

‘雪青’梨叶片高频再生体系的建立

汤绍虎^{1,2} 孙 敏² 周启贵² 龙 云² 李道高^{1*}(¹西南农业大学园艺园林学院, 重庆 400716; ²西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘 要: 以‘雪青’梨叶片为外植体, MS为基本培养基, 培养温度 (25 ±1) , 光照强度 2 000 lx, 14 h/d, 继代周期 30 d。在 MS+2,4-D 2 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹培养基中, 外植体脱分化率达 100%, 愈伤组织增殖倍数达 12.05; 在 MS+6-BA 5 mg·L⁻¹+IAA 0.1 mg·L⁻¹中, 不定梢诱导率达 100%, 在 MS+6-BA 2 mg·L⁻¹+IAA 0.1 mg·L⁻¹+CH 100 mg·L⁻¹中, 1~6代不定梢平均繁殖系数达 7; 在 1/2 MS+BA 2 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+AC 500 mg·L⁻¹中, 不定梢生根率达 67.50%; 68株试管苗移栽到珍珠岩营养钵中, 30 d成活 46株, 成活率为 67.65 %。

关键词: 梨; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S 661.2; Q 945.51 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-1084-04

Establishment of High Frequently Regeneration System from Leaves of ‘Xueqing’ Pear

Tang Shaohu^{1,2}, Sun Min², Zhou Qigui², Long Yun², and Li Daogao^{1*}(¹College of Horticulture and Gardening, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China; ²College of Life Science, Southwest Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Leaves excised from one-year old shoots of ‘Xueqing’ pear (*Pyrus* sp.) were used as materials to induce adventitious shoots on MS medium supplied with different combinations of plant growth regulators, 8 g·L⁻¹ agar and 30 g·L⁻¹ sucrose, pH = 5.8 in a growth chamber set at a 14 h photoperiod, a 2 000 lx photosynthetic density and a (25 ±1) temperature. 100% of the leaf explants dedifferentiated on MS + 2,4-D 2 mg·L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ and calli increased 12.05 times in a 30-day subculture period. All the calli could regenerate adventitious shoots after transferred on MS + 6-BA 5 mg·L⁻¹ + IAA 0.1 mg·L⁻¹ and the shoots proliferated about 7 times in every subculture during one to six subcultures on MS + 6-BA 2 mg·L⁻¹ + IAA 0.1 mg·L⁻¹ + CH 100 mg·L⁻¹. 67.50% of shoots rooted on 1/2 MS + BA 2 mg·L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + AC 500 mg·L⁻¹. Of 68 plantlets, 46 plantlets (67.65%) were acclimatized after transplanting to matrix perlite for 30 days.

Key words: Pear; Tissue culture; Plant regeneration

1 目的、材料与方法

迄今已经建立了梨的叶片、茎尖、茎段、顶芽和花药等不同外植体的再生体系, 但是梨的叶片再生效率普遍较低^[1~6]。

试验材料 ‘雪青’梨为优质早熟梨品种^[7], 由重庆绿康果业有限公司提供。2002年 9月至 2004年 10月在西南农业大学园艺园林学院和西南师范大学生命科学学院进行本试验。取当年生叶片, 流水冲洗 2 h, 0.1% HgCl₂消毒 10 min, 无菌水冲洗 4次后接种。基本培养基为 MS, 含琼脂 8 g·L⁻¹、蔗糖 30 g·L⁻¹, pH 5.8。培养温度 (25 ±1) , 光照强度 2 000 lx, 光照时间 14 h/d, 继代周期 30 d。

收稿日期: 2005 - 01 - 04; 修回日期: 2005 - 03 - 18

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (2002-7297)

*通讯作者 Author for correspondence

愈伤组织诱导的外植体为叶片（2~3 mm²），继代培养的为愈伤组织（3~4 mm³），培养基为 C₁~C₄（表 1）。随机抽取各培养基 20 个外植体，以 1 个继代周期中培养后/前鲜样质量比计算愈伤组织的增殖倍数。不定梢诱导的外植体为愈伤组织（3~4 mm³），继代培养的为单个不定梢（长 5~10 mm）。不定梢诱导与继代培养基为 S₁~S₅（表 2）。以各培养基培养后/前不定梢的数量比计算各代繁殖系数。试管苗生根的外植体为单个不定梢（长 15~20 mm），培养基含蔗糖 15 g·L⁻¹。各培养阶段，每种培养基每次接种生长良好的外植体 4 个，10 次重复。当试管苗根长 10 mm 以上，苗高 20~30 mm 时，揭开瓶塞炼苗 3 d 后移栽到珍珠岩营养钵中，常规管理，30 d 后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导与继代培养

叶片接种后 10 d 左右开始形成愈伤组织（图版，1）。试验结果（表 1）表明：C₁培养基脱分化率最高，达 100 %，分别比 C₂和 C₃高 27.5 %和 12.5 %；在连续 4 代的继代培养中，C₁的平均增殖倍数也最高（图版，2），达 12.05 倍，分别比 C₂和 C₃高 6.14 和 4.51 倍，C₄的脱分化率和平均增殖倍数均最低。说明在愈伤组织诱导与继代培养中，2,4-D 优于 NAA，6-BA 优于 KT。因此，选定 C₁同时为愈伤组织诱导与继代培养基。

表 1 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织分化与增殖的影响

Table 1 Effects of plant growth regulators on dedifferentiation and multiplication of callus from leaves of ‘Xueqing’ pear

代号	植物生长调节剂	脱分化率	无性世代增殖倍数 Multiplied times of clone generations				
Code	Plant growth regulators(mg · L ⁻¹)	Dedifferentiated rate(%)	2	3	4	5	平均 Average
C ₁	2,4-D 2 + 6-BA 0.5	100	12.45	13.06	10.87	11.83	12.05
C ₂	NAA 2 + 6-BA 0.5	72.5	6.34	6.23	5.78	5.29	5.91
C ₃	2,4-D 2 + KT 0.5	87.5	8.27	7.64	7.41	6.85	7.54
C ₄	NAA 2 + KT 0.5	52.5	4.78	4.64	3.97	4.26	4.41

2.2 不定梢的诱导与继代培养

愈伤组织经 20~30 d 诱导可形成不定梢（图版，3）在 S₁~S₅ 中不定梢诱导率分别为 100 %、70 %、85 %、45 %和 67.5 %，其中 S₁最低，说明在不定梢诱导中 6-BA 优于 TDZ，IAA 优于 NAA；S₁~S₃均高于 S₄和 S₅，表明较高浓度的 6-BA 有利于不定梢的分化；S₅比 S₄高 22.5 %，说明 CH 100 mg·L⁻¹能够明显促进不定梢的分化。选定 S₁为不定梢诱导培养基。

不定梢连续 6 代继代培养，各代繁殖系数见表 2。在继代培养中，较高浓度的 6-BA 和 CH 100 mg·L⁻¹有利于不定梢的分化与增殖。虽然 S₅的 1~6 代繁殖系数比 S₁、S₃略低，但到第 6 代仍全为正常不定梢（图版，4），而 S₁~S₃中第 3 代已开始有部分不定梢发生玻璃化。说明在继代培养中较高浓度的 6-BA 易使梨外植体玻璃化。玻璃化苗不能移栽成活。因此，本试验选定 S₅为不定梢继代培养基。试验结果还表明，在相同的不定梢诱导与继代培养基中，由不同的愈伤组织诱导与继代培养基所诱导和继代产生的愈伤组织，对不定梢的诱导与增殖无明显差异，但是，愈伤组织继代时间越长，不定梢的诱导频率和繁殖系数越低。

表 2 不定梢在不同培养基中各世代的繁殖系数

Table 2 Propagation coefficients of different clone generations of adventitious shoots from ‘Xueqing’ pear in different media

代号 Code	培养基 Media	植物生长调节剂 Plant growth regulators(mg·L ⁻¹)	各世代繁殖系数 Propagation coefficients						平均 Average
			1	2	3	4	5	6	
S ₁	MS	6-BA 5 + IAA 0.1	8.55	8.62	8.25	8.45	7.53	7.35	8.13
S ₂	MS	TDZ 5 + IAA 0.1	6.85	6.53	7.13	6.70	6.45	5.80	6.58
S ₃	MS	6-BA 5 + NAA 0.1	7.50	7.63	7.83	7.48	7.03	6.55	7.34
S ₄	MS	6-BA 2 + IAA 0.1	6.18	5.45	5.68	5.40	5.30	4.32	5.39
S ₅	MS	6-BA 2 + IAA 0.1 + CH 100	7.15	7.33	6.92	7.16	6.75	6.72	7.00

2.3 不定梢生根与试管苗移栽

生根结果 (表 3) 表明, T₅ 生根率最高, 说明 BA 优于 NAA; 较低浓度的 6-BA 与 BA 配合使用, 能明显提高生根率; 500 mg · L⁻¹ AC (活性炭) 和较低浓度的无机盐有利于不定梢生根。

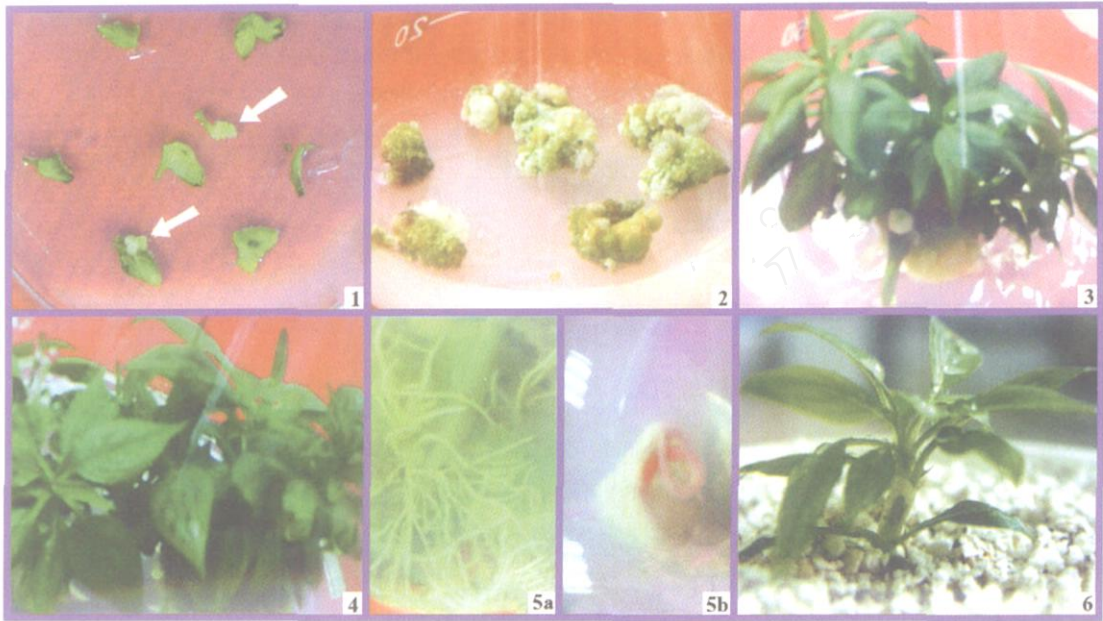
68株试管苗移栽成活 46株, 生长正常 (图版, 6), 成活达 67.65 %。

在本试验中, 愈伤组织和不定梢诱导率达 100 %, 1~6代不定梢平均繁殖系数达 7。通过适当降低继代培养基 6-BA 浓度, 既保证了较高的繁殖系数, 又避免了玻璃化苗的发生, 从而建立了 ‘雪青’ 梨叶片的高频再生体系, 为其快速繁殖和遗传转化奠定了基础, 同时也可作为梨的体细胞突变体的筛选、细胞培养和原生质体融合等提供重要参考。本试验中 ‘雪青’ 梨的不定根多为粗大根 (图版, 5), 根系发育欠佳, 导致根系吸收能力较差, 影响试管苗的移栽成活率, 因此试管苗的生根率有待进一步提高。

表 3 培养基和植物生长调节剂对不定梢生根的效应

Table 3 Effects of media and plant growth regulators on rooting of adventitious shoots from ‘Xueqing’ pear

植物生长调节剂			接种数	生根不定梢	生根率
代号	培养基	Plant growth regulators	No. of	数 No. of	Rate of
Code	Media	regulators (mg · L ⁻¹)	inocul- ated	adventitious rooted	rooting (%)
T ₁	MS	BA 2	40	9	22.50
T ₂	MS	NAA 2	40	6	15.00
T ₃	MS	BA 2 + 6-BA 0.5	40	15	37.50
T ₄	1/2MS	BA 2 + 6-BA 0.5	40	22	55.00
T ₅	1/2MS	BA 2 + 6-BA 0.5 + AC 500	40	27	67.50



图版说明: ‘雪青’ 梨叶片组织培养及植株再生 1. 叶片外植体培养 10 d形成的愈伤组织; 2 继代培养的愈伤组织; 3. 由愈伤组织再生的不定梢; 4 不定梢继代培养形成的丛芽; 5 由不定梢再生的不定根 (a 正常根; b 粗大根); 6 移栽 30 d成活的试管苗。

Explanation of plates: Tissue culture and plant regeneration from leaves of ‘Xueqing’ pear 1. Formation of callus from leaves cultured for 10 d; 2. Proliferation of callus in a 30 d subculture; 3. Regeneration of adventitious shoots from callus; 4. Proliferation of adventitious shoot in one subculture; 5. Rooting of adventitious shoots (a Normal roots; b Stout roots); 6. One acclimatized plantlet after transplanting to matrix perlite for 30 days

参考文献:

1 徐凌飞, 马锋旺, 王喆之, 任小玲, 曹晓雁. 梨叶片离体培养和植株再生. 园艺学报, 2002, 29 (4): 367 ~ 368
Xu L F, Ma F W, Wang Z Z, Ren X L, Cao X Y. Leaf culture and plantlet regeneration of pear (Pyrus). Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29 (4): 367 ~ 368 (in Chinese)

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 Caboni E, Tonelli M G, Lauri P, D'Angeli S, Damiano C. In vitro shoot regeneration from leaves of wild pear Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 59 (1): 1 ~ 7

4 韩文璞, 袁明莲. 黄金梨的组织培养和快繁研究. 落叶果树, 2001, (2): 7 ~ 8
Han W P, Yuan M L. Studies on tissue culture and rapid propagation of ‘Huangjin’ pear Deciduous Fruits, 2001, (2): 7 ~ 8 (in Chinese)

- 5 Caboni E, D'Angeli S, Chiappetta A, Innocenti A M, Van Onckelen H, Damiano C. Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, 70 (2): 199 ~ 206
- 6 杨振英, 薛光荣, 史永忠. “锦丰”梨花药培养获得小植株. *植物生理学通讯*, 1994, 30 (6): 278
Yang Z Y, Xue G R, Shi Y Z. The plantlets induced by anther culture of ‘Jinfeng’ pear in vitro. *Plant Physiology Communication*, 1994, 30 (6): 278 (in Chinese)
- 7 沈德绪, 林伯年, 严根洪, 黄麦平, 冉志林, 周永年. 梨新品种—雪青. *园艺学报*, 2002, 29 (2): 187
Shen D X, Lin B N, Yan G H, Huang M P, Ran Z L, Zhou Y N. A new pear cultivar — ‘Xueqing’. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29 (2): 187 (in Chinese)

舞草叶片的活动表现

徐本美 孙运涛 李锐丽 郭琛 宋宇航 (中国科学院植物研究所, 北京 100093)

Observation of the Plant Movement of *Codariocalyx motorius*

Xu Benmei, Sun Yuntao, Li Ruili, Guo Chen, and Song Yuhang (Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

关键词: 舞草; 三出复叶; 叶片的活动

中图分类号: S 68 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 06-1087-01

舞草 [*Codariocalyx motorius* (Houtt.)] 为豆科含羞草亚科舞草属植物。直立小灌木, 三出复叶, 侧生, 小叶很小, 或缺仅单小叶 (图版, 1)。原产北美, 我国产于福建、江西、广东、四川、贵州、云南、台湾等地。花期 7~9 月, 果期 10~11 月。植株供观赏及药用。

试验于 2004 年 3~7 月在北京进行。观察发现, 舞草的小叶在每天的 10:00 和 17:00 左右会出现两个活动高峰, 其与大叶叶柄之间的角度变化幅度接近 180°; 表现为小叶片向大叶方向活动, 紧贴叶柄, 也可相反远离大叶; 此间大叶的活动不明显。各叶片向光性强, 叶片相互遮荫的现象很少见 (图版, 2)。傍晚, 光照和温度均开始下降, 各小叶先后向叶柄下端活动, 每动 1 次约 1 s, 有时 1 片小叶可出现 2~3 次明显动作。大叶的活动为在凌晨 5:00 迅速展开, 叶柄向上, 与主茎之间的角度多呈 45° 或 60°。而在傍晚 17:00~19:00 缓慢闭合, 紧贴主茎 (小于 30°) (图版, 3)。

舞草植株的保卫反应: 2004 年 4 月 3 日, 盆栽土壤过于干燥, 在阳光下叶片为减少蒸腾均呈下垂状态, 经夜晚浇水后第 2 天叶片恢复正常。顶端新长出大叶叶片多以叶脉为中轴相互闭合, 可避免灼晒和水分蒸发。

舞草的生物钟现象: 即使夜晚室内用 100 W 的灯光照射, 舞草仍处于夜闭合睡眠状态。

舞草在北京栽种的可能性: P. Simons (1992 年) 指出在温室中夜温 21℃, 昼温 25℃ 小叶活动频繁。张智英等 (2001 年)、袁志章 (2002 年) 也指出舞草适宜在 20~30℃ 中萌发生长。本试验证实北京地区 4~9 月份, 阳台或加温温室中均可栽种。从播种开始到植株长到 20 cm, 约 2 个月。10 月份将长到 90 cm 的植株转入温室, 始终未见开花结实, 这可能与长日照有关。未进行田间栽培试验。

Paul Simons 将舞草的活动称为“搏动”。他观察到舞草在黑暗中“搏动”明显减弱, 直至停止。早在 1923 年 J. L. Bose 就指出: “搏动”主要是外部刺激引起的, 强光增加 10 min 可使“搏动”增加 4 个幅度。并认为“搏动”的作用是促进植株汁液上升和维持水分转移。本试验中对舞草活动的观察均未伴随音乐, 而在室内的盆栽舞草旁边唱歌或播放音乐均未见舞草有活动迹象, 因此作者认为舞草的活动与音乐无关, 日光和温度的变化是影响舞草活动的主要因素。



图版说明: 1. 舞草的叶片; 2. 舞草白天的株型; 3. 舞草夜晚的株型。

Explanation of plates: 1. Leaves of *Codariocalyx motorius*, 2. *Codariocalyx motorius* plants during the day, 3. *Codariocalyx motorius* plants at night

收稿日期: 2005 - 03 - 09; 修回日期: 2005 - 09 - 29

致谢: 本文承中国科学院院士、中国农业大学姜成后教授指教, 谨致谢意。孙超参加部分试验。