

库尔勒香梨叶片不定芽再生诱导的研究

秦 璐, 陈 泉, 梁志强, 祝建波

(石河子大学 生命科学院, 新疆 石河子 832000)

摘 要:以库尔勒香梨幼叶为外植体,研究基本培养基种类、外源激素浓度、 AgNO_3 浓度及接种叶片的放置方向对叶片不定芽再生的影响。结果表明:培养基的种类是影响叶片能否获得再生不定芽成功的关键,NN69 培养基是香梨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+TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L 为最佳;附加 0.5 mg/L AgNO_3 有利于叶片再生;以叶片远轴面接触培养基比近轴面接触培养基更利于不定芽的再生;结合 21 d 暗培养香梨叶片再生频率最高可达到 64.3%,再生芽数最高为 2.59。

关键词:库尔勒香梨;叶片再生;不定芽

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)09-0076-04

新疆库尔勒香梨(*Pyrus sinkiangensis* Yü)果实呈纺锤形或倒卵形,果皮黄绿色,阳面有红晕,肉质细腻,酥脆,味甜。此梨为新疆特色品种,主要分布在巴音郭楞州的库尔勒市、轮台县和各团场,是该地区重要的出口创汇品种。但是近年来由于香梨的不抗腐烂病,优斑螟及储藏褐变,导致产量、果品下降^[1-2],严重影响到了该产品的销售,亟待进行品种的改良和优化。由于梨童期长、杂合程度高等原因,给常规杂交育种带来了很大的困难。目前,体细胞诱变育种和遗传转化为梨品种改良提供了新的手段,而以叶片为外植体建立高效的再生体系成为了品种改良的关键。

关于梨再生体系的建立,早在 1979 年 Lane^[3] 茎尖培养获得了成功。1982 年赵惠祥^[4] 以“锦丰”和“早酥”的顶梢为材料培养出完整植株。1988 年 Laimer 等^[5] 以西洋梨 Conference 试管苗叶片为材料,在多激素的配合下获得不定梢。到目前为止,锦丰^[6]、鸭梨、秋白梨^[7]、金花^[8]、幸水、丰水^[9] 等品种均已在离体培养上取得了成功。然而针对库尔勒香梨再生的报道较少,该研究以库尔勒香梨叶片为试验材料,研究了不同培养基、不同种类和浓度的外源激素、不同叶片放置方向及不同浓度的 AgNO_3 对香梨叶片再生的影响,以期通过库尔勒香梨叶片再生的试验,为梨树品种改良和进一步的遗传转化操作奠定基础,为其它梨品种叶片再生提供参考。

第一作者简介:秦璐(1990-),女,硕士研究生,研究方向为基因工程。E-mail:qinlu689@163.com.

责任作者:祝建波(1967-),男,博士,研究员,现主要从事植物基因工程等研究工作。E-mail:zjbshz@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(c020406)。

收稿日期:2015-01-16

1 材料与方法

1.1 试验材料

库尔勒香梨当年生枝条取自新疆库尔勒市 29 团园五连,经单芽茎段消毒进行无菌培养,建立试管苗无性繁殖系。

1.2 试验方法

1.2.1 不同培养基和外源激素对叶片再生的影响 选取香梨生长旺盛的无菌苗的顶端幼嫩叶片,垂直于叶片主脉于远轴面将叶片切 2~3 刀^[8,10],接种于诱导培养基上。再生培养基为 NN69、MS、B5 3 种培养基,均附加琼脂 6 g/L,蔗糖 30 g/L,用 NaOH 调 pH 5.8。并附加 0.5 mg/L AgNO_3 和不同浓度的 TDZ、IBA,按照 3 因素 3 水平设计正交实验 $L_9(3^4)$,见表 1,共 9 个处理(表 2)。每个三角瓶 3 片叶,以远轴面接触培养基,每个处理 6 瓶,重复 3 次。

1.2.2 不同叶片放置方向对叶片再生的影响 试验选用培养基为 NN69+TDZ 1.0 mg/L,附加以不同浓度的 IBA(0.1、0.3、0.5 mg/L),以 2 种方式接种于上述培养基上:一是叶片远轴面接触培养基,二是近轴面接触培养基,每个三角瓶接种 3 片叶,每个处理 3 瓶,重复 3 次。

1.2.3 不同 AgNO_3 浓度对叶片再生的影响 试验选用培养基为 NN69+TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L,添加不同浓度的 AgNO_3 (0、0.5、1.0、1.5 mg/L)以远轴面接触培养基的方式进行接种,每个三角瓶接种 3 片叶,每个处理 3 瓶,重复 3 次。

1.2.4 培养条件 所有处理均在接种叶片后进行 21 d 的暗培养,再转移至光下培养,培养条件为温度(25±2)℃,光强 2 500 lx,光照时间 10 h/d。

1.3 数据分析

叶片接种 50 d 后进行调查并计算叶片再生率(%) 和再生芽数(个/片),再生频率(%)=(再生芽叶片数/接种总叶片数)×100%;再生芽数=再生总芽数/接种总叶片数。并运用 SPSS 软件对结果进行方差分析,显著水平为 0.05。

表 1 试验因子水平

Table 1		Factor and level	
水平	因子 Factor		
Level	基本培养基	噻苯隆	吲哚丁酸
	Medium	TDZ/(mg·L ⁻¹)	IBA/(mg·L ⁻¹)
1	NN69	0.5	0.3
2	MS	1.0	0.5
3	B5	2.0	1.0

2 结果与分析

2.1 叶片再生过程

叶片接种 3 d 后,外植体卷曲,7 d 开始出现黄白色愈伤,14 d 出愈率可达到 100%。暗培养 21 d 后,转至光下培养,愈伤组织明显膨大,主要位于叶脉处,个别出现黄绿色芽点。接种 35 d 左右,愈伤变为黄绿色或绿色,继而出现嫩绿色的芽点,形成不定芽。不定芽多为单个分布,也存在丛生芽。接种 50 d 后不定芽长至约 2.0 cm,长势良好。不定芽多发生在叶基部伤口,叶尖伤口无不定芽产生。

2.2 不同培养基和外源激素对叶片再生的影响

表 2 表明,不同处理间叶片再生效率差异较大。2 号处理再生频率最高,为 57.2%,其再生芽数为 2.54,4 号处理再生频率最低,为 3.3%,其再生芽数为 0.23。*R* 值为极值,其值越大表示该因素对叶片再生的影响越大。因此,在该试验中,培养基对叶片再生的影响最大,其次是 TDZ 的浓度。

3 种培养基中 NN69 的 *L* 值最大,为 1.524,说明 NN69 培养基更适合用于香梨的叶片再生;其次是 B5 培养基,其 *L* 值为 0.892;*L* 值最低的为 MS 培养基,仅有 0.134。培养基 *L* 值最高值和最低值相差 10 倍以上,说明不同培养基对叶片再生的影响极大,即诱导培养基的基本元素组成是决定叶片能否诱导出不定芽的关键因素。TDZ 浓度为 0.5 mg/L 和 2.0 mg/L 时均会降低叶片的再生频率,但是在浓度为 2.0 mg/L 时配合 B5 培养基可使再生芽数增加,而在与 MS 和 NN69 的组合中,这一现象并不明显。

表 2 表明,当培养基为 NN69,TDZ 浓度为 1.0 mg/L,IBA 浓度为 0.3 mg/L 时叶片再生的频率最高,即 NN69+TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L 为最优组合,可作为香梨叶片再生的最优培养基使用。

2.3 不同叶片放置方向对叶片再生的影响

由表 3 可知,不同的叶片放置方向对叶片再生有较

表 2 不同培养基和
外源激素对叶片再生的影响Table 2 Influence of different medium and
plant growth regulators on bud regeneration of the leave

组合号	培养基	噻苯隆	吲哚丁酸	再生频率	再生芽数
Combination No.	Medium	TDZ/(mg·L ⁻¹)	IBA/(mg·L ⁻¹)	Regeneration frequency/%	Bud number per leave/(个·片 ⁻¹)
1	NN69	0.5	0.1	43.9	2.11
2	NN69	1.0	0.3	57.2	2.54
3	NN69	2.0	0.5	51.3	2.52
4	MS	0.5	0.3	3.3	0.23
5	MS	1.0	0.5	4.1	0.45
6	MS	2.0	0.1	6.0	0.44
7	B5	0.5	0.5	24.2	1.04
8	B5	1.0	0.1	35.2	1.32
9	B5	2.0	0.3	29.8	1.62
L1	1.524	0.714	0.851		
L2	0.134	0.965	0.903		
L3	0.892	0.871	0.796		
R	0.632	0.251	0.134		

注:*L* 代表各处理水平上再生频率之和;*R* 代表处理中最大再生频率和最小再生频率之差。

Note:*L* represents the sum of the regeneration frequency in all deal;*R* represents the discrepency between the max regeneration frequency and the min regeneration frequency in all deal.

表 3 叶片放置方向对叶片再生的影响

Table 3 Effect of leaf direction on
shoot regeneration of leaves

IBA 浓度	叶片放置方向	再生频率	再生芽数
IBA concentration	Leaf direction	Regeneration frequency/%	Shoot number per leaf/(个·片 ⁻¹)
/(mg·L ⁻¹)			
0.1	远轴面接触培养基	43.9	2.12
	近轴面接触培养基	32.1	1.44
0.3	远轴面接触培养基	56.3	2.57
	近轴面接触培养基	52.0	1.38
0.5	远轴面接触培养基	51.4	2.52
	近轴面接触培养基	43.2	1.10

大的影响。试验中的 3 组培养基组合均表现为:叶片远轴面接触培养基的接种方式比近轴面接触培养基的接种方式更有利于提高叶片的再生频率和再生芽数。其中远轴面接触培养基的接种方式比近轴面接触培养基的接种方式的再生芽数高出 1 倍左右。因此,从叶片不定芽再生频率和再生芽数 2 方面看,香梨叶片再生的接种方式以远轴面接触培养基的方式为最适宜。

2.4 不同 AgNO₃ 浓度对叶片再生的影响

表 4 表明,AgNO₃ 的浓度在该试验中为 0.5 mg/L 时最适宜香梨叶片的再生。一定范围内提高 AgNO₃ 的浓度,可以提高叶片的再生频率,但是超过一定浓度时 AgNO₃ 对外植体有明显的毒害作用,可使外植体明显褐化,大幅降低叶片的再生频率和再生芽数。

3 讨论与结论

大量的文献表明,梨叶片再生过程中培养基的选择至关重要,不同梨树品种叶片不定芽再生所需要的基本培养基有所不同,主要用于果树叶片再生培养的培养基

表4 不同浓度 AgNO_3 对叶片再生的影响Table 4 Influence of different concentration of AgNO_3 on shoot regeneration of leaves

AgNO_3 浓度 AgNO ₃ concentration /(mg · L ⁻¹)	再生频率 Regeneration frequency /%	再生芽数 Shoot number of per leaf /(个 · 片 ⁻¹)
0	49.1	1.29
0.5	64.3	2.59
1.0	53.7	1.18
1.5	39.6	0.98

有 NN69、MS、1/2MS、B5、QL 等^[6-9]。大多研究结果表明 MS 培养基不适合梨叶片不定芽的诱导,而 NN69、B5 培养基在梨不定芽的诱导方面作用显著^[8,11]。但是不同基因型的梨种之间也可能存在差异,有报道称 1/2MS 培养基比较适合西洋梨康佛伦斯的叶片不定芽的再生。该试验采用 MS、NN69、B5 作为基本培养基对这一观点进行验证,后二者对香梨叶片不定芽的诱导与前者存在显著差异,MS 培养基不利于香梨的叶片再生,NN69 为香梨的最适合培养基,这与孙清荣^[8]和王莉萍^[12]报道的结论一致。试验所使用的 3 种培养基在有机元素的种类和含量方面存在较大的差异,可能是影响再生的原因之一。不同基因型的梨种适应其生长的细胞分裂素和生长素的配比也存在着较大的差异。常用的植物激素为 TDZ^[13]、ZT 和 6-BA 等细胞分类素及 NAA、IBA 和 IAA 等生长素。孙清荣等^[14]的研究结论表明 TDZ 比 6-BA 更适合大鸭梨叶片不定芽的再生,而 Caboni 等^[15]的研究结论表明 IBA 对梨叶片不定芽再生的诱导效果优于 TDZ。一般而言,NAA 是西洋梨再生最常用的生长素,东方梨以 IBA 为主,库尔勒香梨属于新疆梨,是东方梨亚组之一^[16]。因此,该试验参照孙清荣等的结论使用 TDZ 和 IBA 的组合进行配比,并得出最适合香梨叶片再生的 TDZ 和 IBA 浓度分别为 1.0 mg/L 和 0.3 mg/L,配合 NN69 培养基,再生频率可以达到 57.2%,再生芽数为 2.54。当 IBA 浓度较高时,改变了细胞分裂素和生长素的比值,再生率下降,因此细胞分裂素和生长素的比值是叶片再生的重要影响因素之一。

叶片的接种方向对于其不定芽再生的影响之前的研究者得到了不同的结论,大量结果表明叶片接种的方向对于叶片的再生起到决定性的作用,远轴面接触培养基比近轴面接触培养基更有利于叶片不定芽的再生^[15,17]。原因可能是叶片远轴面和近轴面的结构差异较大,远轴面叶肉细胞较为疏松且具备较多气孔,近轴面叶肉细胞

结构较为紧实,相比之下远轴面接触培养基更易吸收营养。一定浓度的 AgNO_3 可提高叶片不定芽的再生频率,其原因可能是由于加入的 AgNO_3 中的银离子与细胞膜上的乙烯受体相结合,从而阻止或降低了乙烯对于叶片再生的抑制作用,进而提高了叶片不定芽再生的频率。试验中,当 AgNO_3 浓度升高到 2.0 mg/L 时,由于银离子的毒害作用抑制叶片不定芽的再生,结果表明 0.5 mg/L 的 AgNO_3 对于香梨叶片不定芽再生具有显著地促进作用。

参考文献

- [1] 王国平,洪宽,张尊平,等.我国北方梨产区主栽品种病毒种类的鉴定研究[J].中国果树,1994(2):1-4.
- [2] 洪宽,王国平,张尊平,等.梨病毒脱除技术研究[J].中国果树,1995(4):5-7,24.
- [3] Lane D. Regeneration of Pear plants from shoot meristem tips[J]. Plant Science Lett, 1979(13):181-285.
- [4] 赵惠祥.梨茎尖离体培养[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1982(4):392-394.
- [5] Laimer M, Camara M A, Hanzer V, et al. Regeneration of shoots from leaf discs and stem microcuttings of fruit trees as a tool for transformation[J]. Acta Horticulturase, 1988, 235:85-92.
- [6] 薛光荣,杨振英,史永忠,等.锦丰梨花粉植株的诱导[J].园艺学报,1996(2):123-127.
- [7] 薛光荣,杨振英,洪宽,等.茎尖培养等处理脱除梨病毒的技术研究[J].中国果树,1996(3):9-11.
- [8] 孙清荣.金花梨叶片不定梢诱导研究[J].落叶果树,2000(3):8-10.
- [9] 孙清荣,孙洪雁,刘庆忠.丰水梨的组培快繁研究[J].落叶果树,2001(4):4-5.
- [10] 孙清荣.影响苹果叶片不定芽再生的几个因素[J].落叶果树,1995(4):3-4.
- [11] Lane W D, Iketani H, Hayashi T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese (*Pyrus pyrifolia*) [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1998, 54(1):9-14.
- [12] 王莉萍.阿月浑子和库尔勒香梨微繁殖技术研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2004.
- [13] 张志宏,景士西,王关林. TDZ 对苹果叶片离体再生不定芽的效应(简报)[J].植物生理学通讯,1997(6):420-423.
- [14] 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.
- [15] Caboni E, Tonelli M G, Lauri P, et al. In vitro shoot regeneration from leaves of wild pear[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 59(1):1-7.
- [16] 路娟,吴俊,张绍铃,等.不同系统梨种质遗传多样性与分类关系的 SSR 分析[J].南京农业大学学报,2011(2):38-46.
- [17] 陶爱群,尹婷,谢深喜.黄金梨叶片再生体系建立研究[J].湖南农业科学,2012(5):108-111.

Study on Regeneration of Adventitious Bud from Leaves of *Pyrus sinkiangensis* Yü

QIN Lu, CHEN Quan, LIANG Zhi-qiang, ZHU Jian-bo

(College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

冷诱导基因转录因子 *CBF1* 转入黄瓜的研究

谭克¹, 赵福顺¹, 吴慧杰¹, 宋述尧²

(1. 吉林省蔬菜花卉科学研究院, 吉林 长春 130033; 2. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

摘要:以抗冷性强的黄瓜“山东5号”为试材,研究冷诱导转录因子 *CBF1* 基因对黄瓜抗冷性的影响。从“山东5号”黄瓜基因组 DNA 中扩增并克隆了冷诱导转录因子 *CBF1* 基因,将其与 CaMV 35S 启动子和 Nos 终止子融合后构建成植物表达载体 pROK₂-*CBF1*。通过花粉管通道法转化黄瓜植株,获得了具有卡那霉素抗性的黄瓜再生植株。结果表明:*CBF1* 基因已整合到黄瓜基因组中,转基因植株胁迫期间可溶性糖含量、幼苗含水量显著高于对照;MDA 含量、叶片电解质渗透率显著低于对照,黄瓜已具备了较强抗冷性。

关键词:*CBF1* 转录因子;抗冷;遗传转化;黄瓜

中图分类号:S 642.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)09-0079-04

低温引起的冷害会引起农作物严重减产甚至绝收,传统的杂交育种方法已经培育出许多抗寒作物,但都需要较长的周期,而植物基因工程的发展为培育抗寒作物提供了一条崭新的途径。近年来,已克隆了一系列与抗寒有关的基因,将其转入植物中,可获得抗寒力较高的植物^[1-2]。

在拟南芥中发现的以 CRT/DRE 为主要元件介导的低温和脱水响应信息途径,为植物的抗寒性研究提供了新思路^[3-4]。COR 是冷应答蛋白,在冰冻、ABA 及干旱条件下诱导产生。Jaglo-Ottosen 等^[5]在拟南芥中利用共隔离分子标记法发现, *COR* 基因包括 *COR616*、*COR15a*、*COR47* 及 *COR78* 4 种。在这些 *COR* 基因的启动子中均发现了 CRT/DRE 基序^[6]。CRT/DRE

(C-repeat/Dehydration Responsive Element)是一段 DNA 顺式作用因子,它含有一段中心保守序列 CCGAG,在许多冷诱导的植物基因启动子中,以一个或多个拷贝形式存在。如拟南芥基因 *COR15a* 和 *COR78/RD29a* 及油菜基因 *BNI15* 都存在 CRT/DRE^[7-8]。CRT/DRE 作为一个冷诱导的顺式作用因子,最早是由 Shinozaki 发现的。通过试验,他们发现在拟南芥 *COR78/RD29a* 基因的启动子中,有 2 段 9 bp 的 C-repeat DNA 片段,当把这 2 个片段与报告基因相连时,能诱导冷调控基因的表达。其具体途径是 CBF 转录因子→CRT/DRE 基序→*COR* 基因表达→植物抗寒性增加,即转录活性因子 CBF 结合到 CRT/DRE 基序上,诱导了 *COR* 基因表达,从而提高了植物的抗寒性^[9-14]。

该研究构建了由光合启动子 CaMV 35S 调控下的 *CBF1* 融合基因植物表达载体 pROK₂-*CBF1*,并通过花粉管通道法导入黄瓜^[15],对得到的黄瓜植株进行了 PCR 鉴定和抗冷性检测,以期能为植物抗寒新种质资源的快速获得提供一种新途径。

第一作者简介:谭克(1982-),男,吉林长春人,硕士研究生,助理研究员,研究方向为蔬菜育种。E-mail:foolish1982321@sina.com.

责任作者:宋述尧(1957-),男,吉林长春人,教授,博士生导师,研究方向为蔬菜生理。E-mail:syongjilau@126.com.

收稿日期:2015-02-11

Abstract: Taking Korlas frant pear (*Pyrus sinkiangensis* Yü) young expanded leaves extracted as explants, the effect of element composition of basic medium, the concentration of plant growth regulators, AgNO₃ concentration and leaf direction on the medium on shoot regeneration were studied. The results showed that the element composition of basic media was the major factor affecting the shoot regeneration. NN69 medium was the optimal basic medium for the adventitious shoot regeneration from leaves of the *Pyrus sinkiangensis* Yü and the optimum medium was NN69 medium with 1.0 mg/L thidiazuron and 0.3 mg/L indole-3-butyric acid. AgNO₃ enhanced the regeneration efficiency while its concentration was 0.5 mg/L. Adventitious buds was easier induced with the leaf abaxial side touching the medium than with the other side. After 21 days dark culture, the maximum regeneration frequency was 64.3% and the maximum bud number per explant was 2.59.

Keywords: Korlas frant pear (*Pyrus sinkiangensis* Yü); regeneration from leaves; adventitious buds