

孙俊. 南果梨叶片离体培养的高效再生体系[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 44-46.

# 南果梨叶片离体培养的高效再生体系

孙俊

(辽宁省经济林研究所, 辽宁大连 116031)

**摘要:**为探索一种南果梨叶片离体培养高效再生的方法,以南国梨离体培养试管苗叶片为材料,在 MS 基本培养基中添加 6-BA、NAA、IAA 进行离体培养,系统地研究植物生长调节物质浓度、苗龄、不同部位叶片、接种方向、温度、pH 值及光照强度对南国梨叶片离体培养再生的影响。结果表明,MS + 5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 7 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖为南国梨叶片再生芽诱导的适宜培养基,诱导率最高,为 46.1%;选择 25~35 d 苗龄叶片、近叶柄处远轴面向上叶片可获得高再生频率;南果梨叶片离体再生的适宜条件为:温度(25±2)℃,pH 值为 5.8~6.4,高光照强度。

**关键词:**南果梨;叶片再生;离体培养;影响因素

**中图分类号:** S661.204+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0044-03

南果梨(*Pyrus ussuriensis* Maxim.)属于蔷薇科(Rosaceae)梨亚科(Pomaceae)梨属(*Pyrus* L.)植物<sup>[1]</sup>,是秋子梨(*Pyrus ussuriensis* Maxim.)中优良的地方品种之一<sup>[2-3]</sup>。该品种果实色泽鲜艳、果肉细腻、爽口多汁,风味香浓,深受人们欢迎,市场发展前景十分广阔<sup>[4]</sup>。但南国梨果实成熟集中,不耐储运,柜台寿命短,限制了南国梨的发展。常规育种过程相对较慢,难以解决此问题。随着农业生物技术的发展,通过基因工程技术加快南国梨耐储品种的培育将成为解决南国梨保鲜的一条新捷径。而在转基因研究中,成功的基因转化首先依赖于高效稳定的再生系统。原生质体培养与叶片培养是目前运用最广泛的转基因植株再生系统<sup>[5]</sup>。叶圆盘法因能避免对原生质体的繁琐操作而成为基因转移中最常用的方法<sup>[6]</sup>。梨属植物叶片的再生已有报道<sup>[7-12]</sup>,但未有南果梨叶片离体培养再生体系建立及其影响因素研究的报道。本研究以南果梨试管苗叶片为试材,建立高频稳定的叶片离体再生体系为目的,以 MS 基本培养基添加 6-BA、NAA、IAA 进行离体培养,系统地研究植物生长调节物质浓度、苗龄、不同部位叶片、接种方向、温度、pH 值及光照强度对南国梨叶片离体培养再生影响的研究。本试验旨在研究叶片离体再生不定芽的影响因素,建立简单、快速、高效的叶片离体再生体系,从而为进一步利用基因工程技术对南国梨进行遗传改良提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

材料为采自辽宁省鞍山市的大红南果的一年生枝条,在无菌条件下培育出的试管苗。

### 1.2 方法

**1.2.1 不同激素组合对叶片再生不定芽诱导的影响** 取继代培养 25~35 d 的试管苗顶部生长健壮、完全展开的幼叶,

将其放在无菌滤纸上,然后用解剖刀在叶片背面(远轴面)垂直中脉横划 3 刀,但不要完全切断叶片的上表皮。叶片再生芽诱导的基本培养基为 MS 培养基,不同激素组合见表 1,附加蔗糖 30 g/L,pH 值 5.8。培养温度为(25±2)℃,每天光照 8~10 h,光照强度 2 500~3 000 lx。叶片接种后 50 d,调查叶片再生效率和再生芽数。

**1.2.2 试验叶片的苗龄对不定芽诱导的影响** 采用离体培养 25、35、60、90、120 d 组苗龄叶片进行叶片苗龄对再生频率的影响研究。选取上部 1~3 叶位幼嫩叶片,垂直主脉横切 2 刀,将叶块近轴面向下接种于分化培养基上。

**1.2.3 叶片种方向对叶片再生不定芽的影响** 设叶片远轴面和近轴面接触培养基 2 种接种方法处理,接种于 MS + 5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 7 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖培养基上,对比观察不定芽的诱导情况。培养及调查方法同“1.2.1”部分。

**1.2.4 叶片不同部位对叶片再生不定芽的影响** 取继代培养 35 d 的无菌苗叶片。在叶片的基本部、中部和尖部垂直于中脉各切 1 刀,接种在筛选出的含适宜激素的不定芽诱导培养基(MS + 5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 7 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖)上,每瓶放 3 张叶片,重复 8 次。培养及调查方法同“1.2.1”部分。

上述试验均为每瓶接种 9 个叶块(3 张叶),随机区组试验设计,每处理 10 瓶,重复 3 次。试验再生培养基为 MS + 5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 7 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖。

### 1.3 结果调查与统计分析

在叶片接种 30 d 后对不定芽的再生率和平均每个叶块的分化不定芽数进行调查。结果用 DPS 统计软件进行方差分析,百分率经反正弦转换。再生频率 = 再生不定芽的叶块数/接种叶块数 × 100%;叶块平均再生芽数(个/叶块) = 叶块再生不定芽总数/出芽叶块数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素组合对叶片再生的影响

接种后 2 周,叶片开始膨胀,边缘逐渐向中央无规则卷

收稿日期:2013-11-04

基金项目:辽宁省博士基金启动项目(编号:20131051)。

作者简介:孙俊(1983—),女,辽宁大连人,博士,工程师,主要从事经济林树种的病害研究工作。E-mail: sunjun3200@163.com。

起,叶片伤口处长出少量的白色愈伤组织,质地松散。3 周左右,伤口处形成致密的愈伤组织,颜色由暗黄至深褐,体积迅速增大。5 周时,伤口末端的愈伤组织处开始分化出绿色芽点(图 1-A)。7 周后,不定芽分化率迅速上升,此后不定芽不断伸长(图 1-B)。随着培养时间的延长,叶片再生频率和再生不定芽数量开始增加。

表 1 表明,附加适宜的生长素可提高芽的再生频率,但不同种类生长素诱导芽的效果不同,IAA 效果不如 NAA;IAA 或 NAA 浓度一定下,6-BA 浓度越大,叶片再生频率越高,但相同 6-BA 浓度下,同浓度 NAA 比 IAA 效果好。以 MS 为基本培养基诱导南国梨叶片不定芽再生的最适 6-BA 浓度为 5 mg/L。在 6-BA 浓度为 5.0 mg/L 的条件下,0.2 mg/L NAA

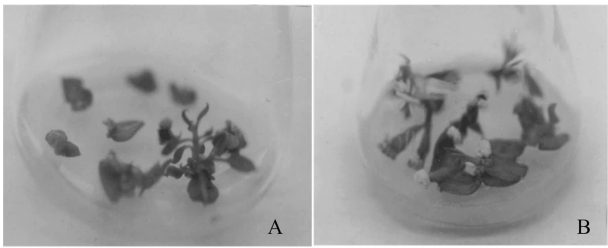


图1 南国梨叶片离体培养愈伤组织诱导和不定芽再生

的诱导率最高,为 46.1%。因此,MS + 5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 7 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖为南国梨叶片再生芽诱导的适宜培养基。

表 1 不同激素组合对南国梨叶片离体再生芽诱导的影响

培养基	再生频率 (%)	再生芽数 (个)	培养基	再生频率 (%)	再生芽数 (个)
MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA	28.1	3.56	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA	23.1	2.57
MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L NAA	19.3	1.49	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L IAA	15.3	1.26
MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L NAA	16.2	0.93	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L IAA	12.4	0.64
MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA	36.7	3.78	MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA	26.7	2.75
MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L NAA	25.4	2.94	MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L IAA	19.4	1.91
MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L NAA	19.3	1.51	MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L IAA	15.3	1.22
MS + 5.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA	46.1	4.26	MS + 5.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA	29.1	3.09
MS + 5.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L NAA	29.4	3.83	MS + 5.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L IAA	25.4	2.59
MS + 5.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L NAA	27.6	3.25	MS + 5.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L IAA	22.6	2.32

2.2 苗龄对不定芽诱导的影响

培养中的外植体细胞团由于不断继代,其形态发生能力可能保持,也可能丧失,产生不正常植株的频率也会增加。因此,笔者对不同苗龄南国梨叶片离体再生情况进行了研究。结果(表 2)表明,25、35 d 苗龄的离体再生频率显著大于 60 d 苗龄,极显著大于 90、120 d,而 25、35 d 苗龄间差异不显著。因此,选择 25~35 d 苗龄叶片作为获得高再生频率的试材。

表 2 5 种苗龄的南国梨叶片离体再生频率

苗龄(d)	再生频率 (%)
25	40aA
35	36aA
60	30bAB
90	24cB
120	22cB

注:同列数据后不同大、小写字母分别表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )、显著 ( $P < 0.05$ )。

2.3 叶片放置方向对不定芽再生的影响

南国叶片接种在培养基上,在剪口和叶脉处均可再生出不定芽,叶片的近轴面和远轴面都有芽形成。从表 3 可看出,叶片的放置方向对再生频率及叶片平均再生芽数有一定的影响,远轴面向上叶片再生芽数、再生频率高于近轴面向上叶片。

表 3 接种方向对叶片再生的影响

接种方向	叶片平均再生芽数 (个)	再生频率 (%)
近轴面向上	3.3	24.7
远轴面向上	4.9	37.2

2.4 叶片不同部位对不定芽再生的影响

同一叶片不同部位的再生能力不完全相同。本试验将南国梨叶片横剪成两部分,靠近叶柄的部分再生频率较高,且近叶柄处伤口极易再生出芽,而远离叶柄部分再生频率明显下降(表 4)。

表 4 接种部位对南国梨叶片再生的影响

接种部位	叶片平均再生芽数 (个)	再生频率 (%)
近叶柄部分	6.7	45.6
远叶柄部分	4.4	25.3

2.5 温度、pH 值及光照条件对不定芽再生的影响

pH 值影响培养基的状态和培养物对营养成分的吸收,不同的基本培养基因其成分不同,所要求的 pH 值也不同,因此它也成为影响南国梨叶片再生的一个重要因素。本试验初步研究了温度、pH 值及光照强度对南国梨叶片再生的影响。

从表 5 可以看出,温度对南国梨叶片的再生频率和叶片平均再生芽数有明显影响。在一定温度范围内(23~25℃),随温度升高,再生频率与再生芽数也相应升高,并达到最大值;而超过这一范围(25℃),温度升高,再生频率与再生芽数反而下降。这表明南国梨叶片离体再生的适宜温度是(25±2)℃。

从表 6 可知,当 pH 值在 5.8~6.4 之间时对叶片再生频率和叶片平均再生芽数的影响没有明显差异;而当 pH 值增至 7.0 时,叶片再生频率下降 10 个百分点左右,叶片平均再生芽数也明显减少。这表明南国梨叶片离体再生适于酸性条件,最适 pH 为 5.8~6.4 之间。

表 5 温度对南果梨叶片再生的影响

温度 (℃)	叶片平均再生芽数 (个)	再生频率 (%)
23 ± 2	3.8	29.6
25 ± 2	4.9	37.2
27 ± 2	3.4	27.4

表 6 pH 值对南果梨叶片再生的影响

pH 值	叶片平均再生芽数 (个)	再生频率 (%)
5.8 ± 0.2	4.8	34.8
6.4 ± 0.2	4.6	36.1
7.0 ± 0.2	3.6	25.3

从表 7 可知,光照强度对不定芽始发时间、再生频率、叶片平均再生芽数和愈伤组织始发时间都有不同程度的影响。在自然光照下,愈伤组织与不定芽始发时间最晚,再生频率和叶片平均再生芽数最低;而当光照强度为 2 000 lx 时,明显提高了再生频率和叶片平均再生芽数,并且缩短了愈伤组织和不定芽始发时间;当光照强度为 1 000 lx 时,虽然叶片平均再生芽数高于光强 2 000 lx 的叶片再生芽数,但在其他三方面均低于光照强度为 2 000 lx 时的指标,这表明南果梨叶片离体再生要求高强度光。

综合上述结果可得出南果梨叶片离体再生的适宜条件,即温度(25 ± 2)℃,pH 值 5.8 ~ 6.4,高强度光。

表 7 光照强度对南果梨叶片再生的影响

光照强度	不定芽始发 时间(d)	再生频率 (%)	叶片平均再 生芽数(个)	愈伤组织始 发时间(d)
自然光照	20	26.4	3.9	12
1 000 lx	18	35.8	4.8	8
2 000 lx	15	38.3	4.7	6

3 结论与讨论

3.1 外源激素的影响

在不同生长素和细胞分裂素的配合使用中,两者的比例十分重要。有研究证明,细胞分裂素类似物质腺嘌呤与生长素 IAA 之间的浓度配比可有效地控制植物组织培养中芽和根器官的发生。本试验支持此观点。本研究以在 MS 基本培养基上添加 6-BA 与 NAA 组合较 6-BA 与 IAA 组合更有利于不定芽的再生。这与孙清荣等研究结果<sup>[8]</sup>一致,与刘洪章等的研究结果<sup>[13]</sup>正好相反。培养基中激素的种类、浓度、配比不同造成生长和分化能力不同,可能是因为它们刺激了不同基因控制的酶类,从而影响内源激素的分布水平,进而在生长和分化上形成差异<sup>[14]</sup>。

3.2 苗龄的影响

随着继代次数增多,培养中的外植体器官形成的能力会发生改变。对不同苗龄叶片的再生能力进行比较试验发现,苗龄越大,再生频率越低,苗龄 25 ~ 35 d 的叶片再生能力最

强。这可能与叶片的生理状态有关,不同苗龄的叶片基因组中代谢基因及其活性不同,导致酶的活性及内源激素水平的差异,在外源激素及其他环境因素的作用下,表现出不同的再生能力<sup>[15]</sup>。

3.3 外植体放置方向的影响

以南果梨叶片远轴面接触培养基,其再生频率高于近轴面接触培养基的处理,这与刘洪章等的研究结果<sup>[13,16-17]</sup>一致,所以接种时以远轴面向下为宜。

3.4 培养温度的影响

本研究发现,温度对南果梨叶片再生芽有明显影响,27℃以上明显不利于叶片生长,与吴禄平等在苹果品种试管苗叶片再生不定芽的研究结果<sup>[18]</sup>一致,造成这种现象的原因可能是温度过高,使参与新陈代谢酶的活性受到抑制,从而使代谢过程和生长速率受到抑制,进而影响叶片再生。

参考文献:

[1]曲泽洲,孙云蔚. 果树种类论[M]. 北京:农业出版社,1990:50-51.

[2]蒲富慎,黄礼森,孙秉钧,等. 梨品种[M]. 北京:农业出版社,1989:83.

[3]农业部农业技术推广总站,张 力,于润卿. 梨优良品种及其丰产优质栽培技术[M]. 北京:中国林业出版社,1993:62-66.

[4]王晓利,任宝君. 以开发南果梨为突破口大力推进农业产业结构调整[J]. 河北农业科技,2008(7):55.

[5]王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社,2009.

[6]孙爱君,章 镇,张新生,等. 苹果遗传转化的研究进展[J]. 遗传,2001,23(6):583-587.

[7]曹 霞,柴明良. 砂梨叶片再生不定梢的研究[J]. 果树学报,2005,22(5):557-560.

[8]孙清荣,刘庆忠,赵瑞华. 西洋梨叶片直接再生体细胞胚[J]. 园艺学报,2003,30(1):85-86.

[9]徐凌飞,马锋旺,王喆之,等. 八月红梨叶片不定芽诱导研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2002,30(4):73-75.

[10]刘翠琼. 梨的离体培养与叶片不定梢诱导研究[D]. 雅安:四川农业大学,2003:32-40.

[11]李海云,王中伟,邢少辰,等. 早梨 18 号叶片不定芽诱导及植株再生的研究[J]. 北方园艺,2008(9):151-153.

[12]韩继成,冯志红,陈霜莹. 梨离体叶片诱导不定芽的研究[J]. 河北果树,1998(2):12.

[13]刘洪章,谭雪辉,郑 涛. 山梨叶片再生体系的研究[J]. 吉林农业大学学报,2008,30(4):472-476.

[14]黄学林,李筱菊. 高等植物组织培养离体培养的形态建成及调控[M]. 北京:科学出版社,1995:78-80.

[15]布赖恩特 J A. 植物基因表达的分子基础[M]. 朱至清,译. 北京:科学出版社,1986:274.

[16]韩清芳,徐凌飞,马锋旺,等. 梨叶柄再生不定芽的研究[J]. 西北植物学报,2002,22(6):1485-1488.

[17]孙清荣,石荫坪,孙洪雁. 梨成熟胚子叶不定梢诱导[J]. 河北农业大学学报,1999,22(2):50-52.

[18]吴禄平,张志宏,林丽华,等. 苹果品种试管苗叶片再生不定芽[J]. 沈阳农业大学学报,1995,26(2):131-135.