

梨多倍体化对离体叶片不定梢再生能力的影响

孙清荣, 孙洪雁, 辛力, 李慧峰, 刘庆忠

(山东省果树研究所 泰安 271000)

摘要: 以源于二倍体梨品种 Fertility (*Pyrus communis* L.) 通过秋水仙碱离体诱变体细胞染色体加倍获得的不同同源多倍体无性系为试材, 以离体叶片为外植体, 观察研究了不同倍性无性系叶片的不定梢再生能力。结果表明, 多倍体的不定梢再生率显著低于二倍体的再生率。不同多倍体无性系的不定梢再生能力也存在显著差异。三倍体无性系 3x-3 和四倍体无性系 4x-4 不能诱导产生不定梢。表明器官发生能力下降或植物细胞全能性的丧失与细胞染色体多倍体化有关。

关键词: 梨; 多倍体; 叶片; 不定梢再生; 细胞全能性

Effect of Polyploidization of Pear (*Pyrus communis* L.) on Shoot Regeneration Ability from *in vitro* Leaf Explants

SUN Qing-rong, SUN Hong-yan, XIN Li, LI Hui-feng, LIU Qing-zhong

(Shandong Institute of Pomology, Taian 271000)

Abstract: Shoot regeneration ability from *in vitro* leaf explants of different ploidy clones which were derived from the same diploid cultivar of pear (*Pyrus communis* L.) by colchicine treatment was examined. The regeneration rates of Neopolyploids were significantly lower than that of diploid control. Regeneration rates among different neopolyploid clones were significantly different. Triploid '3x-3' and tetraploid '4x-4' failed to regenerate. These results revealed that the decrease of regeneration ability or loss of totipotency was related to the polyploidization.

Key words: *Pyrus communis*; Neopolyploid; *in vitro* leaves; Shoot regeneration; Totipotency

离体条件下, 植物叶片能成功被诱导产生不定梢在于它们细胞的全能性, 即细胞进行二次分化、器官发生及再生完整植株的能力。植物叶片培养通过直接再生途径或通过愈伤再生途径诱导产生不定梢(或体细胞胚), 已在很多植物种类上获得了成功。但研究证明, 同一试材开始能被成功诱导产生不定梢的外植体(如愈伤或子叶等), 如果其细胞内 DNA 含量或染色体的倍性产生变化后, 则会导致再生能力下降或细胞全能性的丧失。在一些植物的愈伤组织继代培养中发现, 随着培养年龄的增加, 形态发生能力下降, 长期继代培养的愈伤组织, 胚性愈伤会转变为非胚性愈伤, 开始能够成功诱导器官发生的愈伤, 长期继代

后转变为器官发生能力下降或器官发生能力完全丧失。如黄瓜胚性愈伤, 随着培养年龄的增加, 体细胞胚再生率下降和逐步丧失^[1]; 胡萝卜胚性细胞悬浮培养中存在全能性细胞和非全能性细胞^[2]; 橡树体细胞胚随着继代培养时间的延长, 有的无性系失去了体细胞胚再生为完整植株的能力^[3]; 培养 3~5d 黄瓜实生苗的子叶不定梢再生率达 100%, 而实生苗培养 7d 或更长时间, 其子叶不定梢再生率急剧下降^[4]等。研究分析这些再生能力下降的愈伤或外植体的 DNA 含量, 结果都证明细胞 DNA 含量增加或染色体数目发生了变异, 表明了体细胞的器官再生能力下降与染色体的多倍化有关。Binarova 等^[5]的研究用实验证明

收稿日期: 2011-01-25 修回日期: 2011-07-11

基金项目: 山东省自然科学基金(Y2008D50); 山东省科技发展计划项目(2008GG2HZ09018)

作者简介: 孙清荣, 博士, 研究员。主要从事果树生物技术育种研究。E-mail: sunqr@sdip.cn

了染色体多倍化与体细胞胚发生的关系: 抗微管药物 APM (amiprophos-methyl) (阻止细胞分裂, 使染色体加倍) 短时间处理苜蓿和胡萝卜的胚性细胞悬浮培养物, 结果阻止了体细胞胚发生。已报道的这些研究结果都是根据愈伤组织或体细胞胚的继代培养过程中, 由于细胞倍性的不稳定而导致了器官发生能力下降或丧失。关于人工诱导同一个作物品种产生多倍体后, 同源多倍体植株的倍性变化对其离体叶片器官发生能力的影响尚未见报道。本文首次研究了二倍体梨品种 Fertility (*Pyrus communis* L.) 经体细胞染色体加倍获得的系列多倍体无性系离体叶片的不定梢再生能力, 目的是探明梨倍性变化与叶片不定梢再生能力或细胞全能性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

秋水仙碱离体诱变二倍体梨品种 Fertility (*Pyrus communis* L.) 获得的三倍体、四倍体、五倍体和混倍体 (4x/6x) 无性系的试管苗^[6], 二倍体 Fertility 试管苗为对照。

1.2 方法

1.2.1 叶片不定梢诱导 从不同倍性无性系继代培养 4~5 周的试管苗的顶端摘取刚展开的幼嫩叶片, 用无菌刀片垂直于叶片中脉横切伤 3~5 刀, 接种于不定梢诱导培养基: NN69 + 5mg/L BA + 0.3mg/L IBA^[6-7], 接种后放暗培养条件下培养 3 周, 然后转光下培养。8 周后观察不定梢发生情况

并计算不同倍性无性系的不定梢再生率。

1.2.2 不同培养基组成对多倍体无性系叶片不定梢再生的影响 为了提高多倍体无性系叶片不定梢再生率, 设计观察了不同 TDZ 浓度及不同碳源对多倍体无性系叶片不定梢再生的作用。

1.2.3 再生不定梢的倍性分析 参照文献 [8], 诱导不同倍性无性系叶片获得的再生不定梢的倍性用 Flow Cytometry 倍性分析仪鉴定。

1.3 统计分析

所有不定梢诱导试验中的每个处理重复 3 次, 每次重复 30 个外植体。结果采用 DPS v3.01 软件进行统计分析, 不同处理平均值用 Duncan 法进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 梨倍性对叶片不定梢再生能力影响

不同倍性无性系的叶片接种在能成功诱导二倍体梨品种 Fertility 再生不定梢的培养基 NN69 + 5mg/L BA + 0.3mg/L IBA 上, 多倍体无性系叶片的不定梢再生率比二倍体显著降低 (表 1), 相同倍性的不同无性系间, 其再生率也不相同, 尤以四倍体不同无性系间差异最显著, 4x-1 的再生率可达 61.7%, 而 4x-4 不能再生不定梢。同样的, 三倍体 3x-3 也不能再生不定梢。表明叶片的不定梢再生潜力与供体植株的倍性变化及基因型有关, 梨人工多倍体化对离体叶片不定梢的发生具有负影响。

表 1 梨倍性对离体叶片不定梢再生率的影响及再生不定梢和供体梢生长形态特征比较

Table 1 Effect of different ploidy clones on shoot regeneration from leaf explants and growth characteristics comparison between regenerated shoots and parent neopolyploids

无性系 Ploidy clones	不定梢再生率* (%) Shoot regeneration rate	不定梢形态特征 Regenerated shoots growth characteristics <i>in vitro</i>	再生不定梢的倍性 Regenerated shoots ploidy level
混倍体 Mixploid (Mix-1)	6.7 ± 2.9de	分离形成两种类型: 一种和供体亲本完全不同; 另一种和供体亲本相似	三倍体和六倍体
五倍体 Pentaploid (5x-1)	11.7 ± 7.6de	不分离, 和供体亲本相似	五倍体
五倍体 Pentaploid (5x-2)	16.1 ± 12.1d	不分离, 但和供体亲本完全不同, 而和产生 供体亲本的亲本即其祖父相似	二倍体
四倍体 Tetraploid (4x-1)	61.7 ± 14.4b	不分离, 和供体亲本相似	四倍体
四倍体 Tetraploid (4x-2)	32.9 ± 6.7c	不分离, 和供体亲本相似	四倍体
四倍体 Tetraploid (4x-4)	0e	不能再生	N/A
三倍体 Triploid (3x-1)	16.7 ± 5.8d	不分离, 和供体亲本相似	三倍体
三倍体 Triploid (3x-2)	6.7 ± 2.9de	不分离, 和供体亲本相似	三倍体
三倍体 Triploid (3x-3)	0e	不能再生	N/A
二倍体 Diploid Fertility	83.3 ± 5.8a	不分离, 和供体亲本相似	二倍体

* 不定梢再生培养基为 NN69 添加 5mg/L BA 和 0.3mg/L IBA。同一列中的不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

* Shoot induction medium was NN69 with 5mg/L BA and 0.3mg/L IBA.

Different letters within same column were significantly different at $P < 0.05$. The same as below

2.2 培养基及碳源对多倍体叶片不定梢再生的影响

为了提高多倍体无性系叶片的不定梢再生率,选择细胞分裂素活性高的 TDZ 代替 BA,观察研究了 TDZ 是否能提高低再生率多倍体无性系的不定梢再生率。与表 1 的结果相比,所试验的 TDZ 浓度(0.5~2.0mg/L)都不能明显提高多倍体无性系叶

片的不定梢再生能力(表 2),有的无性系还表现再生率下降,如 Mix-1 和 4x-1。另一个试验中,把 TDZ 浓度提高到 4mg/L,多倍体叶片外植体则产生更多愈伤,不定梢分化能力更低或不能分化(数据没列出)。表明梨多倍化趋势相对于衍生它们的二倍体倾向于不定梢再生能力下降。

表 2 TDZ 浓度对多倍体无性系叶片不定梢再生的影响

Table 2 Effect of media on shoot regeneration from leaf explants of different neopolyploids

培养基*	不定梢再生率(%) Percentage of shoot regeneration								
	Mix-1	5x-1	5x-2	4x-1	4x-2	4x-4	3x-1	3x-2	3x-3
TDZ 0.5	0h	8.3 ± 5.3efg	11.3 ± 6.3cdef	25.0 ± 4.1b	35.0 ± 9.1a	0h	15.0 ± 7.1cd	0h	0h
TDZ 1.0	0h	3.3 ± 2.3gh	3.9 ± 1.3gh	17.5 ± 2.9c	15.0 ± 4.1c	0h	10.6 ± 3.1def	0h	0h
TDZ 2.0	0h	3.8 ± 2.5gh	4.0 ± 1.3gh	17.5 ± 5.0c	17.5 ± 6.1c	0h	13.8 ± 8.5cde	0h	0h

*: 激素单位 mg/L, 培养基其他组成为 NN69 加 0.3mg/L IBA Hormone unit mg/L, Medium composition was NN69 with 0.3mg/L IBA

碳源用麦芽糖替代常规使用的蔗糖,培养基中加 30g/L 麦芽糖时对三倍体无性系 3x-1 叶片不定梢的发生具有显著的促进作用(表 3),再生率为 48.9%,显著高于蔗糖 20g/L、30g/L 和麦芽糖 20g/L,而麦芽糖 20g/L 和蔗糖 20g/L 之间无显著差异。麦芽糖对其他多倍体无性系表现负影响作用,要么不能再生,

要么再生率降低。表明除了三倍体 3x-1 外,诱导不定梢再生,蔗糖比麦芽糖更有效。推测三倍体 3x-1 倍性变异的可能还伴有基因突变、染色体结构重排等基因型的变异从而导致不同倍性无性系间和相同倍性的不同无性系间对碳源的反应不同。

表 3 碳源对多倍体无性系叶片不定梢再生的影响

Table 3 Effect of carbon source on shoot regeneration from leaf explants of neopolyploids

碳源(g/L)	不定梢再生率(%) Percentage of shoot regeneration						
	Mix-1	5x-1	5x-2	4x-2	4x-4	3x-1	3x-2
麦芽糖 Maltose 20	0h	0h	0h	0h	0h	23.1 ± 4.2c	0h
麦芽糖 Maltose 30	5.0 ± 5.0gh	0h	0h	0h	0h	48.9 ± 1.9a	0h
蔗糖 Sucrose 20	0h	0h	0h	3h	0h	21.7 ± 2.9cd	0h
蔗糖 Sucrose 30	6.7 ± 2.9fg	11.7 ± 7.6ef	16.1 ± 12.1de	32.9 ± 6.7b	0h	16.7 ± 5.8de	6.7 ± 2.9fg

2.3 多倍体叶片再生不定梢的倍性变异

从不同倍性无性系的离体叶片诱导产生的不定梢也表现出不同的倍性变异(表 1)。大部分多倍体无性系叶片产生和亲本相同倍性的不定梢,不定梢表型不表现分离和变异,能够保持多倍体亲本原种的特性。但混倍体(4x/6x)产生和亲本倍性完全不同的不定梢,不定梢发生分离,表现两种表型变异。这两种表型变异经 flow cytometry 倍性分析仪鉴定:一种表型变异是六倍体,另一种表型变异是三倍体,这两种倍性产生的比例是不同等的,在获得的 40 个不定梢中,仅有 1 个为三倍体,其余都为六倍体。混倍体离体叶片产生的不定梢不能保持亲本特性。五倍体无性系 5x-2 的离体叶片产生的不定梢,同样表现不同于亲本倍性和表型的变异,产生的不定梢不分离,这些表型一致的不定梢的倍性经 flow cytome-

try 鉴定都为二倍体,其表型和衍生多倍体亲本的二倍体祖先(亲本的亲本)(亦即不定梢的祖父)完全相似,表明人工多倍体有丝分裂是不平衡的和不稳定的,有向二倍化发展的趋势。混倍体 Mix-1 和五倍体 5x-2 多倍体新种质不能用离体叶片体细胞再生的方法来繁殖和保存原种。

3 讨论

经分析证明较老子叶的核 DNA 含量增加,表现为多倍化。Coutos-Thevenot 等^[2]比较了胡萝卜胚性细胞系和非胚性细胞系区别,表明胚性细胞系的细胞都是二倍体,而非胚性细胞系是四倍体或二倍体,推测多倍性和非整倍性是胚性能力丧失的主要原因。培养时间较长的黄瓜胚性愈伤组织的不定器官发生能力下降和丧失,也与愈伤组织细胞的高度多倍化密

切相关^[1]。抗微管药物 APM(amiprophos-methyl) 短时间处理苜蓿和胡萝卜的胚性细胞悬浮培养物阻止体细胞胚发生^[5] ,与 APM 导致细胞倍性的不稳定及 DNA 的非整倍性有关。本研究中,梨人工秋水仙碱诱变获得了 9 个多倍体无性系,这些多倍体无性系的叶片不定梢再生能力相对于二倍体对照都显著降低,这一结果与上述报道的植物细胞培养过程中的多倍化伴随再生能力的下降和逐步丧失的结果相一致。多倍体在离体条件下,器官发生能力下降可能是由于完成正常的有丝分裂比较困难或有丝分裂产生更多的非整倍细胞,非整倍细胞生长较慢或不能生长发育形成新的个体^[9]。但 Zhang 等^[10]研究了长期继代培养的 35 个柑桔品种愈伤组织的 DNA 含量变化与体细胞胚发生能力的关系,结果证明 DNA 量的变化对体细胞胚发生能力的影响并不表现显著相关性,体细胞胚发生能力可能是由基因型决定的。本研究中相同倍性的不同多倍体无性系如 4_{x-1}、4_{x-2} 和 4_{x-4},它们叶片的不定梢再生能力也有显著区别,说明多倍体不单是产生染色体数目的加倍或基因冗余,还可能发生染色体结构的重排、易位、倒位或重复基因发生丢失或保留^[11],使得相同倍性的不同无性系的不定器官发生能力也表现出不同。

混倍体 Mix-1 叶片再生不定梢分离形成两种不同倍性的不定梢,可能与多个同源染色体的存在导致了染色体之间的假性配对和不平衡配对,从而使子细胞含有不平衡的染色体数目(非整倍体)有关,非整倍细胞生长较慢,被周围的整倍细胞的优先快速生长所覆盖^[10]。秋水仙碱诱导获得了拟南芥同源四倍体,该四倍体的愈伤组织在进行脱分化时经历了包括无丝分裂和多极纺锤体的异常有丝分裂,从而导致了四倍体的二倍化^[12],这些二倍体的细胞优先参与植株再生,所以四倍体的愈伤产生较高频率的二倍体再生植株。本文中,同源五倍体 5_{x-2} 叶片再生所获得的不定梢 100% 表现为二倍体,也可能是由于有丝分裂的异常,导致了多倍体向二倍化发展的趋势。

无性系 3_{x-3} 和 4_{x-4} 的叶片不能再生不定梢,这与报道的离体细胞全能性的丧失与多倍化相关的结果相一致^[14]。在植物上关于器官发生能力丧失与多倍化关系的机制研究还几乎是空白,但在酵母中,研究染色体有丝分裂对倍性的敏感性反应表明:倍性调节一致致死基因,该基因编码与微管相连的蛋白 BIK1^[13]。维持正常细胞骨架功能需要 BIK1, BIK1 丢失对二倍体有丝分裂没有任何影响,但导致四倍体有丝分裂致死。另外,一个物种能承受的最

大倍性水平似乎是有限的,但决定这个有限的机制并不清楚。本研究中观察到了梨多倍体比二倍体叶片不定梢再生能力显著下降,有的甚至不能再生这一现象,但多倍体器官发生能力下降或丧失的分子机制尚不清楚,有待于阐明。

本文中的倍性检测采用的是 flow cytometry 倍性分析仪,这一方法对染色体数整倍(1_x)有差异的区别是有效的,但也不能排除有非整倍体的存在^[14]。

总之,本研究中梨多倍体比衍生它们的二倍体的叶片不定梢再生能力下降或丧失,为研究染色体多倍化和体细胞器官发生能力的关系提供了良好的研究试材,梨染色体多倍化引起器官发生能力下降或丧失的细胞学机制和分子机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Kubalakovam M, Dolezel J, Lebeda A. Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus culture [J]. Biol Plant, 1996, 38 (3): 475-480
- [2] Coutos-Thevenot P, Jouanneau J P, Brown S, et al. Embryogenic and non-embryogenic cell lines of daucus carota cloned from meristematic cell clusters: relation with cell ploidy determined by flow cytometry [J]. Plant Cell Rep, 1990, 8: 605-608
- [3] Endemann M, Hristoforoglu K, Stauber I, et al. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry [J]. Biol Plant, 2001, 44(3): 339-345
- [4] Colijn-Hooymans C M, Hakkert J C, Jansen J et al. Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages [J]. Plant Cell Tissue Organ Cul, 1994, 39: 211-217
- [5] Binarova P, Dolezel J. Effect of anti-microtubular drug amiprophos-methyl on somatic embryogenesis and DNA ploidy levels in alfalfa and carrot cell suspension cultures [J]. Biol Plant, 1993, 35 (3): 329-339
- [6] Sun Q, Sun H, Li L, et al. *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar, 'Fertility' [J]. J Hort Sci Biotechnol, 2009, 84 (5): 548-552
- [7] 孙清荣, 孙洪雁. 西洋梨 '丰产' 叶片不定梢再生 [J]. 落叶果树, 1999, 31 (4): 9-10
- [8] 孙洪雁, 孙清荣, 辛力. 秋水仙碱诱导梨离体叶片再生多倍体 [J]. 西北植物学报, 2009, 29 (9): 1785-1790
- [9] Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid [J]. Nat Rev Genet, 2005, 6: 836-846
- [10] Zhang J E, Guo W W, Deng X X. Relationship between ploidy variation of Citrus calli and competence for somatic embryogenesis [J]. Acta Genet Sinica, 2006, 33 (7): 647-654
- [11] Blanc G, Wolfe K H. Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during Arabidopsis evolution [J]. Plant Cell, 2004, 16: 1679-1691
- [12] D' amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates [J]. CRC Crit Rev Plant Sci, 1986, 3: 73-112
- [13] Lin H, Carvalho P D, Kho D, et al. Polyploids require Bikfor kinetochore-microtubule attachment [J]. J Cell Biol, 2001, 155: 1173-1184
- [14] Meng R, Finn C. Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2002, 127(5): 767-775