

‘砭山酥’梨叶片再生体系的建立

付镇芳, 孟颢光, 张朝红, 王跃进

(西北农林科技大学 园艺学院, 农业部西北园艺植物种质资源利用重点开放实验室, 陕西省农业分子生物学重点实验室 陕西 杨凌 712100)

摘要:以‘砭山酥’梨(*Pyrus bretschneideri* cv. Dangshansu)叶片为材料, 研究基本培养基种类、植物生长调节物质浓度、抗氧化剂、碳源对再生的影响, 以及不同浓度生长激素对再生芽生根的影响。结果表明:NN₆₉培养基是叶片再生不定芽的最佳培养基, 诱导不定芽的分化以培养基NN₆₉+6-BA 3.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+琼脂 6 g/L为佳; AgNO₃比活性炭和PVP更利于叶片的诱导; 与蔗糖相比山梨醇更适宜作为叶片再生的碳源, 最佳浓度是10 mg/L, 叶片再生频率最高为74.03%, 平均再生芽数1.01。生根培养基以ASH+IBA 10 mg/L+间苯三酚 80 mg/L+蔗糖 15 g/L+琼脂 6 g/L为佳, 生根率高且根粗壮。

关键词:梨; 叶片再生; 山梨醇

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)14-0098-04

梨(*Pyrus* spp.)是世界性的重要果树, 目前世界上栽培梨树的国家现有76个, 我国梨栽培面积和产量均居世界首位。梨属植物种类较多, 主栽种有白梨、砂梨、秋子梨、新疆梨和西洋梨等, 白梨(*Pyrus bretschneideri*)是我国栽培最广、品质最优的一个种, 同时也是梨黑星病危害最为严重的梨树树种之一。‘砭山酥’梨在分类上属于白梨, 是我国栽培历史较早的一

个优良品种, 但其最大的缺点是易感染梨黑星病^[1]。在梨优良品种快速繁殖、突变体保存利用及转基因等生物技术领域的研究中, 梨的组织培养发挥了重要作用, 建立高效的组织培养体系是进行相关研究的基础。目前仅在西洋梨^[2,7]、沙梨^[8-9]、白梨^[10,13]和某些砧木^[14-15]上初步建立离体器官再生体系, ‘砭山酥’梨再生体系的报道较少。现以‘砭山酥’梨叶片为试材, 研究了不同种类基本培养基、不同浓度的植物生长调节物质、不同抗氧化剂及碳源对‘砭山酥’梨叶片再生的影响, 以及不同浓度IBA对再生芽生根的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘砭山酥’梨的带芽枝条于2010年4月采自西北农林科技大学南校区。

1.2 试验方法

1.2.1 初代培养 从田间取树势强壮的成年树1 a生枝

第一作者简介:付镇芳(1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为园艺植物遗传与育种。E-mail: fuzhenfang0209@163.com。

责任作者:王跃进(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 现主要从事葡萄种质资源与生物技术育种研究工作。E-mail: wangyuejin@263.net。

基金项目:国家“863”计划资助项目(2007AA10Z182); 陕西省重点科技专项资助项目(2006kz05-G4)。

收稿日期:2011-04-11

[5] 张培栋. 西部地区草地生态补偿机制的构建[J]. 中国林业, 2007(5): 57.

[6] 黄世华. 玛曲草地生态补偿机制和补偿资金初探[J]. 草原与草坪, 2008(5): 73-76.

Research on Ecological Compensation for the Grassland Ecological System

CAO Su-zhen¹, GUO Shu-qing¹, GONG Hong-dong¹, MA Hai-cai¹, CAO Jian-jun²

(1. Gansu Normal University for Nationalities, Hezuo, Gansu 747000; 2. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract: In this paper, we selected Maqu as a study area, and explored how to achieve the compensation. The results showed that downstream of the Yellow River must pay the herders of Maqu 2.2×10^8 RMB per year in order to promote their enthusiasm of protection, thus, each herd would be compensated about 5 500 RMB per year in order to improve his welfare.

Key words: grassland; degradation; Maqu; ecological compensation

条,剪成 2~3 cm 长的单芽茎段,洗衣粉水洗涤 2~3 次,自来水冲洗 2 h,在超净工作台上用 0.1%的升汞消毒 7 min,无菌水冲洗 3~5 次,接种在 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+PVP 1 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L,灭菌前将培养基 pH 调至 5.8。每瓶接种 1 个单芽茎段。待萌发芽长 1~2 cm 将其剪下接种到 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L。

1.2.2 不定芽的诱导 切取继代培养 25~30 d 的试管苗中上部展开的幼嫩叶片,去掉叶柄 垂直叶片中脉横切伤 2 刀,远轴面向下,接种在叶片不定芽再生培养基上。基本培养基对叶片再生的影响:分别接种叶片在 MS、1/2MS、NN₆₉ 3 种不同培养基上,每种培养基都附加 6-BA 3.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 6 g/L, pH 为 5.8。不同激素浓度对叶片再生的影响:接种叶片于培养基 NN₆₉+蔗糖 20 g/L+琼脂 6 g/L,并附加不同浓度的 6-BA、IBA 的培养基上再生不定芽。不同碳源对叶片再生的影响:接种叶片于培养基 NN₆₉+6-BA 3.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+琼脂 6 g/L, pH 5.8,培养基中分别加入蔗糖和山梨醇作为叶片再生的碳源,每种碳源均设置 3 个浓度梯度,10、20 和 30 g/L。

1.2.3 不同浓度 IBA 对生根的影响 将诱导出的不定芽切下,转移到 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 培养基上培养,不定芽发育成的不定梢生长正常。取继代培养 2 次的‘砀山酥’叶片再生苗茎段,高度 1~2 cm 左右的不定梢,接种于 ASH+间苯三酚 80 mg/L+蔗糖 15 g/L+琼脂 6 g/L, pH 为 5.8 的培养基上,暗培养 7 d 后取出转接到不含 IBA 的 ASH 培养基上进行光培养,获得了生根植株。培养条件:培养温度(25±2)℃,光周期 14 h,光源为日光灯,光照强度 2 000 lx。

1.3 数据分析
试验数据采用 SAS 软件进行分析,用新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 叶片再生不定芽

叶片接种 10 d 后,开始隆起肿胀,在叶片切伤处产生少量淡黄色愈伤组织。经过 20 d 暗培养,愈伤组织明显增大并形成块状,主要在叶背中脉处形成(图 1 B),光培养 5 d 后,愈伤组织变为黄绿色,出现黄绿色芽点,形成不定芽。不定芽有的呈单个分布(图 1 C),部分芽呈簇状。

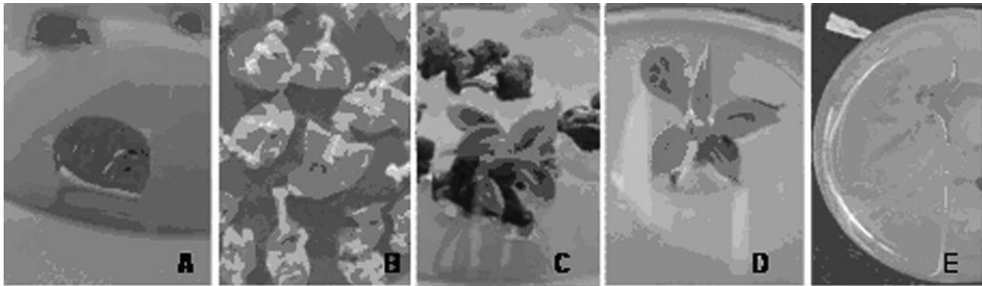


图 1 ‘砀山酥’梨叶片再生过程
注: A 叶片外植体; B 叶片暗培养 20 d 后; C 叶片再生的不定芽; D 再生不定芽转入新鲜的培养基; E 不定芽生根。

2.2 不同基本培养基对‘砀山酥’梨叶片再生不定芽的影响

在 3 种培养基上叶片都能再生不定芽(表 1), NN₆₉ 培养基不定芽再生效果较好,再生率达到 64.37%,再生芽数为 0.81。而 1/2MS 和 MS 培养基上,再生效率较低,不到 NN₆₉ 培养基的 1/3,再生芽数仅为 NN₆₉ 培养基的 1/4,试验结果表明, NN₆₉ 培养基作为‘砀山酥’梨叶片再生不定芽的基本培养基是最适宜的。

2.3 不同激素浓度对不定芽再生的影响

由表 2 可知,所有激素组合中都能诱导不定芽的再生,不同浓度 6-BA 和 IBA 对‘砀山酥’梨叶片再生效率影响不同。组合 6-BA 3.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L

的再生频率最高 64.37%,再生芽数最多 0.81,其次为 6-BA 2.5 mg/L+IBA 0.3 mg/L 组合,再生率为 48.69%,再生芽数 0.62。这 2 个激素组合叶片再生率显著高于其它激素组合,说明高浓度的 6-BA 和低浓度的 IBA 有利于‘砀山酥’梨叶片再生不定芽。

表 1 不同基本培养基对‘砀山酥’梨叶片再生不定芽影响

培养基类型	再生率/ %	平均不定芽诱导数/ 个
1/2MS	19.36 b	0.2
MS	17.90 b	0.21
NN ₆₉	64.37 a	0.81

注:相同字母表示经最小显著极差法检测无显著差异(P=0.05)。下同。

表 2 不同浓度激素对‘砀山酥’梨叶片再生不定芽影响

不同激素浓度		再生率	平均不定芽诱导数
6-BA /mg ° L ⁻¹	IBA /mg ° L ⁻¹	/ %	/ 个
2.5	0.1	32.21 cd	0.47
2.5	0.2	35.85 cd	0.42
2.5	0.3	48.69 b	0.62
2.5	0.4	33.02 cd	0.36
3.0	0.1	31.74 cd	0.40
3.0	0.2	64.37 a	0.81
3.0	0.3	42.39 bc	0.52
3.0	0.4	23.20 d	0.38

2.4 不同抗氧化剂对叶片再生不定芽的影响

由表 3 可知,不同抗氧化剂对‘砀山酥’梨叶片再生影响效果不同。使用 PVP 与活性炭时再生频率低,再生芽数最少,外植体褐化严重。当使用 AgNO₃ 时叶片再生频率显著高于其它 2 个处理,再生芽数也最多。不同抗氧化剂的使用影响‘砀山酥’梨叶片再生不定芽,使用 AgNO₃ 有利于叶片再生不定芽。

表 3 不同抗氧化剂对‘砀山酥’梨叶片再生不定芽影响

不同抗氧化剂	再生率/ %	平均不定芽诱导数/ 个
PVP/1 g ° L ⁻¹	11.94 b	0.12
活性炭/1 g ° L ⁻¹	1.30 c	0.01
AgNO ₃ /0.5 mg ° L ⁻¹	54.05 a	0.69

2.5 2 种碳源对不定芽再生的影响

由表 4 可知,山梨醇对梨叶片再生不定芽有明显影响。与含蔗糖培养基相比,梨叶片在含山梨醇的培养基上再生率明显提高,为 74.03%,且再生芽数最多,为 1.01。说明在‘砀山酥’梨叶片再生不定芽过程中山梨醇作为碳源有着极强的优势。不同浓度的山梨醇对‘砀山酥’梨叶片再生也有显著影响,在山梨醇浓度为 10 g/L 时再生率最高,显著高于浓度为 20、30 g/L,低浓度的山梨醇更适合做为叶片再生不定芽的碳源,最佳浓度为 10 g/L。

表 4 山梨醇对‘砀山酥’梨叶片再生不定芽影响

碳源类型	浓度/g ° L ⁻¹	再生率/ %	平均不定芽诱导数/ 个
蔗糖	10	48.21 b	0.64
蔗糖	20	55.30 b	0.62
蔗糖	30	28.07 c	0.28
山梨醇	10	74.03 a	1.01
山梨醇	20	22.11 c	0.21
山梨醇	30	16.18 c	0.15

2.6 不同浓度 IBA 对不定芽生根的影响

该研究采用二次生根法,所有再生苗在不同高浓度 IBA 暗培养 7 d 后,基部出现不同程度的膨大,转入不加任何激素的 ASH 培养正常光照培养 3~4 周后,再生苗基部诱导长出根。不同浓度 IBA 对‘砀山酥’梨叶片再生苗生根影响不同,IBA 浓度为 10 mg/L 时,生

根率最高 36.67%,显著高于其它 3 个浓度,同时在 IBA 浓度为 10 mg/L 时平均生根数也是最多的,为 0.63(图 1D),但是 IBA 浓度为 15 mg/L 时平均根最长,为 4.00 cm。综合考虑以上结果,IBA 浓度为 10 mg/L 时‘砀山酥’梨叶片再生苗生根的最适浓度。

表 5 不同浓度 IBA 对‘砀山酥’梨叶片再生不定芽影响

IBA 浓度 /mg ° L ⁻¹	生根率/ %	平均生根数/ 个	平均根长/ cm
5	3.33 d	0.03	1.70
10	36.67 a	0.63	3.46
15	30.00 b	0.50	4.00
20	23.33 c	0.33	1.52

3 讨论与结论

影响外植体离体再生的因素很多,可以分为外植体自身因子(基因型、外植体类型、叶片极性和外植体生理生化状态等)和外界因子(如培养基、激素种类和配比、培养条件等)二方面。外植体自身因素决定其再生能力,外界因素影响外植体的再生效果。对于特定梨品种,只有通过其它因素的影响获得再生和提高再生效率。

基本培养基是影响‘砀山酥’梨叶片再生不定芽的重要因素,对于梨的再生,品种不同适合再生的培养基也不同。大量有关梨叶片不定芽再生的研究结果表明^[16-17],组织培养中广泛使用的 MS 培养基普遍不适于梨叶片不定芽的诱导,而用 NN₆₉ 则效果显著。赵竑博等^[18] 在‘砀山酥’梨的再生中使用 MS、1/2MS、NN₆₉、WPM 4 种基本培养基,NN₆₉ 最好,这与该研究结果是一致的,NN₆₉ 适于‘砀山酥’梨叶片再生,且再生效果显著。基本培养基对外植体再生的影响在于其组成成分和浓度是否适宜外植体再生。NN₆₉ 同 MS 等培养基的区别主要是 NN₆₉ 的无机盐成分较低,无机盐含量约为 MS 的一半,又增添了生物素和叶酸成分。也许是这些因素影响了‘砀山酥’梨叶片的再生。

植物激素和植物生长调节剂的种类及其配比不仅是影响果树叶片培养成功与否、再生率高低的关键因素,而且还决定着愈伤组织的分化方向^[19]。植物再生率的高低与所用植物激素的种类、浓度及组合有密切关系,关于 6-BA、IBA 使用效果的比较,报道不尽一致,只有适当的细胞分裂素和生长素及其适宜的浓度配比才能获得满意的不定芽再生效果。该研究中 6-BA 3.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 组合叶片再生率最高,为 64.37%,再生芽数 0.81。

梨离体再生过程中会出现外植体被氧化而褐化,产生乙烯影响梨叶片的再生。该研究结果表明,3 种抗氧化剂中,硝酸银的效果最好。培养基中的生长素会促进乙烯的产生,密闭的培养容器会使乙烯逐渐累

积, 累积的乙烯可使培养物的生长分化受到影响^[20]。据报道^[21], 硝酸银可抑制乙烯的合成, 从而促进愈伤组织再生芽的能力。在培养基中加入硝酸银, 可以明显提高梨叶片的再生频率^[22]。

碳源用于满足培养物所需的碳骨架、能源及渗透压调节。不同碳源与碳源使用量对梨叶片再生影响明显。碳源用量过高、过低都不利于叶再生。在对梨砧木 OHF333 的叶片培养中, Zhu 等^[15]证实了山梨醇的效果更佳。该试验比较了山梨醇和蔗糖, 发现山梨醇浓度为 10 mg/L 不定芽诱导效果极佳。

IBA、IAA 或 NAA 是诱导不定芽生根的较好的激素^[23], 但近年来发现, IBA 比 IAA 生根作用更强, 原因是 IBA 比 IAA 稳定^[24]。不同浓度生长素对梨生根的试验中得出, 4 个浓度 IBA 对‘砀山酥’梨再生苗生根有很大的影响。综合考虑生根率、平均生根数和平均根长 IBA 浓度为 10 mg/L 对‘砀山酥’梨生根最好。

参考文献

- [1] 鲍为民, 曹三强, 孙竟锋. 13 个梨品种对黑星病的抗性鉴定[J]. 农技服务, 2009, 26(11): 68-69, 75.
- [2] Laimer M, Camara Machado A da, Hazer V, et al. Regeneration of shoot from leave discs and stem microcuttings of fruit trees as a tool for transforation[J]. Aeta Hortieulturase, 1988, 235: 85-92.
- [3] Predieri S, Fasolo Fabbri Malavasi F, Passey A, et al. Regeneration from *in vitro* leaves of conference and other pear cultivar[J]. J. Hortie. Scé., 1989, 64: 553-559.
- [4] Chevreau E, Skirvin M R, Abu-Qaoud H A, et al. Adventitious shoot regeneration from leave tissue of three pear (*Pyrus* sp.) *in vitro*[J]. Plant Cell Reports, 1989, 688-691.
- [5] Leblay C, Chevreau E, Rbaoin L M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 25: 99-105.
- [6] Chevreau E, Leblay C. The effect of mother plant pretreatment and explant choice on regeneration from *in vitro* pear leaves[J]. Aeta Hort, 1993, 336: 263-268.
- [7] 孙清荣, 孙洪雁. 西洋梨‘丰产’叶片不定梢再生[J]. 落叶果树, 1999(4): 9-10.

- [8] Moretti C, Seozzoli A, Pasini D, et al. *In vitro* propagation of pear cultivars[J]. Aeta Hortieulturase, 1992, 300: 115-118.
- [9] 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.
- [10] 孙清荣, 孙洪雁, 郑红军. 乙烯抑制剂 AgNO₃ 对梨叶片再生不定梢的促进作用[J]. 落叶果树, 1998(4): 8-10.
- [11] 韩志成, 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.
- [12] 孙清荣. 金花梨叶片不定梢诱导研究[J]. 落叶果树, 2000(3): 8-10.
- [13] 孙清荣, 樊圣华, 刘庆忠. 大鸭梨叶片高频率不定梢再生诱导研究[J]. 山东农业科学, 2003(2): 10-12.
- [14] 及华. 梨 S 系矮化砧组培快繁技术体系研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2002.
- [15] Zhu L H, Welander M. Adventitious shoot regeneration of two dwarfing pear rootstocks and the development of a transformation protocol[J]. Journal of Hortieultural Science and Biotechnology, 2000, 75(6): 745-752.
- [16] 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.
- [17] 孙清荣. 金花梨叶片不定梢诱导研究[J]. 落叶果树, 2000(3): 8-10.
- [18] 赵竑博, 徐凌飞, 马锋旺, 等. 砀山酥梨叶片培养和植株再生[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 153-157.
- [19] 裴东, 郑均宝, 凌艳荣, 等. 红富士苹果试管培养中器官分化及其部分生理指标的研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 229-234.
- [20] Lentini Z, Mussel H, Mutschler M A, et al. Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development in vitro rapid-cycling *Brassica campestris* L.[J]. Plant Sci, 1981, 54(1): 75-80.
- [21] Palmer C E. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* silver nitrate[J]. Plant Cell Rep, 1992(11): 541-546.
- [22] 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.
- [23] 王金祥, 严小龙, 潘瑞焱. 不定根形成与植物激素的关系[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 133-142.
- [24] 朱青松, 梅康明, 王沙生. 外源生长素对烟草愈伤组织分化和内源 IAA 含量的影响[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(1): 22-25.

Primary Establishment of Plant Regeneration System of Pear Scion Cultivar ‘Dangshansu’

FU Zhen-fang, MENG Hao-guang, ZHANG Chao-hong, WANG Yue-jin

(College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Key Laboratory of Horticultural Plant Germplasm Resources Utilization in Northwest China, Ministry of Agriculture of China, Shaanxi Key Laboratory for Molecular Biology of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Pear scion cultivar ‘Dangshansu’ was chosen as material. The factors which include medium, plant growth regulators, antioxidant, and concentration of sorbitol that influence adventitious buds regeneration from leaf were examined systematically. The results showed that the optimal combination for leaf regeneration of pear cultivar ‘Dangshansu’ was NN69+6-BA 3.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+agar 6 g/L at the beginning of culture. AgNO₃ was more excellent than activated carbon and PVP. Compared with sugar as carbon sources of regeneration, sorbitol was more appropriate, optimal concentration was more suitable for 10 mg/L. The highest regeneration frequency of pear cultivar ‘Dangshansu’ was 74.03%, and the mean bud number per leaf was 1.01. The regenerated shoots were rooted on ASH+IBA 10 mg/L+phloroglucinol 80 mg/L+agar 6 g/L+ sucrose 6 g/L.

Key words: pear; leaf culture; sorbitol