

段艳欣. 苹果 M₇ 砧木组织培养与抗性筛选[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 52–54.

苹果 M₇ 砧木组织培养与抗性筛选

段艳欣

(青岛农业大学园艺学院/青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要:以 M₇ 组培苗为试验材料, 进行继代扩繁和卡那霉素抗性筛选研究。结果表明, M₇ 芽苗在 MS + 4.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA (3% 蔗糖) 固体培养基中继代时, 出现严重的玻璃化, 而 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA (3% 蔗糖) 固体培养基可大大改善其玻璃化程度, 使其恢复健康生长; 卡那霉素对 M₇ 叶片再生、新梢增殖、新梢生根均有抑制作用, 并且随卡那霉素浓度增加, M₇ 叶片再生率、新梢增殖率、新梢生根率不断下降; M₇ 叶片愈伤组织形成、愈伤组织生根、新梢增殖及新梢生根对卡那霉素的敏感浓度分别为 20、5、40、10 mg/L。

关键词:苹果 M₇ 砧木; 组织培养; 玻璃化; 抗性筛选

中图分类号: S661.104. +3; Q813.1 +2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0052-02

苹果 (*Malus pumila* Mill) M₇ 是蔷薇科苹果属植物, 为苹果的半矮化砧木, 与苹果嫁接亲和力强, 其根系发达, 较抗旱、抗寒, 耐瘠薄, 适应性很强。转基因安全性一直是人们关心的热点, 而对苹果砧木的遗传改良比对品种的改良更具有可操作性。卡那霉素抗性基因即新霉素磷酸转移酶基因 (*npt II*) 是目前在植物基因转化中应用最广泛的选择标记基因^[1]。前人研究表明, 不同外植体或同一外植体不同发育阶段对卡那霉素的敏感性不一样^[2], 因此在进行遗传转化之前, 首先要确定外植体对卡那霉素的敏感性浓度^[3]。本试验以苹果 M₇ 砧木组培苗为试验材料, 研究其在继代扩繁过程中的生长情况, 并分别在叶片再生、新梢增殖、生根等方面进行了卡那霉素敏感试验, 以期为后期的遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

以苹果 M₇ 砧木组培苗为试验材料, 由笔者所在实验室保存, 选取生长健壮、带 2~3 张叶的芽为外植体。试验用卡那霉素为医药级, 购自美国 Sigma 公司; 其他试剂为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 M₇ 苗的继代增殖培养 选取生长健壮的 M₇ 组培苗, 接种在继代增殖培养基内, 培养基配方为: MS + 4.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA, 每瓶接 4 个新芽, 每个处理接 5 瓶, 重复 3 次。培养 30 d 后统计芽的增殖与生长情况。在使用上述增殖培养基继代时, 发现大部分芽出现玻璃化, 将玻璃化的芽单独切下, 改用 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 培养基培养, 15 d 后观察芽苗的生长情况。

1.2.2 M₇ 叶片再生过程对卡那霉素的敏感性 选取组培苗顶部幼嫩、生长健壮、平展的叶片, 叶片大小、形状和色泽基本一致, 将叶片用接种刀横切几刀, 叶背朝上平铺在加有不同浓

度 (0.5、10、20 mg/L) 卡那霉素的叶片再生培养基上^[4], 培养基配方为: MS + 4.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA, 暗培养 14 d 后转移至光照下培养 20 d 后, 观察叶片长愈伤组织或长芽情况。接种量 10 张叶片/皿, 3 皿/处理, 2 次重复。

1.2.3 M₇ 新梢增殖对卡那霉素的敏感性试验 将长度约 2 cm 的组培芽 (新梢) 分别接种于加有不同浓度 (0、10、20、40 mg/L) 卡那霉素的新梢扩繁培养基 (MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA) 中, 于光照下培养 1 个月后统计结果。接种量 4 个芽/瓶, 5 瓶/处理, 重复 2 次。

1.2.4 M₇ 新梢生根对卡那霉素的敏感性试验 将长度约 2 cm (带有 2~3 张叶) 的组培芽 (新梢) 分别接种于加有不同浓度 (0.5、10、20 mg/L) 卡那霉素生根培养基中 (1/2MS + 1.0 mg/L IBA), 于光照下培养 20~30 d 后统计结果。接种量 3 个芽/瓶, 4 瓶/处理, 重复 2 次。

1.3 培养条件

芽增殖与生根培养在光照培养室内进行, 培养条件为: 温度为 (25 ± 2) °C, 光照强度为 2 000 lx, 光照时间为 12 h/d。叶片再生试验的暗培养是在恒温箱中进行的, 培养温度 24 °C。培养基为基本培养基, 附加蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L, pH 值 5.8, 将配制好的培养基在 121 °C 下灭菌 20 min 备用。

2 结果与分析

2.1 M₇ 组培苗的增殖与玻璃化苗的改善

取生长健壮的 M₇ 组培苗, 茎段部分带 3~4 张嫩叶, 转移至继代扩繁培养基中 (图 1-A); 于光下培养 20 d 左右, 发现长出大量不定芽, 培养 30 d 时, 部分不定芽表现正常 (图 1-B), 部分不定芽的嫩茎、叶片呈半透明水渍状 (图 1-C), 即玻璃化, 此类芽生长缓慢, 繁殖系数低, 不利于保存与再利用; 改变培养基配方后, 其玻璃化现象得到了较大改善, 芽与叶片呈绿色, 恢复生长 (图 1-D)。

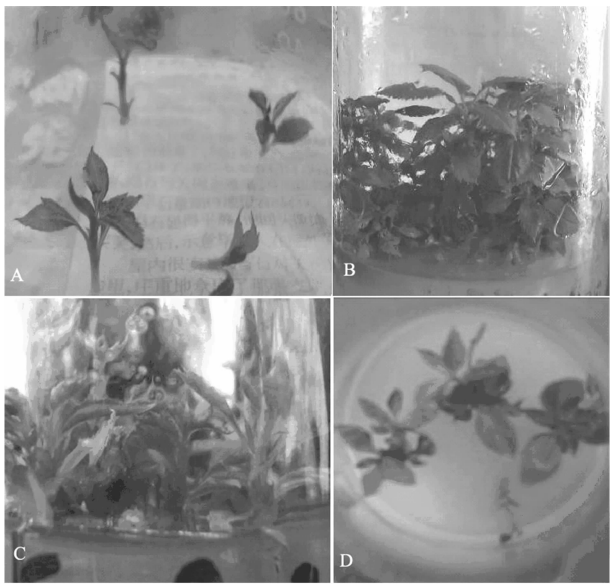
2.2 M₇ 叶片再生过程对卡那霉素的敏感性

在 M₇ 叶片再生过程中, 添加不同浓度卡那霉素后, 叶片再生情况为: 没有添加卡那霉素的培养基叶片形成愈伤组织率高达 100%, 之后从愈伤组织处生根 (图 2-A、图 2-B); 当卡那霉素浓度为 5 mg/L 时, 叶片出愈率为 60%, 愈伤组织

收稿日期: 2014-01-15

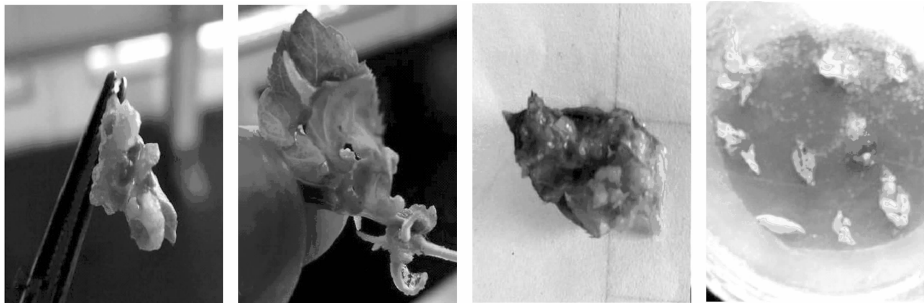
基金项目: 青岛农业大学高层次人才科研基金 (编号: 630726)。

作者简介: 段艳欣 (1978—), 女, 河北衡水人, 博士, 副教授, 主要从事果树生理与分子生物学等方面的研究。Tel: (0532) 86080740; E-mail: dyxdy2007@163.com。



A—刚接种的M₇组培苗; B—扩繁后长出大量不定芽; C—玻璃化后的组培苗; D—玻璃化经抢救后生长趋于正常的幼苗

图1 M₇ 组培芽的继代扩繁及玻璃化芽的调控



A. 卡那霉素为 0 mg/L 时叶片出愈情况 B. 卡那霉素为 0 mg/L 时叶片愈伤生根情况 C. 卡那霉素为 5 mg/L 时叶片的再生情况 D. 卡那霉素为 20 mg/L 时叶片的再生情况

图2 M₇ 叶片再生过程对卡那霉素的敏感性

表 1 卡那霉素对 M₇ 新梢增殖的影响

卡那霉素浓度 (mg/L)	接种芽数 (个)	芽再生情况	
		芽增殖倍数	芽生长状况(健壮与否)
0	40	7.8	绿色, 健壮
10	40	2.5	黄绿色, 生长较弱
20	40	0.4	黄绿色, 几乎不生长
40	40	0	无

表 2 卡那霉素对 M₇ 新梢生根的影响

卡那霉素浓度 (mg/L)	接种芽数 (个)	生根数量 (条)	根生长情况
0	12	35	白色, 健壮, 生长较快
5	12	2	白色, 生长较慢
10	12	0	无
20	12	0	无

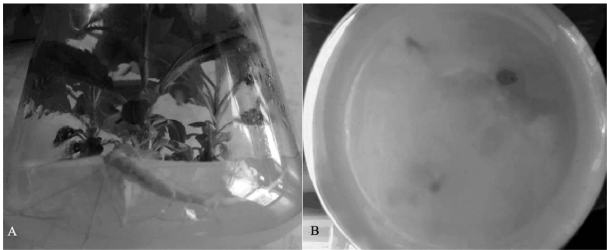
不能分化出根(图 2 - C);卡那霉素浓度升高至 10 mg/L 时的出愈率仅为 10%,卡那霉素浓度为 20 mg/L 时,无愈伤组织形成(图 2 - D),这 2 个浓度下均没有根分化。

2.3 M₇ 新梢增殖对卡那霉素的敏感性

由表 1 可见,M₇ 新梢芽增殖倍数随卡那霉素浓度增大而减少直至无增殖甚至死亡。卡那霉素浓度为 0 mg/L 时,芽增殖率 100%,并且芽生长健壮,正常绿色;浓度为 10 mg/L 时,芽增殖倍数为 2.5,比对照约下降 68%,且再生芽黄绿色,生长势弱;浓度为 20 mg/L 时,芽增殖率下降到对照的 5% 左右,芽黄绿色,几乎不生长;当卡那霉素浓度为 40 mg/L,新梢没有增殖,说明该浓度可以完全抑制 M₇ 新梢的增殖。

2.4 M₇ 新梢生根对卡那霉素敏感性

由表 2 看出,M₇ 新梢生根数随卡那霉素浓度的升高而明显下降,且芽苗不断变黄甚至白化死亡。卡那霉素浓度为 0 mg/L 时,芽苗生根率 100%(图 3 - A),平均每棵苗生根数为 2~3 条,并且根生长粗壮,白色,生长较快;卡那霉素浓度为 5 mg/L 时,生根率 10%,根白色,生长明显减慢;卡那霉素浓度为 10 mg/L 时,新梢不能生根(图 3 - B),可见 ≥10 mg/L 卡那霉素可以完全抑制 M₇ 芽苗的生根。



A. 卡那霉素为 0 mg/L 时新梢生根情况 B.卡那霉素为 10 mg/L 时新梢生根情况

图3 M₇ 新梢在含不同浓度卡那霉素的培养基上的生根情况

经常遇到的问题,发生玻璃化的材料呈半透明水渍状,生长缓慢、繁殖系数低,偶尔可在延长培养期间恢复正常生长,但通常比率很低。导致这种现象的原因,张洪胜等认为是培养环境中的某种胁迫条件诱导产生应激乙烯,乙烯的直接或间接作用引起玻璃化的发生^[5];也有研究表明,改变培养时的湿度、琼脂浓度、细胞分裂素浓度等均可以有效地预防和缓解玻璃苗的发生^[6]。本试验中,采用 4.0 mg/L 6-BA 与 0.3 mg/L IBA 组合,虽然可以诱导 M₇ 大量增殖,但容易导致玻璃化苗的产生,采用 1.0 mg/L 6-BA 与 0.1 mg/L NAA 组合可使玻

3 小结与讨论

玻璃化现象是一种生理病态现象,也是苹果茎尖培养时

雷武生,杨宝林,戴金平. 不同氮肥运筹对水稻品种越光氮素吸收利用及产量的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):54-56.

不同氮肥运筹对水稻品种越光氮素吸收利用及产量的影响

雷武生^{1,2}, 杨宝林¹, 戴金平¹

(1. 江苏农林职业技术学院,江苏句容 212400;

2. 南京农业大学国家信息农业工程技术中心/农业部南方作物生理生态重点开放实验室,江苏南京 210095)

摘要:以水稻品种越光为材料,在氮肥施用总量不变的条件下,研究不同基肥、蘖肥、穗肥、粒肥比例对机插稻产量及氮素利用率的影响。结果表明:适当提高生育后期氮肥施用比例能提高水稻成穗率、功能叶叶绿素含量、籽粒产量、氮肥利用效率,基肥:蘖肥:穗肥:粒肥=3:3:2:2是越光合理的氮肥运筹方式。

关键词:水稻;越光;氮肥运筹;氮素表观利用率;氮素农学利用率;氮素生产效率

中图分类号: S511.06 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0054-03

水稻是我国最重要的粮食作物之一,其总产量占全国粮食总产量的50%。随着水稻品种改良和产量水平提高,施氮量不断增加,高产栽培中的氮肥施用量已达300~350 kg/hm²,甚至高达400~450 kg/hm²。由于氮肥施用的盲目性和不合理性,导致水稻产量、品质、肥效下降,造成土壤质量退化、环境污染等问题,已成为制约农业生产可持续发展的重要限制因素^[1-5]。对于水稻而言,不仅施氮量对水稻产量和氮素利用率有直接影响,而且基肥、蘖肥、穗肥的施用比例对其产量和氮素利用率也有一定影响^[6-10]。丁艳锋等研究表明,水稻对不同生育期追加的氮肥表现出较大的吸收利用率差异,并指出穗粒肥的氮肥利用率明显比基肥、蘖肥高^[11]。江立庚等研究了3个

水稻品种的氮素利用率及其对产量和品质的影响,发现在相同施氮水平下提高穗肥比例可增加氮素回收效率、氮素积累总量和氮素运转效率,而氮素生产效率下降^[12]。日本水稻品种越光具有外观晶莹透亮、香味浓厚、味道香甜等特征,是世界公认的顶级优质水稻品种,但由于越光单产较低,稻谷产量只有4 125 kg/hm²左右^[13],比我国各地推广水稻品种产量低3 000~4 000 kg/hm²,从而制约了越光的推广应用。目前关于氮肥运筹对越光氮素吸收利用和产量影响的研究还相对较少。本研究探讨不同氮肥运筹对越光产量和氮肥利用率的影响,以期对越光因种栽培、定量施肥提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点、材料

试验于2013年5—9月在位于江苏省句容市陈武镇的江苏农林科技示范园进行,该地区属北亚热带季风气候,年平均气温15.1℃,年平均相对湿度78%,年平均降水量1 018.6 mm,无霜期229 d,年日照时数2 116 h,地势平坦。

regeneration from embryogenic calluses of *Citrus sinensis*[J]. *Biologia Plantarum*, 2007, 51(2): 212-216.

[3] 王紫萱,易自力. 卡那霉素在植物转基因中的应用及其抗性基因的生物安全性评价[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(6): 9-13.

[4] 魏国芹,梁美霞,李鼎立,等. 平邑甜茶与M₁离体叶片不定芽再生的研究[J]. *青岛农业大学学报:自然科学版*, 2009, 26(2): 103-108.

[5] 张洪胜,牟云辛,辛培刚. 苹果离体培养中试管苗玻璃化现象发生机理的探讨[J]. *果树科学*, 1991, 8(2): 71-74.

[6] 高遐虹,李梅,张桂凤. 苹果砧木试管苗发生玻璃化的因素及预防[J]. *北京农学院学报*, 1997, 12(2): 16-19.

[7] 魏爱民,张文珠,杜胜利,等. 黄瓜花粉管通道法抗虫基因导入及卡那霉素抗性筛选[J]. *华北农学报*, 2008, 23(6): 54-57.

[8] 王峰,卢永恩,李汉霞. 几种白菜类蔬菜卡那霉素抗性的研究[J]. *武汉植物学研究*, 2006, 24(4): 377-380.

[9] 徐鹏飞,张淑珍,吴俊江,等. 利用卡那霉素对花粉管通道法转基因大豆的筛选研究[J]. *大豆科学*, 2006(3): 275-278.

收稿日期:2014-02-17

基金项目:江苏省高等学校大学生实践创新训练计划[编号:苏高教(2010)16号];江苏农林职业技术学院科研项目(编号:2012kj001)。

作者简介:雷武生(1980—),男,甘肃泾川人,博士研究生,讲师,研究方向为作物生理生态。E-mail:leiwsh@163.com。

璃化芽苗恢复正常生长。

卡那霉素是植物转基因研究中最常用的筛选标记,不同物种、基因型及外植体材料对卡那霉素的敏感性存在较大差异^[7]。筛选用卡那霉素的最佳浓度是一方面可有效抑制非转化组织的生长,另一方面能使转化组织正常发芽和生长发育^[8-9]。通过系统研究不同浓度卡那霉素对M₁叶片再生、芽增殖及生根的影响,明确了适宜M₁筛选用的最佳浓度。苹果M₁砧木叶片愈伤组织形成对卡那霉素的敏感浓度为20 mg/L,抑制叶片愈伤组织生根的卡那霉素浓度为5 mg/L;M₁新梢增殖与生根对卡那霉素的敏感浓度分别为40、10 mg/L。

参考文献:

[1] 程家胜,鄂超苏,田颖川,等. 转Bt抗虫基因苹果植株的再生[J]. *中国果树*, 1994(4): 14-15.

[2] Duan Y X, Guo W W, Meng H J, et al. High efficient transgenic plant