

# -射线照射梨试管苗诱导产生多倍体变异

孙清荣<sup>1\*</sup>, 孙洪雁<sup>1</sup>, 祝恩元<sup>2</sup>, 李林光<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 山东省果树研究所, 农业部泰安温带果树资源重点野外科学观测试验站, 山东省果树生物技术育种重点实验室, 山东泰安 271000; <sup>2</sup> 山东省科学技术厅, 济南 250014)

**摘要:** 用  $\gamma$ -射线照射梨试管苗, 照射后对其顶芽、侧芽和叶片 3 种外植体分别接种, 经过继代和筛选, 获得了形态变异明显的变异无性系, 其变异表现为茎变粗, 节间变短, 叶长/叶宽比变小, 叶柄变短。经染色体计数鉴定, 这些变异中既有三倍体也有四倍体。多倍体的气孔长度及比叶重较对照二倍体显著增大。

**关键词:** 梨; 试管苗;  $\gamma$ -射线; 多倍体

**中图分类号:** S 661.2    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0513-353X (2009) 02-0257-04

## Polyplid Induction in Pear in vitro Treatment with Gamma-rays

SUN Qing-rong<sup>1\*</sup>, SUN Hong-yan<sup>1</sup>, ZHU En-yuan<sup>2</sup>, and LILIN-guang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Shandong Institute of Pomology, the State Agriculture Ministry Experiment Station of Temperate Fruits Germplasm Key Outdoor Observation in Tai'an, Shandong Fruits Biotechnology Breeding Key Laboratory, Tai'an, Shandong 271000, China; <sup>2</sup> Department of Science and Technology of Shandong Province, Jinan 250014, China)

**Abstract:** *In vitro* shoots of pear cultivar ‘Fertility’ (*Pyrus communis* L.) were irradiated with gamma-rays. Three different explants of shoot tip, lateral bud and young leaf from irradiated shoots were cultured separately. Shoots from 3 different explants were subcultured and selected. Morphological mutants with thicker stem, shorter internode, smaller leaf index and shorter petiole were obtained. Chromosome counting confirmed that the mutants were triploids and tetraploids. The lengths of stomatal guard cells and specific leaf mass of polyploids were significantly increased than that of diploids.

**Key words:** pear; *in vitro* shoots; gamma-ray; polyploid

随着果树组织培养技术的成熟和完善, 离体组织培养和诱发突变相结合已成为一项很有前途的育种研究项目, 组织培养可提供更广泛的处理材料, 如器官、组织和细胞, 比原位活体 (*in vivo*) 更适于诱变, 而且辐射诱变育种与离体培养结合能大大降低嵌合体的比例, 可在有限的空间内对大量诱变群体进行选择, 提高后代筛选和鉴定效率 (刘进平和郑成木, 2004)。到目前为止, 诱导果树组培材料变异的研究以离体材料对诱变的敏感性报道较多 (Pinet-Leblay et al., 1992; Predieri, 2001; 孙清荣等, 2004), 而获得有利性状改良的品种较少, 仅在香蕉上用  $\gamma$ -射线照射组培苗顶芽获得了比母本开花时间早 10 周的品种 ‘Novaria’ 和果穗大的品种 ‘Klue Hom Thong KU1’ (Jain & Swennen, 2004)。另外, 用  $\gamma$ -射线照射香蕉试管苗获得了矮化和半矮化变异无性系 (李丰年等, 1996)。用  $\gamma$ -射线照射桃组培苗获得了比母本早熟 20 d 左右的早熟桃 ‘辐属’ (张毅, 1998)。用  $\gamma$ -射线照射梨试管苗获得了株型紧凑型变异及果实形状由梨形变为圆卵形的变异 (Predieri et al., 1997; Predieri & Zimmerman, 2001) 等。本文报道用  $\gamma$ -射线照射梨试管苗获得多倍体变异无性系。

收稿日期: 2008-08-06; 修回日期: 2008-12-10

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (01DS48)

\* E-mail: qingrongsun@hotmail.com; qingrongsun@yahoo.com.cn

## 1 材料与方法

试验材料为山东省果树研究所繁殖的梨 (*Pyrus communis L.*) ‘丰产’品种试管苗，2003年5月在山东农业大学南校区钴源进行辐射处理。<sup>60</sup>Co射线照射剂量分别为10、20和30 Gy，剂量率为0.15 Gy·min<sup>-1</sup>，照射梨无根无菌苗。照射方法：以<sup>60</sup>Co源为圆心，在不同半径上放置培养瓶，相同半径为同一剂量。每个剂量处理10瓶，每瓶15~20个绿梢。照射后的无菌苗分成顶端幼嫩叶片、顶芽及侧芽分别接种在增苗培养基上继代培养，每个芽梢分别增殖，并从第2次继代开始观察茎粗、节间长、叶形、叶色等的变化。逐代逐步淘汰没有变异或变异不稳定的绿梢，保留稳定变异的绿梢。对每一个变异梢分别编号增殖，形成各自的无性系。

参照李林光等(2007)的方法进行染色体计数。从变异试管苗中下部摘取充分生长的功能叶片，用尖头镊子撕取下表皮，放在载玻片上，用Olympus光学显微镜观察，在40倍物镜下用100小格(1小格=0.271 μm)目镜测微尺测量气孔保卫细胞长度。每个叶片测量10个气孔保卫细胞。每个无性系重共测30个叶片。取充分生长的功能叶片，用打孔器取10个叶圆盘称其鲜样质量，放在85℃下烘干，称其干样质量，每个无性系重复3次(30个叶圆盘)，计算单位叶面积干样质量(即比叶重)。

应用DPS3.01专业版分析软件对数据进行Duncan's多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 辐射后梨试管苗产生的变异

不同剂量辐射对梨试管苗不同外植体生长产生的影响已有报道(孙清荣等，2004)。辐射后无菌苗的顶端嫩叶、顶芽和侧芽产生的绿梢经过3次继代培养，筛选出一批变异无性系，继代5~6次，获得了变异稳定的无性系。经过1年的继代淘汰选择，3种外植体都获得了比对照(图1，a、c)茎变粗，节间变短(图1，b)，叶柄变短，叶指数(叶长/叶宽)变小(图1，d)等类似多倍体性状的变异无性系。



图1 二倍体和四倍体‘丰产’梨试管苗生长形态比较

a和c为二倍体，b和d为四倍体。

Fig. 1 Comparison of morphological characteristics of in vitro diploid and tetraploid shoots of pear ‘Fertility’  
a, c: Diploid; b, d: Tetraploid

### 2.2 染色体计数

对无性系进行染色体计数：对照为二倍体， $2n=2x=34$ (图2，a)，不同的变异无性系染色体数有51和68，表明既有三倍体， $2n=3x=51$ (图2，b)，也有四倍体， $2n=4x=68$ (图2，c)变异。共获得多倍体变异无性系10个，2个为三倍体，都来源于顶芽变异，8个为四倍体，来源于顶芽、侧芽和叶片再生不定梢。

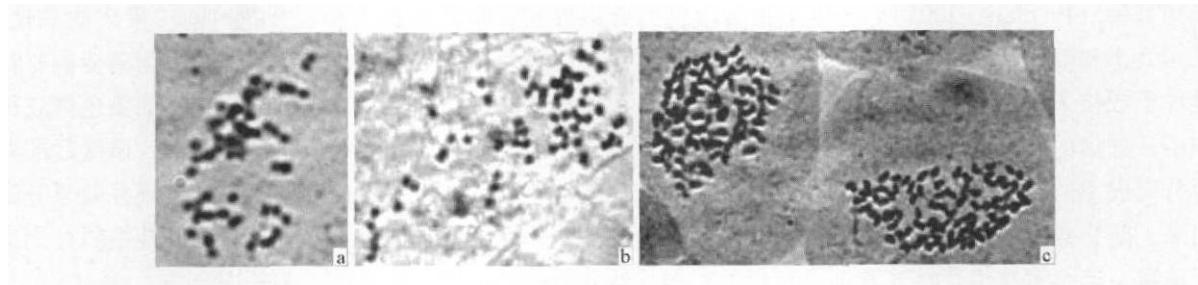


图 2 不同无性系染色体数观察

a: 二倍体 ( $2n=2x=34$ )；b: 三倍体 ( $2n=3x=51$ )；c: 四倍体 ( $2n=4x=68$ )。

Fig. 2 Chromosome observation of different clones

a: Diploid ( $2n=2x=34$ )；b: Triploid ( $2n=3x=51$ )；c: Tetraploid ( $2n=4x=68$ ).

### 2.3 气孔保卫细胞长度和比叶重

气孔保卫细胞长度随倍性增加而增加，三倍体和四倍体与对照二倍体之间差异达极显著水平（表 1）。三倍体与四倍体无性系 F-1 和 F-2 差异极显著，而与四倍体无性系 F-3、F-4、F-5、F-6、F-7、F-8 差异不显著，这是因为四倍体的不同无性系间保卫细胞长度有差异，这种差异是正常的，相同的倍性不同的无性系生物学性状也是不同的，在四倍体咖啡（Mishra, 1997）及四倍体茶树（Ng'Etich & Wafhira, 2003）中都有类似的结果。相同倍性的不同无性系之间差异不显著，表明试管苗叶片的气孔保卫细胞长度可用作多倍体变异早期选择的有效标记，多倍体的气孔保卫细胞长度明显大于二倍体（表 1），最大的为四倍体 F-1，最小的为二倍体对照母株。这和已报道的四倍体葡萄砧木（Motosugi et al., 2002）、四倍体沙梨（Kadota & Niimi, 2002）、四倍体咖啡（Mishra, 1997）的研究结果一致。

表 1 梨不同倍性无性系气孔保卫细胞长度和比叶重

Table 1 Mean length of stoma guard cells and specific leaf mass of different ploidy in pear

无性系 Clones	倍数 Ploidy	平均保卫细胞长度 / $\mu\text{m}$ Mean length of guard cells	比叶重 /( $\times 10^{-3}\text{mg} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) Specific leaf mass
F-1	4x	4.61 ± 0.31 a A	36.1 ± 1.45 a A
F-2	4x	4.60 ± 0.33 a A	35.3 ± 1.50 ab A
F-3	4x	4.33 ± 0.34 ab AB	33.6 ± 1.90 b AB
F-4	4x	4.30 ± 0.32 ab AB	25.1 ± 3.47 c C
F-5	4x	4.32 ± 0.31 ab AB	26.5 ± 2.84 c BC
F-6	4x	4.30 ± 0.30 ab AB	25.9 ± 4.10 c C
F-7	4x	4.33 ± 0.39 ab AB	25.7 ± 2.20 c C
F-8	4x	4.30 ± 0.31 ab AB	27.3 ± 2.40 c BC
F-9	3x	4.05 ± 0.34 b B	19.7 ± 1.46 d D
F-10	3x	4.04 ± 0.30 b B	19.1 ± 2.60 d D
对照母株 Control plant	2x	2.95 ± 0.32 c C	0.8 ± 0.35 e E
对照再生不定梢 Regenerating shoots of control	2x	3.22 ± 0.31 c C	1.1 ± 0.31 e E

注：不同小写字母代表 5% 显著水平，不同大写字母代表 1% 显著水平。

Note: Different small letters denote  $P < 0.05$ , different capital letters denotes  $P < 0.01$ .

比叶重结果也表现为四倍体最高，二倍体最低，不同倍性之间达极显著差异（表 1），与不同倍性茶树的研究结果（Ng'Etich & Wafhira, 2003）一致，表明比叶重也是多倍体变异选择的有效标记。

### 3 讨论

-射线辐射植物，可引起基因、染色体及基因组水平上发生变化。-射线辐射已有效的用于

果树育种 (Predieri, 2001), 提供了很多改良的有用性状, 包括植株大小、开花时间、果实成熟期、果实大小和颜色及抗病等。但这些性状的改良不是通过染色体加倍获得的, 这可能是因为诱变的材料是种子或枝条, 然后通过种植或嫁接选择变异, 在这种情况下, 如果只有少数几个细胞的染色体获得加倍, 加倍的细胞常常比正常细胞分裂和生长慢, 逐渐被排挤。诱变和组织培养相结合, 诱变后的材料分离成不同外植体分别放在最有利于生长的培养基上培养, 能更好地使不同的变异表现并及早分离出来, 防止被生长快的组织所吞并。本研究获得的多倍体变异就是通过早期分离不同的芽组织分别进行培养, 连续多次继代培养和选择获得的, 而且所获得的多倍体是纯合的, 不是嵌合的。

本研究获得的多倍体无性系已移栽到田间, 多倍体与二倍体差异明显, 对多倍体的生物学性状有待进一步观察和研究。

## References

- Jain M S, Swennen R. 2004. Banana improvement: Cellular, molecular biology, and induced mutations. Enfield (NH), USA, Plymouth, UK: Science Publishers, Inc.
- Kadota M, Niimi Y. 2002. *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Rep.*, 21: 282 - 286.
- Li Feng-nian, Huang Bing-zhi, Yang Hu, Xu Lin-bing, Zeng Xi-bing. 1996. Preliminary study of induction effect of  $^{60}\text{Co}$  irradiation on banana. *Guangdong Agricultural Science*, (3): 29 - 31. (in Chinese)
- 李丰年, 黄秉智, 黄 护, 许林兵, 曾惜冰. 1996. 香蕉 $^{60}\text{Co}$ 辐射诱变效应的初步研究. 广东农业科学, (3): 29 - 31.
- Li Lin-guang, He Ping, Ou Chun-qing, Li Hui-feng, Zhang Zhi-hong. 2007. *In vitro* induction of tetraploid from mature embryos of 'Golden Delicious' apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (5): 1129 - 1134. (in Chinese)
- 李林光, 何 平, 欧春青, 李慧峰, 张志宏. 2007. 金冠苹果成熟胚离体诱导四倍体的研究. 园艺学报, 34 (5): 1129 - 1134.
- Liu Jin-ping, Zheng Cheng-mu. 2004. Induced mutation in connection with *in vitro* culture for crop breeding. *Acta Agriculturae Shanghai*, 20 (1) : 19 - 22. (in Chinese)
- 刘进平, 郑成木. 2004. 诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用. 上海农业学报, 20 (1) : 19 - 22.
- Mishra M K. 1997. Stomatal characteristics at different ploidy levels in *Coffea* L. *Annals of Botany*, 80: 689 - 692.
- Motosugi H, Okudo K, Kataoka D, Naruo T. 2002. Comparison of growth characteristics between diploid and colchicine induced tetraploid grape rootstocks. *J Japan Soc Hort Sci*, 71: 335 - 341.
- Ng'Etich W K, Wafhira F N. 2003. Variation in leaf anatomy and gas exchange in tea clones with different ploidy. *J Horti Sci Bio*, 78: 173 - 176.
- Pinet-Leblay C, Tupin F X, Chevreau E. 1992. Effect of gamma and ultraviolet irradiation on adventitious regeneration from *in vitro* cultured pear leaves. *Euphytica*, 62: 225 - 233.
- Predieri S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 185 - 210.
- Predieri S, Magli M, Zimmerman R H. 1997. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma-rays and field selection for vegetative form traits. *Euphytica*, 93: 227 - 237.
- Predieri S, Zimmerman R H. 2001. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica*, 117: 217 - 227.
- Sun Qing-tong, Li Lin-guang, Fan Sheng-hua, Liu Peng, Yang Jian-ming. 2004. The effect of gamma irradiation on shoot regeneration from leaf and bud growth of apple and pear *in vitro*. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (2): 217 - 220. (in Chinese)
- 孙清荣, 李林光, 樊圣华, 刘 鹏, 杨建明. 2004.  $\gamma$ -射线对苹果和梨叶片不定梢再生及芽生长的影响. 园艺学报, 31 (2): 217 - 220.
- Xuan Pu, Xu Li-yuan, Qu Shi-hong, Yu Gui-tong, Yin Chun-tong, Yue Chun-fang. 2000. Techniques of radiation induced haploid breeding of wheat. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 14 (1): 17 - 20. (in Chinese)
- 宣 朴, 徐利远, 颜世洪, 余桂容, 尹春蓉, 岳春芳. 2000. 小麦单倍体辐射诱变育种技术研究. 核农学报, 14 (1): 17 - 20.
- Zhang Yi. 1998. Peach cultivar Fuyan derived from irradiation and tissue culture. *Deciduous Fruits*, (1): 66. (in Chinese)
- 张 毅. 1998. 用辐射与组培技术育成的桃品种——福靥. 落叶果树, (1): 66.