

doi:10.11937/bfyy.20172255

淡水沙梨离体叶片愈伤组织诱导技术

曾令达^{1,2}, 黄郁敏¹, 徐春香³, 李彩华¹

(1. 惠州学院 生命科学院, 广东 惠州 516007; 2. 惠州学院 生物技术研究, 广东 惠州 516007;

3. 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:以淡水沙梨离体叶片为外植体,以 MS 和 White 培养基为基本培养基,研究了不同浓度 6-BA、NAA 等植物生长调节剂及不同接种方式对淡水沙梨继代培养离体叶片的影响。结果表明:MS 和 White 培养基中淡水沙梨的叶片愈伤组织诱导率分别为 72.4% 和 30.9%,叶片最佳愈伤组织诱导配方为 MS+6-BA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,20 d 叶龄叶片愈伤组织诱导率为 100.0%,40 d 叶龄叶片愈伤组织诱导率为 60.0%,叶片远轴面平贴愈伤组织诱导率为 100.0%,叶片近轴面平贴、叶片直插时愈伤组织诱导率分别为 78.3% 和 50.0%。淡水沙梨离体叶片培养中 MS 培养基较 White 利于愈伤组织诱导,叶龄较小进行培养愈伤组织诱导率较高,叶片远轴面平贴的接种方式更适合于叶片的离体培养。

关键词:淡水沙梨;离体叶片;愈伤组织;培养基

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2017)22-0062-05

淡水沙梨是以地方名命名的著名沙梨种,原产在惠州市惠阳区淡水。目前,淡水沙梨种植数量极少,因此有了淡水沙梨产业“已不存”的说

法^[1],说明淡水沙梨种质资源现状令人堪忧。叶片离体培养是构建高效稳定转基因植株的首要基础^[2-4],梨叶片的诱导试验中,不同梨品种的叶片诱导基本培养基不尽相同,汤绍虎等^[5]用“雪青梨”的叶片为外植体,在 MS 基本培养基上培养 10 d 左右叶片就长出愈伤组织,而付镇芳等^[6]认为 NN69 培养基是“砀山酥梨”的叶片诱导最佳基本培养基。同样是以 NN69 培养基为基本培养基的条件下,砀山酥梨^[6]、苹果梨^[7]、雪花梨^[8]和秋子梨^[9]等不同类型梨的叶片诱导培养基配方也有差异。而且接种方式不同其愈伤组织诱导率也不

第一作者简介:曾令达(1974-),男,博士,副教授,研究方向为植物生理生态和生物技术。E-mail: hzlingda@139.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31272117);广东省科技计划资助项目(2013B020304010);惠州市科技计划资助项目(2013B040009001);惠州学院自然科学基金资助项目(C211-0220)。

收稿日期:2017-07-10

Abstract: Watermelon variety ‘Meiyue’ was used as test material, using foliar spray, effects of different foliage fertilizer on watermelon growth and quality were studied. The results showed that all foliage fertilizer combinations could gain better effect compared with CK. ‘Shengtai 300 times + Runkangyepeng 2 000 times’ foliage fertilizer combinations possessed the best effects, ‘Meiyue’ watermelon after being sprayed, the peel thickness was 0.37 cm, diameter was 14.50 cm and vertical stems was 25.90 cm, watermelon fruit weight was 1.31 kg, yield were 2 620 kg per 667 m², increasing rate was 45.56%, and the soluble sugar content was 12.95%, soluble solids content was 13.50%, these indexes met the standard of high-quality watermelons.

Keywords: foliage fertilizer combinations; ‘Meiyue’ watermelon; growth; quality

同,陶爱群等^[10]对“黄金梨”叶片进行研究,发现当远轴面贴培养基时,愈伤组织诱导率较高,达 100%,当近轴面贴培养基时,愈伤组织诱导率则较低,为 90%。同样叶龄对愈伤组织诱导率也有影响,焦展^[11]用“喜水”和“秦丰”2 个梨品种以及西洋梨矮化砧木 BA29 的叶片进行诱导,发现叶龄不同,诱导率也不同,且“喜水”和“秦丰”同样是试管苗的中部叶片,仅“秦丰”适合诱导再生。

淡水沙梨作为地方特有经济作物,适应南方高温高湿的气候,果品贮藏期长,具有独特和明显的品种优势,但尚鲜见淡水沙梨的组织培养研究,亦鲜见叶片诱导愈伤组织的试验报道。该研究在淡水沙梨离体新梢增殖试验成功的基础上,以试管苗离体叶片为外植体,进一步分析淡水沙梨离体叶片愈伤组织的诱导条件及技术。该研究探讨培养基类型、叶龄和叶片接种方式等对淡水沙梨离体叶片愈伤组织形成的影响,明确愈伤组织诱导适宜的培养基,合适的叶龄和接种方式,以期为淡水沙梨的组织培养研究及利用离体叶片进行快繁提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

淡水沙梨离体叶片取自生命科学学院组培课题组培育的淡水沙梨试管苗,取材的试管苗继代次数相同,长势良好,叶片舒展。试验主要试剂为 MS 和 White 培养基(青岛海博生物技术有限公司),6-苄氨基腺嘌呤(6-BA,阿拉丁试剂公司),萘乙酸(NAA,阿拉丁试剂公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 不同基本培养基和不同生长调节剂浓度对叶片愈伤组织形成的诱导

取完全展开的叶片,剪去边缘,切成 5 mm×5 mm 的叶切片,以远轴面平贴接种(叶背面接触培养基),以 MS 和 White 培养基为基本培养基,即 MS/White + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹, MS/White + 6-BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ 和 MS/White + 6-BA 3.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ 等 6 种诱导培养基上。各诱导培养基中再添加蔗糖 30 g·L⁻¹ 和琼脂 7 g·L⁻¹。每瓶接 5 个叶片,

重复 4 次。20 d 后记录叶片的成活数,及愈伤形成数,计算愈伤组织诱导率。愈伤组织诱导率(%) = 愈伤形成数/叶片成活总数×100。愈伤组织的判断依据为在被剪的叶子周边形成白色或绿色的簇状物。基本培养基对叶片愈伤的诱导测定中接种成活数和愈伤形成数均为所有生长调节剂处理浓度条件下 MS 或 White 诱导培养基中的接种成活数和愈伤形成数。调节剂浓度对叶片愈伤的诱导测定中则对不同的生长调节剂处理浓度条件统计接种成活数和愈伤形成数。

1.2.2 不同叶龄对叶片愈伤组织形成的诱导

将茎段长出 20、40 d 叶龄的叶子为外植体,将叶片采用剪去边缘,切成 5 mm×5 mm 叶片远轴面平贴接种在 MS + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹, MS + 6-BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹, MS + 6-BA 3.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ 的培养基上。每瓶接 5 个叶片,重复 4 次。在接种后 20 d 计算愈伤形成数和愈伤组织诱导率,愈伤组织诱导率计算同 1.2.1。

1.2.3 不同接种方式对叶片愈伤组织形成的诱导

接种方式选取 20 d 叶龄的叶片,采用远轴面平贴(叶背面接触培养基)、近轴面平贴(叶正面接触培养基)、叶直插(近基端向下)的接种方式,将叶片剪取处理后接种到 MS + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ 培养基上。每瓶接 5 个叶切片,重复 4 次。在接种后 20 d 计算愈伤形成数和愈伤组织诱导率,愈伤组织诱导率计算同 1.2.2。

1.2.4 诱导培养条件

各处理诱导培养条件:光周期(光照/黑暗)为 16 h/8 h,光照强度为 2 000 lx,温度为 (25±1)℃。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 和 SPSS 19.0 软件对试验数据进行统计分析,并用邓肯氏新复极差法进行差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对叶片愈伤组织形成的影响

由表 1 可知,淡水沙梨离体叶片在 MS 为基本培养基的愈伤诱导培养基中,叶片的愈伤形成数平均值为 13.9 个,愈伤组织诱导率平均值为

72.4%;在 White 为基本培养基的愈伤诱导培养基中,叶片的愈伤形成数为平均值 5.8 个,愈伤组织诱导率平均值为 30.9%。MS 和 White 作为基本培养基时,二者在愈伤组织诱导率平均值存在

显著差异($P<0.05$,下同)。因此,MS 培养基比 White 更适合于进行淡水沙梨叶片愈伤诱导。MS 具有较高的愈伤组织诱导率,可能与培养基中具有较高的离子浓度有关。

表 1 不同基本培养基对叶片愈伤组织形成的影响

Table 1 Effects of different basic medias on callus formation of leaves

培养基类型 Medium type	接种成活数平均值 Average number of survival inoculation/个	愈伤形成数平均值 Average number of callus/个	愈伤组织诱导率平均值 Average calli induction frequency/%
MS	19.3	13.9	72.4b
White	19.0	5.8	30.9a

注:不同小写字母表示存在显著差异($P<0.05$)。下同。

Note: Different lwoercase letters represent significant difference at 0.05 level. The same as below.

2.2 不同生长调节剂浓度对叶片愈伤组织形成的影响

由表 2 可知,淡水沙梨离体叶片在 MS 为基本培养基的愈伤诱导培养基中,当 6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤形成数为 16.0 个,离体叶片愈伤组织诱导率最高,为 84.9%,当 6-BA 浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤形成数为 11.0 个,离体叶片愈伤组织诱导率最低,为 60.0%;在 White 为基本培养基的愈伤诱导培养基中,当 6-BA 的浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤形成数为 9.0 个,离

体叶片愈伤组织诱导率最高,为 52.2%,当 6-BA 的浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤形成数为 2.0 个,离体叶片愈伤组织诱导率最低,为 10.0%。

随着 6-BA 浓度下降,在 MS 和 White 为基本培养基的诱导培养基配方中,叶片愈伤组织诱导率均增加,当 6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,愈伤组织诱导率最高,其中 MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 在 6 种诱导培养基中诱导率最高,为 84.9%,且与其它各处理均差异显著,为淡水沙梨叶片愈伤组织的最佳培养基。

表 2 不同生长调节剂浓度对叶片愈伤组织形成的影响

Table 2 Effects of different growth regulators on callus formation of leaves

培养基 Medium	接种成活数 No. of survival inoculation/个	愈伤形成数 No. of callus/个	愈伤组织诱导率 Calli induction frequency/%
MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	19.0	16.0	84.9a
MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	20.0	14.0	72.2b
MS+6-BA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	19.0	11.0	60.0c
White+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	19.0	9.0	52.2d
White+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	18.0	6.0	30.8e
White+6-BA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	20.0	2.0	10.0f

2.3 不同叶龄对叶片愈伤组织形成的影响

由表 3 可知,采用不同叶龄的离体叶片进行接种组培,培养 20 d 时,MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基叶片的愈伤组织诱导率为 100.0%,愈伤组织诱导率最高;MS + 6-BA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基叶片的愈伤组织诱导率为 75.0%,愈伤组织诱导率最低。培养 40 d 时,

MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基叶片的愈伤组织诱导率为 52.6%,MS+6-BA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基叶片的愈伤组织诱导率为 60.0%,愈伤组织诱导率最高。不同叶龄叶片中,最佳愈伤组织诱导率不同,且二者存在显著性差异,从愈伤组织诱导率来看,叶龄较小的叶片更适合愈伤培养。

2.4 不同接种方式对叶片愈伤组织形成的影响

由表 4 可知,采用远轴面(叶的背面)平贴培养基方式进行组培,全部成活叶片均脱分化形成愈伤组织,愈伤组织诱导率为 100.0%。近轴面(叶的正面)平贴在培养基中,叶片的愈伤组织诱

导率较高,为 78.3%。叶片直插于在培养基中,叶片的愈伤组织诱导率最低,为 50.0%。不同方式接种中,远轴面平贴效果最好,与其它处理差异显著,这可能与淡水沙梨叶片背面较正面有更多的气孔,有利于叶片对养分的吸收有关。

表 3
Table 3
不同叶龄对叶片愈伤组织形成的影响
Effects of different leaf ages on callus formation of leaves

叶龄 Leaf age/d	培养基 Medium	接种成活数 No. of survival inoculation/个	愈伤形成数 No. of callus/个	愈伤组织诱导率 Callus induction frequency/%
20	MS+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.2 mg · L ⁻¹	20.0	20.0	100.0a
	MS+6-BA 2.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.2 mg · L ⁻¹	18.0	15.0	87.5b
	MS+6-BA 3.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.2 mg · L ⁻¹	18.0	14.0	75.0c
40	MS+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.2 mg · L ⁻¹	19.0	10.0	52.6e
	MS+6-BA 2.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.2 mg · L ⁻¹	17.0	10.0	58.3d
	MS+6-BA 3.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.2 mg · L ⁻¹	18.0	11.0	60.0d

表 4
Table 4
接种方式差异对叶片愈伤形成的影响
Effects of different inoculation methods on callus formation of leaves

接种方式 Inoculation methods	培养基 Medium	接种成活数 No. of survival inoculation/个	愈伤形成数 No. of callus/个	愈伤组织诱导率 Callus induction frequency/%
远轴面平贴 Far axle surface sticking	MS+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ + NAA 0.2 mg · L ⁻¹	20.0	20.0	100.0a
近轴面平贴 Near axle flat surface sticking	MS+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ + NAA 0.2 mg · L ⁻¹	18.0	14.0	78.3b
叶片直插 Leaf straight pin	MS+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ + NAA 0.2 mg · L ⁻¹	18.0	9.0	50.0c

3 讨论与结论

培养基的种类是影响叶片能否获得再生不定芽的关键^[12-13]。该试验在添加一定的植物生长调节剂条件下,MS 和 White 的愈伤组织诱导率分别 72.4%和 30.9%。何志祥等^[14]研究发现,脆冠梨茎段组织的最佳愈伤组织培养基为 AS 培养基。陶爱群等^[15]发现 MS 比 1/4MS 对豆梨的愈伤组织诱导更高。该试验与何志祥等^[14]、陶爱群等^[15]选择的培养基类型和接种材料不同,但试验结果同样表明,在高盐培养基条件下,更有利于梨外植体愈伤组织的形成。该试验表明,MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.2 mg · L⁻¹是淡水沙梨叶片诱导中最佳的生长调节剂浓度组合,愈伤组织诱导率最高,为 84.9%。陶爱群等^[10]用黄金梨叶片在雪青梨、八月红梨的叶片愈伤组织诱

导培养基中进行诱导,发现此类培养基并不是黄金梨的最佳愈伤组织诱导培养基。说明不同品种梨的愈伤组织诱导都有其最佳的生长调节剂浓度和配比,有必要筛选最适培养基。该试验中,40 d 叶龄的叶片其最高的愈伤组织诱导率配方与 20 d 的配方并不一致,较低叶龄的叶片在 6-BA 较低在 1.0 mg · L⁻¹条件下最高,而 40 d 的则在 6-BA 为 3.0 mg · L⁻¹条件下最高。不同叶龄最佳愈伤组织诱导率不同,可能与不同叶龄叶片所含激素种类和含量不同有关,这有待于进一步的研究。叶龄为 20 d 的条件下,远轴面平贴的愈伤组织诱导率最高,且与其它接种方式差异显著。淡水沙梨适宜以远轴面平贴的方式进行叶片愈伤组织的诱导,与陶爱群等^[10]、焦展^[11]和孙文英等^[16]的试验结果一致。

参考文献

- [1] 赵飞,倪根金,章家恩. 惠阳淡水沙梨栽培历史考述[J]. 农业考古,2013(3):158-165.
- [2] 赵瑞华,刘庆忠,孙清荣,等. 抗真菌 γ -硫堇蛋白 *Rsafpl* 基因导入丰产梨获得转基因植株[J]. 农业生物技术学报,2004,12(6):729-730.
- [3] 王小平. 刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt.) 离体繁殖与四倍体选育研究[D]. 重庆:西南大学,2009.
- [4] 冉昆,王宏伟,王少敏. 梨组织培养与遗传转化研究进展[J]. 中国农学通报,2017,33(4):74-79.
- [5] 汤绍虎,孙敏,周启贵,等. ‘雪青’梨叶片高频再生体系的建立[J]. 园艺学报,2005,32(6):1084-1087.
- [6] 付镇芳,孟颖光,张朝红,等. 砀山酥梨叶片再生体系的建立[J]. 北方园艺,2011(14):98-101.
- [7] 李文剑,曹后男,宗成文,等. 苹果梨离体叶片再生体系的建立[J]. 果树学报,2012,29(5):800-803.
- [8] 王德芬,张梅,李鼎立,等. 秋子梨叶片高效再生体系的构建[J]. 北方园艺,2016(4):97-101.
- [9] 闫允青,姜桦韬,谷超,等. ‘雪花梨’扩繁和叶片再生体系的建立[J]. 南京农业大学学报,2017,40(1):68-75.
- [10] 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.
- [11] 焦展. 梨品种及砧木离体叶片再生体系建立的研究[D]. 保定:河北农业大学,2008.
- [12] 韩继成,冯志红,陈霜荣. 梨离体叶片诱导不定芽的研究[J]. 河北果树,1998(2):12.
- [13] 秦璐,陈泉,梁志强,等. 库尔勒香梨叶片不定芽再生诱导的研究[J]. 北方园艺,2015(9):76-79.
- [14] 何志祥,曾艳玲,谭晓风. 翠冠梨茎段组织培养的研究[J]. 中南林学院学报,2006,26(1):66-68.
- [15] 陶爱群,谢深喜,姜小文,等. 豆梨子叶再生体系的建立[J]. 经济林研究,2009,27(4):52-56.
- [16] 孙文英,陈世昌,申顺先,等. 七月酥梨离体叶片诱导不定芽的研究[J]. 中国果树,2015(3):32-34.

Calli Induction Techniques of Danshui Pear Leaf *in vitro*

ZENG Lingda^{1,2}, HUANG Yumin¹, XU Chunxiang³, LI Caihua¹

(1. Department of Life Science, Huizhou University, Huizhou, Guangdong 516007; 2. Institute of Biotechnology, Huizhou University, Huizhou, Guangdong 516007; 3. College of Horticulture, South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: Leaf of Danshui pear was used as explant, MS and White medium as the basic medium, the plant growth regulator 6-BA and NAA and different inoculation methods were studied to obtain callus of Danshui pear. The results showed that leaf callus induction rate of the Danshui pear in MS and White culture medium were 72.4% and 30.9%, the best callus induction formula was MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 20 days leaves the highest callus induction rate was 100.0%, 40 days leaves the highest callus induction rate was 60.0%, abaxial surface of flat leaf callus induction rate was 100.0%, the adaxial flat rate of callus induction was 78.3%, when the line of leaf callus induction rate was 50.0%. These results indicate that MS medium was better than White medium for leaf calli induction, younger leaves had higher callus initiation rates, leaf abaxial side in contact with the medium was more suitable for inducing leaf callus *in vitro*.

Keywords: Danshui pear; leaf *in vitro*; callus; culture medium