

# 早梨 18 号叶片不定芽诱导及植株再生的研究

李海云, 王中伟, 邢少辰, 马 瑞, 董英山

(吉林省农业科学院 生物技术研究中心 吉林 长春 130124)

**摘 要:** 体外建立并扩繁了早梨 18 号的无性系, 以试管苗叶片为外植体。研究了基本培养基、植物生长调节剂组合、暗培养时间对叶片不定芽诱导与植株再生的影响。结果表明: 早梨 18 号叶片在适宜的条件下可发生大量不定芽; 暗培养预处理有利于提高叶片的再生频率, 以暗培养 15 d 为宜; 叶片在 NN 69+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 和 NN 69+TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L 的培养基上分别获得了 56%和 54%的叶片再生频率。

**关键词:** 梨; 叶片; 不定芽诱导; 植株再生

**中图分类号:** S 661.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)09-0151-03

就果树现有的优良品种与品系来看, 都有一定的缺陷。解决这些问题仅靠常规杂交育种是困难的。梨同其他果树一样, 由于童期长和基因高度杂合的特点使其依赖传统的有性杂交育种成效较低。现代转基因技术大大加速了品种的改良进程, 提高了改良的效果。能否获得转基因的植株, 除基因转移的方法外, 在很大程度上依赖于不定器官的高效再生<sup>[1]</sup>, 高效、稳定的再生体系是转基因的关键环节。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>[2]</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>[3]</sup>。梨叶片的再生已有报道 西洋梨品种再生成功的较多, 砂梨和白梨品种再生成功的相对较少<sup>[4-5]</sup>。

试验以吉林省果树所育成的早梨 18 号为试材, 它是由以早甜为母本, 杭青为父本杂交选育出来的。优点是成熟期早, 果实整齐, 质优, 味佳, 早果, 丰产, 适于密植, 抗寒、抗病性强。该试验进行早梨 18 离体叶片不定芽诱导与植株再生的研究 为进一步建立其高效再生及遗传转化体系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 初代培养与增殖培养

2005 年 3 月上旬, 在吉林省农业科学院果树所采集早梨 18 号 1 a 生枝条于温室内水培。待腋芽萌发后, 剪取腋芽流水冲洗干净后, 于超净工作台上用 75%酒精灭

菌 30 s, 无菌水冲洗 2 遍后用 0.1%升汞消毒 7 min, 无菌水冲洗 3 遍, 将嫩芽基部伤口切一下后接种到启动培养基上。获得无菌苗后, 将无菌苗切割成带腋芽的 1 cm 左右的茎段进行继代增殖培养。

### 1.2 叶片接种培养

切取继代培养的试管苗(图版-A)的顶部幼嫩叶片, 切去叶片顶部 1/3, 留 0.5 cm 左右的叶柄, 在叶背垂直叶中脉横划 3 刀制造伤口, 但不切断叶片边缘。远轴面(叶背面)接触培养基。采用 MS 与 NN69 两种基本培养基, 添加细胞分裂素与生长素组合成 14 种培养基, 用于叶片再生研究。每处理接种 50 个叶片, 共 7 皿, 每皿接种 7~8 个叶片。叶片接种后先进行 15 d 暗培养(除进行光、暗培养比较试验外), 再移至光下。培养温度(25±2)℃, 16 h 光照/8 h 黑暗 光照强度 2 000~3 000 lx。

### 1.3 培养基

启动培养基: MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 7 g/L。

继代增殖培养基: MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L+GA<sub>3</sub>0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 7g/L。

用于叶片再生的培养基: 使用 MS 与 NN 69 基本培养基, 细胞分裂素使用 6-BA 和 TDZ, 生长素使用 NAA 与 IBA。

所用培养基均在灭菌前调节 pH 值为 6.0, 在 121℃ (1.2 kg/cm<sup>2</sup>)下高压灭菌 20 min。

### 1.4 结果调查

叶片接种 2 个月后统计再生频率。叶片再生频率(%)=再生不定芽的叶片数/接种叶数×100%; 平均每叶再生芽数(个/叶片)=再生不定芽总数/再生不定芽的叶片数。

## 2 结果与分析

### 2.1 无性系建立

第一作者简介: 李海云(1979-), 女, 硕士, 主要从事果树与花卉组织培养工作。E-mail: haiyun1224@yahoo.com.cn.  
通讯作者: 王中伟。E-mail: wangzhongwei@cjaas.com.  
基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项资助项目(JY04-B-02)。  
收稿日期: 2008-04-15

嫩芽接种在初代培养基上,第2天嫩芽基部周围的培养基就会有褐化物渗入,将嫩芽及时转到新鲜的培养基中,褐化现象大大减轻,并提高嫩芽的成活率。半月后嫩芽就会伸长生长,并有新叶长出,形成带节间的植株。将植株切割成带腋芽的小茎段进行继代扩繁培养,提供充足的试管苗进行下一步的叶片诱导再生试验。

选取高度在3 cm以上的健壮苗进行生根试验。该试验采用二步生根法获得了较好的生根效果。最佳的培养条件为:在无菌条件下,将苗基部切成楔形,增大切口面积,速蘸100 mg/L的IBA溶液,再接种至1/2MS固体培养基中诱导生根。在该种方法下,生根状况良好(图版-I)。3 d左右就有少量白色的愈伤组织形成,7 d左右就可见幼根的发生。根数多而长,随培养时间的延长,须根逐渐产生。

2.2 不定芽产生动态与产生部位

在暗培养状态下,叶片培养5 d后开始膨胀、变皱,10 d左右在叶片切伤处、叶基部产生少量白色愈伤组织。在MS基本培养基上,叶片产生黄绿色愈伤组织,而在NN 69基本培养基上,叶片产生的绿色愈伤组织表面带有红色的颗粒。经过15 d的暗培养,将叶片转至光下,愈伤组织逐渐增大,变成绿色致密的愈伤组织(图版-B)。35 d左右开始有肉眼可见的不定芽的产生,不定芽多产生在叶片中脉切口处及叶柄端处的愈伤组织上(图版-C, D)。随着培养时间的延长,叶片再生频率和平均每叶再生芽数增加(图版-E)。60 d后,未产生不定芽的叶片也不再产生不定芽,只是已形成的不定芽的增殖与伸长生长形成不定梢(图版-F, G, H)。不定芽主要产生于叶片的近轴面(图版-H),但远轴面也有发生(图版-F)。

2.3 暗培养对早梨18叶片再生不定芽的影响

大量资料表明黑暗处理对叶片再生不定芽有十分

重要的作用。叶片接种后,一直在光下培养仅产生微量的愈伤组织,而这些愈伤组织极易老化,很难再生出不定芽。而暗培养时间较长时,叶片也会在黑暗条件下分化不定芽,但这些不定芽见光后生长不健壮。试验证明,暗培养15 d效果最佳,随暗培养时间的延长,再生率反而下降(见表1)。

表1 暗培养时间对叶片再生不定芽的影响		
暗培养天数/d	叶片再生频率/%	平均每叶再生芽数/个
0	0	0
15	54.0	4.26
20	40.0	2.60
25	22.0	1.82

注:再生培养基为NN 69+TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7 g/L。

2.4 基本培养基和植物生长调节剂对叶片再生的影响

表2显示了基本培养基种类与植物生长调节剂对早梨18叶片再生不定芽的影响。从表2看出:基本培养基的种类对不定芽的再生频率影响较大,植物生长调节剂相同的情况下,叶片在NN 69培养基上获得了较高的再生频率;细胞分裂素与生长素在叶片再生中是必不可少的,当细胞分裂素与生长素浓度在适当的配比下可起到促进叶片再生的作用;随着6-BA浓度的升高,叶片再生频率升高,而增大生长素的浓度并未提高叶片再生频率;细胞分裂素相同的情况下,使用不同种类的生长素对再生频率的影响不大;TDZ的活性要比6-BA高,使用1 mg/L浓度的TDZ,也能获得较高的叶片再生频率,但TDZ浓度过高,将使再生的不定芽玻璃化;早梨18号叶片在4号和6号培养基上都获得了较高的再生频率,且再生频率相差不大,但在使用TDZ的6号培养基中,平均每叶再生芽数升高了,再生的不定芽不如含6-BA的4号培养基上再生的芽健壮,但将不定芽转到继代培养基上后很快就会生长健壮。

表2 培养基种类与植物生长调节剂对早梨18叶片再生不定芽的影响

组合号	基本培养基	6-BA/mg·L <sup>-1</sup>	TDZ/mg·L <sup>-1</sup>	NAA/mg·L <sup>-1</sup>	IBA/mg·L <sup>-1</sup>	不定芽发生率/%	平均每叶再生芽数/个
1	NN69	1.0	—	0.5	0	12.0	1.67
2	NN69	3.0	—	0.5	0	32.0	3.69
3	NN69	3.0	—	1.0	0	40.0	2.60
4	NN69	5.0	—	0.5	0	56.0	4.57
5	NN69	5.0	—	1.0	0	44.0	3.18
6	NN69	—	1.0	—	0.5	54.0	5.11
7	NN69	—	1.0	0.5	—	48.0	4.13
8	NN69	—	2.0	—	0.5	42.0	不定芽玻璃化
9	MS	3.0	—	0.5	—	14.0	2.14
10	MS	3.0	—	1.0	—	18.0	1.78
11	MS	5.0	—	0.5	—	24.0	1.83
12	MS	5.0	—	1.0	—	20.0	1.60
13	MS	—	1.0	—	0.5	36.0	2.39
14	MS	—	1.0	0.5	—	28.0	2.14

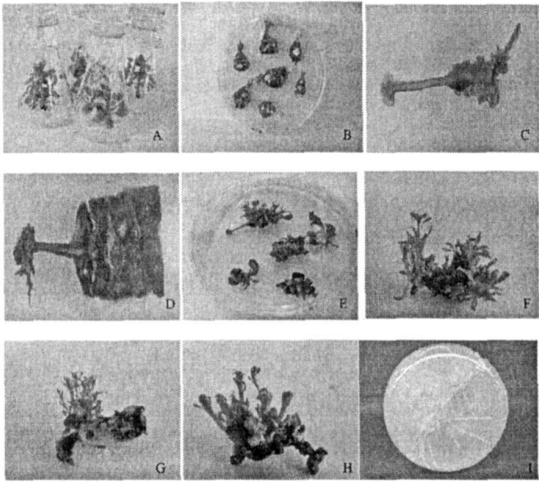
3 讨论

在对早梨18叶片再生不定芽的研究中发现,基本

培养基NN 69的诱导效果优于MS。这与徐凌飞等<sup>[9]</sup>报道的NN 69培养基对东方梨八月红叶片再生不定芽的

诱导效果优于 MS 一致, 但与刘翠琼<sup>[7]</sup>对西洋梨、巴梨、考密斯叶片再生不定芽的研究结果不一致。这可能是基因型的不同对培养基的反应存在差异。

TDZ 在植物组织培养中表现出很高的细胞激动素活性, 它能使难以进行组织培养的植物, 特别是木本植物的组织培养获得成功<sup>[8]</sup>。但在该试验中, TDZ 的诱导效率并未高于 6-BA。



图版说明

A: 用于不定梢再生的试管苗; B: 在切割面形成的绿色致密的愈伤组织; C: 35 d 左右, 在叶片中脉切口处愈伤组织上产生的不定芽; D: 35 d 左右, 在叶柄端处切口的愈伤组织上产生的不定芽; E: 在 40 d 时叶片再生出不定芽的状态; F: 60 d 时在叶片近轴面与远轴面形成的不定芽; G: 60 d 时叶柄端处形成的不定芽; H: 60 d 时叶片近轴面形成的不定芽; I: 采用二步生根法获得的根的形态。

在建立植物再生体系的研究中, 暗处理是某些植物外植体再生不定芽的重要影响因素。很多学者指出, 叶片接种后先进行一段时间的暗培养对叶片再生不定芽是必要的。该试验也得出在 NN 69 基本培养基上, 经过 15d 的暗培养促进分化, 不经过暗培养过程, 叶片不能

再生的结论。韩继成等<sup>[9]</sup>也发现在 MS 培养基上不经过暗培养诱导出不定芽, 但在 NN 69 培养基上暗培养对再生影响不大。Lane 等<sup>[10]</sup>也证实 B5 培养基上暗培养处理对日本砂梨叶片再生无促进作用。这种在不同的基本培养基上, 再生对光照有不同响应的现象还需进一步探讨。

该试验中, 不定芽产生的部位集中于叶中脉切口处与叶柄端切口处形成的愈伤组织上, 在叶脉伤口处也有少量不定芽产生, 在叶片其他部位肉眼没有观察到不定芽的产生。这可能与叶脉部位的维管束密度较高有关。但将叶柄与叶片切离, 单独诱导叶柄的再生频率却很低。这可能与完整叶片更有利于激素在外植体内的积累与运输有关。

参考文献

[ 1 ] 汤浩茹, 王永清, 任正隆. 核桃体细胞胚发生与转基因研究进展[ J ]. 林业科学, 2000, 36(3): 102-110.  
[ 2 ] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[ M ]. 北京: 科学出版社, 2002: 8.  
[ 3 ] 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.  
[ 4 ] 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.  
[ 5 ] 孙清荣, 刘庆中, 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.  
[ 6 ] 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.  
[ 7 ] 刘翠琼. 梨的离体培养与叶片不定梢诱导研究[ D ]. 四川农业大学硕士学位论文, 2003.  
[ 8 ] 王关林, 方宏筠, 那杰. 高活性细胞激动素在组织培养基中的作用[ J ]. 生物学通报, 1997(3): 47-53.  
[ 9 ] 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.  
[ 10 ] Lane W D, Iketa H, Hayashi T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear(Pyrus pyrifolia)[ J ]. Plant Cell Tiss & Org Cult, 1998, 54(1): 9-14.

The Studies on the Adventitious Buds Induction of Pear cv. premature 18 Leaves and Plantlet Regeneration

LI Hai-yun, WANG Zhong-wei, XING Shao-chen, MA Rui, Dong Ying-shan

(Biotechnology Research Center, Jinlin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130124, China)

**Abstract:** The asexual line of “Pear cv premature 18” was established and propagated, leaves of in vitro “Pear cv premature 18” were used as explants. Effects of basic medium, plant growth regulator, dark culture period on adventitious buds induction and plantlet regeneration were studied. Results showed that: In the best condition, many adventitious buds regenerated from leaves. Dark pretreatment could promote leaves regeneration rates, 15 days was the optimum period. In the medium of NN 69+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L and NN 69+TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L, leaf regeneration frequency was 56% and 54% respectively.

**Key words:** Pear; Leaf; Adventitious bud induction ; Plantlet regeneration