

秋子梨茎段薄层细胞培养再生初探

周佳红¹, 邢才华², 曹慧², 王德芬², 杨春蕾², 李鼎立²

(1. 长岛富涛建筑有限公司, 山东 烟台 265800; 2. 青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109)

摘要:以秋子梨试管苗为试材,进行了其茎段薄层细胞组织培养再生体系的构建,以期秋子梨无性繁殖和工厂化育苗奠定基础,同时为薄层细胞培养在梨属植物当中的应用提供参考。结果表明:秋子梨茎段薄层细胞的再生受到激素浓度和配比的影响,其中不定芽再生最佳培养基为 MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂糖 7 g/L,再生效率达 100%;不定根再生最佳培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂糖 7 g/L,根再率达 66.7%;同时研究还发现适宜的暗培养有助于愈伤组织的诱导和不定芽的再生。

关键词:秋子梨;薄层细胞;再生;茎段

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)06-0095-04

秋子梨(*Pyrus ussuriensis*)原产于中国,是梨种中最抗寒的砧木类型,其野生种可耐-52℃低温,同时兼具抗病、抗旱、抗涝以及与栽培梨亲和性好等优点^[1]。但在实际生产中,秋子梨砧木主要依靠种子繁殖,后代变异大,参差不齐,种苗的一致性难以保证,限制了其进一步的应用。组织培养技术是实现种苗无性繁殖的途径之一,已经在草莓、香蕉、葡萄等果树当中得到应用并取得较好的效果。在梨属植物中,组织培养研究仍以高效再生体系的建立及优化为主,除基因型、培养基的筛选外^[2-4],外植体也是影响其再生的重要因素之一。薄层细胞(TCL, Thin cell layer culture)是将外植体横切成1 mm厚的薄片进行培养的方法(transverse TCL),该技术始于紫凤草(*Nautilocalyx lynchii*)表皮组织的培养,后逐渐在十几个属中培养成功^[5-6]。相比茎段、叶片,薄层细胞培养作为组织培养外植体具有来源广泛、数量大等优点为研究者青睐,且再生过程中嵌合体少,可以直接经过器官发育途径再生植株,提高了再生效率。除此以外其还是进行植物形态建成和遗传转化研究的原始材料。梨属植物中,叶片、茎段、茎尖等外植体组织培养研究已

经得到开展^[7],但薄层细胞培养尚鲜见相关报道。故现以秋子梨茎段薄层细胞为外植体进行培养和再生研究,以期秋子梨无性繁殖和工厂化育苗奠定基础,同时为梨属植物形态建成、基因工程研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料秋子梨采自青岛农业大学现代农业科技示范园梨种质资源圃,试管苗2012年获得,常规继代保存。

1.2 试验方法

1.2.1 薄层细胞的获得 取秋子梨试管苗在黑暗条件下预培养15 d,温度25℃。预培养后用手术刀在无菌滤纸上进行横切,厚度约1 mm,然后放置在无菌蒸馏水中待用或快速放置在不定芽诱导培养基中。

1.2.2 茎段薄层细胞不定芽诱导培养基的筛选 不定芽诱导培养基的筛选,以MS为基本培养基,分别附加不同的BA和NAA,试验采用双因素完全随机设计(表1),培养基为MS+BA(0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)+NAA(0、0.25、0.50、0.75、1.00 mg/L)+蔗糖30 g/L+琼脂糖7 g/L, pH 5.8,光周期16 h/d。

1.2.3 暗培养时间的筛选 将茎段薄层细胞接种在芽最佳诱导培养基上进行暗培养时间的筛选,处理时间分别为0、3、7、11、15 d后统计结果。

1.2.4 根的诱导与再生 在前期研究的结果上重点对IBA的浓度进行筛选(表3),培养基为1/2MS+IBA(0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)+蔗糖30 g/L+琼脂糖7 g/L, pH 5.8,光周期16 h/d。

第一作者简介:周佳红(1992-),女,山东烟台人,本科,研究方向为园艺植物逆境生理与分子生物学。E-mail:532003959@qq.com。

责任作者:李鼎立(1979-),男,博士,副教授,现主要从事果树分子生物学等研究工作。

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(BS2011NY007);现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-29);青岛农业大学高层次人才启动基金资助项目(630920)。

收稿日期:2014-11-10

1.3 项目测定

再生效率(%)=芽(愈伤组织、根)的外植体数量/总外植体的数量×100%;平均生芽(根)数=芽(根)的总数/生芽(根)的外植体数量。

2 结果与分析

2.1 培养基的筛选

以 MS 为基本培养基评价了不同浓度 BA 和 NAA 对茎段薄层细胞再生的影响,表 1 表明,经过 5 d 暗培养后,茎段薄层周围开始出现淡黄色的愈伤组织,后逐渐增多,不定芽一般伴随愈伤组织的产生而出现,但不定芽的再生效率和愈伤组织的再生效率并不一致(图 1B、D)。经 30 d 后,统计结果显示,在培养基 MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂糖 7 g/L 上,不定芽的诱导效率最高,达到 100%,同其它培养基相比在 1%水平达到极显著性差异(图 1C)。相比不定芽的再生效率,薄层细胞平均生芽数则较低,各处理之间差异不明显,每个茎段薄层平均再生芽数多数仅为 3~4 个,且受到外植体大小的影响,再生芽数目重复性较差,未达到预期效果。

2.2 暗培养时间的筛选

暗培养时间影响茎段薄层愈伤组织和不定芽的再生效率,经 30 d 的统计发现,暗培养 7 d 后愈伤组织和不定芽的再生效率和 0、3 d 相比均具有显著性差异,分别达到 72%和 96%。但随着暗培养时间的延长,在 11 d 和 15 d 时,愈伤组织和不定芽的再生效率并没有明显的变化(表 2),故在秋子梨茎段薄层培养 7 d 左右就可以满足愈伤组织和不定芽的诱导要求。

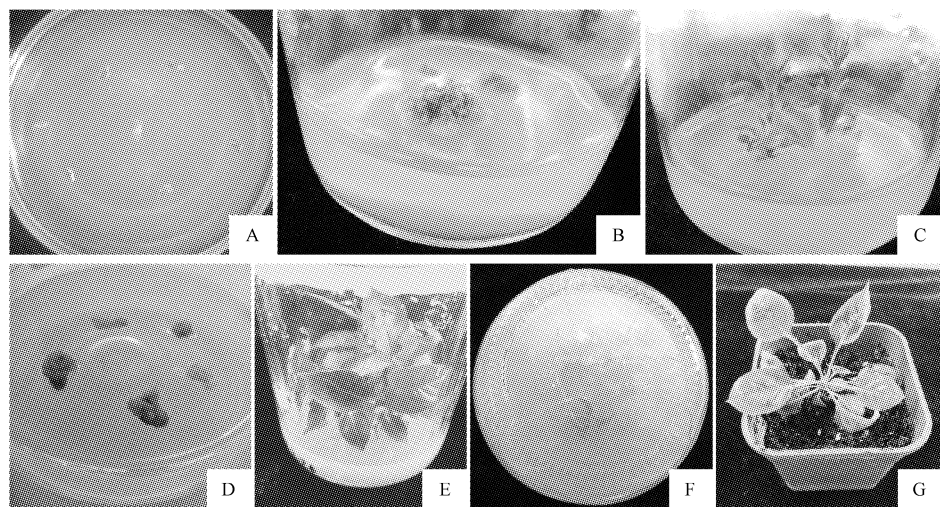
表 1 激素对愈伤组织和不定芽再生效率的影响

Table 1 Effect of hormones on regeneration rate of calli and adventitious shoots

BA 浓度 Concentration of BA /(mg·L ⁻¹)	NAA 浓度 Concentration of NAA/(mg·L ⁻¹)	愈伤组织诱导率 Calli induction frequency/%	不定芽再生效率 Adventitious shoot induction frequency/%
0	0	8.0 hF	0.0 fG
0	0.25	48.0 defghABCDEF	4.0 iFG
0	0.50	32.0 fghDEF	8.0 rFG
0	0.75	32.0 fghDEF	4.0 iFG
0	1.00	32.0 fghDEF	12.0 rFG
0.5	0	28.0 ghEF	8.0 rFG
0.5	0.25	52.0 cdefgABCDEF	24.0 defCDEFG
0.5	0.50	80.0 abcdeABCDE	4.0 iFG
0.5	0.75	68.0 abcdefgABCDEF	4.0 iFG
0.5	1.00	88.0 abcdABCD	24.0 defCDEFG
1.0	0	32.0 fghDEF	16.0 efEFG
1.0	0.25	64.0 abcdefgABCDEF	44.0 bcdBCDE
1.0	0.50	56.0 bcdefgABCDEF	50.0 bcBC
1.0	0.75	72.0 abcdefABCDEF	64.0 bB
1.0	1.00	100.0 aA	52.0 bcBC
1.5	0	28.0 ghEF	12.0 rFG
1.5	0.25	92.0 abcABC	100.0 aA
1.5	0.50	96.0 abAB	52.0 bcBC
1.5	0.75	76.0 abcdeABCDE	20.0 efDEFG
1.5	1.00	52.0 cdefgABCDEF	16.0 efEFG
2.0	0	40.0 efghBCDEF	16.0 efEFG
2.0	0.25	100.0 aA	16.0 efEFG
2.0	0.50	76.0 abcdeABCDE	12.0 rFG
2.0	0.75	96.0 abAB	48.0 bcBCD
2.0	1.00	72.0 abcdefABCDEF	32.0 cdeCDEF

注:数据分析采用邓肯氏新复极差法,其中大写字母和小写字母分别代表在 0.01 和 0.05 水平上的差异。下同。

Note:Significance of difference was analyzed via duncan's multiple range test, and capital and lowercase letters show significant difference at 0.01 and 0.05 levels. The same below.



注:A:茎段薄层;B、D:愈伤组织和体细胞胚的再生;C:芽的再生;E、F:根的再生;G:温室苗。

Note:A;Thin cell layer;B,D;Regeneration of callus and embryo;C;Regeneration of shoot;E,F;Regeneration of root;G;Plantlet in greenhouse.

图 1 秋子梨茎段薄层细胞再生过程

Fig. 1 Regeneration of TCL of *Pyrus ussuriensis*

表 2 暗培养时间对再生效率的影响

Table 2 Effect of dark culture on regeneration of adventitious shoots

处理时间 Culture time /d	愈伤组织再生效率 Calli induction frequency /%	不定芽再生效率 Adventitious shoots induction frequency /%
0	8 bB	16 bB
3	32 bB	24 bB
7	72 aA	96 aA
11	74 aA	96 aA
15	84 aA	96 aA

2.3 根的诱导与再生

根的再生是组织培养是否成功的关键,研究表明,不定根的诱导一般不需要进行预培养,待茎段薄层细胞再生不定芽生长到约 0.5 cm 高度时就可以直接进行生根培养,一般在不定芽接种到生根培养基 15 d 后即开始产生不定根。经 30 d 的统计结果可知,在 1/2MS 培养基上,IBA 浓度为 0.5 mg/L 时,与其它浓度相比差异性显著,根的诱导效果达到最佳,其中根的再生率达到 66.7%,平均生根数为 3.8 条(图 1E、F)。但同时研究发现,不定根诱导后经常出现根茎处输导组织不通畅的现象,在经过温室练苗后逐渐干枯致死。

表 3 激素对不定根再生的影响

Table 3 Effect of different concentrations of hormone on root induction from shoots

培养基 Medium	根再生率 Rate of rooting/%	平均生根数 No. of average roots/条
1/2MS+IBA 0 mg/L	4.2 cC	0.2 cC
1/2MS+IBA 0.5 mg/L	66.7 aA	3.8 aA
1/2MS+IBA 1.0 mg/L	37.5 bB	2.4 bB
1/2MS+IBA 1.5 mg/L	33.3 bB	2.2 bB
1/2MS+IBA 2.0 mg/L	37.5 bB	2.0 bB

3 讨论

组织培养技术是工厂化育苗的技术基础,同时还为植物的基础研究提高了材料基础和技术支撑。对于梨的组织培养研究,前人开展了大量工作^[1,7-10],主要以体系优化和理论研究为主,包括的外植体类型,但对于薄层细胞培养则无相关报道。在植物组织培养再生中,激素是影响再生的关键因素之一,该研究以秋子梨茎段薄层细胞为外植体进行了再生体系的优化,初步建立了梨茎段薄层细胞的再生体系。研究表明,秋子梨薄层细胞

不定芽诱导最佳培养基为 MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂糖 7 g/L,不定根再生最佳培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂糖 7 g/L,但和其它梨的组织培养再生相比^[8-11],虽然外植体的数量得到一定的提高,但再生不定芽和不定根的数量并不是很理想。推测其原因,其再生效率的差异主要和基因型、外植体类型和激素种类有关^[12],如郑亚杰等^[13]和杨芳等^[9]同样在秋子梨再生体系的构建中,不同外植体对激素浓度和配比和该研究均不相同,原因即是受基因型、外植体类型等因素的影响;同时,薄层细胞生理状态、大小、极性和所处光暗环境等亦是影响其再生的重要因素^[14],推测这些也直接导致了薄层细胞再生的不稳定,故如何获得稳定的再生效率将会是今后研究的重点之一。

参考文献

- [1] 张绍玲. 梨学[M]. 北京:中国农业出版社,2013:48-66.
- [2] 李艳艳,吴翠云. 新梨七号茎段组织培养再生植株的研究[J]. 西北农业学报,2011,20(5):130-134.
- [3] 韩文璞,袁明莲. 黄金梨的组织培养和快繁研究[J]. 落叶果树,2001,33(2):7-8.
- [4] 张玉娇,蔺经,丛郁,等. 黄冠梨组织培养与快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2009(3):35-36.
- [5] Tran Thanh van K M, Drija A. Definition of a simple experimental system of directed organogenesis de novo; Organ neoformation from epidermal tissue of *Nautilocalyx lynchei*[J]. Les Cultures de Tissus des Plantes, 1970, 193:169-176.
- [6] 王鹤鹑,黄学林. 薄层培养的应用现状与前景[J]. 植物学通报,1999,16(6):631-635.
- [7] 张虹. 梨树组织培养研究的进展[J]. 广西热带农业,2004(5):12-16.
- [8] 谭雪辉,刘洪章. 梨组织培养与遗传转化研究进展[J]. 北方园艺,2007(1):147-149.
- [9] 李晓刚,王宏伟,杨青松,等. 豆梨低玻璃化组培快繁技术[J]. 江苏农业科学,2012,40(12):54-56.
- [10] 王苏珂,杨健,王龙,等. 西洋梨矮化砧木 BA-29 的组培快繁技术研究[J]. 果树学报,2010,27(6):1002-1005.
- [11] 杨芳,王忆,许雪峰,等. 秋子梨叶片植株再生研究[J]. 中国果树,2008(3):13-16.
- [12] 张红晓,经剑颖. 木本植物组织培养技术研究进展[J]. 河南科技大学学报,2003,23(3):66-69.
- [13] 郑亚杰,张茂君,姚寰宇,等. 山梨组织培养及快繁技术研究[J]. 吉林农业科学,2010,35(1):45-46.
- [14] 刘利平. ‘卡特’夏橙薄层细胞培养高频再生体系建立及转基因应用初探[D]. 武汉:华中农业大学,2008.

Study on Regeneration of Thin Cell Layer of *Pyrus ussuriensis*

ZHOU Jia-hong¹, XING Cai-hua², CAO Hui², WANG De-fen², YANG Chun-lei², LI Ding-li²

(1. Changdao Futao Design Architectural Limited Company, Yantai, Shandong 265800; 2. College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

甜瓜掌状裂叶基因 *pll* 的精细定位

高兴旺¹, 王贤磊², 宁雪飞², 张自强², 卢浩², 李冠²

(1. 新疆大学 资源与环境科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830046; 2. 新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:以甜瓜掌状裂叶材料 *bm7* 和甜瓜圆叶材料 Y8 为亲本, 构建 BC₁ 分离群体作为作图群体, 同时利用甜瓜基因组序列, 采用 SSR 分子标记技术, 结合混合分离分析法(BSA), 将甜瓜裂叶基因 *pll* 进一步定位到 SSR 标记 G61 和 G76 之间 65 kb 的区间之内。结果表明: 在此区域内, 共有 6 个候选基因, 从 MELO3C010780 到 MELO3C010785, 其中, MELO3C010784 与 ANT 转录因子相似。根据文献报道, 在拟南芥中过表达从椰子中克隆的 ANT 基因导致叶片出现锯齿形边缘, 该表型与甜瓜株系 *bm7* 的裂叶形状具有相似性。这些结果表明 MELO3C010784 为最可能的候选基因。

关键词:甜瓜; 裂叶; SSR; 精细定位; 叶发育

中图分类号:S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)06-0098-05

甜瓜是世界十大果蔬之一, 在世界范围内广泛栽培。新疆甜瓜以其优良品质享誉海内外, 并发展成为新疆重要的特色经济作物之一。甜瓜叶片是进行光合作用的主要器官, 其形态对甜瓜品质产生重要影响。甜瓜叶片多为规则的扇形全缘叶。新疆农业大学的王惠林教授在育种地发现一株叶形表现为规则掌状裂叶形态的自然突变体, 并将其命名为 *bm7*。该突变体的获得为深入进行裂叶形态建成的分子机制的研究提供了良好的研究材料。

叶片形态建成的分子机制是发育生物学研究的重

要内容之一, 是研究植物形态发生, 尤其是多细胞生物有机体形成机理的良好模型^[1-3]。国外从 20 世纪 90 年代^[4] 开始开展叶发育的机制研究, 通过模式植物拟南芥揭示了大量与叶片形态建成相关的基因。在研究叶片形态建成的分子机制的过程中, 发现多个基因与裂叶形成相关, 如 *CUC2*^[5] 和 *KNAT* (包括 *KNAT1*、*KNAT2*、*KNAT6*)^[6-10]。但是, 关于裂叶形态建成的分子机制还是一知半解, 也没有开展这方面的专门研究, 国内在这方面的研究也很少, 因此, 深入研究裂叶形态建成的分子机制具有重要的理论意义。

Niklas^[11] 研究发现, 裂叶植株可以减少植株自身引起的遮阴效应, 从而有利于植株更好地接收光能^[12]。Vogel^[13] 研究发现, 裂叶有利于热扩散, 可以一定程度上降低叶片温度, 从而可以减弱阳光对植物的灼伤。叶片形态影响着植株生长状态以及光能利用效率, 进而影响作物产量和品质^[14-15], 比较不同叶形的棉花近等基因系(浅裂叶、适中裂叶、较大裂叶、深度裂叶)的光合效率发现, 具有适中裂叶的棉花株系表现出最高的光合效

第一作者简介:高兴旺(1983-), 男, 博士, 现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail: gxw516@163.com.

责任作者:李冠(1949-), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 现主要从事植物生理生化与分子生物学等研究工作。E-mail: guanli@xju.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260258); 新疆高技术发展资助项目(201111120)。

收稿日期:2014-11-10

Abstract: Regeneration system of thin cell layers (TCL) was established by using shoots of *Pyrus ussuriensis* as explants, to provide basis for asexual propagation and industrialized seedling production of *Pyrus ussuriensis*, meanwhile to provide reference for application of TCL technique in *Pyrus* research. The results showed that regeneration efficiency of TCL was affected by the combination and concentration of hormones. The optimal culture medium of adventitious shoots regeneration was MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L+sucrose 30 g/L+agarose 7 g/L, and the regeneration rate was 100%. The optimal culture medium of adventitious roots was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agarose 7 g/L, and the rate of rooting was 66.7%. Meanwhile, callus and adventitious shoots induction rate increased under dark culture.

Keywords: *Pyrus ussuriensis*; thin cell layer; regeneration; stem