

杨立,伍涛,刘政,等.基于正交设计的西洋梨‘Conference’愈伤组织诱导研究[J].湖北农业科学,2022,61(24):160-162.

# 基于正交设计的西洋梨‘Conference’愈伤组织诱导研究

杨立,伍涛,刘政,程寅胜,李谢雨,聂显双,秦仲麒

(湖北省农业科学院果树茶叶研究所/湖北省梨工程技术研究中心,武汉 430070)

**摘要:**以西洋梨‘Conference’为材料诱导愈伤组织,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法,探讨各因子对‘Conference’梨愈伤组织诱导效果的影响。结果表明,各因素对愈伤组织诱导率的影响表现为 TDZ 浓度 > 外植体类型 > IBA 浓度,TDZ、IBA 浓度对试验结果的影响呈显著水平( $P < 0.05$ ),不同水平间也差异显著。最优组合为 $A_1B_3C_3$ ,即以茎段为外植体,培养基和植物生长调节剂组合为 MS+2.0 mg/L TDZ + 0.5 mg/L IBA 中暗培养 35 d,诱导率可达 100%。

**关键词:**‘Conference’梨;组织培养;愈伤组织;正交设计

中图分类号:S661

文献标识码:A

文章编号:0439-8114(2022)24-0160-03

DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2022.24.034

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Study on inducing callus of pear (*Pyrus communis* L. ‘Conference’) by orthogonal array-based method

YANG Li, WU Tao, LIU Zheng, CHENG Yin-sheng, LI Xie-yu, NIE Xian-shuang, QIN Zhong-qi

(Institute of Fruit Tree Tea/Pear Engineering Technology Research Center of Hubei Province, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** *Pyrus communis* L. ‘Conference’ was used as material to induce callus, and  $L_9(3^4)$  orthogonal design was used to explore the effects of various factors on callus induction of ‘Conference’ pear. The results showed that the order of influence of each factor on callus induction: TDZ concentration > explants type > IBA concentration, and the influence of TDZ and IBA on the experimental results was significant ( $P < 0.05$ ), in addition, there were significant differences among different levels.  $A_1B_3C_3$  proved to be the best combination, stem segments were used as explants, MS+2.0 mg/L TDZ +0.5 mg/L IBA medium and dark culture for 35 days were adopted, and the induction rate was 100%.

**Key words:** *Pyrus communis* L. ‘Conference’; tissue culture; callus; orthogonal design

梨(*Pyrus* L.)属于蔷薇科(Rosaceae)苹果亚科(Maloideae)或梨亚科(Pomideae)<sup>[1]</sup>,是世界五大水果之一,深受人们青睐。随着现代水果产业的发展,消费市场对梨综合品质的要求不断升级。因此,利用基因工程手段定向培育农艺性状优良的品种是现代果树育种长期关注的重点。

遗传转化是植物基因工程的重要环节,高效、稳定的转化受体系统是进行果树遗传转化研究的关键。尽管梨树中山梨、砀山酥梨等品种已建立了遗传转化再生植株体系<sup>[2,3]</sup>,但普遍存在转化效率低的问题。愈伤组织是已分化的细胞回到脱分化的分生细胞状态,更易于接受外源基因,在理论上作为受体

收稿日期:2022-04-27

基金项目:国家自然科学基金项目(31801819);湖北省自然科学基金项目(2018CFB285);湖北省农业科学院青年科学基金项目(2020NKYJJ12);湖北省农业科技创新中心重大项目(2020-620-000-002-05)

作者简介:杨立(1987-),女,湖北天门人,助理研究员,博士,主要从事梨品质发育生物学与栽培生理研究,(电话)18602756828(电子信箱)kelizi@126.com;通信作者,秦仲麒(1962-),湖北安陆人,研究员,主要从事梨树栽培、育种及分子生物学研究,(电话)13971051389(电子信箱)zhongqiqin@163.com。

的转化效率更高。随着愈伤组织在果树遗传转化功能分析中的成功应用<sup>[4-6]</sup>,有必要在‘Conference’梨中建立一套高效且可持续扩大培养的愈伤组织无性系。

正交设计是研究与处理多因素试验的一种科学方法,可以实现最少的试验次数达到与大量全面试验等效的结果<sup>[7]</sup>。因此,本研究以‘Conference’为试材,通过正交设计研究不同外植体和生长调节剂组合对愈伤组织形成的影响,以期筛选得到最佳试验方案,建立一套成熟稳定的梨无性培养系,为后期开展遗传转化的基因功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为西洋梨品种‘Conference’无菌苗,为华中农业大学洪霓教授赠予,后实验室继代保存。在无菌条件下,选择长势良好的植株作为试验接种的对象,分别剪取叶片(5 mm×5 mm)、叶柄(约 0.5 mm)及带芽的茎段(5~10 mm)为外植体。

### 1.2 正交试验设计

采用 3 因素 3 水平正交试验,3 因素为外植体和加入培养基中的 TDZ 和 IBA,3 水平因素与水平见表 1<sup>[7]</sup>。

表 1  $L_9(3^3)$  正交试验因素与水平

水平	因素		
	外植体(A)	TDZ 浓度(B)/mg/L	IBA 浓度(C)/mg/L
1	茎段	0	0.1
2	叶柄	1	0.3
3	叶片	2	0.5

### 1.3 培养条件

基本培养基为 MS,含 6.5 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖,pH 为 5.8~5.9,培养温度(25±0.2)℃,24 h 暗培养。每个处理设置 4~5 个培养瓶,每瓶各接种 10~15 个外植体。培养 35 d 后统计各处理的外植体愈伤组织诱导率。试验数据采用 SPSS 19 软件分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织诱导率统计

对愈伤诱导情况进行统计,因为部分处理组的脱分化率不在 30%~70%,为提高显著性检验的准确度,对诱导率进行反正弦平方根转换<sup>[8]</sup>(表 2)。

经过外植体、TDZ、IBA 3 因素 3 水平共 9 个组合的正交试验,不同组合对诱导愈伤组织再生影响各不相同。组内因素水平极差值(R)反映了该因素对

试验结果的影响程度。由表 3 可知,设计的 3 个因素对愈伤组织诱导作用主次关系为  $B>A>C$ ,即培养基中 TDZ 的浓度>外植体的类型>IBA 浓度。根据各因素平均值( $K_i$ )的大小,可得出最优组合为  $A_1B_3C_3$ ,即以茎段为外植体,置于培养基 MS+2.0 mg/L TDZ+0.5 mg/L IBA 的组合条件下培养,愈伤组织的诱导率最高。

表 2 正交试验试验结果统计

处理	接种外植体/个	脱分化外植体/个	诱导率/%	$\sin^{-1}\sqrt{X}$
1	40	4	10.00	18.43
2	42	37	88.10	69.82
3	40	40	100.00	90.00
4	42	5	11.90	20.18
5	44	38	86.36	68.33
6	45	35	77.78	61.88
7	40	3	7.50	15.90
8	40	12	30.00	33.21
9	40	13	32.50	34.76

表 3 愈伤组织正交试验结果的直观分析 (单位:%)

因素	$K_1$	$K_2$	$K_3$	R
A	59.42	50.13	27.96	31.46
B	18.17	57.12	62.21	44.04
C	37.84	41.59	63.85	26.01

### 2.2 愈伤组织诱导结果的方差分析及多重比较

2.2.1 试验结果方差分析 试验结果  $\sin^{-1}\sqrt{X}$  的方差分析见表 4。因素 B 对试验结果的影响具有显著性( $P<0.05$ ),在本试验组合中,TDZ 浓度的高低能显著影响梨组织的愈伤组织形成,同时,外植体类型(A)和生长调节剂 IBA(C)对愈伤组织是否形成的影响不显著。

表 4 正交试验结果的方差分析

变异来源	平方和(SS)	自由度(df)	均方(S)	F	P
A	1 567.63	2	783.82	11.99	0.077
B	3 482.86	2	1 741.43	26.65	0.036*
C	695.48	2	347.74	5.32	0.158
误差	130.69	2	65.34		
总变异	5 876.66	8			

注:“\*”表示在 0.05 水平呈显著差异。下表同

2.2.2 不同水平间的多重比较 不同水平之间多重比较的结果见表 5, $A_1$ 和  $A_3$ 、 $A_3$ 和  $A_1$ 、 $B_1$ 和  $B_2$ 、 $B_1$ 和  $B_3$ 、 $B_2$ 和  $B_1$ 、 $B_3$ 和  $B_1$ 水平之间呈显著差异( $P<0.05$ )。但平均诱导率  $B_3$ (62.21%)比  $B_2$ (57.12%)高 5.09 个百分点, $C_3$ (63.85%)比  $C_1$ (37.84%)高 26.01 个百分点,尽管  $B_3$ 和  $B_2$ 、 $C_3$ 和  $C_1$ 之间无显著差异,但可以获得

更多的愈伤组织,因此因素B、C的最佳选项为 $B_3$ 和 $C_3$ 水平。

表5 不同水平间的多重比较分析

因素A(I)	因素A(J)	均值差值(I-J)	P
$A_1$	$A_2$	9.29	0.295
	$A_3$	31.46	0.041*
$A_2$	$A_1$	-9.29	0.295
	$A_3$	22.17	0.078
$A_3$	$A_1$	-22.17	0.041*
	$A_2$	31.46	0.078
$B_1$	$B_2$	-38.95	0.028*
	$B_3$	-44.04	0.022*
$B_2$	$B_1$	38.95	0.028*
	$B_3$	-5.09	0.521
$B_3$	$B_1$	44.04	0.022*
	$B_2$	5.09	0.521
$C_1$	$C_2$	-3.75	0.627
	$C_3$	-26.01	0.092
$C_2$	$C_1$	3.75	0.627
	$C_3$	-16.49	0.130
$C_3$	$C_1$	26.01	0.092
	$C_2$	16.49	0.130

### 3 小结与讨论

植物的再生途径有多种方式,可通过根<sup>[9]</sup>、胚胎和子叶<sup>[10]</sup>、原生质体<sup>[11,12]</sup>再生,或愈伤组织再分化<sup>[13,14]</sup>等。王关林等<sup>[15]</sup>认为,用于基因转化的受体系统,其再生率一般80%~90%。其中,愈伤组织是经历了脱分化的分生细胞,分裂周期短、扩大培养后易获得大量受体细胞,因此,具有更明显的转化优势。

在本试验中,TDZ和IBA对试验结果有影响,诱导率由大到小依次为 $B_3$ 、 $B_2$ 、 $B_1$ 、 $C_3$ 、 $C_2$ 、 $C_1$ ,证明在适宜浓度范围内,愈伤诱导率与培养基中TDZ或IBA的浓度呈正比。尽管生长素在细胞脱分化过程中起主要作用,但当配合一定浓度细胞分裂素时,诱导效果更明显。例如,在IBA(C)浓度为0.1 mg/L时, $B_3C_1$

组合中愈伤组织诱导率最高,为77.78%,当IBA浓度为0.5 mg/L时,诱导效率达到100%。本研究获得了‘Conference’梨大量的愈伤组织,以用于植物瞬时表达分析或优化构建植物再生转化体系,为后期深入开展基因功能研究奠定了良好基础。

#### 参考文献:

- [1] 滕元文. 梨属植物系统发育及东方梨品种起源研究进展[J]. 果树学报, 2017, 34(3): 370-378.
- [2] YANG Y, WANG D, WANG C, et al. Construction of high efficiency regeneration and transformation systems of *Pyrus ussuriensis* Maxim[J]. Plant cell tissue and organ culture, 2017, 131(1): 139-150.
- [3] 孟颖光, 张朝红, 王跃进. 抗病基因 *VpPR10* 转化‘砧山酥梨’及转化条件的优化[J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1567-1574.
- [4] 陈智勇, 易自力, 蒋建雄, 等. 草地早熟禾愈伤组织遗传转化受体系统的建立[J]. 中国草地学报, 2007(2): 54-58.
- [5] BAI S, TAO R, TANG Y, et al. BBX16, a B-box protein, positively regulates light-induced anthocyanin accumulation by activating MYB10 in red pear[J]. Plant biotechnology journal, 2019, 17(10): 1985-1997.
- [6] LIU Y, YANG T, LIN Z, et al. A WRKY transcription factor PbrWRKY53 from *Pyrus betulaefolia* is involved in drought tolerance and AsA accumulation[J]. Plant biotechnology journal, 2019, 17(9): 1770-1787.
- [7] 刘文卿. 实验设计[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005.
- [8] 林德光. 生物统计的教学原理[M]. 沈阳: 辽宁人民出版社, 1982. 195-201.
- [9] SUGIMOTO K, JIAO Y, MEYEROWITZ E M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway[J]. Developmental cell, 2010, 18(3): 463-471.
- [10] BROWNING G, OGNJANOV V, PASSEY A J, et al. Multiple shoot and root regeneration from pear embryo cotyledon explants in vitro[J]. Journal of horticultural science, 1987, 62(3): 305-311.
- [11] OCHATT S J, CASO O H. Shoot regeneration from leaf mesophyll protoplasts of wild pear (*Pyrus communis* var. *pyraster* L.)[J]. Journal of plant physiology, 1986, 122(3): 243-249.
- [12] NAING A H, ADEDEJI O S, KIM C K. Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement[J]. Scientia horticulturae, 2021, 283. DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110043.
- [13] ZHOU C, WANG S, ZHOU H, et al. Transcriptome sequencing analysis of sorghum callus with various regeneration capacities[J]. Planta, 2021, 254(2): 33-33.
- [14] PAL M, YADAV R, GOUTAM U, et al. A simple protocol for high frequency plant regeneration and enhancing *Shikoinin* production from callus cultures in *Arnebia hispidissima*[J]. South african journal of botany, 2022, 149: 781-788.
- [15] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002. 347.