梨组织培养与遗传转化研究进展

谭雪辉, 刘洪章

(吉林农业大学园艺学院, 长春 130118)

摘要: 综述了梨树的组织培养技术和梨遗传转化研究取得的成绩。侧重介绍了应用于梨树研究的叶片培养法、茎尖培养法两种主要的组织培养技术和以农杆菌介导法为主的遗传转化方法; 详细介绍了培养基类型, 生长调节剂, 培养条件等对梨组织培养的影响; 初步介绍了影响梨树遗传转化的因素以及存在的问题和展望。

关键词: 梨; 组织培养; 遗传转化

中图分类号: S 661.203.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2007)01-0147-03

梨(*Pyrus*)属蔷薇科植物,有30个种。我国梨栽培品种有白梨(*P. bretschneideri*),秋子梨(*P. ussuriensis*),沙梨(*P. pyrifolia*)和西洋梨(*P. communis*),其中前三种为东方梨,原产我国。梨是我国传统的果品。我国梨的栽培历史悠久,是东方梨的主要生产国,是世界梨的原产中心之一。梨的果实含有多种营养成分,如蛋白质,脂肪,糖,维生素以及多种矿质元素等,这些都是人体所必需的,因而深受人们的喜爱。然而梨树在生产中还存在某些亟待解决的问题。由于童期长和基因高度杂合两大特点使其传统的有性杂交育种成效低,工作量大。如何缩短育种时间和提高育种效率成为梨树育种工作者长期追求的目标。随着分子生物学,特别是组织培养和基因工程技术的不断进步,利用生物技术进行育种已成为可能。现就梨组织培养和遗传转化研究进展作一综述。

1 组织培养

早在20世纪30年代, Tukey(1935)进行梨的胚胎培养获得成功。1975年,前苏联学者进行洋梨幼胚培养获得植株。1979年赵惠祥等进行早熟系208×早酥梨杂种胚胎培养,得到比亲本更为早熟的优良单株,他还在1981年从锦丰梨胚乳培养诱导出完整植株。1979年David和1981年赵惠祥从茎尖培养中,分别得到试管苗和完整植株。此外还进行了下胚轴,子叶横切段的培养,都成功地获得了不定芽。目前,梨的组织培养工作已有广泛的发展,大多数集中在叶片培养和茎尖培养两

个方面。研究表明,不同品种,即使同一品种不同的外植体,所采用的培养基的种类、植物生长调节剂的比例和浓度、培养条件等因素也不相同。

1.1 叶片培养

叶片是梨组织培养中普遍采用的外植体。梨叶片培养起步较晚,始于1988年。Laimer等用西洋梨品种康佛伦斯(Conference)试管苗叶片做试验,在BA和IBA的配合下,部分愈伤组织能够形成球状结构,但仅有少量球状结构转化成了不定梢。在随后的十几年的时间里,科研工作者对不同梨的品种进行了以叶片为外植体的组织培养工作。

1.1.1 培养基 基本培养基是影响梨叶片再生的重要因素。许多研究表明,组织培养中广泛使用的MS培养基并不适合梨叶片不定芽的诱导,而以 NN_6 为最佳培养基。如韩继成等^[1]通过试验表明,梨的两个品种冀蜜和丰水分别以 N_6 , NN_6 , MS为基本培养基,附加相同的条件($TZD1\text{mg/L} + IBA0.5\text{mg/L} + CH_250\text{mg/L} + S.30\text{mg/L} + A.5\text{mg/L}$),结果在 NN_6 培养基上获得了最佳效果,不定芽的诱导率为100%。孙清荣等^[2]的研究也支持了这一论点,以西洋梨品种“丰产”试管苗叶片为外植体,在附加激素相同($BA5\text{mg/L} + IAA0.3\text{mg/L}$)的条件下, NN_6 培养基上的叶片不定梢的再生率为100%,而MS是仅为20%。但也有研究指出 NN_6 的诱导率不及MS, WPM ^[3],这也许和基因型有关。

1.1.2 植物生长调节剂 植物生长调节剂在组织培养中起重要的调节作用。不同种类、不同浓度和比例的生长调节剂对植物外植体生长和分化的作用不同。影响梨芽分化的生长调节剂主要有TDZ和BA,影响不定根形成的有IAA, IBA, NAA。但是它们并不是独立起作

第一作者简介:谭雪辉,女,吉林农业大学园艺学院果树学硕士。

通讯作者:刘洪章,男,1957年生,博士,教授,博导。

基金项目:国家外专局国际合作项目资助,编号:WJ200322003。

收稿日期:2006-08-20

用,而是具有协同效应的。当培养基中生长素浓度与细胞分裂素浓度的比例高时,愈伤组织仅形成根,生长素与细胞分裂素比例小时则产生苗,而两种激素的比例适中时,产生无结构的愈伤组织。孙清荣等^[4]通过研究表明:在基本培养基 NN₆₉上,分化不定梢 BA 比 TDZ 更有效;分化体细胞胚,则二者恰好相反。杨恩芹等^[5]的试验结果表明,IBA, NAA 对西洋梨 C₄ 试管苗的生根有明显的促进作用,前者较后者效果好。IBA 浓度在 0.4~1.2mg/L 范围内,生根率随浓度增加而提高。当 IBA 浓度在 1.6mg/L 时,生根率有所下降;NAA 也有相同的效果。说明生长素及其水平也是影响再生率高低的重要因素。一般而言, NAA 是西洋梨栽培品种最常用的生长素,而东方梨品种则以 IAA, IBA 为主。

1.1.3 其他 AgNO₃ 作为一种乙烯抑制剂,可明显促进多种植物不定梢的分化,并在丰产、八月红^[6]和谢花甜梨叶片培养中也得到了证实。

1.1.4 培养条件 叶片的培养条件一般采用 12 h 的光周期,温度为 25 ℃ 左右,光照强度 2 000 Lx。孙清荣^[7]对金花梨叶片接种的初代培养期进行暗培养 3 周,然后转入光下培养,不定梢再生率高达 100%。

1.2 茎尖培养

茎尖培养的目的是脱毒和快速繁殖。茎尖是植株中最年轻,细胞分裂最活跃的部位,几乎不含病毒或很少含病毒,茎尖中的生长点培养成了去除植物中病毒使植物复壮的重要方法。

1.2.1 外植体的消毒 梨茎尖的消毒普遍采用的方法是:外植体用 70% 的酒精浸泡 30 s,用无菌水冲洗 3~5 次,再放入 0.1% 的升汞中 10 min,最后用无菌水冲洗 3~5 次,以彻底除去升汞。也有人认为,尽管升汞的杀菌效果极好,但不易将残留的药剂除净,且会给环境造成污染,因此建议使用次氯酸钙。次氯酸钙灭菌后易于除去,不留残余,杀菌力强,对植物材料无害。

1.2.2 培养基的筛选 赵秀梅等以“早六”(早酥×四百目)的嫩梢为试材,进行茎尖培养得出梨茎尖培养芽的分化以 AS 为最佳培养基,但也有研究以 MS, 1/3MS 为基本培养基。生根培养基则以 ASH 和 1/2MS 为基本培养基。

1.2.3 植物生长调节剂及附加物质 研究中大多采用 IAA, IBA, NAA 和 BA, TDZ。有的研究发现在梨诱导芽培养的培养基中还要附加 GA₃,这在香梨, 砀山梨^[8]和玉香梨的茎尖培养中都有相关的报道。NAA 可引愈伤组织的产生,因此在生根培养基中 NAA 的用量不可过大,控制在 0.5 mg/L 以内。另

外,不同品种诱导芽所需要的植物生长调节剂浓度不同。“早六”在 BA1.5 mg/L + NAA0.1 mg/L + GA3.0 mg/L 上芽的分化情况最好。玉香梨则在 BA2 mg/L + NAA0.2 mg/L + GA2.0 mg/L 水平上效果最好。王献革等^[9]在生根培养基中附加 0.5 g 活性炭,结果生根效果好于不加活性炭的。但由于活性炭在吸附酚类的同时,也吸附培养基中的生长调节剂。因此在加有活性炭的培养基中,生长调节剂的浓度应适当提高。

1.2.4 外植体的褐变及防止 生长季节采集梨芽或茎尖进行组织培养最大的问题之一就是褐变,造成成活率低。褐变发生的原因是植物体内含有较多的酚类化合物,其在多酚氧化酶的作用下,氧化而成为褐色的酚类物质和水,酚类物质以会在酪氨酸酶等酶的作用下,使外植体的蛋白质聚合,生长停顿,最终导致死亡。目前采取防止褐变的措施有:缩短转瓶时间,可以控制褐变;在培养基中加入抗氧化剂,如维生素 C, 硫代硫酸钠, 二硫苏糖醇和柠檬酸等。在试验中常使用 0.01%~0.1% 活性炭吸附酚类氧化物,以减轻培养物褐变程度;接种后的初代培养期进行暗处理,可以控制外植体的褐变发生;培养基低 pH 值可降低多酚氧化酶活性和底物利用率,从而抑制褐变。

当然不管采用哪种具体措施,都应既要保证控制褐变效果良好,又要考虑是否经济实用便利,同时还不能与外植体进一步增殖分化生长相矛盾,否则,控制褐变就失去了意义。

2 遗传转化

目前,转基因梨的研究尚处于试验研究阶段,无生产应用的转基因植株。梨的遗传转化普遍采用了农杆菌介导法,即用携带有目的基因的农杆菌感染植物或离体器官(叶片,茎尖,茎段等)的受伤部位,然后将受伤部位的组织在选择培养基上培养,筛选出转基因细胞。

2.1 农杆菌介导法

农杆菌是一种革兰氏阴性土壤杆菌。现已发现,与植物基因转化有关的有两种类型:一为根癌农杆菌,它含有 Ti 质粒;二为发根农杆菌,它含有 Ri 质粒。Ti 质粒(包括 Ri 质粒)上有一段转移 DNA,在农杆菌侵染植物时,这段 DNA 可以插入到植物基因组中,使其携带的目的基因在植物中得以表达。

梨遗传转化虽然起步较晚,但也取得了不小成绩。1996 年 Mourgues 等率先建立了西洋梨的遗传转化体系,通过农杆菌介导法成功地将 GUS 及 NptII 基因导入康弗伦斯,并获得高达 42.7% 的遗传转化率。随后开展

了不少梨转基因研究,但多数是为了提高转基因植株的抗病虫能力。Reyniord 等^[10]和 Mourgues 等分别向梨中导入 attacin E 基因以及抗菌肽 cecropins 基因,均增强了梨对火疫病的抗性。近年 Puterka 等^[11]在梨中导入抗菌肽 D5C1 基因,不仅提高了植株抗火疫病的能力,还能显著降低梨木虱蛹、幼虫和成虫在梨树上的危害。Bell 等^[12]将发根农杆菌基因 *rolC* 成功导入 Beurre Bosc, 并获得了矮化的转基因植株。此后, Zhu 等^[13]也相继将 *rolB* 基因转入 BP10030 砧木品种,但遗传转化率较低。

2.2 影响转基因频率的因素

2.2.1 基因型

基因型是决定转基因成功与否的重要因素。梨种类和品种不同,农杆菌感染力,植株再生能力,生根能力以及转化率均不同。目前获得的转基因植株中仅有欧洲梨及少量砧木品种,而砂梨,白梨,新疆梨等东方梨系还未成功。

2.2.2 外植体的种类

已成功获得的转基因植株大多采用叶片作为外植体,这也许和叶片再生体系的稳定,高效,重复性好有关。或者叶片对农杆菌更为敏感,更易受侵染。

2.2.3 培养条件

外植体培养条件不同,转化频率也不同。梨转基因中外植体与农杆菌共培养时间长短,感染后外植体暗培养时间长短,以及培养基组成都会影响转化频率。

2.3 转基因植株的检测

梨与其它植物转基因一样,先通过抗性筛选获得抗性芽后生成植株,再对抗性植株进行检测,检测阳性的植株才是真正的转基因植株。目前用于鉴定梨转基因植株的检测方法主要有以下几种。

2.3.1 GUS 活性检测

利用 GUS 组织化学染色法对获得的转化植株进行 GUS 基因表达测定。在一定的条件下,将待测定的组织置于 GUS 染液中,转化的组织变蓝,非转化的组织无此种反应。GUS 活性检测是梨转基因植株检测的一种常规方法,在梨转基因植株鉴定中有着广泛应用。

2.3.2 PCR 检测

根据植物表达载体上的已知序列,如 GUS 基因和卡那霉素抗性基因,以及插入到表达载体中的目的基因设计合适的引物,通过 PCR 扩增验证这些已知序列是否存在,从而判断某植株是否是转基因植株。

2.3.3 Southern 杂交检测

由于 PCR 反应极为灵敏,有时会扩增出假阳性带,所以为了证实 PCR 产物的真实性,需要进一步对 PCR 反应呈现阳性反应的部分植株单

系提取 DNA 进行 HindIII 酶切后的 Southern 杂交检测,结果得到阳性反应株系,表明外源基因已被整合到受体植株中。

3 小结与展望

梨的组织培养与转基因研究至今已有 10 多年,在再生体系的建立及外源目的基因的导入两方面已取得了不少的成就,但仍存在很多亟待解决的问题,如受基因型的限制,有些品种再生能力较差,研究范围还较窄。另外,再生频率与转化频率之间存在一定的差距,即使再生能力较强,转化频率也不一定高。基因转化的方法比较单一(主要是农杆菌介导)。与梨产量,品质及抗性等相关的外源目的基因的分离及转入植株的研究还处于起始阶段。然而,随着研究手段的不断更新和改进,以及细胞生物学和分子生物学等理论与技术的发展,用遗传工程全面改良梨品种将指日可待。

参考文献:

- [1] 韩继成,冯志红. 梨离体叶片诱导不定芽的研究[J]. 河北果树,1998(2): 12.
- [2] 孙清荣,孙洪雁. 西洋梨“丰产”叶片不定梢再生[J]. 落叶果树,1999(4): 9-10.
- [3] Shibli RA, A jiluni MMA, Obeidat AA. Direct regeneration from pear (*Pyrus syriaca*) leaf explant[J]. Advances in Hort Science, 2000, 14(1): 12-18.
- [4] 孙清荣,刘庆忠. 西洋梨叶片直接再生体细胞胚[J]. 园艺学报, 2003,30(1): 85-86.
- [5] 杨恩芹,刘贵仁. 西洋梨试管苗的生根试验[J]. 天津农业科学, 1996,2(3): 18-19.
- [6] 徐凌飞,马锋旺. 八月红梨叶片不定芽诱导研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(4): 73-75.
- [7] 孙清荣. 金花梨叶片不定梢诱导研究[J]. 落叶果树,2000(3): 8-10.
- [8] 宋梅,王淑娟. 香梨,砀山梨组织培养及脱毒快繁技术[J]. 新疆农业科学,2003,40(6): 376-377.
- [9] 王献革,及华. 黄金梨的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2003,39(6): 621.
- [10] Reyniord JP, Mourgues F, Norelli J, et al. First evident for difference in fire blight resistance among transgenic pear clones expression attacin E gene from *Hyalophora cecropia*[J]. Plant Sci, 1999, 149: 23-31
- [11] Puterka GJ, Bocchetti C, Dang P, et al. Pear transformed with a lytic peptide gene for disease control affects nontarget organism, pear psylla (*Homoptera: Psyllidae*)[J]. J Econ Entomol, 2002, 95: 797-802.
- [12] Bell RL, Scorza R, Srinivasan C, et al. Transformation of 'Beurre Bosc' pear with the *rolC* gene[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1999, 124: 570-574.
- [13] Zhu LH, Welander M. Adventitious shoot regeneration of two dwarfing pear rootstocks and the development of a transformation protocol[J]. J Hort Sci & Biotech, 2000, 75(6): 745-752.