

保存 8 ~ 33 年的苹果试管苗增殖能力与端粒长度分析

刘雅洁*, 梁 晨*, 王 莉, 杜国强**, 师校欣**

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

摘 要: 为分析苹果试管种质端粒长度与繁殖能力、衰老的关系, 探索端粒长度与苹果试管种质离体保存年限的关系, 对保存多年的不同继代次数的 3 个苹果品种试管苗进行了表型、增殖能力以及端粒长度的研究。结果表明: 保存了 8~33 年的‘富士’、保存 8~27 年的‘金冠’和保存 8~25 年的‘嘎拉’苹果茎尖试管苗继代增殖能力大部分没有变化, 表型未发生明显变化; 3 个品种不同继代次数 30 d 苗龄试管苗叶片端粒长度均差异不显著; 继代 73 代苗龄分别为 10、30、50 和 90 d 的试管苗叶片端粒长度变化因品种而异, ‘富士’‘嘎拉’差异不显著, ‘金冠’50 d 苗龄的最长, 90 d 苗龄的最短; 继代 71 代苗龄 30 d 的‘金冠’试管苗茎段端粒长度显著高于叶片, 茎段和愈伤组织、叶片和愈伤组织之间差异不显著, ‘嘎拉’表现为愈伤组织 > 叶片 > 茎段。苹果试管苗端粒长度变化与其增殖能力、表型及同一继代周期内衰老程度的变化相吻合。

关键词: 苹果; 继代次数; 试管苗; 苗龄; 愈伤组织; 端粒长度

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2021) 02-0243-11

Analysis of Proliferation Abilities and Telomere Lengths of Apple Plantlets *in Vitro* Preserved for Eight to Thirty-three Years

LIU Yajie*, LIANG Chen*, WANG Li, DU Guoqiang**, and SHI Xiaoxin**

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: In order to examine the relationship between telomere lengths and their propagation ability or aging, and to explore the relationship between the telomere lengths and the preservation time limit in apple plantlets *in vitro*, the phenotypes, proliferation characteristics, and telomere lengths of apple plantlets preserved *in vitro* and consecutively subcultured for years were studied in three apple cultivars. The results showed that there were no changes in the proliferation abilities and no significant changes in phenotypes in most apple shoot plantlets *in vitro* from 8 to 33-year ‘Fuji’ preserved, 8 to 27-year ‘Golden Delicious’ preserved, and 8 to 25-year ‘Gala’ preserved, respectively. No significant change in telomere lengths was found in leaves of the plantlets at 30-day plantlet age with different subculture times in three cultivars. The telomere lengths in the 73th subculture time plantlets could change during the given subculture periods,

收稿日期: 2020 - 09 - 16; **修回日期:** 2020 - 12 - 27

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2018204055)

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gdu@hebau.edu.cn, shixx@hebau.edu.cn)

such as 10, 30, 50, and 90 days, which showed cultivar specificity. For example, there was no significant difference of telomere lengths in plantlet leaves of ‘Fuji’ and ‘Gala’, while the telomere lengths in plantlet leaves of ‘Golden Delicious’ were the longest at 50-day and the shortest at 90-day. The telomere lengths in the 71th subculture time plantlet stems cultured for 30 days of ‘Golden Delicious’, were significantly higher than that in leaves, and no significant difference was found either between those in stems and calli or in leaves and calli; while in ‘Gala’, the telomere lengths in calli were the longest, followed by that in leaves and stems. The changes of the telomere lengths in apple plantlets *in vitro* coincided with their proliferation abilities, phenotypes, and aging during the same subculture time.

Keywords: *Malus × domestica*; subculture time; plantlet *in vitro*; plantlet age; callus; telomere length

真核生物染色体末端的端粒是核酸与蛋白质的复合体, 由具有一定保守性的简单重复序列和一系列端粒相关的蛋白组成 (Fulnečková et al., 2016)。细胞分裂过程中 DNA 的半保留复制, 造成染色体末端丢失一定量的碱基对, 端粒则通过自身的缩短维持染色体基因组的完整性 (Gilson & Geli, 2007), 端粒缩短到一定程度, 细胞分裂停止, 逐渐衰老死亡 (Blasco, 2007)。在人类体细胞中, 端粒重复序列 DNA 的长度即端粒长度随年龄增加而缩短, 被认为是衰老的标志 (王钦美 等, 2017)。

目前在植物中已鉴定到拟南芥端粒重复序列为 (TTTAGGG)_n, 且被认为是大多数陆生植物的端粒重复序列 (Richards & Ausubel, 1988)。植物端粒长度变化随生理年龄的增加具有多样性, 在不同植物种类、不同组织部位以及不同环境条件下端粒长度变化不同, 这与动物端粒长度随衰老逐渐缩短的规律存在差别。一方面有研究报道, 女娄菜不同组织和个体发育阶段以及番茄叶片从 4 周到 6 个多月的发育过程中, 端粒长度未见变化 (Broun et al., 1992; Riha et al., 1998); 1 ~ 7 年生的苹果、20 年生的日本樱花 (Moriguchi et al., 2007) 以及 1 ~ 200 年生苏格兰松 (Aronen & Ryyänänen, 2012), 其端粒长度未随树龄变化而变化。另一方面也有报道, 在植物生长发育过程中, 组织器官分化程度越高, 端粒长度越短 (Aronen & Ryyänänen, 2014); 且植物处于不同生长活动期时, 端粒长度也会发生变化, 例如白蜡和柳树端粒长度会随季节改变, 且白蜡雌、雄株端粒长度也有差别 (Mu et al., 2014); Mary-Paz 等 (2015) 研究发现拟南芥根尖分生组织细胞端粒长度与分生组织分裂生长、干细胞功能及植物寿命相关。虽然植物端粒长度变化比较复杂, 但在有些多年生植物中端粒长度随树龄增长呈现规律性变化, 例如狐尾松 (Flanary & Kletetschka et al., 2005) 和银杏 (Liu et al., 2007) 其端粒随树龄增加而延长。Song 等 (2011)、胡旭东等 (2015)、Liang 等 (2015) 及 Cheng 等 (2016) 分别建立了银杏、油松端粒长度与树龄相关性的数学模型, 用于预测植株的生理年龄。可见, 端粒长度的变化与植物细胞分化、衰老及生长发育息息相关。值得注意的是, 以上研究报道多以自然生长的植株为试材, 侧重于端粒长度与植物生长及组织分化的关系, 而植物离体培养中端粒长度变化的相关研究相对较少。离体条件下, 不同植物种类端粒长度变化规律不同, 白桦组织培养状态下端粒长度短于室外树木, 长期离体培养和愈伤组织培养都会导致端粒复制缩短 (Aronen & Ryyänänen, 2014)。而大麦端粒长度在体内分化过程中变短, 在愈伤组织培养过程中延长 (Kilian et al., 1995)。同样, 黄条龙舌兰和韦伯龙舌兰茎段离体培养 (0 ~ 8 周) 过程中端粒长度逐渐伸长 (Rescalvo-Morales et al., 2016)。离体培养条件下在苹果中端粒长度变化研究未见报道。

本试验中以继代培养了不同年限的 ‘富士’ ‘金冠’ 和 ‘嘎拉’ 苹果试管苗为试材, 对不同继代次数、不同苗龄、不同品种的苹果试管苗叶片及不同组织的端粒长度进行研究, 分析苹果试管种质端粒长度与繁殖、衰老的关系, 为进一步探索端粒特性与植物种质资源离体保存年限的关系提供

理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验于 2017 年 3 月—2018 年 10 月在河北农业大学园艺学院生物技术实验室进行。分别于不同年份采集苹果 (*Malus × domestica*) ‘富士’ ‘金冠’ 和 ‘嘎拉’ 品种同一母株茎尖作为外植体接种建立无菌繁殖系, 继代保存至今。2005 年以前接种的试管苗 (常规培养) 未统计实际培养代数, 以平均每年继代 8 次估算继代培养次数, 2011 年 5 月后所有品种试管苗置于 7~9 °C 医用冷藏箱延缓生长保存, 平均 1 年继代 1 次, 2017 年 3 月将试管苗由冷藏箱取出, 常规培养一段时间后进行试验 (详见表 1)。另外, 由 ‘金冠’ ‘嘎拉’ 试管苗叶片诱导愈伤组织, 20 d 继代 1 次, 6 代后用于端粒长度测定。

苹果试管苗继代培养基: MS + BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.05 mg · L⁻¹ + 蔗糖 35.0 g · L⁻¹ + 琼脂 6.0 g · L⁻¹。

苹果试管苗叶片诱导愈伤组织培养基: MS + 2,4-D 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + BA 1.0 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30.0 g · L⁻¹ + 琼脂 6.0 mg · L⁻¹。

愈伤组织继代培养基: MS + BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 维生素 C 5 mg · L⁻¹ + 蔗糖 35.0 g · L⁻¹ + 琼脂 6.0 g · L⁻¹。

常规培养条件: 温度 (25 ± 2) °C, 光照强度 2 000 lx, 光照 14 h · d⁻¹。

端粒长度测定所需试材: 不同继代次数的 ‘金冠’ 和 ‘富士’ (均 143、71 和 34 代) ‘嘎拉’ (165、71 和 34 代) 的苗龄 30 d 试管苗顶端叶片; 继代 73 代的 ‘富士’ ‘金冠’ 和 ‘嘎拉’ 不同苗龄 (10、30、50 和 90 d) 的试管苗顶端叶片; ‘金冠’ ‘嘎拉’ 继代 71 代苗龄 30 d 的试管苗叶片和茎段、继代 6 代培养 20 d 的愈伤组织。

1.2 试验方法

1.2.1 不同继代次数苹果试管苗增殖能力测定

自不同代数的 ‘富士’ ‘金冠’ 和 ‘嘎拉’ 苹果试管苗中, 选取苗龄 30 d 长势一致、大小相同的试管苗新梢茎段接入继代培养基中, 每种材料接种 6 瓶, 每瓶接种 5 株, 重复 3 次, 完全随机试验设计。培养 30 d 后调查出梢数和有效新梢数 (有效新梢数是试管苗高度 ≥ 1.5 cm、可用于生根的新梢数)。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法测定端粒长度

取不同继代次数、不同苗龄的苹果试管苗顶端叶片、茎段及愈伤组织的样品各 0.1 g, 采用 QIAGEN 公司 Plant Genomic DNA Kit 提取基因组 DNA, 具体操作见说明书。

相对端粒长度的测定参照 Cawthon (2002) 的方法, 采用实时荧光定量 PCR 法 (Real-time Quantitative PCR) 并进行改进。将 DNA 样品进行浓度梯度稀释, 记录不同浓度所对应的 Ct 值, 以 DNA 相对浓度为横坐标, Ct 值为纵坐标绘制标准曲线。测量端粒长度的引物为 TelA: 5'-CCCCGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGT-3'; TelB: 5'-GGGGCCCTAATCCCTAATCCCTAATCCCTAATCCCT-3' (Vaquero-Sedas, 2014)。内参基因为 *EF-1α* (FP): 5'-ATTCAAGTATGCC TGGGTGC-3'; *EF-1α* (RP): 5'-CAGTCAGCCTGTGATGTTCC-3'。采用全式金公司 Top Green qPCR

SuperMix 完成实时荧光定量 PCR。扩增体系为: 3 μL DNA, 先导引物和反向引物各 1 μL, 10 μL Top Green qPCR Mix, 5 μL H₂O。反应条件为: 95 ℃ 300 s; 95 ℃ 10 s、59 ℃ 10 s、72 ℃ 10 s, 40 个循环。端粒长度计算采用 T/S 法, 即用样品端粒相对 Ct 值/样品单拷贝基因 Ct 值。公式为 $T/S = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样品}} - \Delta Ct_{\text{标准品}}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{端粒}} - Ct_{\text{单拷贝基因}}$ 。

2 结果与分析

2.1 不同继代次数苹果试管苗的增殖能力及表型

对不同继代次数的‘富士’‘金冠’和‘嘎拉’苹果试管苗进行增殖能力研究, 结果见表 1: 除‘富士’31 代出梢数、68 代有效新梢数及‘金冠’52 代有效新梢数与个别代数有显著差异外, 3 个品种其余材料的出梢数和有效新梢数在不同代数之间差异不显著。试验表明, 多年保存的不同品种苹果试管苗继代增殖能力及表型未发生显著变化(表 1, 图 1)。

表 1 继代培养次数对苹果试管苗增殖能力影响
Table 1 Effects of different subculture times on proliferation abilities of apple plantlets *in vitro*

品种 Cultivar	外植体接种日期/ (Y - M - D) Date of explant inoculated	保存时间/年 Years of preserved time	继代次数 Subculture times	出梢数 Number of shoots	有效新梢数 Number of effective shoots
‘富士’ ‘Fuji’	1985 - 04 - 20	33	229	5.75 ± 1.33 a	2.15 ± 0.50 a
	1996 - 05 - 23	22	139	5.40 ± 0.59 ab	1.55 ± 0.55 ab
	2005 - 05 - 11	13	68	4.85 ± 0.93 ab	1.00 ± 0.75 b
	2007 - 03 - 12	11	52	4.70 ± 1.21 ab	1.35 ± 0.34 ab
	2010 - 03 - 18	8	31	4.05 ± 0.50 b	1.50 ± 0.53 ab
‘金冠’ ‘Golden Delicious’	1991 - 04 - 16	27	180	4.85 ± 0.44 a	2.10 ± 0.26 b
	1996 - 05 - 23	22	68	4.95 ± 0.50 a	2.85 ± 0.82 ab
	2005 - 05 - 11	13	52	5.00 ± 1.07 a	3.05 ± 0.44 a
	2010 - 03 - 18	8	31	4.30 ± 0.26 a	2.70 ± 0.58 ab
‘嘎拉’ ‘Gala’	1993 - 12 - 03	25	165	8.50 ± 0.40 a	2.05 ± 0.72 a
	2000 - 07 - 26	22	106	8.20 ± 0.72 a	2.05 ± 0.96 a
	2005 - 05 - 11	13	68	8.40 ± 0.31 a	1.85 ± 0.34 a
	2007 - 03 - 12	11	52	8.30 ± 0.20 a	1.80 ± 0.16 a
	2010 - 03 - 18	8	31	8.45 ± 0.92 a	1.70 ± 0.90 a

注: 表中同一品种同列数值后标记不同字母表示差异达 0.05 显著水平。下同。
Note: Different letters following the data within each column in same cultivar represent the significance at the level of $P < 0.05$ level. The same below.

2.2 相同继代次数不同苗龄的苹果试管苗表型变化

对同一个继代生长周期内不同苗龄的‘富士’‘金冠’和‘嘎拉’试管苗表型进行观察(图 2), 不同品种表现不同, ‘富士’‘嘎拉’苹果试管苗在 90 d 苗龄时分化生长正常, 叶片增大, 衰老状况不明显; ‘金冠’苹果试管苗在 50 d 时叶片出现褐变, 90 d 时老化特征明显。

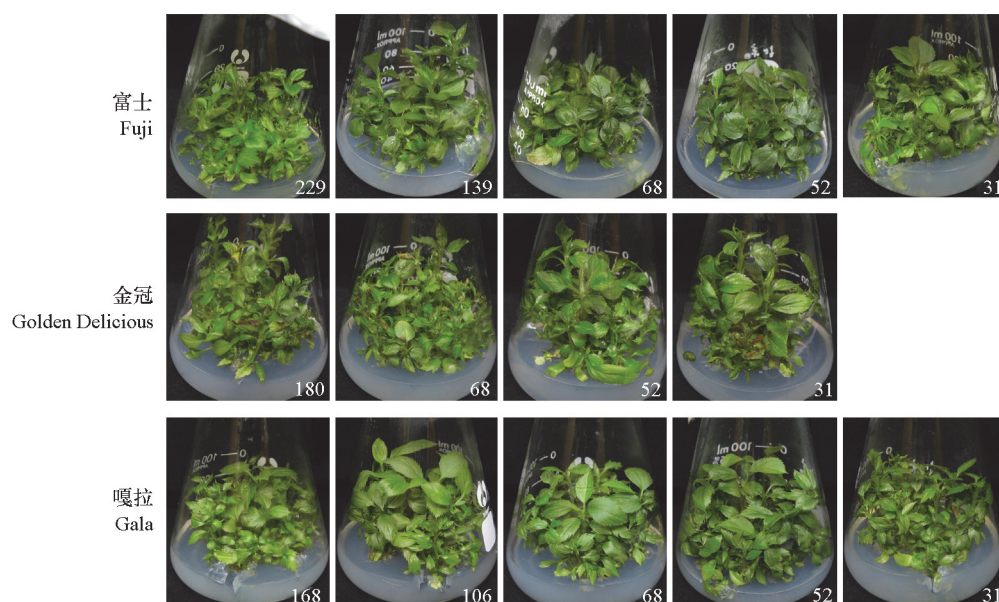


图 1 不同继代次数苹果试管苗生长状态 (苗龄 30 d)

图中数字为继代次数。

Fig. 1 The growth status of apple plantlets with different subculture times (at 30-day plantlet age)

The number in the figures represents the subculture time.

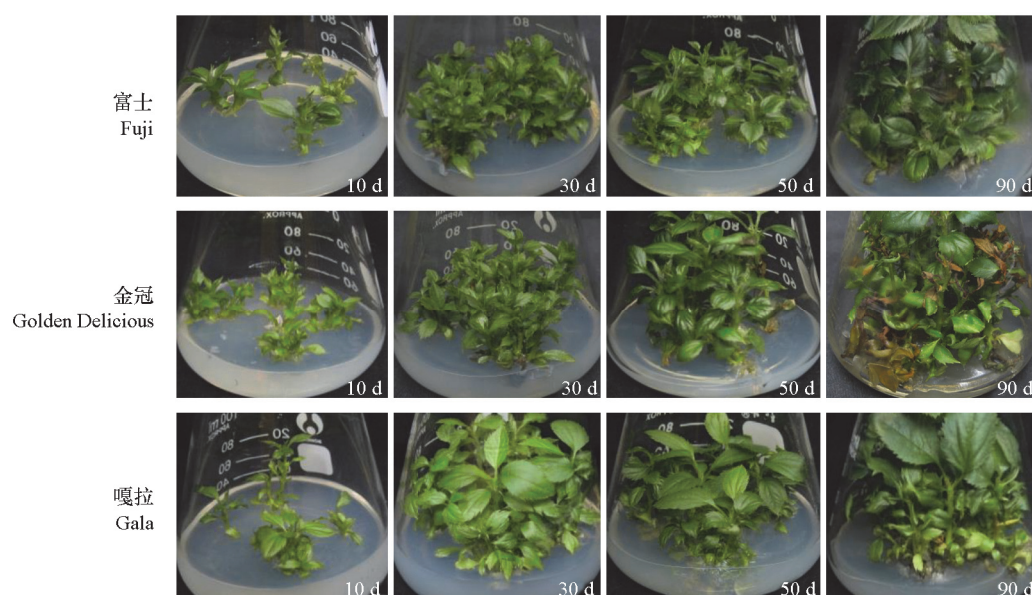


图 2 不同苗龄的苹果试管苗生长状态 (第 73 代继代苗)

Fig. 2 The growth status of apple plantlets at different plantlet age (the 73th subculture time)

2.3 苹果试管苗端粒长度的变化

2.3.1 端粒长度 (T) 和内参基因 (S) 的标准曲线

根据 DNA 含量 (x) 和荧光起始循环数 (Ct) 绘制端粒长度和内参基因的标准曲线, 结果 (图

3) 表明, 荧光起始循环数 (Ct) 与样品 DNA 呈线性关系。端粒长度标准曲线为 $Ct = -0.36x + 19.68$, $R^2 = 0.9736$; 内参基因标准曲线为 $Ct = -0.3033x + 10.969$, $R^2 = 0.985$ 。由此可知端粒和内参基因引物具有较高的特异性和扩增效率, 均可用于试验。

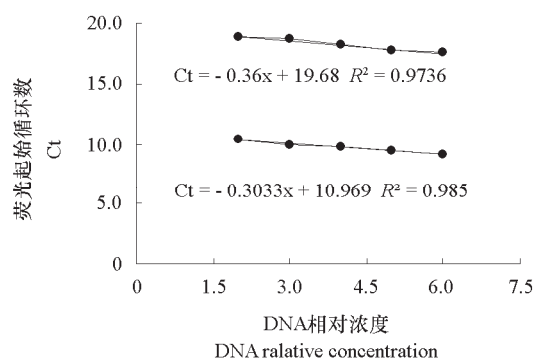


图3 测量相对 T/S 比率的标准曲线

Fig. 3 Standard curves used to measure the relative T/S ratio

2.3.2 不同继代次数苹果试管苗端粒长度

对不同继代次数的‘金冠’‘富士’和‘嘎拉’苹果 30 d 苗龄试管苗叶片进行端粒长度测定, 试验结果 (图 4) 表明, 3 个品种不同继代次数试管苗之间端粒长度均无显著差异。

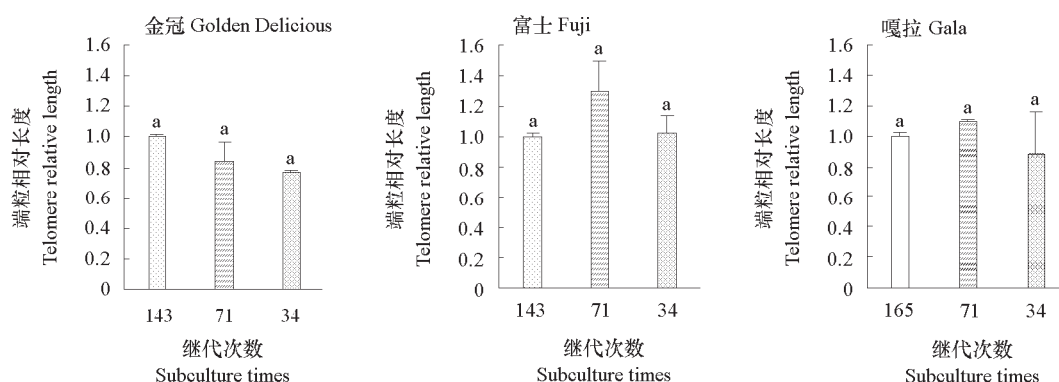


图4 不同继代次数苹果试管苗叶片端粒长度 (苗龄 30 d)

不同字母表示数据差异显著 (邓肯氏检验; $P < 0.05$ 。下同)。

Fig. 4 Telomere length in the apple plantlet leaves *in vitro* with different subculture times (at 30-day plantlet age)

Different letters indicate statistically significant difference (Duncan's test; $P < 0.05$. The same below).

2.3.3 不同苗龄苹果试管苗端粒长度

分别对‘金冠’‘富士’和‘嘎拉’不同苗龄的试管苗叶片进行端粒长度测定, 结果如图 5 所示: 在 1 个生长周期内 (继代 73 代), 不同苗龄的‘金冠’试管苗叶片的端粒长度变化显著, 50 d 苗龄时, 端粒长度达最高值, 90 d 时端粒长度最短; 不同苗龄的‘富士’‘嘎拉’试管苗叶片端粒长度差异不显著。

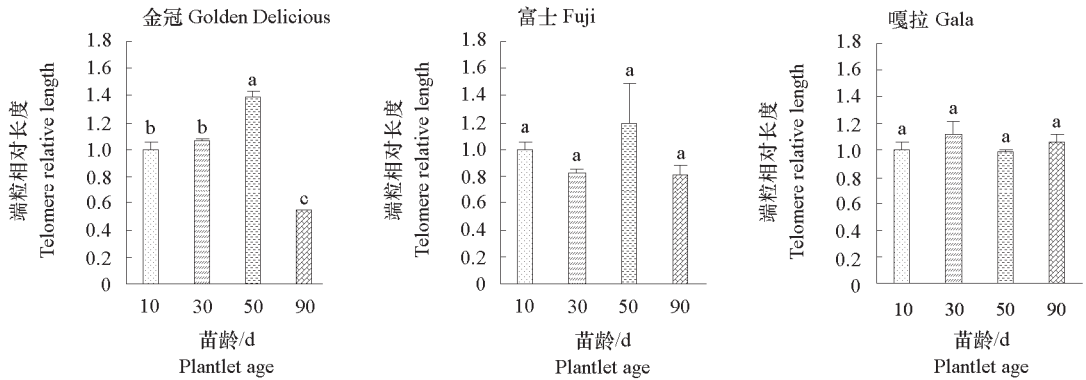


图 5 不同苗龄苹果试管苗叶片端粒长度 (继代 73 代)

Fig. 5 Telomere length in the apple plantlet leaves *in vitro* at different plantlet age (the 73th subculture time)

2.3.4 苹果试管苗不同组织端粒长度的变化

对‘金冠’和‘嘎拉’培养 30 d 的试管苗叶片和茎段以及培养 20 d 的愈伤组织进行端粒长度测定, 结果如图 6 所示: 不同组织材料之间端粒长度存在差异, 且不同品种变化规律不一致。‘金冠’试管苗叶片端粒长度显著低于茎段, 茎段与愈伤组织、叶片与愈伤组织之间差异不显著; ‘嘎拉’表现为愈伤组织 > 叶片 > 茎段。

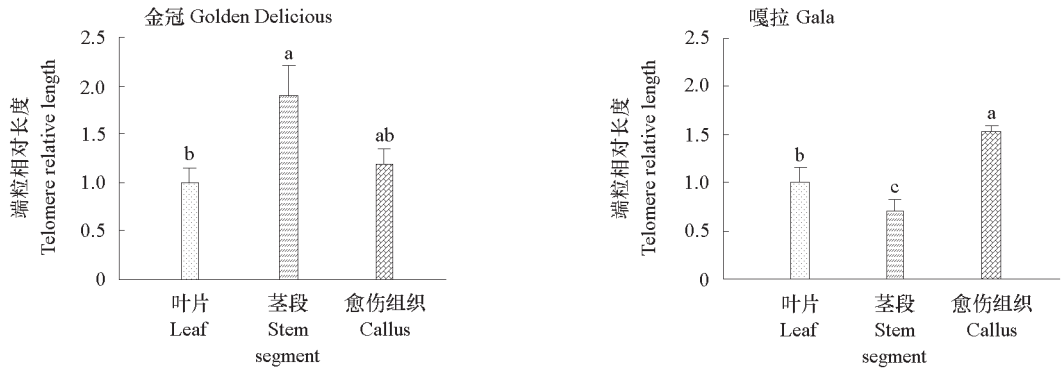


图 6 苹果试管苗不同组织的端粒长度 (继代 71 代, 苗龄 30 d)

Fig. 6 Telomere length in different tissues of the plantlets subcultured *in vitro* (the 71th subculture time, at 30-day plantlet age)

3 讨论

利用现代组织培养技术进行园艺作物种质资源离体保存有独特优势。但有研究报道, 在欧李 (焦淑华 等, 2006)、Gisela 樱桃 (Vujović, 2012)、梨砧木 (及华 等, 2004)、毛叶枣 (续九如 等, 2003)、香蕉 (韦家川 等, 2005)、葡萄 (梁国平 等, 2019)、红芽芋 (刘星月 等, 2020) 等试管种质长期保存时, 频繁继代培养会出现长势变化、繁殖能力下降和遗传变异等问题, 果树种质离体保存年限应引起重视。植物组织培养技术, 最大程度地保持了母株的优良性状 (Wang et al., 2012a), 显著提高了果树种质保存的效率和品质。但在果树种质保存过程中, 植物体细胞会不断分裂、分化和衰老, 且体细胞自身存在无性系变异 (Wang et al., 2012a, 2012b)。

本团队一直从事苹果试管苗的离体保存工作, 已有保存 8 ~ 33 年的‘富士’、保存 8 ~ 27 年的‘金冠’和保存 8 ~ 25 年的‘嘎拉’苹果茎尖试管苗, 并分别于 2006 年、2011 年、2017 年和 2018 年对不同继代次数的苹果茎尖试管苗进行了繁殖能力和遗传稳定性的调查, 发现以上试管苗随保存时间延长、继代次数增加, 表型未发生明显变化, 同时具有稳定的器官再生能力及遗传稳定性(杜国强 等, 2006; 师校欣 等, 2007; 刘颖 等, 2011), 因此从表型和繁殖能力方面证明苹果茎尖试管苗具有长期离体保存的可能性和优越性。

端粒可维护染色体基因组的稳定性(Blackburn, 1991), 调控细胞的复制寿命(Yu et al., 1990), 决定细胞的分裂次数。目前, 端粒长度测定方法包括端粒末端限制性片段分析法(terminal restriction fragment, TRF)、实时荧光定量 PCR 法、定量荧光原位杂交法(quantitative fluorescence *in situ* hybridization, Q-FISH)、流式荧光原位杂交法(flow cytometry and flow fluorescence *in situ* hybridization, Flow FISH)、单链端粒长度分析法(single telomere length analysis, STELA)及基于全基因组测序(WGS)的端粒长度分析法(张彬和王长利, 2016)等。其中, TRF 法操作简单, 错误较少, 但所需 DNA 样本量较大(Southern, 1979); Q-FISH 法和 Flow-FISH 法多用于动物端粒长度测定, 操作技术要求较高(Baird, 2005; 黄馨 等, 2010); STELA 法可较准确测定单个细胞的端粒长度, 但操作要求高、比较繁琐(马国兴 等, 2013)。实时荧光定量 PCR 法具有所需 DNA 样本量少、成本低廉、操作方便的优点, 该方法经 TRF 法验证, 两种方法呈线性相关关系(Cawthon et al., 2002; 郭令军和张七一, 2008; Criscuolo et al., 2009; 陈宇 等, 2012; Vaquero-Sedas et al., 2014), 进一步证实实时荧光定量 PCR 法测定端粒长度的可靠性。鉴于本试验离体条件下 DNA 样本量少的特点, 采用实时荧光定量 PCR 法测定相对端粒长度。本试验中通过对继代次数不同的‘富士’、‘金冠’和‘嘎拉’苹果茎尖试管苗端粒长度的分析测定发现, 3 个品种的试管苗叶片端粒长度在不同继代次数之间差异不显著, 且本实验室前期的研究(梁晨 等, 2020)发现不同代数之间苹果试管苗端粒酶活性无显著差异, 这与苹果试管苗离体保存过程中表现出的表型特征和繁殖能力一致, 从 DNA 水平证明了苹果茎尖试管苗具有长期离体保存的可能性。

端粒长度的变化过程与衰老息息相关。本试验中发现‘金冠’和‘嘎拉’不同试管苗组织端粒长度变化具有特异性; Rescalvo-Morales 等(2016)发现黄条龙舌兰和韦伯龙舌兰离体保存 3 年试管苗茎尖分生组织的端粒长度长于下部叶片和衰老根。植物组织培养过程中, 1 个继代生长周期内试管苗会经历分化生长和衰老的变化。本试验中 1 个继代生长周期内不同苗龄‘金冠’苹果试管苗端粒长度变化差异显著, 苗龄 50 d 端粒长度达最高值, 90 d 出现最低值, 这与本实验室前期研究中‘金冠’50 d 苗龄苹果试管苗端粒酶活性高于 90 d 的结果(梁晨 等, 2020)相吻合, 且与苹果试管苗表型变化相吻合。以上结果说明, ‘金冠’苹果试管苗在 1 个继代生长周期内的端粒长度变化反映了其衰老程度, 因此端粒长度在一定程度上可作为衰老标志。

4 结论

本研究中发现苗龄 30 d 继代 34、71、143 代的‘富士’‘金冠’以及继代 34、71、165 代的‘嘎拉’茎尖试管苗叶片的端粒长度无显著变化, 继代 73 代苗龄分别为 10、30、50 和 90 d 的苹果试管苗之间衰老特征的变化与端粒长度变化相吻合。分别继代了 31 ~ 229 代、31 ~ 180 代、31 ~ 165 代的‘富士’‘金冠’‘嘎拉’试管苗增殖能力能维持较高水平。因此, 苹果茎尖试管苗具有可以长期离体保存的可能性和优越性, 同时端粒长度变化一定程度上可以反映同一继代周期内试管苗的衰老

程度, 为进一步研究植物种质资源离体保存年限与端粒特性之间的关系提供了依据。

References

- Aronen T, Ryynänen L. 2012. Variation in telomeric repeats of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) . *Tree Genetics & Genomes*, 8 (2): 267 - 275.
- Aronen T, Ryynänen L. 2014. Silver birch telomeres shorten in tissue culture. *Tree Genetics & Genomes*, 10 (1): 67 - 74.
- Baird D M. 2005. New developments in telomere length analysis. *Experimental Gerontology*, 40 (5): 363 - 368.
- Blackburn E H. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature*, 350 (6319): 569 - 573.
- Blasco Maria A. 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chemical Biology*, 3 (10): 640 - 649.
- Broun P, Ganai M W, Tanksley S D. 1992. Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. *PNAS*, 89 (2): 1354 - 1357.
- Cawthon R M. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*, 30 (10): e 47.
- Chen Yu, Liu Ji-bin, Liu Peng, Ye Zhi-dong, Zhang Wei-li, Hui Ru-tai. 2012. Comparison of blood leukocyte telomere DNA content and vascular telomere DNA content in human carotid atherosclerotic plaques. *Molecular Cardiology of China*, 12 (1): 27 - 31. (in Chinese)
- 陈 宇, 刘继斌, 刘 鹏, 叶志东, 张伟丽, 惠汝太. 2012. 人颈动脉粥样硬化斑块组织及外周血白细胞相对端粒长度的检测及相关性分析. *中国分子心脏病学杂志*, 12 (1): 27 - 31.
- Cheng C S, Yuan Q X, Zhou H, Huang L Q. 2016. Nondestructive estimation of growth year in ginseng cultivars using the means of mathematical modeling on the basis of allometry. *Microscopy Research and Technique*, 79 (2): 98 - 105.
- Criscuolo F, Bize P, Nasir L, Metcalfe N B, Foote C G, Griffiths K, Gault E A, Monaghan P. 2009. Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres. *Journal of Avian Biology*, 40 (3): 342 - 347.
- Du Guo-qiang, Shi Xiao-xin, Zhang Qing-liang, Ma Bao-kun. 2006. Isozyme patterns and RAPD analysis of apple plantlets repeatedly subcultured *in vitro*. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (1): 33 - 37. (in Chinese)
- 杜国强, 师校欣, 张庆良, 马宝焜. 2006. 苹果不同继代次数的茎尖组培苗同工酶谱及 RAPD 分析. *园艺学报*, 33 (1): 33 - 37.
- Flanary B E, Kletetschka G. 2005. Analysis of telomere length and telomerase activity in tree species of various life-spans, and with age in the bristlecone pine *Pinus longaeva*. *Bio-gerontology*, 6 (2): 101 - 111.
- Fulnečková J, Evíková T, Lukeová A S. 2016. Transitions between the *Arabidopsis*-type and the human-type telomere sequence in green algae (clade Caudivolvocales, Chlamydomonadales) . *Chromosoma*, 125 (3): 437 - 451.
- Gilson E, Geli V. 2007. How telomeres are replicated. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 (10): 825 - 838.
- Guo Ling-jun, Zhang Qi-yi. 2008. Telomere length measurement of human leukocyte in peripheral blood by real-time quantitative PCR. *China Foreign Medical Treatment*, (21): 1 - 2, 7. (in Chinese)
- 郭令军, 张七一. 2008. 实时定量 PCR 分析外周血白细胞的端粒长度. *中外医疗*, (21): 1 - 2, 7.
- Hu Xu-dong, Han Jing-yi, Yao Xiao-yun, Li Li-hong, Jiang Lu-yao, Lu Hai, Liu Di. 2015. Correlation between telomere length and age in Chinese pine (*Pinus tabulaeformis* Carr.) . *Guangdong Agricultural Sciences*, 42 (12): 61 - 65. (in Chinese)
- 胡旭东, 撒静宜, 要笑云, 李丽红, 蒋璐瑶, 陆 海, 刘 颀. 2015. 油松端粒长度与树龄相关关系研究. *广东农业科学*, 42 (12): 61 - 65.
- Huang Xin, Shi Gui-ying, Chen Xian-da, Ju Zhen-yu. 2010. Flow-FISH to measure the average length of telomeres. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 20 (7): 67 - 71. (in Chinese)
- 黄 馨, 石柱英, 陈显达, 鞠振宇. 2010. 利用流式荧光原位杂交法测定细胞端粒长度. *中国比较医学杂志*, 20 (7): 67 - 71.
- Ji Hua, Zhang Hai-xin, Zhao Yu-fen, Ge Hui-bo. 2004. Influencing factors on multiplication coefficient and regeneration quality of adventitious shoots of the S series dwarfing rootstock of pear. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 8 (2): 40 - 44. (in Chinese)
- 及 华, 张海新, 赵玉芬, 葛会波. 2004. 梨 S 系矮化砧组培苗增殖系数和质量的影响因子. *河北农业科学*, 8 (2): 40 - 44.
- Jiao Shu-hua, Lin Li-hua, Li Bao-jiang, Zhang Shu-hong. 2006. Shoot-tip culture of *Cerasus humili*. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 37 (4): 573 - 577. (in Chinese)
- 焦淑华, 林丽华, 李宝江, 张淑红. 2006. 欧李茎尖组织培养研究. *沈阳农业大学学报*, 37 (4): 573 - 577.

- Kilian A, Stiff C, Kleinhofs A. 1995. Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 9555 – 9559.
- Liang Chen, Liu Ya-jie, Wang Li, Du Guo-qiang, Shi Xiao-xin. 2020. Telomerase activity of apple plantlets *in vitro* kept relative stable after conserved for years. *Molecular Plant Breeding*, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20200716.1250.008.html>. (in Chinese)
- 梁晨, 刘雅洁, 王莉, 杜国强, 师校欣. 2020. 保存多年苹果试管苗端粒酶活性具有相对稳定性. *分子植物育种*, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20200716.1250.008.html>.
- Liang Guoping, Li Wenfang, Ma Zonghuan, Zuo Cunwu, Chu Mingyu, Ma Lijuan, He Honghong, Wan Peng, Chen Baihong, Mao Juan. 2019. Transcriptome studies the effect of glucose on carbon metabolism of grape plantlets. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (1): 121 – 134. (in Chinese)
- 梁国平, 李文芳, 马宗桓, 左存武, 褚明宇, 马丽娟, 何红红, 万鹏, 陈佰鸿, 毛娟. 2019. 基于转录组研究葡萄糖对葡萄试管苗碳代谢的影响. *园艺学报*, 46 (1): 121 – 134.
- Liang J B, Jiang C, Peng H S, Shi Q H, Guo X, Yuan Y, Huang L Q. 2015. Analysis of the age of *Panaxginseng* based on telomere length and telomerase activity. *Sci Rep*, 5: 7985.
- Liu D, Qiao N, Song H, Hua X, Du J, Lu H, Li F L. 2007. Comparative analysis of telomeric restriction fragment lengths in different tissues of *Ginkgo biloba* trees of different age. *Journal of Plant Research*, 120 (4): 523 – 528.
- Liu Xingyue, Zhu Qianglong, Li Huiying, Sun Jingyu, Li Bicong, Zhang Hongyu, Huang Yingjin, Fang Jiajun, Zhou Qinghong. 2020. Induction and plant regeneration of virus-free microtuber in red bud taro. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (12): 2427 – 2438. (in Chinese)
- 刘星月, 朱强龙, 李慧英, 孙静宇, 李必聪, 张宏玉, 黄英金, 方加军, 周庆红. 2020. 红芽芋脱毒试管芋诱导及植株再生. *园艺学报*, 47 (12): 2427 – 2438.
- Liu Ying, Shi Xiao-xin, Du Guo-qiang, Chang Teng-fei. 2011. Organogenesis characteristics of apple shoot explants *in vitro* after subcultured for years. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27 (16): 206 – 209. (in Chinese)
- 刘颖, 师校欣, 杜国强, 常腾飞. 2011. 苹果茎尖试管苗继代保存多年后繁殖特性研究. *中国农学通报*, 27 (16): 206 – 209.
- Ma Guo-xing, Ma Deng-Xu, Yang Li-yuan, Zheng Jie, Wei Jing-hang, Liu Xiao-chuan. 2013. Analysis and quantitative determination of single telomere length in rice. *Journal of Zhejiang Sci-Tech University*, 30 (4): 585 – 589. (in Chinese)
- 马国兴, 马登旭, 杨力媛, 郑洁, 韦敬航, 刘小川. 2013. 水稻单个端粒长度定量测定及分析. *浙江理工大学学报*, 30 (4): 585 – 589.
- Mary-Paz G G, Irina P, Andrés C, Xavier S, Katherine A L, Andrew D L, Nelson M, Dorothy E S, Maria A B, Ana I C. 2015. Single-cell telomere-length quantification couples telomere length to meristem activity and stem cell development in *Arabidopsis*. *Cell Reports*, 11 (6): 977 – 989.
- Moriguchi R, Kato K, Kanahama K, Kanayama Y, Kikuchi H. 2007. Analysis of telomere lengths in apple and cherry trees. *Acta Horticulturae*, 738: 389 – 395.
- Mu Y, Ren L F, Xun Z L, Zhang D D, Song H, Lu H, Li F L, Liu D. 2014. Sex- and season-dependent differences in telomere length and telomerase activity in the leaves of ash and willow. *Springer Plus*, 3 (1): 1 – 7.
- Rescalvo-Morales A, Monja-Mio K M, Herrera-Herrera G, Robert M L, Sánchez-Teyer L F. 2016. Analysis of telomere length during the organogenesis induction of *Agave fourcroydes* Lem and *Agave tequilana* Weber. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 127: 135 – 143.
- Richards E J, Ausubel F M. 1988. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 53: 127 – 136.
- Riha K, Fajkus J, Siroky J, Vyskot B. 1998. Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. *The Plant Cell*, 10 (10): 1691 – 1698.
- Shi Xiao-xin, Du Guo-qiang, Wang Chen, Ma Bao-kun, Ge Yi-nan. 2007. Effects of subculture times on organogenesis characteristics of apple *in vitro* shoot explants. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (3): 561 – 564. (in Chinese)
- 师校欣, 杜国强, 王晨, 马宝焜, 葛一楠. 2007. 苹果离体新梢外植体继代培养次数对其再生的影响. *园艺学报*, 34 (3): 561 – 564.
- Song H, Liu D, Li FL, Lu H. 2011. Season-and age-associated telomerase activity in *Ginkgo biloba* L. *Molecular Biology Reports*, 38 (3): 1799 – 1805.
- Southern E M. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 100 (2): 319 – 323.
- Vaquero-Sedas, María I, Vega-Palas M A. 2014. Determination of *Arabidopsis thaliana* telomere length by PCR. *Scientific Reports*, 4 (1): 405 –

413.

- Vujović T, Ružić D, Cerović R. 2012. *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. Horticultural Science, 39 (3): 101 - 107.
- Wang Q M, Gao F Z, Gao X, Zou F Y, Sui X, Wang M, Hui Y J, Wang L. 2012a. Regeneration of *Clivia miniata* and assessment of clonal fidelity of plantlets. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 109 (2): 191 - 200.
- Wang Q M, Wang Y Z, Sun L L, Gao F Z, Sun W, He J, Gao X, Wang L. 2012b. Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets. Plant Cell Reports, 31 (7): 1283 - 1296.
- Wang Qing-mei, Zhang Zhi-hong, Cui Jian-guo. 2017. The physiological age of asexual plants—thinking arise from telomere length. Forest Research, 30 (5): 866 - 870. (in Chinese)
- 王钦美, 张志宏, 崔建国. 2017. 无性繁殖植株的生理年龄——由端粒长度引发的思考. 林业科学研究, 30 (5): 866 - 870.
- Wei Jia-chuan, Lü Ping, Zhang Hui-ying. 2005. The research of variant on banana tissue seedling. Journal of Guangxi Agric and Biol Science, 24 (3): 255 - 258. (in Chinese)
- 韦家川, 吕 平, 张慧英. 2005. 香蕉组培苗变异体的研究. 广西农业生物科学, 24 (3): 255 - 258.
- Xu Jiu-ru, Li Chun-li, Sun Jian-she. 2003. Micropropagation of ber (*Ziziphus mauritiana* Lam.) . Journal of Beijing Forestry University, 25 (3): 28 - 32. (in Chinese)
- 续九如, 李春立, 孙建设. 2003. 毛叶枣组培快繁技术研究. 北京林业大学学报, 25 (3): 28 - 32.
- Yu G L, Bradley J D, Attardi L D, Blackburn E H. 1990. *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. Nature, 344 (6262): 126 - 132.
- Zhang Bin, Wang Chang-li. 2016. Methods of measuring telomere length and its application. Biotechnology Bulletin, 32 (11): 93 - 98. (in Chinese)
- 张 彬, 王长利. 2016. 端粒长度检测方法及其应用. 生物技术通报, 32 (11): 93 - 98.