

不同基因型梨叶片离体培养和植株再生

刘翠琼 汤浩茹^{*} 罗 娅

(四川农业大学林学园艺学院, 雅安 625014)

摘要: 以‘巴梨’、‘身不知’和‘早酥’梨试管苗叶片为外植体, 对不定芽进行了诱导、增殖和生根。重点探讨了基本培养基、植物生长调节剂配比、 AgNO_3 不同浓度和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 比例对不定芽再生的影响。结果表明, MS + TDZ 0.5 mg/L + BA 0.1 mg/L 为‘巴梨’叶片不定芽发生的最佳培养基。在 QL + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基上, 暗培养 3周后转光下培养, ‘身不知’和‘早酥’分别获得 89.6%、81.2% 的不定芽再生率和 3.45、3.73 的平均再生芽数; 对‘巴梨’和‘早酥’不定芽再生有效促进的 AgNO_3 浓度范围为 0.1~0.5 mg/L, 0.1~4.0 mg/L 的 AgNO_3 、1~2~7 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ / $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 21.50 mmol/L 的 K^+ 对‘身不知’叶片再生均有促进作用, 缺乏 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 不利于不定芽的再生; 转移到 MS + BA 1.0 mg/L + BA 0.1 mg/L 培养基上能快速增殖; 在 MS、1/4MS + BA 1.0~2.5 mg/L + 蔗糖 5~15 g/L + 活性炭 0.5~1.0 g/L 上获得了不同程度的生根苗。

关键词: 梨; 叶片; 再生; 组织培养

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-1080-04

Leaf Culture and Plantlet Regeneration of Pears with Different Genotypes

Liu Cuiqiong, Tang Haorū^{*}, and Luo Ya

(College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Taking leaves from the vitro cuttings of *Pyrus communis* L. ‘Bartlett’, *P. pyrifolia* Nak ‘Shenbuzhi’ and *P. bretschneideri* Rhed ‘Zaosu’ as explants, the adventitious bud were induced, propagated, and rooted. The effects of basic media, plant growth regulators and their concentration, AgNO_3 with different concentration and the ratios of the nitrate: ammonium on adventitious bud regeneration were studied. The results showed that the best bud regeneration medium from leaves of ‘Bartlett’ was MS + TDZ 0.5 mg/L + BA 0.1 mg/L. The bud regeneration rate of ‘Shenbuzhi’ and ‘Zaosu’ respectively from leaves was reached 89.6% and 81.2%, with an average regeneration buds of 3.45 and 3.73 on QL + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L after three weeks dark pretreatment. The bud regeneration frequency of ‘Shenbuzhi’ from leaves was enhanced on medium containing AgNO_3 0.1~4.0 mg/L, 1~2~7 of the nitrate: ammonium with K^+ 21.50 mmol/L, while inhibited without nitrate; The subculture medium for in vitro proliferation of three cultivars was MS + BA 1.0 mg/L + BA 0.1 mg/L; The rooting rate in varying degrees was obtained in the media of MS, 1/4MS supplemented with BA at 1.0~2.5 mg/L and sucrose at 5~15 g/L and AC (activated charcoal) at 0.5~1.0 g/L.

Key words: Pear; Leaf; Regeneration; Tissue culture

1 目的、材料与方法

有关梨的叶片不定芽再生的研究虽有一些报道, 但再生率(尤其是出芽数)普遍较低^[1,2]。本试验以‘巴梨’(*Pyrus communis* L. ‘Bartlett’)、‘身不知’(*P. pyrifolia* Nak ‘Shenbuzhi’)和‘早酥’(*P. bretschneideri* Rhed ‘Zaosu’)3个品种为试材, 对试管苗叶片进行了不定芽的诱导、增殖和生根, 并重点探讨了影响高频不定芽再生的因素。

收稿日期: 2005-01-14; 修回日期: 2005-05-24

基金项目: 教育部优秀教师资助计划项目(2075); 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金项目(200253); 农业部‘948’项目(2004246)

* 通讯作者 Author for correspondence (Email: htang@scau.edu.cn)

2001年春从四川农业大学梨品种资源圃 25年生树上采集刚萌动的芽培养出试管苗，然后取继代35~40 d的试管苗顶部刚展开的叶片，剪去叶柄，垂直于叶片中脉横切 2刀，以远轴面接触培养基，接种在 MS、NN69 和 QL^[3] 并附加不同植物生长调节剂（表 1）的诱导培养基上，用 Parafilm 密封；然后在筛选出的最佳培养基上附加不同浓度的 AgNO₃（表 2）；同时以‘身不知’为试材，用 KNO₃ 调节 NN69 培养基中 NH₄⁺-N 与 NO₃⁻-N 的不同比例（表 3）。各处理均添加蔗糖 30 g/L，琼脂 6.5 g/L，pH 5.8。每品种接种 30~40 个叶片，先暗培养 3 周，然后转移至光下培养，50 d 时统计不定芽再生率和再生芽数。试验重复 3 次。培养条件为（25 ±1），光照 4 800 lx，光周期 16 h/d。

2 结果分析与讨论

2.1 叶片不定芽的诱导

2.1.1 叶片不定芽的生长动态 暗培养约 10 d，叶片开始隆起肿胀，叶脉膨大，在切口处开始产生少量的白色愈伤组织。25 d 左右，在叶片远轴端、近轴端伤口处、叶片中脉处均分化出了单芽或丛芽（图版，1~3），甚至少数叶片还发育出了体胚苗（图版，4）。30~40 d 时不定芽大量形成，随后产生不定芽的速度逐渐减缓，仅是不定芽伸长生长形成不定梢。

2.1.2 培养基和植物生长调节剂对不同基因型不定芽再生的影响 在相同的培养基 QL + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 上，‘身不知’和‘早酥’的不定芽再生率高达 89.6% 和 81.2%，平均每叶不定芽数也达 3.45 和 4.73，而‘巴梨’却仅为 10.6% 和 1.85（表 1）；而且‘身不知’叶片产生不定芽的速度较快，接种后 20 d 左右就可见不定芽大量发生。由此可见，基因型对梨不定芽的再生率起着十分重要的作用。

表 1 不同品种不同培养基对梨叶片不定芽再生率和每叶再生芽数的影响

Table 1 Effects of species and media on bud regeneration rate and number of buds per leaf

基本培养基 Basic media	植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg/L)				巴梨 Bartlett		身不知 Shenbuzhi		早酥 Zao su	
	BA	BA	NAA	TDZ	再生率 Regeneration rate (%)	再生芽数 Number of buds per leaf	再生率 Regeneration rate (%)	再生芽数 Number of buds per leaf	再生率 Regeneration rate (%)	再生芽数 Number of buds per leaf
MS	3	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0
MS	6	0.1	11.3	0.34	5.6	0.78	4.6	0.41		
MS	6	0.1	24.2	0.65	8.4	0.83	6.3	0.50		
MS	0.1	0.5	62.8	3.00	18.3	1.50	10.5	0.86		
NN69	0.1	0.5	26.9	1.78	59.0	1.66	19.1	1.03		
NN69	5	0.4	12.6	1.23	35.6	1.38	11.9	1.00		
NN69	0.1	1.0	16.5	2.10	71.4	2.32	52.7	1.88		
NN69	0.1	1.5	35.0	1.52	62.6	2.45	29.8	1.12		
NN69	0.4	1.0	27.3	2.03	21.6	1.23	75.0	4.15		
QL	0.1	1.0	10.6	1.85	89.6	3.45	81.2	4.73		
QL	0.1	0.5	15.0	1.21	25.7	1.52	25.3	1.20		

基本培养基的种类影响着不定芽的再生效果，同时这种效果还因基因型的不同而异。对‘巴梨’而言，在 TDZ 0.5 mg/L + BA 0.1 mg/L 组合中，MS 对不定芽的诱导效果明显好于 NN69，表现为再生率高，再生不定芽数量大（图版，5），这与 Shibli 等的研究结果^[4] 相同，QL 效果最差，表明 MS + TDZ 0.5 mg/L + BA 0.1 mg/L 是‘巴梨’最适宜的不定芽诱导培养基；而对于‘身不知’和‘早酥’而言，再生效果 QL > NN69 > MS。在 QL + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基上，再生率分别达到了 89.6%（图版，6）和 81.2%；相反在 MS 培养基上的叶片产生的愈伤特别容易褐变。

此外，叶片不定芽的再生能力还受植物生长调节剂种类及其浓度的影响。在 MS + BA 0.1 mg/L 培养基上，0.5 mg/L 的 TDZ 对不定芽的诱导率普遍高于 6.0 mg/L 的 BA；当 BA 为 3.0 mg/L 时，3 个品种都没有不定芽产生，而当 BA 上升至 5.0~6.0 mg/L，都有不同程度的不定芽再生能力，表明高浓度的 BA 对于梨叶片不定芽的诱导是十分必要的。

2.1.3 不同 AgNO_3 浓度对不定芽再生的影响 在筛选出的最佳培养基（‘巴梨’：MS + TDZ 0.5 mg/L + BA 0.1 mg/L；‘身不知’和‘早酥’：QL + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L）上，研究 AgNO_3 不同的浓度对叶片不定芽分化的影响。当 AgNO_3 在 0.1 ~ 0.5 mg/L 时，对‘巴梨’和‘早酥’不定芽再生均有一定的促进作用，且 AgNO_3 为 0.5 mg/L 时‘巴梨’不定芽再生率与对照呈极显著差异，当其浓度超过 1.0 mg/L 时二者都表现出抑制作用；对于‘身不知’来说，0.1 ~ 4.0 mg/L 的 AgNO_3 浓度都可不同程度地促进叶片不定芽的发生，但与对照差异不显著（表 2）。

表 2 AgNO_3 对不定芽再生率和每叶再生芽数的影响Table 2 Effects of AgNO_3 on bud regeneration rate and number of buds per leaf

AgNO_3 (mg/L)	巴梨 Bartlett		身不知 Shenbuzhi		早酥 Zaosu	
	再生率 rate (%)	Regeneration buds per leaf	再生率 rate (%)	Regeneration buds per leaf	再生率 rate (%)	Regeneration buds per leaf
0	57.7 ±2.1 bB	2.86 ±0.48 aA	86.3 ±2.9 aA	3.26 ±0.46 aA	78.4 ±3.7 abAB	4.45 ±1.09 aA
0.1	65.8 ±3.0 aAB	3.12 ±0.39 aA	92.2 ±4.2 aA	3.78 ±0.97 aA	85.3 ±6.9 aA	5.06 ±0.59 aA
0.5	72.6 ±6.6 aA	3.26 ±0.80 aA	90.6 ±2.3 aA	3.59 ±0.74 aA	82.5 ±3.7 aAB	4.78 ±0.31 aA
1.0	33.2 ±5.9 cC	2.95 ±0.24 aA	89.7 ±7.5 aA	3.27 ±0.76 aA	72.6 ±3.8 bB	2.34 ±0.40 bB
2.0	0 dD	0 bB	87.2 ±1.8 aA	2.87 ±0.33 aA	0 cC	0 cC
4.0	0 dD	0 bB	86.8 ±2.0 aA	2.5 ±0.39 aA	0 cC	0 cC

注：大小写字母表示显著性水平 ($a=0.05, A=0.01$)。Note: Capital and lowercase indicate significance.

2.1.4 NH_4^+ -N NO_3^- -N 及 K^+ 浓度对‘身不知’不定芽再生的影响 以‘身不知’为试材，在 NN69 + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基上，用 KNO_3 调节 NN69 培养基中 NH_4^+ -N 与 NO_3^- -N 的不同比例，除 K^+ 外，其它元素离子种类和浓度不变（表 3）。当 NH_4^+ -N NO_3^- -N 为 0 1 时，没有不定芽的发生，说明 NH_4^+ -N 对于梨不定芽的诱导是必不可少的；随着 NH_4^+ -N 与 NO_3^- -N 比例和 K^+ 浓度的逐渐提高，不定芽再生幅度也随之加大。1 7 的 NH_4^+ -N NO_3^- -N 并配合 21.50 mmol/L 的 K^+ 时‘身不知’叶片再生率就极显著地高于其他处理，不定芽再生率和平均芽数分别达到 97.4% 和 2.87（表 3），说明较高比例的 NH_4^+ -N 与 NO_3^- -N 和 K^+ 浓度对于梨叶片不定器官的诱导具有协同作用。但更高浓度的 NO_3^- 是否对外植体产生抑制作用有待于进一步的探索。

表 3 不同 NH_4^+ -N NO_3^- -N 对‘身不知’梨叶片不定芽再生的影响

Table 3 Effects of the ratios of the nitrate namm on bud regeneration from leaves of ‘Shenbuzhi’

NH_4^+ -N NO_3^- -N	浓度 Concentration (mmol/L)				不定芽再生率 Bud regeneration rate (%)	平均每叶再生芽数 Number of buds per leaf
	总 N	Total N	NH_4^+	NO_3^-		
0 1	18.40	0.00	18.40	18.90	0 dC	0 cB
1 2	27.40	9.00	18.40	9.90	68.2 ±1.4 cB	2.00 ±0.47 bA
1 3	27.40	6.90	20.50	14.10	70.6 ±2.6 bcB	2.06 ±0.35 bA
1 4	27.50	5.50	22.00	17.00	72.1 ±2.5 bcB	2.23 ±0.29 abA
1 5	27.00	4.50	22.50	18.50	76.4 ±3.8 bB	2.85 ±0.25 aA
1 7	28.00	3.50	24.50	21.50	97.4 ±1.3 aA	2.87 ±0.73 aA

注：大小写字母表示显著性水平 ($a=0.05, A=0.01$)。Note: Capital and lowercase indicate significance.

2.2 不定芽的增殖

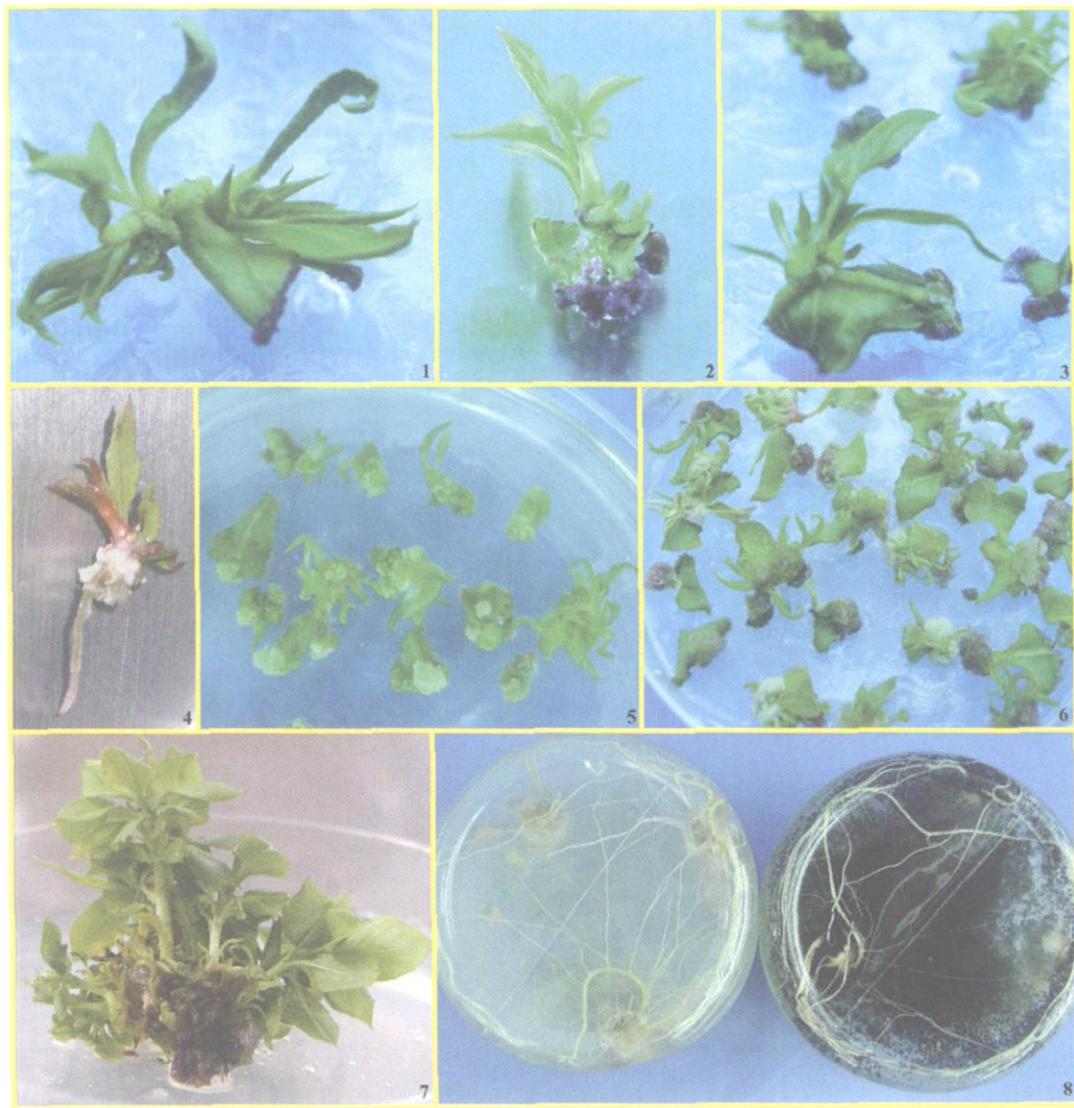
将产生的不定芽转移到 MS + BA 1.0 mg/L + BA 0.1 mg/L 培养基上进行增殖。结果表明在该培养基上不定芽伸长和增殖生长良好，表现为茎粗、叶大，月增殖倍数达到 4 ~ 5（图版，7）。

2.3 生根培养

分别选取长约 1.5 cm 生长健壮的单苗接人生根培养基，‘巴梨’茎段在 1/4 MS + BA 1.0 mg/L + 蔗糖 15.0 g/L 上光照培养 10 d 后转入 1/4 MS + 蔗糖 15.0 g/L 上，培养 25 d 后生根率为 87.5%，平均根数为 6.42；‘早酥’茎段转入 MS + BA 2.5 mg/L + 蔗糖 15.0 g/L 上暗培养 10 d 后转入 MS + 蔗糖 15.0 g/L + AC 0.5 g/L 上生根率获得了 75.0%，平均根长达到 7.48，但平均苗的根干质量偏低，仅为 1.4 mg；‘身不知’接种在 1/4 MS + BA 2.5 mg/L + 蔗糖 5.0 g/L 上暗培养 10 d 后转入 1/4 MS + 蔗糖 5.0 g/L + AC 0.5 g/L 光培养，生根率为 83.3%（图版，8）。

参考文献：

- 1 Lane W D, Iketani H, Hayashi T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 54: 9~14
- 2 孙清荣, 刘庆忠, 赵瑞华. 西洋梨叶片直接再生体细胞胚. *园艺学报*, 2003, 30 (1): 85~86
Sun Q R, Liu Q Z, Zhao R H. Somatic embryo genesis from in vitro leaves of pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30 (1): 85~86 (in Chinese)
- 3 王乔春, Svensson M. 培养基种类对梨试管苗增殖的影响. *四川农业大学学报*, 1993, 11 (1): 77~81
Wang Q C, Svensson M. The role of media in shoot multiplication of pear cultures in vitro. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 1993, 11 (1): 77~81 (in Chinese)
- 4 Shibli R A, Ajibouni M M A, Obeidat A A. Direct regeneration from pear (*Pyrus syriaca*) leaf explant. *Advances in Horticultural Science*, 2000, 14 (1): 12~18



图版说明：1. 叶片远轴端直接发生的不定芽；2. 叶片近轴端直接发生的不定芽；3. 叶片远轴端中脉上直接分化出的不定芽；4. 体胚发育成苗；5. ‘巴梨’在MS + TDZ 0.5 mg/L + BA 0.1 mg/L培养基上发生的不定芽；6. ‘身不知’在QL + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L培养基上发生的不定芽；7. 不定芽的增殖；8. 试管苗的生根情况。

Explanation of plates: 1. Direct bud regeneration from the abaxial section of the leaf; 2. Direct bud regeneration from the proximal section of the leaf; 3. Direct bud regeneration from the main vein of the distal section of leaf; 4. Plantlet from somatic embryo; 5. Adventitious bud regeneration of 'Bartlett' pear on medium with MS + TDZ 0.5 mg/L + BA 0.1 mg/L; 6. Adventitious bud regeneration of 'Shenbuzhi' pear on medium with QL + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; 7. Proliferation of adventitious shoots; 8. Rooting state of the vitro seedlings