

‘嘎拉’苹果小孢子来源纯合基因型 植株叶片再生体系研究

李芙蓉¹, 邓舒², 张春芬², 肖蓉², 侯丽媛³,
石江鹏¹, 董艳辉³, 聂园军⁴, 曹秋芬^{1,3*}

(¹山西大学生物工程学院, 太原 030006; ²山西省农业科学院果树研究所, 太原 030001;

³山西省农业科学院生物技术研究中心, 太原 030031; ⁴山西省农业科学院农业资源与经济研究所, 太原 030031)

摘要:【目的】建立‘嘎拉’苹果小孢子来源纯合基因型植株高效再生体系, 探索一个简单有效的苹果纯合基因型植株叶片外植体诱导再生不定芽的方法。【方法】以‘嘎拉’苹果花药离体培养获得的纯合基因型株系离体叶片为外植体, 进行再生培养, 检测‘嘎拉’各纯合基因型株系的不定芽再生能力; 通过优化植物生长调节剂、叶片预处理和培养方式, 建立苹果纯合基因型植株高效再生体系。【结果】苹果纯合基因型株系中双单倍体株系DH2-10的再生率最高, 四倍体纯系DH2-15次之, 单倍体株系DH2-3再生率较低, 三倍体纯系DH2-40在培养中难以再生。不同基因型适宜的激素质量浓度不同, 相较于双单倍体株系, 四倍体纯系DH2-15在较高细胞分裂素水平再生率较好。再生培养过程中, 整叶带伤口的外植体预处理方式优于叶片切块接种的方式, 接种苗龄40 d左右的叶片有更好的再生率。【结论】建立了苹果纯合基因型高频高效离体再生体系: 双单倍体株系DH2-10在最适再生培养基MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA+5 mg·L⁻¹ 6-BA上培养, 再生周期为23~35 d, 再生系数为7.27, 再生率达100%。四倍体纯合基因型株系DH2-15适宜在MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA+6 mg·L⁻¹ 6-BA培养基上进行再生培养, 再生率为93.33%。建立的再生体系可用于纯合基因型株系的快速增殖和遗传转化。

关键词: ‘嘎拉’苹果; 小孢子来源; 纯合基因型; 再生体系

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)05-0620-11

A study of plant regeneration from the leaflets of microspores-derived homozygous plants generated from anther culture of ‘Gala’ apple

LI Furong¹, DENG Shu², ZHANG Chunfen², XIAO Rong², HOU Liyuan³, SHI Jiangpeng¹, DONG Yanhui³, NIE Yuanjun⁴, CAO Qiufen^{1,3*}

(¹College of Biological Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China; ²Shanxi Academy of Agricultural Sciences Pomology Institute, Taiyuan 030001, Shanxi, China; ³Biotechnology Research Center, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Taiyuan 030031, Shanxi, China; ⁴Agricultural Resource and Economic Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, Shanxi, China)

Abstract: 【Objective】Apple is highly heterozygous due to its self-incompatibility, but the microspores-derived plantlets from the *in vitro* culture of ‘Gala’ apple anther are highly homozygous and can be a better material for genetic transformation. This study aimed to establish a stable and highly efficient *in vitro* regeneration system from leaves of the homozygous microspores-derived ‘Gala’ plantlets, so as to provide a good system for genetic transformation. These plantlets were regenerated on MS medium containing phytohormone (6-BA and IBA), and the method was optimized by optimizing the combination

收稿日期: 2018-01-18 接受日期: 2018-03-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31372033); 山西省重点研发(国际合作)项目(201603D421001); 山西省回国留学人员科研资助项目(2016-131, 2016-132); 山西省基础研究项目青年科技研究基金(201701D221168)

作者简介: 李芙蓉, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为植物遗传育种。Tel: 18103514897, E-mail: lifuronghello@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13753480017, E-mail: qjufengcao@163.com

of plant growth regulators, the way of leaf wounding and dark culture.【Methods】The genotype of microspores-derived homozygous plantlets from anther culture of ‘Gala’ apple differed among plantlets. The leaves of microspores-derived plantlets with cutting wounds were used as the explants and cultured on MS medium with different hormone combinations and concentrations (M1: MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA+4 mg·L⁻¹ 6-BA; M2: MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA+5 mg·L⁻¹ 6-BA; M3: MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA+6 mg·L⁻¹ 6-BA; M4: MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA+4 mg·L⁻¹ 6-BA; M5: MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA+5 mg·L⁻¹ 6-BA; M6: MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA+6 mg·L⁻¹ 6-BA), and were incubated at 25 °C/17°C (14/10 h) for 14 days in dark. The leaves of 40 d, 80 d and 120 d were used as the explants for regeneration culture to explore the effect of leaf age on regeneration. Both the entire leaves with cutting wounds and leaflet slices were used as the explants for regeneration culture to find the best explant form. And the explants were cultured under light or in darkness for 14 days. The progresses of regeneration were observed, and the callus rate and regeneration rate were calculated. The regenerated buds were subcultured on MS medium containing 0.1 mg·L⁻¹ IBA+1 mg·L⁻¹ 6-BA, and 1/2MS medium+3 mg·L⁻¹ IBA was used as the rooting medium for the regenerated plantlets.【Results】The anther culture obtained homozygous plants, which had been analyzed by flow cytometry (BD Accuri C6) and proved to be haploid (plantlets of DH2-3 and DH2-41), diploids (plantlets of DH2-10, DH2-20, DH2-24 and DH2-35), triploid (plantlet of DH2-40) or tetraploid (plantlet of DH2-15). Shoot regeneration frequency was different among plantlets. The regeneration rate of the diploid plantlet DH2-10 was the highest, followed by tetraploids DH2-15 and haploid plantlets, and the tritraploid DH2-41 had the lowest regeneration frequency. The regeneration frequency of the haploid plantlets DH2-10 and DH2-20 was 31.1% and 5.0%, respectively. That of the diploid plantlets DH2-10, DH2-20, DH2-24, DH2-35 was 100%, 78.89%, 60% and 33.33%, respectively. The regeneration frequency of the tetraploid plantlets DH2-15 was 93.33%. The results showed that plant genotype greatly affected plant regeneration. DH2-10 was a good material for highly efficient plant regeneration. The period of regeneration of the diploid DH2-10 was only 23-35 d, shorter than the other plantlets, and its average bud number per explant was 7.27. Furthermore, hormones had impact on plant regeneration. MS medium containing 6-BA and IBA could be used for callus differentiation and for adventitious bud regeneration. When the concentration of 6-BA was 5 mg·L⁻¹, the induction of callus from leaf explants was good. The best hormone combination for different genotypes varied. The optimal auxin concentration suitable for the haploid plantlets was higher than those for the diploid plantlets and tetraploid plantlets. The regeneration of the tetraploid DH2-15 required a higher level of cytokinin than that of the diploid plantlets and haploid plantlets. In regeneration process, the explant of whole leaf with wounds had a higher regeneration rate than that of small leaf slices. A higher regeneration rate was obtained using the 40 day old leaves as the explants. Culture under dark increased the regeneration rate significantly. The regenerated plants were subcultured and rooted plants were obtained after root induction.【Conclusion】A high-frequency *in vitro* regeneration system for homozygous apple plantlets was established. The diploid plantlets of DH2-10 had a regeneration rate of 100% after 14 d dark culture in the optimized regeneration medium of MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA+5 mg·L⁻¹ 6-BA. The tetraploid homozygous plantlets DH2-15, had a regeneration rate of 93.33% after 14 d dark culture in the optimized regeneration medium of MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA+6 mg·L⁻¹ 6-BA. The regeneration system could be used for the rapid propagation and genetic transformation.

Key words: ‘Gala’ apple; Microspore-derived; Homozygous genotype; Regeneration system

随着苹果基因组草图的完成和分子生物学研究的不断深入,苹果逐渐成为多年生木本园艺植物在后基因组时代的一种模式植物^[1]。但苹果自交不亲和、遗传背景十分复杂,基因组高度杂合,花药培养获得的小孢子来源苹果纯合基因型株系作为新的种质资源,可以加速育种进程,在苹果基础研究和育种实践方面极具优势。花药培养获得的纯合基因型株系能较充分地显现重组的配子类型,丰富种质资源^[2],其遗传背景简化,可以提高遗传分析、基因定位和分子标记辅助选择的效率^[3],20世纪70年代,Niizeki^[4]首次用苹果花药培养出愈伤组织原生质体并获得愈伤组织,Höfer等^[5-9]从20世纪90年代开始研究,通过花药培养和小孢子培养获得了单倍体来源的植株。国内研究也相继取得了突破和进展,费开韦等^[10]首次获得苹果品种‘元帅’的花粉植株,继而培育出‘国光’‘赤阳’‘金冠’‘新红星’等8个品种的花粉植株,并通过田间培育成活^[11]。任莹^[12]通过苹果花药培养获得22个再生株系,温鑫等^[13]从苹果17条染色体中筛选出17个SSR标记,对花药培养获得的再生株系进行了纯合性鉴定,证明了再生株系的小孢子来源。苹果花药培养获得的纯合基因型株系已取得重大进展,苹果花药培养技术体系日趋成熟^[14-16],基于苹果纯合基因型株系进行育种或分子遗传等方面的研究亟待开展。植物基因工程技术的应用要求高效的不定芽再生体系,建立高频高效且具有稳定外植体来源的离体培养再生体系是遗传转化研究的前提。目前基于纯系植株进行再生转化的研究大多集中于单子叶植物^[17],木本植物特别是果树基于纯合株系再生的研究较少,苹果再生转化研究大多集中于杂合双单倍体品种基因型材料^[18-21],以苹果纯系为材料进行再生培养方面的研究目前未见报道。建立苹果纯合基因型再生体系,在苹果育种及分子遗传学研究等方面具有重要意义。

笔者以‘嘎拉’苹果花药培养获得小孢子来源的单倍体株系及自然加倍获得的双单倍体、三倍体、和四倍体纯合基因型株系叶片为外植体,在加有不同配比植物激素的MS培养基上进行再生培养,对影响芽再生的一些主要因素进行初步探索,建立高频高效的苹果纯合基因型再生体系,为实现利用苹果纯合基因型植株进行外源基因的高效遗传转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

以山西省农业科学院生物技术研究中心通过苹果花药培养获得的8个株系为试材^[12],经SSR鉴定均为‘嘎拉’苹果小孢子发育而来的纯合基因型株系^[13]。

1.2 倍性分析

以杂合二倍体‘嘎拉’供体为对照,利用流式细胞仪(BD-accuri 6)对纯合基因型株系进行倍性分析。

1.3 培养基及培养条件

再生分化培养基以MS为基础培养基(含6 g·L⁻¹琼脂、30 g·L⁻¹蔗糖,pH为5.8~6.0),在其中分别添加不同质量浓度配比的激素(表1)。于121℃高压蒸汽灭菌20 min。再生继代增殖培养基为MS培养基+0.1 mg·L⁻¹ IBA+1 mg·L⁻¹ 6-BA,生根培养基为1/2MS培养基+3 mg·L⁻¹ IBA+6 g·L⁻¹ 琼脂+20 g·L⁻¹ 蔗糖。培养条件为日光灯照射,光照强度2 000 lx,光照14 h·d⁻¹,培养温度为25℃/17℃。再生培养基植物激素的不同质量浓度配比,以笔者实验室前期杂合‘嘎拉’苹果再生研究为基础进行设计^[22]。

表 1 再生培养基激素质量浓度

Table 1 Hormone concentrations in the regeneration medium

培养基编号 Medium number	ρ (激素) Hormone concentration/(mg·L ⁻¹)	
	IBA	6-BA
M1	1.0	4
M2	1.0	5
M3	1.0	6
M4	0.5	4
M5	0.5	5
M6	0.5	6

1.4 愈伤组织诱导及不定芽分化

在无菌条件下收集培养40 d左右的株系试管苗顶端健康、完全展开的幼叶,选取植株顶端3~6枚相同大小的叶片,用手术刀沿垂直主叶脉方向横切2~5刀造成穿透伤口,但注意不要切断叶片,对叶片进行预处理。将不同纯合基因型株系处理好的叶片背面朝上接种于含不同激素质量浓度配比的再生培养基,进行愈伤组织诱导及不定芽分化,暗培养14 d后转光下培养,观察统计不同纯合基因型株系的再生情况,比较不同激素水平对纯合基因型株系再生的影响。

另外将叶片垂直中脉切成3或4枚约0.5 cm²的叶块组织,作为叶片预处理方式的对照试验。设叶

龄40、80、120 d 3个水平,探究叶龄对再生的影响。将接种在培养基上的叶片外植体暗培养14 d和不进行暗培养处理直接光下再生培养进行对照试验。以上试验培养基为M5再生培养基。

以上所有处理接种3皿,每皿接种10个外植体,每处理设3次重复,观察愈伤形成以及不定芽生长情况,统计愈伤率和再生率。

1.5 继代增殖和生根

选取叶片再生出的不定芽接种到继代增殖培养基上进行芽的伸长和继代增殖培养,30 d后观察增殖情况,并用流式细胞仪进行倍性分析。从继代增殖的丛生芽中切取生长健壮的幼苗,接种到生根诱导培养基中进行生根诱导,30 d后观察生根情况。

1.6 数据统计分析

愈伤组织诱导率/%=诱导出愈伤组织的外植体数/供试外植体数 \times 100;再生率/%=出芽外植体数/供试总外植体数 \times 100;单叶再生芽数=出芽总数/出芽外植体数。数据采用SPSS 24.0软件进行方差分析、显著分析及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 ‘嘎拉’纯合基因型植株倍性分析

苹果花药培养获得的纯合基因型株系来源于小孢子,每一株系基因型各不相同。以杂合二倍体‘嘎拉’供体为对照,取纯合基因型株系试管苗,用流式细胞仪测试细胞核DNA含量,确定被检测植株的倍性。根据结果(图1)显示,具有单倍体、双单倍体、

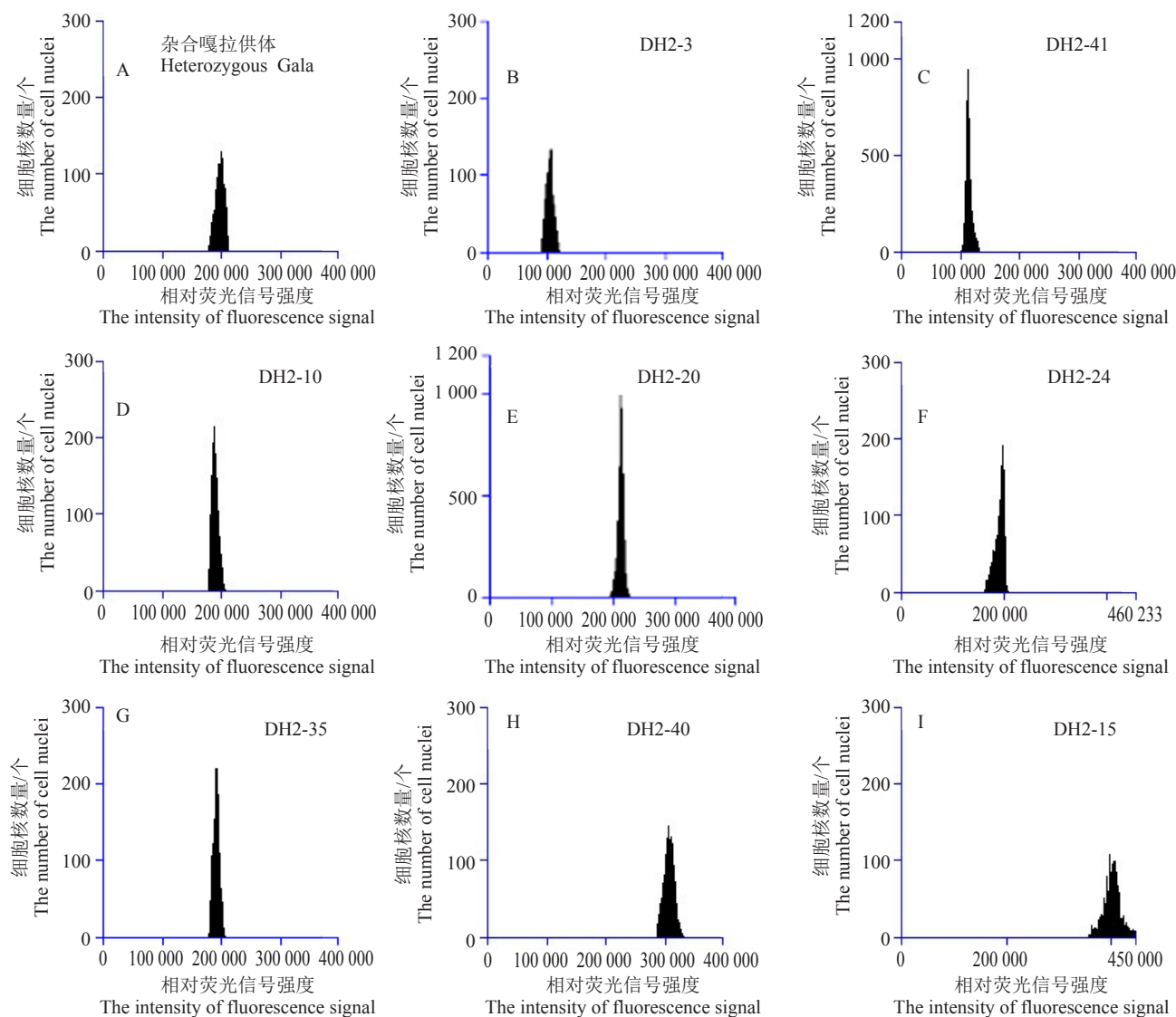


图1 流式细胞仪对纯合基因型株系倍性分析

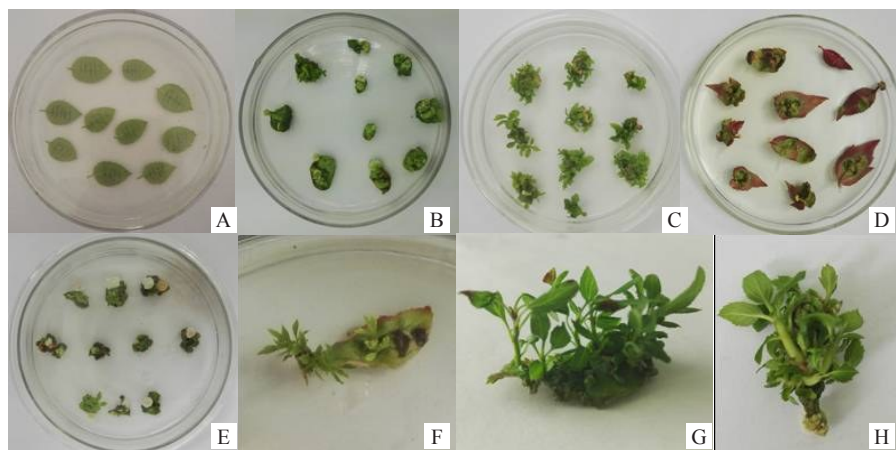
Fig. 1 Flow cytometric (FCM) analysis of the ploidy of the homozygous plantlets

三倍体和四倍体 4 种不同的倍性。DH2-3、DH2-41 为单倍体, DH2-10、DH2-20、DH2-24、DH2-35 为双单倍体, DH2-40 为三倍体, DH2-15 为四倍体。

2.2 基因型对‘嘎拉’纯合基因型植株再生的影响

如图 2 所示, 将各株系试管苗叶片分别接种于

M5 再生培养基上(图 2-A), 暗培养 14 d 后转移至光下培养。暗培养 5~7 d 后, 叶片于伤口处(包括叶柄切口处)开始形成愈伤组织(图 2-B), 光照培养 7 d 后叶片开始分化形成不定芽, 不定芽继续培养生长伸长(图 2-C)。



A. 叶片接种再生培养; B. 叶片形成愈伤; C. 叶片再生不定芽; D. 叶片变红; E. 叶柄处形成白色膨大组织; F. DH2-3 ($n=x$)再生不定芽; G. DH2-10 ($2n=2x$)再生不定芽; H. DH2-15 ($2n=4x$)再生不定芽。

A. Regeneration cultured leaves; B. Leaves forming callus; C. Adventitious shoots from leaf callus; D. Leaves become red; E. Petiole producing white swelled tissue; F. Regenerated buds of DH2-3 ($n=x$); G. Regenerated buds of DH2-10 ($2n=2x$); H. Regenerated buds of DH2-15 ($2n=4x$).

图 2 纯合基因型株系叶片的再生

Fig. 2 *In vitro* regeneration from leaf explants of homozygous plantlets

不同株系叶片愈伤形态有明显区别, 株系的叶片经诱导形成绿色愈伤组织(图 2-B), 株系 DH2-35 于叶柄处形成了白色膨大的愈伤组织(图 2-E), DH2-24 经暗培养转至光下培养后, 出现叶片变红的现象(图 2-D)。不同株系不定芽再生形态不同, 不定芽皆从叶片切伤伤口处分化再生, 单倍体株系伤口处和叶柄切口处均有不定芽再生(图 2-D)。单倍体株系的再生不定芽细瘦, 而四倍体纯系 DH2-15 的再生不定芽较为粗壮(图 2-F)。双单倍体株系整体有较好的再生效果, 其中株系 DH2-10 再生能力最强, 接种培养 23 d 后就开始再生不定芽, 14 d 后完成不定芽再生过程, 单叶再生芽数为 7.27, 再生系数最高且再生不定芽周期显著短于其他株系(表 2)。三倍体纯系 DH2-40 诱导形成的愈伤较弱且未能诱导出不定芽。

2.3 植物激素对‘嘎拉’纯合基因型植株再生的影响

将各纯合株系试管苗叶片分别接种于 M1~M6 培养基进行再生培养。结果表明, 不同质量浓度组合激素对叶片再生有显著影响。在几种含不同质量浓度激素组合的培养基中, 不同基因型株系均能形

成愈伤, 部分株系在不同培养基上的愈伤率有明显差异(表 3)。单倍体株系 DH2-3 和三倍体纯系 DH2-40 在 M2、M3、M5 培养基上愈伤率较高, 而在 M1、M4、M6 上愈伤率较低; 单倍体株系 DH2-41 在 M2、M5、M6 培养基上愈伤率较高。双单倍体株系在 M2 和 M5 培养基上愈伤诱导效果较好, 再生能力较强的双单倍体株系 DH2-10 和四倍体纯系 DH2-15 在几种不同质量浓度组合中均获得了 100% 的愈伤率, 差异不明显。综合比较, IBA 质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或者 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对愈伤组织的形成影响不大, 而 6-BA 质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对愈伤组织有较好的诱导效果。

纯合株系在 M1~M6 培养基上继续培养进行不定芽诱导, 不定芽再生情况有显著差异(表 4), 单倍体株系 DH2-3 在 M2 培养基上再生率相对较高, 再生率为 31.11%, 单倍体株系 DH2-41 在 M2 培养基上愈伤率为 5%, 而在其他培养基上没有再生不定芽。双单倍体株系 DH2-10 在 M5 培养基上再生率为 100%, 极显著高于其他激素组合培养基。另外, 株系 DH2-20、DH2-24、DH2-35 在

表2 不同纯合株系在M5培养基上再生培养愈伤出芽情况

Table 2 The formation of callus and buds on M5 medium in different homozygous plantlets

株系 Plantlets	开始生芽时间 Time of start regenerating buds/d	单叶再生芽数 Number of regenerated buds per leaf	外观描述 Description of the regeneration process
DH2-3 (n=x)	28	3.20±0.91 b	伤口处及叶柄处成绿色愈伤组织并再生不定芽,不定芽细瘦 The wound and petiole formed green callus. Adventitious bud clusters formed from the petiole. Adventitious buds were weak and thin
DH2-41 (n=x)	0	0.00 a	伤口处形成绿色愈伤组织 Green callus was formed at the wound
DH2-10 (2n=2x)	23	7.27±1.43 d	不定芽直接从伤口处大量丛生,且不定芽叶片开展生长健壮 The adventitious buds directly formed from the wound, and the leaves in adventitious bud grew robustly
DH2-20 (2n=2x)	25	5.27±0.70 c	伤口处形成绿色愈伤组织,愈伤处丛生不定芽,再生芽细小密集、长势一般 Green callus formed at the wound, adventitious buds formed from the callus, and the regenerated buds were small and dense
H2-24 (2n=2x)	27	3.30±1.45 b	转光培养后叶片变红,伤口处形成绿色愈伤并于愈伤处生不定芽,长势一般 After light culture, the leaves became red. Green callus formed at the wound and adventitious buds formed from the callus
DH2-35 (2n=2x)	30	1.73±1.61 ab	叶柄处形成白色膨大愈伤,伤口处形成绿色愈伤并发生不定芽,不定芽长势缓慢 The leaf petiole produced white swelled callus, and the wound formed green callus and adventitious buds. The adventitious bud grew slowly
DH2-40 (2n=3x)	0	0.00 a	伤口处形成绿色愈伤组织,愈伤较弱,不发生不定芽 Green callus formed in the wound and the callus was weak. Adventitious buds formed
DH2-15 (2n=4x)	28	1.43±0.21 b	伤口处形成绿色愈伤组织,愈伤处生不定芽,不定芽粗壮,长势较好 Green callus formed at the wound. Adventitious buds formed from the callus. Adventitious buds were thick and grew fast

注:不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同。

Note: Different small letters indicate significant difference according to LSD test ($p < 0.05$). The same below.

表3 各纯合株系在不同培养基上愈伤率

Table 3 Efficiency of callus formation on different media

株系 Plantlets	愈伤率 Efficiency of callus formation/%					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
DH2-3 (n=x)	67.78±5.09 ab	96.67±3.33 c	100.00 c	61.11±5.09 a	100.00 c	70.00±5.00 b
DH2-41 (n=x)	85.56±6.94 b	100.00 c	76.67±3.33 ab	71.11±10.71 a	95.56±3.85 c	100.00 c
DH2-10 (2n=2x)	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a
DH2-20 (2n=2x)	92.22±5.09 a	100.00 a	91.11±5.36 a	93.33±6.6 a	97.78±3.85 a	100.00 a
DH2-24 (2n=2x)	90.00±6.67 b	100.00 c	81.11±1.92 a	100.00 c	100.00 c	98.33±2.89 c
DH2-35 (2n=2x)	76.67±3.33 a	100.00 b	81.67±14.81 a	86.67±6.67 ab	100.00 b	91.11±1.92 ab
DH2-40 (2n=3x)	85.56±5.09 b	100.00 c	100.00 c	91.11±5.09 b	100.00 c	76.67±3.33 a
DH2-15 (2n=4x)	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a

表4 纯合株系在不同培养基上的再生率

Table 4 Regeneration rate of different plantlets on different media

株系 Plantlets	再生率 Regeneration rate/%					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
DH2-3 (n=x)	12.22±1.92 bc	31.11±1.92 e	3.33±3.33 a	8.89±1.92 b	16.67±3.33 c	18.33±2.89 d
DH2-41 (n=x)	0.00 a	5.00±1.67 b	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
DH2-10 (2n=2x)	52.22±8.39 b	57.78±6.94 bc	66.67±6.67 c	57.78±3.85 bc	100.00 d	31.67±4.41 a
DH2-20 (2n=2x)	35.56±13.88 b	66.67±5.77 c	20.00±5 a	48.89±8.39 b	78.89±6.94 c	70.00±3.33 c
DH2-24 (2n=2x)	0.00 a	15.56±1.92 c	1.11±1.92 a	5.56±1.92 b	60.00±3.33 d	3.33±2.89 a
DH2-35 (2n=2x)	0.00 a	18.89±5.09 b	0.00 a	0.00 a	33.33±7.64 c	1.11±1.92 a
DH2-40 (2n=3x)	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
DH2-15 (2n=4x)	36.67±6.67 a	63.33±3.33 b	50.56±4.19 a	42.22±6.94 a	45.56±7.69 a	93.33±7.64 c

M5 培养基上再生率也相对较高。四倍体纯系 DH2-15 在 M6 培养基上再生率为 93.33%，显著高于其他培养基。三倍体纯系 DH2-40 虽然在几种培养基上形成了愈伤，但在培养中愈伤停止分化均未再生出不定芽。结果可见，4 个双单倍体株系再生率最高的激素质量浓度组合培养基均为 M5；单倍体株系 DH2-3、DH2-41 和四倍体纯系 DH2-15 再生率最高的激素质量浓度组合培养基分别为 M2 和 M6。

再生培养中，叶片皆形成了愈伤，尤其是在 M2 和 M5 培养基上，纯合株系愈伤组织率均超过 95%，愈伤诱导效果较好，但各株系再生率却存在显著差异，再生系数也各不相同。对各纯合株系叶片获得的愈伤率、再生率和再生系数进行皮尔森相关性分析(表 5)发现，再生率与愈伤率不具有相关性，而再生系数与再生率呈显著正相关。

表 5 愈伤率、再生率、再生系数相关性分析

Table 5 Correlation analysis among callus rate, regeneration rate and regeneration coefficient

		愈伤率 Callus rate	再生率 Regeneration rate	再生系数 Regeneration coefficient
愈伤率 Callus rate	Pearson 相关性 Pearson's correlation	1	0.142	0.17
	显著性(双侧) Significant (bilateral)		0.507	0.428
	N	24	24	24
再生率 Regeneration rate	Pearson 相关性 Pearson's correlation	0.142	1	0.903**
	显著性(双侧) Significant (bilateral)	0.507		0
	N	24	24	24
再生系数 Regeneration coefficient	Pearson 相关性 Pearson's correlation	0.17	0.903**	1
	显著性(双侧) Significant (bilateral)	0.428	0	
	N	24	24	24

注:**. 在 0.01 水平(双侧)显著相关。

Note: ** indicates significant correlation at the level of 0.01(bilateral).

2.4 叶龄对再生的影响

为探究叶龄对再生的影响，选取继代天数分别为 40、80、120 d 的叶片进行再生培养，结果如图 3 所示，DH2-3、DH2-20、DH2-24 取继代 40 d 的叶片培养时，再生率分别为 16.67%、78.89%、60%，显著高于

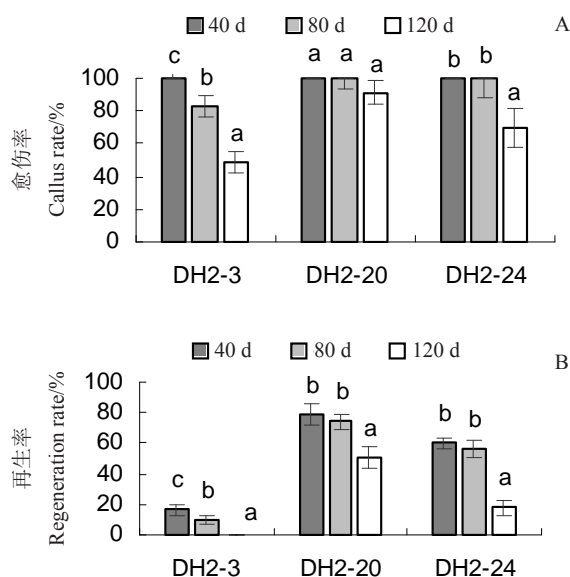


图 3 不同叶龄叶片的愈伤率和再生率

Fig. 3 Callus and bud formation rates in leaves at different ages

120 d 的 0、51.11% 和 17.78%；DH2-20、DH2-24 株系继代 40 d 叶片再生率高于继代 80 d 叶片再生率，差异不显著。继代培养 120 d 的叶片接种后出现叶片枯萎凋亡的现象，影响愈伤形成，且形成的愈伤停止分化，再生率较低。因此，宜选继代 40 d 左右的试管苗叶片进行再生培养。

2.5 叶片预处理方式对再生的影响

接种带有伤口的整叶和块状叶片组织进行再生培养，纯合株系均能获得较好的愈伤效果，差异不明显。不定芽再生统计结果如图 4 所示，株系 DH2-10、DH2-15、DH2-24 整叶切伤的再生率分别为 100%、45.56% 和 60%，块状叶片的再生率分别为 86.67%、19.81%、36.94%。以整叶切伤的叶片进行再生培养获得的再生率明显高于叶块组织。

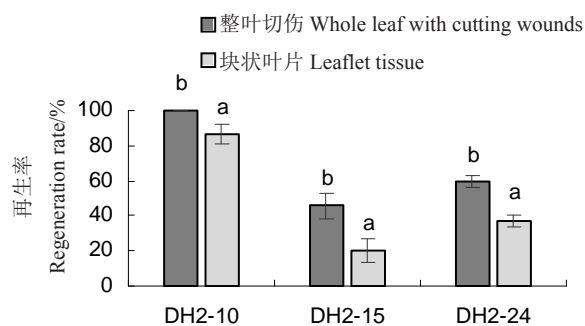


图 4 不同预处理方式叶片的再生率

Fig. 4 Regeneration rates of explants prepared in different ways

2.6 暗培养对再生的影响

将DH2-3、DH2-10、DH3-15纯合株系分别进行暗培养和无暗培养对照试验。各株系在无暗培养条件下愈伤率较低(图5),DH2-3在经暗培养条件下再

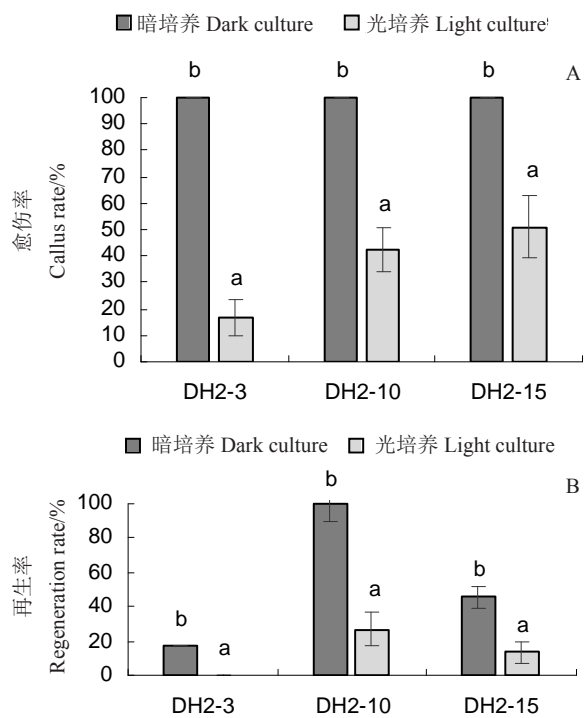


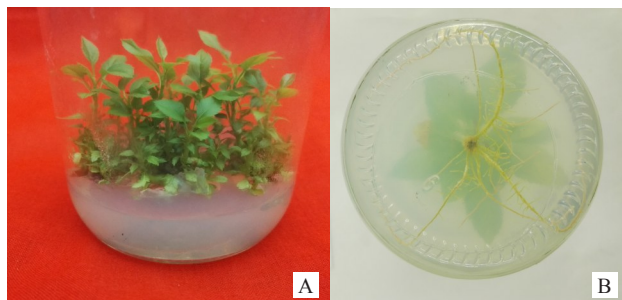
图5 暗培养和光培养叶片的愈伤率和再生率

Fig. 5 Callus and bud formation rates of leaves under dark culture and light culture

生率为16.67%,不进行暗培养无不定芽发生,DH2-10、DH2-15不进行暗培养条件下叶片再生率分别为26.67%、33.33%,显著低于经暗培养的再生率(100%、45.56%)。暗培养可以促进纯合基因型苹果叶片愈伤的形成和叶片不定芽的再生。

2.7 继代增殖培养和生根

由图6可知,选取叶片再生的不定芽接种到继



A. 再生芽继代; B. 继代苗生根。

A. Subculture of regenerated buds; B. Rooting of subcultured buds.

图6 再生芽的继代和生根

Fig. 6 Subculture and rooting of regenerated buds

代增殖培养基上培养,接种的不同纯合株系再生不定芽均能在培养基上良好生长并大量增殖(图6-A)。继代1个月以后,取再生植株茎尖叶片,利用流式细胞仪进行倍性检测。对每一株系的再生苗进行倍性检测,株系未发生染色体加倍。从继代增殖的丛生芽中切取生长健壮的幼苗,接种到生根诱导培养基中进行生根诱导,得到了生根植株,生根率为100%,生根情况良好(图6-B)。

3 讨论

3.1 苹果花药培养再生植株的加倍现象

由花药培养或小孢子培养得到的再生植株在理论上应该是单倍体,但在培养过程中有较高的自然加倍率,因此得到的通常是单倍体、双单倍体、三倍体、四倍体、嵌合体以及非整倍体等染色体倍性水平不同的植株组成的混合群体。陈斌等^[23]报道,辣椒花药培养再生的110个植株中,单倍体、双单倍体、三倍体、混倍体和非整倍体的比例分别为70.91%、25.45%、0.91%、2.73%和2.73%。介智靖等^[24]也发现,甘蓝型油菜小孢子培养的88个植株中,单倍体、双单倍体、四倍体及嵌合体同时存在。花药培养再生植株倍性变异的原因主要有2个:一是植株起源于花药壁、花丝等体细胞花药组织;二是花粉起源的单倍体通过核内多倍体或者核融合导致自然加倍^[25]。苹果花药培养中,早期获得再生植株也包括单倍体、双单倍体、三倍体、四倍体以及单倍体与双单倍体的嵌合体等不同倍性植株,在经过一段时间培养后,非整倍体整合为整倍体或者死亡^[26]。因此笔者使用的8个株系经分析包含了2个单倍体、4个双单倍体、1个三倍体和1个四倍体,并且所有株系已经经过SSR分析,确定其来源于单倍体的小孢子。

3.2 基因型与植株再生

在苹果叶片再生体系研究中,基因型是影响离体组织再生的关键因素,再生能力强的品种有‘M26’‘皇家嘎拉’‘绿袖’等,再生能力较强的品种有‘王林’‘新乔纳金’等,再生较难的有‘富士’‘金冠’等^[27]。本研究中‘嘎拉’苹果花药培养获得的株系来源于单个小孢子,经减数分裂每个小孢子都含有各不相同的半数染色体,每个小孢子各代表一个基因型且不同于‘嘎拉’。笔者选的8个株系为各倍性株系中生长发育较好的株系,试验结果表明,各株系之间再生形态和再生能力存在显著差异,双单倍

体株系 DH2-10 再生效果最好,四倍体 DH2-15 次之,而 2 个单倍体株系再生率均较低,三倍体纯系 DH2-40 再生培养难以分化出不定芽,可见苹果纯合基因型株系再生过程中,不同基因型是影响再生的最关键因素,倍性对再生也有一定影响。

3.3 激素对纯合基因型株系再生的影响

在植物叶片再生培养中,激素是影响愈伤组织形成和不定芽分化的重要影响因子,不同基因型需要不同的激素水平,添加激素的种类、质量浓度及对比对再生诱导效果影响很大^[19-21]。6-BA 是植物组织培养中常用的细胞分裂素,有研究发现,含 6-BA 的培养基可直接诱导叶片出芽并伸长生长形成不定梢^[19,22],笔者采用含 6-BA 的再生诱导培养基,不定芽均生长伸长形成再生植株,缩短了再生周期,简化了再生培养步骤,大大提高了再生效率。在杂合‘嘎拉’再生研究的基础上,使用了较高的细胞分裂素 6-BA 与较低的生长素 IBA 质量浓度配比,结果表明,双单倍体株系 DH2-10 获得了很好的再生效果。DH2-10 在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 与 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的激素质量浓度条件下获得了 100% 的再生率。在适宜的细胞分裂素浓度条件下,单倍体 DH2-3、DH2-41 在较高的生长素浓度水平下(M2 培养基)再生效果相对较好,而在合适的生长素水平上,提高细胞分裂素质量浓度(M6 培养基)后,四倍体纯系 DH2-15 的再生率显著提高。激素质量浓度对不同倍性植株再生的影响需要通过对单倍体进行染色体加倍后进一步研究。

3.4 叶龄与纯合基因型株系再生

在纯合基因型株系再生培养中发现,继代 40 d 左右的组培苗叶片再生能力最强。张汝刚等^[28]研究表明,苹果试管苗的苗龄对离体叶片再生率和出芽数影响显著,25~30 d 苗龄的试管苗叶片再生能力最强。Jin 等^[29]进行苹果砧木不定芽再生试验时发现,30~35 d 苗龄的叶片具有更好的再生效果。而花药培养获得纯合基因型株系生长较慢,培养 40 d 时方达到生长旺盛阶段,取这一时期的叶片再生培养可获得更好的再生效果。

3.5 叶片预处理方式对再生的影响

离体叶片通常于预处理伤口处形成愈伤并分化出芽,预处理对再生有重要影响。接种带有伤口的整叶^[22]与接种将叶片横切中脉切成 3 或 4 片的块状叶片组织进行再生培养时发现,带有伤口的整叶能

获得较高的再生率和单叶再生芽数。这可能是因为整叶的生理状态与营养水平优于切成小块的叶块组织。因此纯合基因型植株再生培养时,对叶片进行整叶切伤预处理可获得更好的再生效果。

3.6 暗培养对纯合基因型株系再生的影响

一般认为,外植体通过暗培养可以促进细胞的分裂与分化,从而刺激外植体的分化。吴雅琴等^[30]在‘昌红’苹果叶片再生研究中发现,暗培养是必要的,师校欣等^[31]在‘王林’‘乔纳金’叶片的再生培养中发现,暗培养对苹果叶片再生不定芽并非必需,但经过黑暗培养可显著提高叶片的再生效率。本试验中,对苹果纯合基因型植株叶片进行再生培养时发现,黑暗培养可显著提高叶片的再生效率。对于再生能力弱的株系,叶片经过暗培养才能再生不定芽;对于再生能力强的株系,暗培养并非叶片再生培养的必需条件,接种后完全光照培养叶片也能再生不定芽,但经过 14 d 的暗培养后再生效率更高。

4 结 论

建立了苹果纯合基因型离体叶片高效不定芽再生体系,不同基因型、不同倍性、激素质量浓度对纯合基因型叶片再生均有很大影响。激素质量浓度对不同倍性植株再生的影响还有待对单倍体进行染色体加倍后进一步研究。本研究中双单倍体株系 DH2-10 在 $\text{MS}+0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 上培养再生率达 100%,再生周期短且再生系数高,是很好的高效再生苹果纯合基因型材料;四倍体纯系 DH2-15 在 $\text{MS}+0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 培养基上再生率为 93.33%。建立的再生体系可用于纯合基因型株系的快速增殖和遗传转化,为今后利用遗传转化等生物技术手段改良品种奠定基础,也为今后纯系苹果叶片离体再生研究提供参考。

参考文献 References:

- [1] VELASCO R, ZHARKIKH A, AFFOURTIT J, …… VIOLA R. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.)[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(10): 833-839.
- [2] GERMANÀ M A. Doubled haploid production in fruit crops[J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2006, 86(2): 131-146.
- [3] HORN R, LECOULS A C, CALLAHAN A A, DANDEKAR A, …… ABBOTT A G. Candidate gene database and transcript map for peach, a model species for fruit trees[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2005, 110(8): 1419-1428.
- [4] NIIZEKI M, HIDANO Y, SAITO K. Callus formation from iso-

- lated protoplasts of apple, *Malus pumila* Mill.[J]. Japanese Journal of Breeding, 1983, 33(4): 369-374.
- [5] HÖFER M. *In vitro* and genesis in apple-improvement of the induction phase[J]. Plant Cell Reports, 2004, 22(6): 365-370.
- [6] HÖFER M. Regeneration of androgenic embryos in apple (*Malus × domestica* Borkh.) via anther and microspore culture [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2005, 27(4B): 709-716.
- [7] HÖFER M, GRAFE C, BOUDICHEVSKAJA A, LOPEZ A, BUENO M A, ROEN D. Characterization of plant material obtained by *in vitro* androgenesis and *in situ* parthenogenesis in apple[J]. Scientia Horticulturae, 2008, 117(3): 203-211.
- [8] HÖFER M, FLACHOWSKY H. Comprehensive characterization of plant material obtained by *in vitro* androgenesis in apple [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2015, 122(3): 617-628.
- [9] HÖFER M, TOURAEV A, HEBERLE-BORS E. Induction of embryogenesis from isolated apple microspores[J]. Plant Cell Reports, 1999, 18(12): 1012-1017.
- [10] 费开韦, 薛光荣. ‘元帅’苹果花培单倍体植株的诱导[J]. 中国农业科学, 1981, 14(4): 41-45.
FEI Kaiwei, XUE Guangrong. Induction of haploid plantlets by anther culture *in vitro* in apple ‘Delicious’ [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1981, 14(4): 41-45.
- [11] 薛光荣, 牛健哲, 杨振英, 史永忠, 费开韦. 苹果花药培养技术及8个主栽品种的花粉植株培育成功[J]. 中国农业科学, 1990, 23(3): 86-87.
XUE Guangrong, NIU Jianzhe, YANG Zhenying, SHI Yongzhong, FEI Kaiwei. The technique of apple anther culture and the successful culture of pollen plantlets of 8 main apple cultivar [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1990, 23(3): 86-87.
- [12] 任莹. 苹果单倍体育种技术探究[D]. 太原: 山西大学, 2015.
REN Ying. Research on haploid breeding technique in anther culture [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2015.
- [13] 温鑫, 邓舒, 张春芬, 侯丽媛, 石江鹏, 聂园军, 肖蓉, 秦永军, 曹秋芬. ‘嘎拉’苹果花药培养种质创新[J]. 中国农业科学, 2017, 50(14): 2793-2806.
WEN Xin, DENG Shu, ZHANG Chunfeng, HOU Liyuan, SHI Jiangpeng, NIE Yuanjun, XIAO Rong, QIN Yongjun, CAO Qiufen. Regeneration of new germplasms using anther culture of apple cultivar ‘Gala’ [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(14): 2793-2806.
- [14] 罗慧珍, 邓舒, 张春芬, 肖蓉, 王卉, 孟玉平, 曹秋芬. 低温诱导下苹果花药差异表达基因分析[J]. 植物生理学报, 2016, 52(3): 259-268.
LUO Huizhen, DENG Shu, ZHANG Chunfen, XIAO Rong, WANG Hui, MENG Yuping, CAO Qiufen. Differentially expressed gene analysis of apple (*Malus domestica*) anther under low temperature induction[J]. Plant Physiology Journal, 2016, 52(3): 259-268.
- [15] ZHANG C, TSUKUNI T, IKEDA M, SATO M, OKADA H, OHASHI Y, MATSUNO H, YAMAMOTO T, WADA M, YOSHIKAWA N, MATSUMOTO S, LI J, MIMIDA N, WATANABE M, SUZUKI A, KOMORI S. Effects of the microspore development stage and cold pre-treatment of flower buds on embryo induction in apple (*Malus × domestica* Borkh.) anther culture[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2013, 82(82): 114-124.
- [16] ZHANG C, SATO S, TSUKUNI T, SATO M, OKADA H, YAMAMOTO T, WADA M, MATSUMOTO S, YOSHIKAWA N, MIMIDA N, TAKAGISHI K, WATANABE K, CAO Q, KOMORI S. Elucidating cultivar differences in plant regeneration ability in an apple anther culture[J]. The Horticulture Journal, 2017, 86(1): 1-10.
- [17] 杜志钊, 陆瑞菊, 黄剑华. 以单倍体材料为转化受体的植物转基因研究进展[J]. 核农学报, 2010, 24(2): 302-306.
DU Zhizhao, LU Ruiju, HUANG Jianhua. Advances on plants transgenic research by using haploid materials as target [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2010, 24(2): 302-306.
- [18] 丛郁, 孙爱君, 姚泉洪, 章镇. 转 *rolC* 基因八棱海棠组培苗生物学特性的研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(12): 2563-2569.
CONG Yu, SUN Aijun, YAO Quanhong, ZHANG Zhen. Study on the biology characteristics of *rolC*-transgenic *Malus robusta* Rehd. *in vitro*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(12): 2563-2569.
- [19] 孙洪雁, 孙清荣, 李国田, 张琼, 李芹. 苹果矮化砧木‘JM7’的组织培养及其离体叶片不定梢再生[J]. 植物生理学报, 2014, 50(6): 779-784.
SUN Hongyan, SUN Qinrong, LI Guotian, ZHANG Qiong, LI Qin. Tissue culture and shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of apple dwarfing rootstock cultivar ‘JM7’ [J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(6): 779-784.
- [20] 李文剑, 曹后男, 宗成文, 金灿, 刘淼. ‘苹果梨’离体叶片再生体系的建立[J]. 果树学报, 2012, 29(5): 800-803.
LI Wenjian, CAO Hounan, ZONG Chengwen, JIN Can, LIU Miao. Establishment of regeneration system of ‘Pinguoli’ pear (*Pyrus breschneideri*) leaves *in vitro*[J]. Journal of Fruit Science, 2012, 29(5): 800-803.
- [21] 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.
- [22] 孟玉平, 曹秋芬, 周慧, 杜建中, 曹尚银. 农杆菌介导 *FT* 基因转化嘎拉苹果的研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 41-45.
MENG Yuping, CAO Qiufen, ZHOU Hui, DU Jianzhong, CAO Shangyin. Transformation of apple cultivar Gala with a *FT* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008, 23(6): 41-45.
- [23] 陈斌, 赵泓, 耿三省, 张宝玺, 张月云, 刘凡. 辣椒花药培养再生株群体染色体倍性构成的多样性[J]. 华北农学报, 2007, 2(1):

- 123-128.
CHEN Bin, ZHAO Hong, GENG Sansheng, ZHANG Baoxi, ZHANG Yueyun, LIU Fan. Studies on ploidy composing in regenerated plants from anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2007, 2(1): 123-128.
- [24] 介智靖, 闫晓红, 方小平, 杨洁, 黄进勇, 魏文辉. 甘蓝型油菜 DH 植株创建及其倍性的流式鉴定[J]. *中国油料作物学报*, 2010, 32(3): 349-353.
JIE Zhijing, YAN Xiaohong, FANG Xiaoping, YANG Jie, HUANG Jinyong, WEI Wenhui. Construction of doubled haploid plants and flow detection of their ploidies in *Brassica napus* [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2010, 32(3): 349-353.
- [25] 张圣仓, 魏安智, 杨途熙. 果树单倍体和加倍单倍体(DH)技术研究与应用进展[J]. *果树学报*, 2011, 28(5): 869-874.
ZHANG Shengcang, WEI Anzhi, YANG Tuxi. Advances in the research and application of haploid and doubled haploid technologies in fruit trees[J]. *Journal of Fruit Science*, 2011, 28(5): 869-874.
- [26] 张春芬, 邓舒, 肖蓉, 孟玉平, 曹秋芬. 花药培养再生植株的倍性鉴定及 SSR 分析[C]//中国园艺学会中国园艺学会. 2015 年学术年会论文摘要集, 2015.
ZHANG Chunfen, DENG Shu, XIAO Rong, MENG Yuping, CAO Qiufen. Ploidy identification and SSR analysis of regenerated plants from apple anther culture[C]//*Acta Horticulturae Sinica*. Abstract of the academic annual conference in 2015, 2015.
- [27] 李玉生, 吴永杰, 程和禾, 吴雅琴, 赵艳华. 转基因苹果研究现状与展望[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(12): 6965-6967.
LI Yusheng, WU Yongjie, CHENG Hehe, WU Yaqin, ZHAO Yanhua. Prospect and research status of transgenic apples[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2011, 39(12): 6965-6967.
- [28] 张汝刚, 朱素贤, 魏海霞, 祝军. 柱型苹果鲁加 16 号叶片再生研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(11): 4424-4426.
ZHANG Rugang, ZHU Suxian, WEI Haixia, ZHU Jun. Study of leaf regeneration of columnar apple Lujia 16[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2008, 36(11): 4424-4426.
- [29] JIN W M, WANG Y H, WANG H. Adventitious shoot regeneration from leaves of apple rootstock 'Pingyitiancha' (*Malus hupehensis* var. *pinyiensis*) and genetic fidelity of regenerated plantlets using SSR markers[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2017, 94(8): 1345-1354
- [30] 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.
WU Yaqin, ZHAO Yanhua, LI Chunming. Efficient adventitious bud induction and plant regeneration from leaves *in vitro* of apple 'Changhong' [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2006, 21(1): 32-35.
- [31] 师校欣, 杜国强, 高仪, 王彦立, 李秀巧. 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.
SHI Xiaoxin, DU Guoqiang, GAO Yi, WANG Yanli, LI Xiuxiao. The effect of darkness culture on micorpropagation and adventitious bud generation from leaf in apple[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2004, 27(4): 18-21.