

八月红梨叶片不定芽诱导研究*

徐凌飞¹, 马锋旺¹, 王喆之², 任小林¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

[摘要] 采用正交试验设计研究了基本培养基、BA 和 IAA 3 个因素及其组合对八月红梨 (*Pyrus communis* L.) 叶片不定芽再生的影响。结果表明, 基本培养基的种类对叶片不定芽的诱导起主要作用, 诱导叶片再生的最优组合是 NN 69+ BA 5.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L; 用同质量浓度葡萄糖代替蔗糖, 对叶片再生频率的影响不显著, 用白砂糖代替蔗糖, 显著降低了叶片再生频率; AgNO₃ 质量浓度在 0.1~1.5 mg/L 时, 对叶片再生有促进作用, 培养基中附加 AgNO₃ 0.5 mg/L, 可显著提高叶片再生频率。

[关键词] 梨; 叶片; 不定芽再生

[中图分类号] S661.203.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)04-0073-03

梨由于童期长、杂合程度高等原因, 给常规杂交育种带来很大困难。体细胞诱变育种和遗传转化为梨品种改良提供了新的手段。植物外植体离体再生是植物遗传转化的基础, 叶片是最常用的外植体。对梨叶片再生虽有报道, 但再生效率普遍较低^[1], 有的品种叶片再生频率最高只能达到 23%^[2]。本研究通过八月红梨叶片再生试验, 以期为梨树无性变异体筛选和进一步的遗传转化操作奠定基础, 并为其他品种叶片再生提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为梨栽培品种八月红试管苗。试管苗继代培养基为 MS+BA 0.5 mg/L + BA 0.2 mg/L + 葡萄糖 30 g/L + 琼脂 6.0 g/L, pH 5.8。

1.2 方法

取继代培养 30~40 d 的试管苗顶部展开的幼嫩叶片, 去掉叶柄, 垂直叶片中脉横切伤 3 刀, 远轴面向下, 接种在再生培养基上。叶片再生培养基选用 MS^[3]、1/2MS (大量元素减半) 和 NN 69^[4] 3 种基本培养基, 附加葡萄糖 30 g/L、不同浓度的 BA 和 IAA。按 L₉(3⁴) 正交试验设计, 共 9 个处理, 试验因子水平见表 1。每个三角瓶接种 3 片叶, 每处理接种 8 瓶。糖种类和 AgNO₃ 对叶片再生的影响试验选用的再生培养基分别为 NN 69+BA 5.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 和 NN 69+BA 5.0 mg/L + NAA

0.5 mg/L + 葡萄糖 30 g/L, 2 个试验均采用随机区组试验设计, 每处理 6 瓶, 重复 1 次。培养基均附加琼脂 6 g/L, pH 5.8。接种叶片首先暗培养 20 d, 然后转移到培养架上培养。温度 (25±2), 光照时间 14 h, 光照强度 2 000 lx, 日光灯光源。叶片接种后 60 d 统计叶片再生效率 (叶片平均再生频率和再生芽数), 并对结果进行方差分析, 显著水平为 0.05。

表 1 试验因子水平

Table 1 Factors and levers				mg/L
因子水平 Levels of factors	基本培养基 Medium	6-苄基腺嘌呤 BA	吲哚乙酸 IAA	
1	MS	2.5	0.1	
2	1/2MS	5.0	0.3	
3	NN 69	10.0	0.5	

2 结果与分析

2.1 叶片不定芽再生的过程

叶片接种 10 d 后开始隆起肿胀, 在叶片切伤处、叶柄端处产生少量白色愈伤组织。经过 20 d 暗培养, 愈伤组织明显增多并形成块状, 呈黄白色, 主要在叶背中脉处形成, 个别叶片愈伤组织上出现黄绿色芽点, 已明显不同于愈伤组织。光培养 3 d 后, 愈伤组织变为黄绿色。愈伤组织继续分化, 出现黄绿色芽点, 形成不定芽。不定芽有的呈单个分布, 有的则连成芽丛。随着培养时间延长, 叶片再生频率和再生不定芽数量开始增加。光下培养 30 d 时, 叶片再

* [收稿日期] 2002-01-24

[基金项目] 西北农林科技大学青年科研专项基金资助项目

[作者简介] 徐凌飞(1969-), 男, 陕西乾县人, 讲师, 在读博士, 主要从事果树生物技术育种研究。

生频率不再增加,以后仅是不定芽增殖和伸长形成不定梢。不定芽产生于叶片近中脉、中脉伤口及叶基部伤口上,在叶片中后部产生较多。这与本试验曾进行的叶片不同部位的再生能力结果相一致,不定芽基本产生于中部和后部叶块,前部产生很少。

2.2 培养基种类和植物生长调节剂对叶片再生的影响

表 2 表明,不同处理间叶片再生效率差异较大,再生频率最高为 66.7%,再生芽数最高可达 2.83,最少为 0.92。R 为极差,其值越大,表示该因素越重要,因此对叶片不定芽诱导影响最大的是基本培养基的种类,其次是植物生长调节剂。3 种基本培养基

的 L 值以 NN 69 最大,为 1.584,说明 NN 69 培养基诱导不定芽效果最好,1/2MS 次之,MS 最差。NN 69+ BA 2.5~5.0 mg/L + IAA 0.1~0.5 mg/L 再生频率最高达 66.7%,再生芽数大于 2.5;1/2MS+ BA 5.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 再生频率较高,为 55.6%,再生芽数也较多,为 2.33。

对 L₉(3⁴) 正交试验的单因子效益分析结果表明,当基本培养基为 NN 69,BA 浓度为 5.0 mg/L,IAA 浓度为 0.5 mg/L 时,叶片再生频率最高。NN 69+ BA 5.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 为最优配方组合,可以作为八月红梨叶片再生的适宜培养基。

表 2 不同培养基和植物生长调节剂对叶片再生的影响

Table 2 Influence of different medi and plant growth regulators on bud regeneration of leave

组合号 Combination No.	基本培养基 Medium	苄基腺嘌呤/ (mg·L ⁻¹) BA	吲哚乙酸/ (mg·L ⁻¹) IAA	再生频率/% Regeneration frequency	再生芽数 Bud No. per leave
1	MS	2.5	0.1	25.0	0.92
2	MS	5.0	0.3	25.0	0.83
3	MS	10.0	0.5	33.3	1.58
4	1/2MS	2.5	0.3	33.3	1.33
5	1/2MS	5.0	0.5	55.6	2.33
6	1/2MS	10.0	0.1	41.7	1.00
7	NN 69	2.5	0.5	66.7	2.75
8	NN 69	5.0	0.1	66.7	2.83
9	NN 69	10.0	0.3	25.0	1.25
L ₁	0.833	1.25	1.334		
L ₂	1.306	1.473	0.833		
L ₃	1.584	1.00	1.556		
R	0.751	0.473	0.723		

注: L 代表各处理水平上再生频率之和; R 代表处理中最大再生频率与最小再生频率之差。

Note: L stands for the sum of regeneration frequency in all deal; R stands for the discrepancy between maximum regeneration frequency and minimum regeneration frequency in deal

2.3 糖的种类对叶片再生的影响

由表 3 可以看出,不同种类的糖对梨叶片再生有明显影响。采用白砂糖的叶片再生频率很低,与葡萄糖和蔗糖的再生频率有显著差异,并且再生芽数也极低,所以建议在梨叶片再生时不要使用白砂糖。3 种糖中,以蔗糖的再生频率最高,再生芽数最多,但葡萄糖和蔗糖的再生频率无显著差异,其作用效果相近。

表 3 糖对叶片再生的影响

Table 3 Effect of sugars on bud regeneration of leave

处理 Treatment	浓度/(g·L ⁻¹) Concentration	再生频率/% Regeneration frequency	再生芽数 Bud No. per leave
白砂糖 Granulated sugar	30	16.7 b	0.17
葡萄糖 Glucose	30	38.9 a	0.89
蔗糖 Sucrose	30	44.4 a	1.28

2.4 不同质量浓度 A gNO₃ 对叶片再生的影响

A gNO₃ 溶液采用过滤灭菌,在培养基高压灭菌后、凝固前加入。

表 4 不同质量浓度 A gNO₃ 对叶片再生的影响

Table 4 Effect of A gNO₃ with different concentration

A gNO ₃ / (mg·L ⁻¹)	再生频率/% Regeneration frequency	再生芽数 Bud No. per leave
0	27.8 b	0.83
0.1	33.3 b	0.99
0.5	66.7 a	2.0
1.0	33.3 b	0.99
1.5	38.9 b	1.16

由表 4 可见,A gNO₃ 在 0.1~1.5 mg/L 时,对八月红梨叶片再生有一定的促进作用。A gNO₃ 0.5 mg/L 对叶片再生表现出了显著的促进作用,叶片再生频率最高,平均再生芽数最多,分别

为 66.7% 和 2.0。其他质量浓度的 AgNO_3 与对照没有显著差异。

3 讨论

基本培养基是影响梨叶片再生的重要因素, 其次是植物生长调节剂。NN 69 培养基对八月红梨叶片再生不定芽的诱导效果优于 1/2MS 和 MS。冀蜜、丰水和金花梨^[5,6] 叶片离体培养也表明 NN 69 是一种适宜于梨叶片再生的培养基。基本培养基对外植体再生的影响在于其组成成分和浓度是否适宜于外植体再生。在建立外植体再生体系时, 要选择适宜的基本培养基, 并要同其他因素结合起来。

在试验中发现八月红梨叶片在同一种培养基 NN 69+ BA 5.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 上, 各次试

验的叶片再生效率有差异, 而且有时差异很大。这说明叶片接种前的生理生化状态对叶片的再生有很大影响。来源不同的外植体具有不同的遗传或营养物质基础, 而成为影响其再生能力的先决条件。高活性的细胞分裂素 TDZ (Thidiazuron) 可以降低苹果叶片接种前生理生化状态对叶片再生效率的影响, 获得高的叶片再生频率^[7]。TDZ 在诱导梨叶片再生不定芽中也有显著作用^[8]。本研究从八月红梨叶片诱导出不定芽, 叶片再生效率高于已报道的一些梨品种, 但再生效率尤其是再生芽数远低于苹果品种嘎拉、乔纳金等^[9]。这虽然与梨和苹果的基因型有关, 但还有待于应用 TDZ 以及筛选其他培养条件提高梨叶片的再生效率。

[参考文献]

- [1] Caboni E, Tonelli M G, Lauri P, et al. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild Pear[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 59(1): 1- 7.
- [2] Lane W D, L ketani H, Hayashi T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese (*Pyrus pyrifolia*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 54(1): 9- 14.
- [3] 李浚明 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. 41.
- [4] 杨增海 园艺植物组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 1987. 351- 352.
- [5] 韩志成, 冯志红, 陈霜莹. 梨离体叶片诱导不定芽的研究[J]. 河北果树, 1998, (2): 12.
- [6] 孙清荣. 金花梨叶片不定芽诱导研究[J]. 落叶果树, 2000, (3): 8- 10.
- [7] 张志宏. 苹果叶片离体再生不定芽及遗传转化的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 1996.
- [8] Leblay C, Chevreau E, Raboin L M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 25: 99- 105.
- [9] 师校欣, 杜国强, 高 仪, 等. 苹果离体叶片高效再生不定芽技术研究[J]. 果树科学, 1999, 16(4): 255- 258.

Regeneration of adventitious bud from leaves of 'Bayuehong' pear

XU Ling-fei¹, MA Feng-wang¹, WANG Zhe-zhi², REN Xiao-lin¹

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: The basal medium, BA, and IAA were used to compare their effect on adventitious bud induction from leaves of 'Bayuehong' pear by using the orthogonal experiment design. The results showed that the basal medium played a determinant role in initiating the adventitious buds. NN 69+ BA 5.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L was the best combination for leaf regeneration. No effect on regeneration efficiency of leaf was found by substituting equal concentration glucose for sucrose in NN 69 medium, while replacing sucrose with granulated sugar greatly reduced regeneration efficiency. AgNO_3 enhanced the regeneration efficiency of leaf while its concentration varied from 0.1 to 1.5 mg/L, and the most effective concentration of AgNO_3 was 0.5 mg/L.

Key words: *Pyrus communis* L.; leaf; bud regeneration