

桃离体组织分化再生植株的研究

张永庆¹ 陈大明¹ 金勇丰² 张上隆^{1,*}

(¹ 浙江大学园艺系, 杭州 310029; ² 浙江大学生物化学研究所, 杭州 310029)

摘 要: 以奉化‘玉露’桃叶片、幼茎、下胚轴、子房、胚珠、胚乳及花后 45~50 d 和 75 d 的未成熟胚、完全成熟的种胚为外植体, 进行离体培养再分化试验。结果表明只有花后 45~50 d 和 75 d 的未成熟胚产生白色致密节球状的愈伤组织, 并可诱导出不定芽, 不定芽分化率分别为 73.8% 和 15.5%; 6-BA 诱导愈伤组织不定芽的效果优于 KT。不定梢转移生根成苗获得了完整的再生植株。探讨了不同激素和碳源等对不定芽诱导的影响。

关键词: 桃; 外植体; 愈伤组织; 再分化; 再生植株; 组织培养

中图分类号: Q 813; S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 04-0342-03

1 目的、材料与方法

国内外学者对桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch] 离体分化培养^[1~3]和遗传转化^[4]作了不少研究。但较多且较为成功的是用于快速繁殖上的茎尖或器官培养, 而通过分化途径再生植株的报道不多。奉化‘玉露’桃品质优良, 但不耐贮运, 作者以其为材料建立再分化频率高且培养方法简单的再生体系, 旨在为利用转基因技术进行品种改良打下基础。

以杭州市大观山果园树龄约 15 年的奉化玉露桃花、茎、叶、果为试材。

外植体的采集与消毒: 幼叶、幼茎经稀吐温漂洗 15 min, 无菌水漂洗 3 次, 0.1% 升汞灭菌 5 min, 无菌水漂洗 5 次; 1 年生茎段经稀吐温漂洗 15 min, 70% 酒精浸 0.5 min, 无菌水漂洗 3 次, 0.1% 升汞灭菌 5 min, 无菌水漂洗 5 次, 无菌去皮; 花期子房经水冲洗, 0.1% 升汞灭菌 3 min, 无菌水漂洗 5 次; 幼果、成熟果或桃核经稀吐温漂洗 15 min, 70% 酒精浸 0.5 min, 无菌水漂洗 3 次, 去果皮取出种子, 0.1% 升汞灭菌 5 min, 无菌水漂洗 3 次, 无菌剥取胚乳、种胚。愈伤组织的诱导: 幼叶剪取 0.5 cm 大小, 茎段长 1 cm 左右, 未成熟胚和成熟胚则于胚芽处切割。所有外植体分别接种于愈伤组织诱导培养基 (MS + 2,4-D 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L) 中, 置于 26℃ 和 16 h 光周期或连续黑暗条件下培养。愈伤组织的继代和分化: 为保持愈伤组织的胚性状态, 愈伤组织接种于无 2,4-D、含低浓度 6-BA (0.1 mg/L) 或 KT、较高浓度 NAA (1.0 mg/L) 的 MS 固体培养基中, 每 28 d 继代 1 次。为使愈伤组织分化不定芽, 愈伤组织被置于富含 6-BA 或 KT 或附加其它成分的不同培养基上培养。不定芽分化发育成苗: 将已经分化的不定芽转移到含 IBA 的 1/2 MS 固体培养基中诱导生根, 然后转至无激素的 MS 固体培养基中继续培养, 之后再转入无菌珍珠岩中于温室下驯化培养成苗。

2 结果与分析

收稿日期: 2000-11-28; 修回日期: 2001-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3987052); 浙江省自然科学基金资助项目 (396278); 农业部“九五”重点资助项目 (95 农-17-01-04-03)

*通讯联系人。

2.1 不同外植体愈伤组织诱导效果 不同外植体诱导愈伤组织差异较大(表1)。激素对愈伤组织的诱导有很大影响。在未成熟胚的愈伤组织诱导中,以 2,4-D 1.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的激素组合愈伤组织诱导频率最高,达 83.3%;而 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0 mg/L 的激素组合诱导效果较差,只有 26.7%。愈伤组织的形态质地不同,较高浓度 2,4-D 和 NAA 配比,其愈伤组织一般为淡黄略带褐色,增殖过快,质地疏松,多为高度液泡化的薄壁细胞,胚性较差。低浓度 2,4-D 和 NAA 组合,其愈伤组织多数未成熟胚呈畸型生长,两片子叶不断加厚增宽,并向两侧展开,即使在胚芽处产生愈伤组织,生长也很慢。2,4-D 1.0 mg/L + NAA 0.5 ~ 1.0 mg/L 的激素组合诱导效果最佳,愈伤组织白色或淡黄透明,质地疏松,后转为致密,分化潜能较好。

表1 不同外植体的愈伤组织诱导反应

Table 1 Inducing effect of callus in various explants

| 外植体 Explant | 诱导率 Inducing rate (%) | 诱导时间 Inducing time (d) | 增殖速度 Rate of increase | 愈伤组织质地特征 Characteristics of callus |
|---|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---|
| 幼叶 Young leave | 70 | 25 | 慢 Slowly | 深绿色, 硬实, 粉状 Deep green, hard, powdery |
| 幼茎 Young shoot | 85 | 15 | 较快 Fast | 浅绿, 较疏松 Light green, a bit loose |
| 去皮茎段 Young shoot (without bark) | 93 | 9 | 快 Fast | 绿色, 较疏松, 球状 Green, a bit loose, globular |
| 下胚轴 Hypocotyl | 40 | 25 | 慢 Slowly | 褐绿色, 硬实, 粉状 Brown green, hard, powdery |
| 胚珠 Ovary | 12.8 | 28 | 慢 Slowly | 褐绿色, 坚硬, 节球状 Brown green, hard |
| 子房 Ovule | 32.6 | 25 | 慢 Slowly | 乳白, 透明, 浆状 Milky, white, transparent |
| 花后 45 ~ 50 d 的未成熟胚 Immature embryo (45 - 50 d) | 53.7 | 18 | 较快 Fast | 洁白或淡黄, 疏松, 节球状 White or light yellow, loose |
| 花后 45 d 的胚乳 Endosperm (45 d) | 58.4 | 14 | 快 Fast | 淡黄绿色, 松脆, 球粒状 Light yellow green, crisp, globular |
| 花后 75 d 的未成熟胚 Immature embryo (75 d) | 97.6 | 12 | 快 Fast | 淡黄或淡绿色, 疏松, 节球状 Light yellow or light green, loose |
| 未成熟胚子叶 Immature cotyledon | 74.3 | 21 | 较慢 Slowly | 黄绿色, 坚硬, 节瘤状 Yellow green, hard |
| 成熟种胚 Mature embryo | 97.3 | 14 | 快 Fast | 绿色, 疏松, 球粒状 Green, loose, globular |

愈伤组织诱导培养基 (Medium inducing callus): MS + 2,4-D 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L

2.2 不同外植体愈伤组织不定芽再分化的能力 将从各种外植体中诱导出的愈伤组织接种于附加 NAA 1.0 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L 的 MS 培养基中,愈伤组织稳定增殖,叶片、茎段、上胚轴、成熟胚、花后 45 ~ 50 d 胚乳所诱导的愈伤组织在原增殖培养中连续 3 ~ 4 次继代后逐渐发褐衰老。胚珠的愈伤组织几乎不生长,子房的愈伤组织继代 2 次后即发褐死亡。花后 45 ~ 50 d 或 75 d 的未成熟胚的愈伤组织经 1 代增殖后,逐渐由质地疏松柔软变成节球状且致密,最适于不定芽的诱导和分化。所有外植体的愈伤组织经 1 次继代增殖后转入分化培养基,结果只有花后 45 ~ 50 d 和花后 75 d 的未成熟胚的愈伤组织分化不定芽,

前者分化率为 73.8%，后者为 15.5%。

2.3 激素、碳源对未成熟胚愈伤组织不定芽分化的影响 采用不同浓度的 6-BA 或 KT，比较其对胚愈伤组织不定芽再分化的影响。结果表明 6-BA 效果远远高于 KT，以 6-BA 1.0 ~ 1.5 mg/L 最佳（表 2）。当 6-BA 高于 1.5 mg/L 时，不定梢玻璃化现象严重，生长缓慢，难以成株。含山梨醇比含蔗糖和葡萄糖的培养基诱导愈伤组织分化不定芽频率稍高，但差异不显著。

2.4 不定芽发育成苗 将愈伤组织再生的不定芽（1.5 ~ 2.0 cm）在 1/2 MS + IBA 1.0 mg/L 培养基上进行生根培养，约 27 d 开始出现不定根，生根率相对较低，为 25.3%，这可能是因不定芽分化过程中的 6-BA 浓度过高，抑制不定芽的生根能力。将长出根系的不定梢转入无激素的 MS 培养基中培养，即长大成植株。

表 2 6-BA 和 KT 组合对未成熟胚愈伤组织分化不定芽的影响

Table 2 Effect of 6-BA and KT on differentiation of adventitious buds from callus derived from immature embryos

| 6-BA (mg /L) | KT (mg /L) | 愈伤组织数 No. of callus | 不定芽数 No. of adventitious bud | 分化率 Differentiation rate (%) |
|--------------------|------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 0.5 | 0 | 40 | 21 | 52.5 |
| 1.0 | 0 | 42 | 31 | 73.8 |
| 1.5 | 0 | 38 | 30 | 78.9 |
| 2.0 | 0 | 42 | 28 | 66.7 |
| 0 | 0.5 | 46 | 3 | 6.5 |
| 0 | 1.0 | 52 | 5 | 9.6 |
| 0 | 1.5 | 41 | 12 | 29.3 |
| 0 | 2.0 | 40 | 8 | 20.0 |

注：接种的愈伤组织取自于 MS + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 培养基上增殖一代的愈伤组织，分化培养基为 MS。

Note: Callus was derived from callus cultured in medium (MS + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L); Differentiation medium was MS medium.

参考文献：

- Hammerschlag F A, Bauchan G, Scorza R. Regeneration of peach plants from callus derived from immature embryos. *Theor Appl. Genet.*, 1985, 70: 248 ~ 251
- Scorza J M, Cordts S M. Long-term somatic embryo production and plant regeneration from embryo-derived peach callus. *Acta Hort.*, 1990, 280: 183 ~ 190
- Bhanasali R, Driver J A, Durzan D J. Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. *Plant Cell Rep.*, 1990, 9: 280 ~ 284
- Scorza J M, Cordts S M. *Agrobacterium*-mediated transformation of peach, *Prunus persica* (L.), leaf segment, immature embryos and long-term embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 1991, 26 (8): 829 ~ 834

Regeneration of Peach Plantlet from Callus Derived from Explant

Zhang Yongqing¹, Chen Daming¹, Jin Yongfeng², and Zhang Shanglong¹

(¹ Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029; ² Institute of Biochemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: Various explants of 'Yulu' peach including leave, young shoot, hypocotyl, ovule, ovary, endosperm, immature embryo collected approximately 45 - 50 days or 75 days after full bloom, and mature embryo were cultured in vitro. As a result, only the white nodular callus derived from immature embryos collected 45 - 50 days and 75 days after bloom succeeded in producing adventitious buds, and the regeneration rates of white callus were 73.8% and 15.5% respectively. 6-BA had stronger effect than KT in inducing adventitious bud formation. Adventitious shoots were transferred and cultured to plantlets. Effect of different hormone, carbon source, medium and transfer time on redifferentiation of adventitious buds from callus derived from immature embryos have been discussed.

Key words: Peach (*Prunus persica*); Explant; Callus; Redifferentiation; Plantlet; Tissue culture