

梨离体再生及遗传转化研究进展

杜宜南^{1,2}, 许建锋^{1,2}, 张玉星^{1,2,3*}, 亓宝秀^{1,2*}

(¹河北农业大学园艺学院, 河北保定 071000; ²河北省梨工程技术研究中心, 河北保定 071000;

³北京林果业生态环境功能提升协同创新中心, 北京 100000)

摘要:综合国内外文献,总结了近年来国内外在梨离体器官再生和遗传转化方面取得的研究进展,并针对生长调节剂的配比、基因型、基本培养基种类和 AgNO₃ 等对再生效率的影响以及农杆菌介导法进行梨遗传转化研究中对转化率有影响的因素进行了重点分析。由此认为基因型是目前限制梨离体器官再生率和遗传转化效率最大的因素,不同的品种宜采取不同的方法。通过系统整理部分前人得到的研究成果,试图从中找到存在于梨再生及遗传转化上的共性问题,并为即将从事梨分子生物学和遗传育种的研究者们提供一些思路。

关键词:梨;再生;遗传转化;基因型

中图分类号:S661.2

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2018)Suppl.-009-08

Progress in the study on *in vitro* regeneration and genetic transformation in pears (*Pyrus* spp.)

DU Yinan^{1,2}, XU Jianfeng^{1,2}, ZHANG Yuxing^{1,2,3*}, QI Baoxiu^{1,2*}

(¹College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China; ²Pear Engineering and Technology Research Center of Hebei, Baoding 071000, Hebei, China; ³Beijing Collaborative Innovation Center for Eco-environmental Improvement with Forestry and Fruit Trees, Beijing 100000, China)

Abstract: The current national and international progress is summarized in the regeneration and genetic transformation of pear explants. The effect of growth hormone ratios, genotypes, basic culture media and AgNO₃ on the regeneration efficiency and factors affecting the transformation rate in the *Agrobacterium*-mediated transformation were analyzed. It is believed that the genotype is the most limiting factor for the regeneration rate as well as the transformation efficiency of pear explants. As the methods used for different pear cultivars are various, therefore, it is the first step to establish a genetic transformation system suitable for one's own experiment in the study on molecular biology of pears. Through summarizing and analyzing the research method and results obtained by some previous researchers in the field, we have attempted to find common obstacles and important solutions in the genetic transformation of pears, so as to provide the new researchers with valuable ideas for the future research on molecular breeding of pears.

Key words: Pear; *In vitro* regeneration; Genetic transformation; Genotype

随着近几年分子生物学的发展,人们对梨基因水平上的研究已经越来越深入,各方面的研究已经相对于之前有了较大的提高。但是,相比较于水稻、玉米、棉花等农作物上的研究还是有一定的差距,尤其是在梨转基因技术的发展和应用方面。目前转基

因技术操作普遍使用的还是农杆菌介导法,即利用携带外源基因的农杆菌菌液侵染梨的外植体器官,而后对其进行再生培养,通过筛选后得到转基因植株。梨转基因技术的发展瓶颈主要是遗传转化,而外植体离体再生是遗传转化研究的基础,归根结底,

收稿日期:2018-11-05 接受日期:2018-12-06

基金项目:林果业生态环境功能提升协同创新中心(CEFF-PXM2018_014207_000024)

作者简介:杜宜南,男,在读硕士研究生,研究方向为果树结实生理与分子生物学。Tel:13733229284, E-mail:467563145@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:zhyx@hebau.edu.cn; E-mail:yyqbx@hebau.edu.cn

提高离体叶片的再生效率是提高梨基因转化效率的关键,也是突破转基因技术发展瓶颈的保证。

1 梨离体再生

1.1 研究现状

梨再生体系虽在近十年内出现了很多报道,但是其在不同的基因型之间差异较大,甚至是相同的品种再生体系也存在着一定的差异,并且可重复性不高。关于梨再生体系的建立大多数为西洋梨品种,比如,早在 1979 年 Lane^[1]茎尖培养获得了成功;1982 年赵惠祥^[2]以‘锦丰’和‘早酥’的顶梢为材料培养出完整植株;1988 年 Laimer 等^[3]以西洋梨‘Conference’试管苗叶片为材料,在多种植物生长调节剂的配合下获得不定梢。到目前为止,‘锦丰’^[4]、‘鸭梨’、‘秋白梨’^[5]、‘金花’^[6]、‘幸水’、‘丰水’^[7]等品种均已在离体培养上取得了成功。在梨再生方面的研

究大多集中在基本培养基种类、植物生长调节剂的浓度及种类、外植体类型等方面,表 1 为目前利用梨离体器官再生成功的情况汇总,其中包括已经应用于遗传转化中并获得转化苗的品种。

1.2 影响梨再生的因素

1.2.1 生长调节剂种类及质量浓度 生长调节剂的种类、质量浓度和配比对梨的离体再生起到很大的作用。有研究认为,培养基中生长调节剂的种类及浓度不同造成了外植体生长和分化能力的不同,可能是因为它们刺激了不同的基因控制的酶类,影响内源激素分布水平,进而在生长和分化上形成了差异^[8]。虽然在梨再生体系建立过程中对生长调节剂种类的选择上各研究相差很多,但是原则上都是以一种生长素搭配一种细胞分裂素的组成方式配比。

就生长素而言,梨离体再生试验一般选择的类型有:萘乙酸(NAA)、吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸

表 1 梨离体器官再生、遗传转化及其研究结果

Table 1 Summary of the study of regeneration and transformation of pear

品种 Variety	离体器官 Explant	基本培 养基 Basic medium	碳源种类及质量浓度 Carbon source type and content/(g·L ⁻¹)	生长调节剂、其他添加 物质的种类及质量浓度 Growth regulators and added substances/(mg·L ⁻¹)	暗培养 时间 Dark culture/d	再生率 Regeneration rate/%	转化率 Conversion rate/%
砀山酥 ^[9] Dangshansu	叶片 Leaves	NN ₆₉	山梨醇 Sorbitol: 20	6-BA 2.5+IBA 0.3	20	83.00	-
砀山酥 ^[10] Dangshansu*	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	6-BA 3.0+IBA 0.2+AgNO ₃ 0.5	21	93.00	18.60
雪花梨 ^[11] Xuehuali	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 1.5+IBA 0.2	21	70.83	-
黄冠 ^[12] Huangguan	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 5.0+IAA 0.3	21	77.10	-
黄金梨 ^[13] Whangkeumbae	叶片 Leaves	MS	蔗糖 Sucrose: 30	6-BA 1.0+NAA 0.2	15	45.00	-
金花梨 ^[6] Jinhuali	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	6-BA 3.0+IAA 0.3	21	100.00	-
金花梨 ^[14] Jinhuali	子叶 Otyledon	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	6-BA 3.0+NAA 0.2+AgNO ₃ 2.0	21	85.20	-
库尔勒香梨 ^[15] Kuerlexiangli pear	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 1.0+IBA 0.3+AgNO ₃ 0.5	21	64.30	-
六月酥梨 ^[16] Liuyuesuli	叶片 Leaves	NN ₆₉	山梨醇 Sorbitol: 40	6-BA 5.0+IBA 0.3	30	83.30	-
若光梨 ^[17] Wakanikari	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 1.0+IBA 0.15 +AgNO ₃ 0.1	21	63.20	-
南果梨 ^[8] Nanguoli	叶片 Leaves	MS	蔗糖 Sucrose: 30	6-BA 5.0+NAA 0.2	0	46.10	-
早红考密斯 ^[18] Early Red Du Comice	叶片 Leaves	MS	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 3.0+IBA 0.1	21	55.60	-
早酥 ^[18] Zaosu	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 1.0+NAA 0.4	21	75.00	-
豆梨 ^[19] Bean pear *	子叶 Otyledon	MS	蔗糖 Sucrose: 30	6-BA 4.0+NAA 0.2	20	85.00	10.00
豆梨 ^[19] Bean pear	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 2.5+NAA 0.1	20	50.00	-
杜梨 ^[20] Duli*	子叶 Otyledon	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	6-BA 5.0+NAA 0.0	0	68.90	11.80
杜梨 ^[21] Duli	子叶 Otyledon	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 35	6-BA 5.0+IBA 0.05	21	100.00	-
杜梨 ^[22] Duli	叶片 Leaves	MS	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 1.0+NAA 0.2	21	44.00	-
Bartlete ^[23]	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 0.6+NAA 0.2	27	38.00	-
DaRGAS II ^[23]	叶片 Leaves	NN ₆₉	蔗糖 Sucrose: 30	TDZ 1.8+NAA 0.2	28	57.00	-
Carrick ^[24]	叶片 Leaves	WPM	蔗糖 Sucrose: 30	预处理 Pretreatment: 6-BA 5.0+ NAA 0.2 再生处理 Regeneration: TDZ 3.0+ NAA 0.2	27	35.00	-

注: 品种带*号的表示已经遗传转化成功。

Note: The variety with the * sign indicates that the genetic transformation has been successful.

(IBA)3种。研究表明NAA为西洋梨再生中最常使用的生长素,而亚洲梨以IBA为主,但最近几年不少人使用NAA也成功地完成了亚洲梨的再生,例如,孙俊^[8]以NAA为生长素建立了‘南果梨’的叶片再生体系,曹霞等^[25]完成了‘翠冠’和‘雪青’的叶片再生。而大多数人仍然以IBA作为生长素进行梨的再生试验,并取得了理想的试验效果。相比较于IBA对于梨离体再生的效果,IAA比IBA稍差,可能是因为细胞分裂素类似物质腺嘌呤与生长素IAA之间的质量浓度配比可影响植物组织培养中芽和根器官的发生^[8]。但针对这一结论,孙清荣^[6]则得到过梨叶片对不同水平的IAA反应敏感,而对IBA反应较迟钝的结论。

在细胞分裂素方面,一般选择的类型有苄氨基腺嘌呤(6-BA)、噻苯隆(TDZ)等。而关于这2种植物生长调节剂对梨叶片再生的影响,目前的研究结论不一。其中孙清荣等^[26]认为TDZ比6-BA更适合‘大鸭梨’叶片不定芽再生,但在‘鸭梨’叶片不定芽再生方面,6-BA比TDZ更有效,且TDZ未能诱导‘鸭梨’叶片产生不定芽^[27]。Caboni等^[28]认为6-BA对梨叶片不定芽再生的诱导效果优于TDZ,这与Liu等^[29]在‘中矮一号’试验中的结论相吻合。

1.2.2 外植体 就目前的研究来看,梨叶片是人们离体再生试验中使用频率较高的外植体器官,另外,也有部分研究通过培养花粉、嫩梢、成熟胚的子叶,得到了再生植株。

叶片是农杆菌介导的梨遗传转化研究中最普遍使用的外植体,因为它为无性试材,再生不定芽和体细胞胚的能力较强,对农杆菌较为敏感,操作简单;叶片熟性、继代培养时间、叶片位置及其大小都影响着转化率的高低。目前研究涉及的有‘鸭梨’^[27]、‘砀山酥’^[9]、‘雪青’^[11]、‘黄冠’^[12]、‘丰水’^[7]等很多品种,再生效率也较高。

子叶的离体再生能力较强,而且对农杆菌也较为敏感,所以选择以梨子叶为外植体进行再生和遗传转化试验往往可以获得较好的试验结果。林静^[21]以杜梨子叶为材料进行再生试验,发现6-BA和IBA在一定浓度范围内,都得到了较高的再生效率,相比王海燕^[20]的试验,将IBA换成NAA,其再生效率并没有明显的差别,而与以杜梨叶片^[22]为材料的再生试验相比,可以看出杜梨子叶的再生能力高于叶片。另外,李秀梅等^[14]用‘金花梨’子叶获得85.2%的

再生率的结果,也支持了这个观点。

以茎段为试材进行再生培养并成功获得植株最早被人们研究,但是并没有被广泛应用。徐凌飞^[30]以‘砀山酥’和‘八月红’节间茎段为材料,首次在两种梨上完成了茎段诱导不定芽的试验,再生率分别为53.3%和66.7%。而李嫦艳^[31]以3个早熟品种‘新梨七号’‘早酥’‘西子绿’的茎段为材料也成功获得了相应的再生植株。

花粉作为外植体进行再生试验在20世纪90年代有过相关的报道,但大多集中在单倍体植株的诱导方面,并未见过有以梨花粉为外植体进行遗传转化的试验。

不同梨品种、器官及生理时期再生能力差异很大,诱导再生条件及效率很难复制。陶爱群^[19]以豆梨为试验材料,对比了不同的离体器官的再生能力,结果发现在同样的培养条件下,豆梨的叶片再生能力高于叶柄,茎段再生能力最差。曹霞等^[25]针对此现象做了相关研究,选取了‘翠冠’‘雪青’‘西子绿’3种材料,发现它们在叶片再生能力上具有显著的差别,不仅如此,‘翠冠’叶片在同一种培养基上的不同批次的试验,其叶片再生率也有明显的差异,她认为这是叶片接种前的生理生化状态不同所致。有趣的是,同为一个试验室的孟颢光等^[10]和付镇芳^[32]在以‘砀山酥’叶片为材料,并选择了相同的生长调节剂浓度配比,却分别得到了93.0%和64.37%的再生率,这与赵竑博等^[9]的研究结果也不尽相同。这说明同样遗传背景的母本材料被多次继代培养后,其生理生化状态可能有了明显的变化,因此,不同的继代次数可能导致外植体具有了不同的营养物质基础和内源激素水平,从而影响其再生效率。

1.2.3 基本培养基 目前用于植物再生的基本培养基有多种,如MS、WPM、1/2MS、NN₆₉、QL、B5等。而在梨再生试验的培养基选择上,主要以NN₆₉为主,秦璐等^[15]对此做了专门的研究,以‘库尔勒香梨’为试材,分别对比了NN₆₉、MS、B5三种培养基对其叶片不定芽再生的影响,其中,用NN₆₉得到了最高的再生率,认为导致差异的主要原因是三种培养基中有机元素的种类和含量的不同。

NN₆₉作为目前使用最多的梨再生试验的基本培养基,其对梨叶片不定芽诱导的高效性已经被很多人所证实。相比于其他基本培养基,铵态氮和硝态氮的离子浓度不同,其中NN₆₉中无机盐浓度低,NO₃⁻

含量高,同时还添加了生物素和叶酸。

1.2.4 AgNO₃对梨叶片再生的影响 有研究表明,在梨再生培养基中添加一定浓度的AgNO₃能有效提高叶片不定芽再生率,并且这个研究结果已经在很多试验中被证实。其中包括钟颖等^[33]和秦璐等^[15]对‘库尔勒香梨’、周莉莉^[34]对‘丰水’等的研究,他们发现,在培养基中添加适量的AgNO₃明显提高了梨叶片不定芽的再生率。但不同的研究在AgNO₃的使用量上也得到了不同的结果,除了跟外植体类型有关系外,不同的生长调节剂种类及浓度配比也可能影响了AgNO₃的用量,并从而影响了再生效果。

AgNO₃对梨不定芽再生的促进作用,其原理尚不是很明确,可能是由于在培养过程中,密闭的生长环境容易使植物器官产生乙烯,进而加速褐化,影响其再生效率,而培养中加入Ag⁺后,Ag⁺与细胞膜上的乙烯受体蛋白结合,阻止或降低了乙烯对外植体不定芽再生的抑制作用,而高浓度的Ag⁺又会产生重金属毒害作用,故表现在一定的浓度下,AgNO₃对梨不定芽再生起到了一定的促进作用。但是钟名其等^[35]在桑树上却得到了不同的结论,他在桑树幼叶培养过程中发现了AgNO₃处理后乙烯产量明显高于对照,得出了Ag⁺促进叶片分化并非因为抑制了乙烯合成的结论。

2 梨遗传转化

2.1 研究现状

由于梨再生体系的建立难度较大,因此相对应的遗传转化体系起步较其他物种也较晚,得到的相应科研成果也较少,但并非空白。比如,1996年Mourgues等^[36]以农杆菌介导的方式将标记基因*npt II*和*GUS*导入西洋梨,首次建立了西洋梨的遗传转化体系。1998年Merkulov等^[37]利用携带含有*npt II*基因表达载体的农杆菌侵染西洋梨叶片,并获得了具有卡那霉素抗性的转基因植株。

由于研究人员分布主要以欧美国家为主,加之西洋梨的再生能力优于东方梨,其研究主要是以西洋梨为试材,导入的目的基因主要集中在以增强西洋梨对梨火疫病的抗性方面。其中Mourgues等^[36]将*Attacin E*基因导入西洋梨中获得转基因植株,Reynoid等^[38]以抗菌肽*Cecropins*基因,用农杆菌法侵染叶片获得转基因植株,研究表明以上两种转基因梨对火疫病的抗性均有了明显的提高。而Mal-

noy等^[39]得到的导入乳铁传递蛋白基因的转基因植株,不但增强了树体对梨火疫病的抗性,对另外的两种病菌也产生了一定的抗性。

目前关于梨遗传转化的研究方面,主要为抗病、矮化和提高果品品质几个方面。选择侵染的离体器官主要是叶片或子叶。比如,孟颢光等^[10]将徐伟荣构建的含有芪合酶基因(*VpSTS*)的农杆菌菌株导入‘砀山酥’中,得到了抗性苗,并利用高效液相色谱在抗性苗中检测到了白藜芦醇,但植株的抗病性是否提高并未说明。

矮密栽植一直是果树的一个重要发展方向,因此这些年来人们也开始通过转基因的手段试图获得具有矮生性状的品种或具有矮化性状的砧木。目前研究较多的基因主要是*rolB*和*rolC*,选用的试材也都为砧木,例如,Zhu等^[40]、陶爱群^[19]和王海燕^[20]都选择了以*rolB*为目的基因,并通过有效的遗传转化体系分别将其导入了梨矮化砧BP10030、豆梨和杜梨当中,其中转入*rolB*基因的矮化砧BP10030表现出了矮化和易生根的特性。

对果品质量影响的研究主要集中在果实保鲜方面,Gao等^[41]和齐靖等^[42]都选择了参与乙烯合成的ACC氧化酶作为目的基因,利用叶盘法将其分别导入‘法兰西梨’和‘鸭梨’中,以期提高其耐贮性。李桂琴等^[43]则通过构建‘鸭梨’PPO基因的反义表达载体,获得相应的突变体苗,并对突变体苗体内多酚氧化酶活性进行检测,发现突变体苗体内的多酚氧化酶活性明显低于非转基因苗。

2.2 影响梨遗传转化的因素

2.2.1 基因型 稳定高效的遗传转化体系需要有高效率的再生体系作为保证,而不同品种的梨由于其基因型不同而导致再生率的不稳定也间接影响着它的遗传转化效率。除此之外,不同品种的梨对农杆菌侵染能力也不同,这则直接影响了梨的遗传转化效率。西洋梨的转化效率同样优于东方梨,但近几年也不断有东方梨转基因试验成功的报道,其中包括‘鸭梨’^[42-43]、‘砀山酥’^[9,30,32]、‘雪青’^[44]等品种。

2.2.2 菌株类型 作为侵染植物的农杆菌菌株,LBA4404、EHA105和EHA101最为常用。日本学者Kaneyoshi等^[45]对此做了专题研究,发现以杜梨子叶为材料时,AKE10TC1菌株的侵染力强于AKE10,而以豆梨子叶为材料时,AEK10菌株的侵染能力则明显优于其他菌株。由此可见,不同的农杆菌菌株

对不同的梨基因型的侵染能力不同,所以,正确选择针对于所转化的梨基因型的农杆菌类型对转化有直接的关系。

2.2.3 侵染时间及菌液浓度 合适的菌液侵染浓度和时间对植株再生转化率也有重要影响。菌液浓度越高,侵染时间越长,农杆菌侵入并吸附在细胞上的数量越多,相应的其转化效率就会越高,而菌液浓度低或侵染时间不够,其转化效率明显较低,但是过长的侵染时间和过高的菌液浓度又会使之后的脱毒不完全,对外植体产生毒害,影响其转化效率。

而具体的脱毒时间则受到了外植体类型、基因型和农杆菌菌种类型等方面的影响。同样以‘砀山酥’叶片为试材,孟颢光等^[10]使用GV3101的菌株侵染时间为5 min,而徐凌飞^[30]使用EHA105菌株侵染时间为10 min,付镇芳^[32]对此进行的研究表明,使用LBA4404的农杆菌菌株,侵染时间为5 min和10 min都取得了较好的试验效果,但两者比较,10 min效果最优。

2.2.4 抗生素种类及浓度 在梨的遗传转化过程中,使用抗生素的主要作用是筛选抗性植株和抑制农杆菌的生长,也因此将抗生素分为抑菌抗生素和筛选抗生素。抑菌抗生素大多选择使用头孢霉素,而筛选抗生素则要根据导入表达载体的标记基因的不同而选择相应抗生素,主要以卡那霉素、潮霉素、除草剂等为主。

抑菌抗生素大多都选择头孢霉素,其质量浓度差异不大,保持在250~300 mg·L⁻¹,表现为最好的抑菌效果和对梨不定芽诱导的影响最小。但在同样的外植体类型上也会存在一些不同,如同样以豆梨子叶为外植体进行遗传转化,陶爱群^[19]选择250 mg·L⁻¹的头孢霉素作为抑菌抗生素,而刘松榆^[46]则发现其并不能有效的抑制农杆菌生长,改为250 mg·L⁻¹头孢霉素加羧苄霉素。

抗生素的种类可能对梨的遗传转化效率有一定的影响,这个理论已经在前人的试验中加以证实。徐凌飞^[30]以‘砀山酥’叶片为试材进行遗传转化试验时发现,卡那霉素在2.5 mg·L⁻¹的低质量浓度下仍完全抑制了愈伤组织的形成,而付镇芳^[32]和孟颢光等^[10]同样以‘砀山酥’为试材进行遗传转化试验时,筛选抗生素也选择了新霉素而不是卡那霉素。

同样,抗生素对梨遗传转化的影响仍与其基因型有关。可完全抑制‘砀山酥’叶片愈伤组织形成的

卡那霉素在其他梨品种上却可以作为筛选抗生素并筛选出了抗性苗。并且以卡那霉素为抗生素在不同外植体上的浓度差异还很大,例如在‘翠冠’叶片^[47]中质量浓度为7.5 mg·L⁻¹,‘黄金梨’叶片^[48]中质量浓度为75 mg·L⁻¹,‘丰水’叶片^[49]中质量浓度为12.5 mg·L⁻¹,杜梨子叶^[10,20]中质量浓度为20 mg·L⁻¹,和豆梨的子叶^[9,41]中质量浓度在75~80 mg·L⁻¹等。

2.2.5 共培养时间 共培养的过程其实是附着的农杆菌将T-DNA通过外植体的伤口整合到植物基因组中的一个过程。由于农杆菌侵染的时间过短,只能使农杆菌附着在外植体表面,因此共培养过程对整个遗传转化试验起到了重要的作用。

有研究表明农杆菌在伤口处生存16 h以后才能诱导形成肿瘤,进而完成T-DNA的转化,因此共培养时间应大于16 h,但是共培养时间太长又会使农杆菌生长过旺,不利于后期的杀菌,从而影响不定芽的诱导。

总结现有文献,梨共培养时间大致在3 d左右,不同的外植体类型之间会稍有差异,如王海燕^[20]、周泳^[47]、尹婷^[48]分别以杜梨、‘翠冠’、‘黄金梨’为试验试材,都认为3 d的共培养时间可以得到最好的转化效果,而甘惠芳^[49]认为‘丰水’共培养4 d的转化效率会更高,付镇芳^[32]和孟颢光等^[10]同用‘砀山酥’为试材,认为共培养时间2 d为最佳。

3 展 望

用基因工程技术解决果树生产问题,是科学技术为我们提供的新思路,也为新品种的培育指明了一条捷径。我国作为梨果产业世界第一大国,在这方面的研究起步较晚,取得成效有限,因此,转基因技术在梨上的研究及利用前景十分广阔。而遗传转化体系的建立在其中起到了举足轻重的作用,建立一个高效稳定的梨遗传转化体系,是实现梨转基因和基因编辑等分子育种技术的首要条件。

梨的再生、转化效率受到许多内源及外源因素的影响,这包括梨的基因型、外植体材料、培养基、生长调节剂种类及配比、农杆菌菌株等。现在虽然有许多报道称发现了梨的有效遗传转化方法,但是,由于存在着相同的外植体材料却得到了不同的结论,甚至不具有很好的重复性,并不能做到普遍适用。基因型和生长调节剂种类及配比作为影响最大的两个因素,今后的工作要重点对此进行研究,掌握各种

类及对比对梨再生及遗传转化各个过程中所起的作用,有针对性地选择生长调节剂的种类和浓度,并不断扩大体系所适用的品种。因此,作为一个研究者,既要结合前人的研究结果,但同时也要对这项技术现存的难度有一个正确的认识,明确基因型的混杂是这项技术发展的最大瓶颈,有针对性地进行之后的研究试验,即要针对具体的试材,研究得到合适的再生转化体系,构建成熟的梨遗传转化体系,从而为梨基因功能研究和分子辅助育种研究等基础工作提供有力的技术平台,以便加快对梨分子生物学研究的进程。

参考文献 References:

- [1] LANE D. Regeneration of pear plant from shoot meristem tips [J]. Plant Science Letters, 1979, 16(2/3): 337-342.
- [2] 赵惠祥. 梨茎尖离体培养[J]. Journal of Intergrative Plant Biology, 1982(4): 392-394.
ZHAO Huixiang. *In vitro* culture of pear stem tips[J]. Journal of Intergrative Plant Biology, 1982(4): 392-394.
- [3] LAIMER M, CAMARA M A, HANZER V, GOTTFRIED H, DIETHARD M, HERMANN K. Regeneration of shoots from leaf discs and stem microcutting of fruit trees as a tool for transformation[J]. Acta Horticulturase, 1988, 235: 85-92.
- [4] 薛光荣, 杨振英, 史永忠, 方成泉, 贾敬贤. 锦丰梨花粉植株的诱导[J]. 园艺学报, 1996, 23(2): 123-127.
XUE Guangrong, YANG Zhenying, SHI Yongzhong, FANG Chengquan, JIA Jingxian. Induction of Jinfeng pear pollen plants [J]. Acta Horticulturase Sinica, 1996, 23(2): 123-127.
- [5] 薛光荣, 杨振英, 洪霓, 史永忠. 茎尖培养等处理脱除梨病毒的技术研究[J]. 中国果树, 1996(3): 9-11.
XUE Guangrong, YANG Zhenying, HONG Ni, SHI Yongzhong. Techniques for removal of pear virus by shoot tip culture and other treatments[J]. China Fruits, 1996(3): 9-11.
- [6] 孙清荣. 金花梨叶片不定梢诱导研究[J]. 落叶果树, 2000, 32(3): 8-10.
SUN Qingrong. Study on the induction of shoots in leaves of Jinhua pear[J]. Deciduous Fruits, 2000, 32(3): 8-10.
- [7] 孙清荣, 孙洪雁, 刘庆忠. 丰水梨的组培快繁研究[J]. 落叶果树, 2001, 33(4): 4-5.
SUN Qingrong, SUN Hongyan, LIU Qingzhong. Study on tissue culture and rapid propagation of Fengshui pear[J]. Deciduous Fruits, 2001, 33(4): 4-5.
- [8] 孙俊. 南果梨叶片离体培养的高效再生体系[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 44-46.
SUN Jun. Efficient regeneration system of *in vitro* culture of Nanguo pear leaves[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(3): 44-46.
- [9] 赵竑博, 徐凌飞, 马锋旺, 梁东, 符轩畅. 砀山酥梨叶片培养和植株再生[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 153-157.
ZHAO Yibo, XU Lingfei, MA Fengwang, LIANG Dong, FU Xuanchang. Leaf culture and plant regeneration of Dangshan pear[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2007, 16(2): 153-157.
- [10] 孟颢光, 张朝红, 王跃进. 抗病基因 VpPR10 转化‘砀山酥梨’及转化条件的优化[J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1567-1574.
MENG Haoguang, ZHANG Chaohong, WANG Yuejin. Optimization of transformation of disease resistance gene VpPR10 into Dangshansuli and transformation conditions[J]. Acta Horticulturase Sinica, 2010, 37(10): 1567-1574.
- [11] 闫允青, 姜桦韬, 谷超, 吴俊. ‘雪花梨’扩繁和叶片再生体系的建立[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(1): 68-75.
YAN Yunqing, JIANG Huatao, GU Chao, WU Jun. The establishment of ‘Snowflake Pear’ and the establishment of leaf regeneration system[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2017, 40(1): 68-75.
- [12] 张玉娇, 李晓刚, 蔺经, 王宏伟, 常有宏. 黄冠梨叶片再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2010, 38(4): 38-39.
ZHANG Yujiao, LI Xiaogang, LIN Jing, WANG Hongwei, CHANG Youhong. Establishment of leaf regeneration system of Huangguan pear[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2010, 38(4): 38-39.
- [13] 陶爱群, 尹婷, 谢深喜. 黄金梨叶片再生体系建立研究[J]. 湖南农业科学, 2012(5): 108-111.
TAO Aiqun, YIN Ting, XIE Shenxi. Study on Establishment of leaf regeneration system of Golden pear[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2012(5): 108-111.
- [14] 李秀梅, 汤浩茹, 罗娅. 金花梨子叶不定梢再生研究[J]. 果树学报, 2004, 21(4): 295-297.
LI Xiumei, TANG Haoru, LUO Ya. Study on the regeneration of the indica from the cotyledon of Jinhua pear[J]. Journal of Fruit Science, 2004, 21(4): 295-297.
- [15] 秦璐, 陈泉, 梁志强, 祝建波. 库尔勒香梨叶片不定芽再生诱导的研究[J]. 北方园艺, 2015(9): 76-79.
QIN Lu, CHEN Quan, LIANG Zhiqiang, ZHU Jianbo. Study on the induction of adventitious bud regeneration in Korla pear[J]. Northern Horticulture, 2015(9): 76-79.
- [16] 吴中营, 徐凌飞, 董晓勤, 陈锡龙, 陈努生. 六月酥梨叶片培养和植株再生[J]. 西北农业学报, 2011, 20(2): 159-164.
WU Zhongying, XU Lingfei, DONG Xiaolin, CHEN Xilong, CHEN Nusheng. Leaf culture and plant regeneration of Liuyuesu pear[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2011, 20(2): 159-164.
- [17] 胡钟东. 砂梨果实成熟相关基因的克隆及其 RNAi 载体的构建[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
HU Zhongdong. Cloning of the genes related to the ripening of pear fruit and the construction of its RNAi vector [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.
- [18] 刘翠琼, 汤浩茹, 罗娅. 不同基因型梨叶片离体培养和植株再

- 生[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1080-1083.
- LIU Cuiqiong, TANG Haoru, LUO Ya. *In vitro* culture and plant regeneration of different genotype pear leaves[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32(6): 1080-1083.
- [19] 陶爱群. 豆梨离体再生体系建立与 rolB 基因转化研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
- TAO Aiqun. Establishment of *in vitro* regeneration system of Pea pear and transformation of rolB gene [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008.
- [20] 王海燕. 农杆菌介导 rolB 基因转化杜梨的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
- WANG Haiyan. *Agrobacterium*-mediated transformation of rolB gene into Du pear [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2014.
- [21] 林静. 杜梨子叶再生及遗传转化体系的建立[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
- LIN Jing. Establishment of cotyledon regeneration and genetic transformation system of Du pear [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2015.
- [22] POUDYAL B, DU G Q, ZHANG Y X. Adventitious shoot regeneration from the leaves of some pear varieties (*Pyrus* spp.) grown *in vitro*[J]. Frontiers of Agriculture in China, 2008, 2(1): 82-92.
- [23] MAHDIEH Y, MARYAM K, ABDOLREZA B, ALI A H, HAMID A. Induction of direct adventitious shoot regeneration in pear (*Pyrus communis* L.)[J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2014, 24(1): 87-92.
- [24] SILVA C, PETERS J, PASA M, DANIELOWSKI R, JOAO B. *In vitro* regeneration of 'Carrick' pear from leaf plants[J]. Revista Eletrônica Científica da UERGS, 2017, 3(1): 238-248.
- [25] 曹霞, 柴明良. 砂梨叶片再生不定梢的研究[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 557-560.
- CAO Xia, CHAI Mingliang. Study on regeneration of shoots in sand pear leaves[J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(5): 557-560.
- [26] 孙清荣, 樊圣华, 刘庆忠. 大鸭梨叶片高频率不定梢再生诱导研究[J]. 山东农业科学, 2003, 35(2): 10-12.
- SUN Qingrong, FAN Shenghua, LIU Qingzhong. Study on the induction of high frequency indefinite shoot regeneration in Dayali pear[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2003, 35(2): 10-12.
- [27] 孙洪雁, 陶吉寒, 辛力, 孙清荣. TDZ 和 BA 对金花梨和鸭梨叶片不定芽再生的影响[J]. 山东农业科学, 2016, 48(1): 26-28.
- SUN Hongyan, TAO Jihan, XIN Li, SUN Qingrong. Effects of TDZ and BA on adventitious bud regeneration of Jinhuali and Yali pear leaves[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2016, 48(1): 26-28.
- [28] CABONI E, TONELLI M G, LAURI P, LAURI P, D'ANGELI D, DAMINO C. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1999, 59(1): 1-7.
- [29] LIU J, ZHANG X, POUDYAL B K, ZHANG Y X, JIAO Z, QI J. Adventitious shoot regeneration from the leaves of *in vitro* grown 'Zhongli 1' pear (*Pyrus* spp.)[J]. Frontiers of Agriculture in China, 2009, 3(1): 60-66.
- [30] 徐凌飞. 梨离体再生和遗传转化的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- XU Lingfei. Study on *in vitro* regeneration and genetic transformation of pear [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2005.
- [31] 李嫦艳. 早熟梨组织培养再生体系建立的研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2011.
- LI Changyan. Study on the establishment of tissue culture regeneration system of early pear [D]. Alaer: Tarim University, 2011.
- [32] 付镇芳. 梨抗黑星病相关基因功能及转化砧山酥梨的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- FU Zhenfang. Study on the function of pear-resistant black spot disease related genes and transformation of Dangshansuli Pear [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2011.
- [33] 钟颖, 冯建荣, 樊新民, 任欢喜, 张秀抗, 许竹叶. 库尔勒香梨离体叶片再生体系的建立[J]. 新疆农业科学, 2018, 55(5): 829-836.
- ZHONG Ying, FENG Jianrong, FAN Xinmin, REN Huanxi, ZHANG Xiukang, XU Zhuye. Establishment of *in vitro* leaf regeneration system of Korla pear [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2018, 55(5): 829-836.
- [34] 周莉莉. 多酚氧化酶基因 dsRNAi 导入丰水梨的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- ZHOU Lili. Study on introduction of polyphenol oxidase gene dsRNAi into Fengshui pear [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006.
- [35] 钟名其, 楼程富, 谈建中, 周金妹, 张有做. AgNO₃ 对桑叶片培养不定芽分化的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(1): 99-102.
- ZHONG Mingqi, LOU Chengfu, TAN Jianzhong, ZHOU Jinmei, ZHANG Youzuo. Influence of AgNO₃ on adventitious bud differentiation of mulberry leaves[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2000, 26(1): 99-102.
- [36] MOURGUES F, CHEVREAU E, LAMBERT C, BONDT A. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16(3/4): 245-249.
- [37] MERKULOV S, BARTISH I, DOLGOV S, PASTERNAK T. Genetic transformation of pear *Pyrus communis* L. mediated by *agrobacterium tumefaciens*[J]. Genetika, 1998, 34(3): 373-378.
- [38] REYNOIRD J, MOURGUES F, CHEVREAU E, BRISSET M. First evidence for differences in fire blight resistance among transgenic pear clones expressing Attacin E gene[J]. Acta Horticulturae, 1999, 489: 245-246.
- [39] MALNOY M, VENISSE J S, BRISSET M N, CHEVREAU E. Expression of bovine lactoferrin cDNA confers resistance to *Erwinia amylovora* in transgenic pear [J]. Molecular Breeding, 2005, 12(3): 231-244.

- [40] ZHU L H, WELANDER M. Adventitious shoot regeneration of two dwarfing pear rootstocks and the development of a transformation protocol [J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2000, 75(6): 745-752.
- [41] GAO M, MURAYAMA H, MATSUDA N, ISUZUGAWA K, DANDEKAR A M, NAKANO H. Development of *Agrobacterium*-mediated transformation of pear (*Pyrus communis* L.) with cotyledon explants and production of transgenic pears using ACC oxidase cDNA[J]. *Plant Biotechnology*, 2005, 19(5): 319-327.
- [42] 齐靖,董祯,张玉星. 鸭梨 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段的克隆及农杆菌介导的反义遗传转化[J]. *植物分类与资源学报*, 2014, 36(5): 622-628.
 QI Jing, DONG Zhen, ZHANG Yuxing. Cloning of ACC oxidase gene cDNA fragment from *agrobacterium* and *Agrobacterium*-mediated antisense genetic transformation[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2014, 36(5): 622-628.
- [43] 李桂琴,齐靖,高志华,许冬倩,李会宣,张玉星. 鸭梨多酚氧化酶基因反义表达载体的构建及农杆菌介导的遗传转化[J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(5): 635-639.
 LI Guiqin, QI Jing, GAO Zhihua, XU Dongqian, LI Huixuan, ZHANG Yuxing. Construction of polyphenol oxidase gene antisense expression vector and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11(5): 635-639.
- [44] 汤绍虎,孙敏,廖志华,周启贵,李道高. 根癌农杆菌介导 Cry1Ac 基因转化‘雪青’梨获得转基因植株[J]. *园艺学报*, 2007, 24(1): 59-62.
 TANG Shaohu, SUN Min, LIAO Zhihua, ZHOU Qigui, LI Daogao. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Cry1Ac gene into ‘Xueqing’ pear to obtain transgenic plants[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 24(1): 59-62.
- [45] KANEYOSHI J, WABIKO H, KOBAYASHI S, TSUCHIYA T. *Agrobacterium tumefaciens* AKE10-mediated transformation of an Asian pea pear[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(7): 622-628.
- [46] 刘松瑜. 豆梨遗传转化体系的建立及转基因植株增殖生根研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2009.
 LIU Songyu. Establishment of genetic transformation system of Pea pear and proliferation and rooting of transgenic plants[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2009.
- [47] 周泳. 农杆菌介导的铁贮藏蛋白基因转化翠冠梨的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2005.
 ZHOU Yong. *Agrobacterium*-mediated transformation of iron storage protein gene into Cuiguan pear [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005.
- [48] 尹婷. 砂梨离体再生体系的建立及转 chit42 基因的研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2008.
 YIN Ting. Establishment of *in vitro* regeneration system of sand pear and study on chit42 gene [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008.
- [49] 甘惠芳. 农杆菌介导苹果 PPO 基因 dsRNAi 转化‘丰水’梨的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2008.
 GAN Huifang. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of apple PPO gene dsRNAi into ‘Fengshui’ pear [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.