3 cm 茎接种于 F14 附加 IBA 0.02 mg/L、NAA 0.02 mg/L 的生根培养基培养 21 d, 切取 1 cm 左右的根切段或取完整的根系作为外植体。胚性愈伤组织的诱导: 外植体接种于 MS 附加不同激素组合的培养基 (表 1), 光照培养 21 d, 将典型的胚性愈伤组织转入分化培养基 MS + NAA 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L, 光照培养 21 d, 之后将再生的不定芽转入 MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L, 不定芽长至 3 cm 时从基部切下, 转入 MS + IBA 0.02 mg/L + NAA 0.02 mg/L 培养基上生根。初生体细胞胚的诱导和植株再生: 切取 1 cm 根切段或取整体根系统接种于诱导培养基 (表 2), 光照培养 21 d 后, 计初生体细胞胚数和单极不定芽数, 取萌发的体细胞胚转入 MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L 培养基, 光照培养 21 d, 再生完整植株。以上试验采用的培养基均含蔗糖 20 g/L, 琼脂 6.5 g/L, pH 5.6 ~ 5.8, 于 2 000 lx、光周期 16 h, 25 °C 下培养。所有样本均 3 次重复, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 不定根胚性愈伤组织的诱导, 不定芽分化及植株再生

不定根切段接种于愈伤组织诱导培养基 (表 1) 后, 光照培养 3 d 时开始膨大, 7 d 时在两端切口处产生白色至浅黄色的质地松软的愈伤组织。13 d 左右在切段的根系分支处诱导产生含有花色素的浅

收稿日期: 2002 - 12 - 24; 修回日期: 2003 - 03 - 19

基金项目: 北京市科委合同项目 (9544164600); 北京市重点实验室合同项目 (954930300)

红色愈伤组织,质地较致密,活力较强,生长较快(见插页1图版,1)。后续试验证实,这是典型的胚性愈伤组织,其发生部位多在根系的分支处,这是否与该部位的激素平衡或存在特殊类型的反应性细胞有关有待进一步证实。松软的白色愈伤组织则活力较差,逐渐褐化,坏死。

表1显示,NAA在0.5~2 mg/L范围内可有效地诱导‘对樱桃’不定根产生胚性愈伤组织,NAA 1.0 mg/L + IBA 0.05 mg/L + BA 0.05 mg/L的组合诱导频率可达54.2%,而2,4-D的最高诱导率仅达到13.3%,NAA诱导效果显著高于2,4-D。生长旺盛的胚性愈伤组织转至MS + NAA 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L培养基后,培养7 d时即可旺盛分化,持续再生大量不定芽,达每1 mm³愈伤组织20多个,无体细胞胚发生(图版,2)。将这些含有大量不定芽的愈伤组织切块转至MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L的培养基培养15 d,不定芽高达3~5 cm,自基部将其切下,转至MS + NAA 0.02 mg/L + IBA 0.02 mg/L培养基培养15~21 d,生根率达100%(图版,3)。

2.2 不定根诱导初生体细胞胚发生和植株再生

‘对樱桃’不定根外植体于含有2,4-D 1~3 mg/L + BA 0.5 mg/L的培养基培养3~5 d即诱导产生大量纤细幼根,继续培养至10 d时,于根系分支部位诱导发生大量的含有花色素的浅红色愈伤组织,呈颗粒状,直径1~2 mm,继续培养至20 d,这些愈伤组织陆续转为浅绿色(图版,4)。继而可见两类结构产生,一类是萌发的体细胞胚,具有完整的根芽两极,顶端发育正常(图版,5),仔细将其剥离后转至MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L培养基可正常发育,长成完整植株(图版,6);另一类则是单极性的不定芽结构,通常是单芽,可继续发育成为幼茎。体细胞胚和不定芽几乎同时出现,它们的发生方式未呈现规律性。由同一种类型的愈伤组织发育出两极性的体细胞胚和单极性的芽,可能与愈伤组织内部不同部位的某些激素均衡有关。

采用根切段和整体根系两种外植体的反应不同。根切段通常自切口两端产生白色松软的愈伤组织,浅红色愈伤组织的数量很少,而完整根系则产生大量浅红色颗粒状愈伤组织,进而诱导产生了数量较多的初生体细胞胚和不定芽,分别达到平均每外植体5~25个和3~22个,显著高于根切段外植体上的再生反应(表2)。2,4-D浓度1~3 mg/L是较为适合的范围,高于3 mg/L则产生毒害作用,外植体多数褐化,不久坏死。导致这种差异的原因尚不清楚,可能与不同外植体内的某种激素均衡有关。

采用‘对樱桃’不定根为外植体和不同的操作策略,可以实现两种方式的植株再生,即由胚性愈伤组织分化形成不定芽和诱导体细胞胚并再生植株。两种方式愈伤组织分化率、体细胞胚诱导率及植株再生率都比较高。

表1 不同生长素对‘对樱桃’不定根切段胚性愈伤组织的诱导效果

Table 1 The effects of auxins on embryogenic callus induction in Chinese cherry ‘Duiyingtao’ (Prunus pseudocerasus)

激 素				外植体数 No. of explants	胚性愈伤组织 Embryogenic callus	
Hormone (mg/L)					个数 No.	%
NAA	2,4-D	IBA	BA			
0.5	—	0.05	0.05	50	14	28
1.0	—	0.05	0.05	48	26	54.2
2.0	—	0.05	0.05	45	17	37.8
—	1.0	0.05	0.05	42	3	7.1
—	2.0	0.05	0.05	45	6	13.3
—	4.0	0.05	0.05	46	0	0

表2 ‘对樱桃’不定根切段和整体根系统的再生反应

Table 2 Regeneration response of adventitious root segments and intact root system in Chinese cherry ‘Duiyingtao’ (Prunus pseudocerasus)

激 素 Hormone (mg/L)		根切段 *		完整根系 * *	
		Root segments		Intact root system	
2,4-D	BA	平均体胚数	平均不定芽数	平均体胚数	平均不定芽数
		No. of somatic embryos	No. of adventitious buds	No. of somatic embryos	No. of adventitious buds
1.0	0.5	5	1	9	22
2.0	0.5	8	2	18	15
3.0	0.5	3	2	25	11
4.0	0.5	0	0	5	3

* 根龄21 d, 去掉根尖1 cm, 取较成熟的10 mm切段。

** 根龄21 d, 由根颈处切除地上部取整体根系。

* The segments were about 10 mm long, cut from 21 days old roots. ** The intact roots used as explants were 21 days old, with the upon-ground part removed.

不定根外植体诱导胚性愈伤组织和体细胞胚发生与基因型有很大关系。采用本试验的操作策略, ‘Colt’ 与 ‘对樱桃’ 的再生反应相似, 而 ‘吉塞拉 5 号’ 和 ‘吉塞拉 6 号’ 以及意大利 CAB 系列未能诱导胚性愈伤组织和体细胞胚发生, 对这些基因型须采用叶片外植体才能有效诱导植株再生 (结果未列出)。此外, 对于由不定根诱导 ‘对樱桃’ 的胚性愈伤组织, NAA 和 2,4-D 两种生长素均有效, 而对抗寒砧木 *Prunus subhirtella autumnosa* 仅 NAA 有效, 2,4-D 无效^[2], 这也反映了基因型间的差异。

参考文献:

- 1 James DJ, Passey AJ, Malhotra S B. Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissues of apple and cherry rootstocks. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1984, (3): 333 ~ 341
- 2 Artur da Camara Machado, Monika Puschmann, Helen Puhlinger, et al. Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumnosa* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 1995, (14): 335 ~ 340
- 3 Philippe Druart. Plant regeneration from root callus of different *Prunus* species. *Scientia Horticulturae*, 1980, (12): 339 ~ 342
- 4 曹汝义, 刘国民主编. 实用植物组织培养技术教程. 甘肃: 甘肃科技出版社, 1996. 27

Plant Regeneration from in Vitro Adventitious Roots of Chinese Cherry ‘Duiyingtao’ (*Prunus pseudocerasus*)

Yan Guohua, Zhang Kaichun, Zhou Yu, Zhang Xiaoming, Niu Aiguo, and Li Wensheng

(Beijing Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Plant regeneration was obtained on embryogenic callus, which derived from in vitro adventitious roots of a Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus*) cultivar ‘Duiyingtao’, either by adventitious bud proliferation or primary somatic embryogenesis. Embryogenic callus were induced from root segments on medium MS + NAA 1.0 mg/L + BA 0.05 mg/L + IBA 0.05 mg/L, with the frequency of 54.2%. Adventitious bud proliferation emerged on all embryogenic callus on medium MS + NAA 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L, the buds developed on medium MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L, and rooted on medium MS + NAA 0.02 mg/L + IBA 0.02 mg/L by 100%. Primary somatic embryos and adventitious bud were induced from intact root systems simultaneously on medium MS + 2,4-D 1 - 3 mg/L + BA 0.5 mg/L, with 5 - 25 somatic embryos and 3 - 22 adventitious buds per root explant. 100% of the somatic embryos developed into intact plantlets when transferred to medium MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L.

Key words: Cherry; Adventitious roots; Embryogenic callus; Primary somatic embryos; Adventitious buds; Regeneration

新书推荐

《中国木本植物种子》

全书共收集 492 属、1276 个种 (含变种和亚种)。按属或种简要记述生长习性、分布、用途和开花结实特点; 着重描述果实的采收、种子调制、种子储藏、发芽前的种子处理、发芽测定、播种等主要生产环节的要点。参与撰稿的多达 70 余人, 均为国内知名学者专家。本书融集体智慧之大成, 汇科学研究之精华, 既总结生产实践的先进经验, 又验之于撰稿人的直接知识; 记载翔实, 描述准确, 数据来于实际。每个属或种均配有种子外观图和剖视图, 种子发芽进程图。具有先进性、科学性和实用性, 可供植物工作者、园林工作者、院校师生以及基层技术人员、行政管理人员参考。

定价: 200.00 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。

闫国华等：中国樱桃‘对樱桃’不定根离体再生植株的研究

Yan Guohua, et al: Plant Regeneration from in Vitro Adventitious Roots of Chinese Cherry ‘Duiyingtao’ (*Prunus pseudocerasus*)



图版说明：1. 在根切段上产生的愈伤组织；2. 愈伤组织分化不定芽；3. 不定芽生根；4. 整体根上诱导产生的体细胞胚；5. 体细胞胚萌发；6. 体细胞胚发育再生植株。

Explanation of plates: 1. Embryogenic callus formed on adventitious root segments of ‘Duiyingtao’; 2. Adventitious buds proliferation on embryogenic callus; 3. Rooting of adventitious buds; 4. Somatic embryos formed on intact root systems; 5. Germination of somatic embryos; 6. Plant regeneration from somatic embryos.