

南果梨茎尖培养的初步研究

马慧, 陈丽静, 钟鸣, 李浩戈, 郭志富, 王学英, 张丽*

(沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁省农业生物技术重点实验室, 辽宁沈阳 110161)

摘要 对大红南果梨的茎尖培养进行了初步研究。结果表明, 以一定浓度的赤霉素进行预处理可提高组培茎尖的诱导率; 不同激素浓度对比对茎尖的增殖作用不同, 在所有的培养基组合中以 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L 的增殖率最高。合适的培养条件为 25℃±2℃, 光照 2 000 lx, 16 h 光周期。

关键词 南果梨; 茎尖; 组织培养

中图分类号 Q813 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)11-03173-02

南果梨是秋子梨(*Pyrus ussuriensis* Maxim.) 中优良的地方品种之一。该品种果实色泽鲜艳、果肉细腻、爽口多汁、风味香浓, 适应能力及抗寒力强, 高接树在-37℃时无冻害, 且抗黑星病, 因此市场前景十分广阔。但随着南果梨栽培年限增加, 体内病毒不断积累, 使南果梨的品质出现了退化的现象。目前生产上繁育苗木主要采用嫁接、扦插等方法, 这种方法繁育苗木的速度慢、费工多、成本高^[1], 而且无性繁殖使病毒通过营养体得到传递, 并且病毒病无法用化学药剂防治, 因而造成果树终生带毒, 果实产量下降品质变劣。研究表明, 病毒是通过维管束组织进行传播的, 而茎尖中无维管束组织, 且有很强的分生能力。因此, 可以利用组织培养方法实现南果梨的脱毒快繁。

影响植物组织培养的因素很多, 包括基因型、外植体来源与生理状态、培养基中激素配比、光照、温度等因素。笔者研究了组培中激素预处理、培养基中激素配比、光照及温度等因素对南果梨茎尖培养的影响, 为南果梨的工厂化育苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 南果梨供试品种为大红南果, 采自辽宁省阜新市阜新县。

1.2 方法

1.2.1 材料的处理。 将从生长健壮的植株上采下的无病虫害的 1 年生大红南果枝条剪下, 用洗洁精逆向刷洗枝条后用自来水冲洗干净。处理 I, 将取得材料冲洗后直接切成茎段(每个茎段带有一个腋芽)在流动的自来水下冲洗 30~60 min, 之后在超净工作台内进行无菌操作过程。其过程为先将材料用浓度 75% 酒精浸泡 30~60 s, 再用浓度 0.1% 氯化汞浸泡 8 min, 无菌水冲洗 3~4 次。灭菌后将茎尖剥出接种于灭菌后的培养基上。处理 II, 将取得材料先在浓度 0.2 mg/L GA₃ 溶液中浸泡 7 d(每天换 1 次培养液)后再进行灭菌处理(方法同处理 I)。处理 III, 将取得材料以清水浸泡 7 d 且每天换水, 其他处理同处理 I。各处理的材料放置于 25℃±2℃、光照强度 2 000 lx、16 h 光周期条件下。

1.2.2 不同取材时间对茎尖再生的影响。 分别于秋天(10月), 春天(4月上旬)取材, 取材质量及材料的处理方法同“1.2.1”。观察不同取材时间对茎尖生长的影响。

1.2.3 不同培养温度及光照对茎尖再生的影响。 设计了 3

个温度: 23℃±2℃、25℃±2℃、27℃±2℃; 3 种光照: 自然光、1 000 lx、2 000 lx, 研究环境条件对茎尖再生的影响。

1.3 不同激素浓度对比对茎尖增殖的影响 植物激素对于茎尖的离体培养有重要的调节作用。配制了 8 种不同的茎尖增殖培养基(表 1), 以研究激素对大红南果梨茎尖再生的影响。接种后均在 25℃±2℃、光照强度 2 000 lx、16 h 光周期条件下培养。

表 1 8 种茎尖增殖培养基配比	
序号	培养基
1	MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA
2	MS+2.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA
3	MS+2.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA
4	MS+3.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA
5	MS+3.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA
6	MS+3.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA
7	MS+4.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA
8	MS+4.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA

1.4 计算方法

$$\text{茎尖再生率} = \frac{\text{生长的茎尖数}}{\text{接种的茎尖数}} \times 100\%$$

$$\text{茎尖增殖率} = \frac{\text{增殖的茎尖数}}{\text{接种的茎尖数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 茎尖诱导影响因素的研究

2.1.1 不同预处理及取材时间对茎尖再生率的影响(表 2)。 将春季和秋季取得材料都进行了不浸泡直接接种、赤霉素浸泡、水浸泡 3 种处理, 接种 30 d 后调查茎尖的诱导率。观察发现接种在培养基上的茎尖, 先是表面变为淡褐色, 约 4~5 d 后茎尖顶端开始转绿; 14 d 后, 长出新芽; 21 d 新芽开始伸开, 长成叶片。另观察发现茎尖生长后会出现小老苗或褐变死亡现象, 秋季取得材料比春季取材更为明显。春季材料的各处理的诱导率均高于秋季取材的诱导率。

表 2 不同预处理对茎尖诱导率的影响				
处理	春季		秋季	
	生长茎尖数/个	生长率/%	生长茎尖数/个	生长率/%
处理 I	11	55	0	0
处理 II	17	85	5	25
处理 III	12	60	0	0

注: 接种茎尖数均为 20。

由表 2 可以看出, 经赤霉素浸泡处理后各取材时间的茎尖再生率都有所提高。秋季取材赤霉素处理比不浸泡和水浸泡的诱导率高出了 25%, 春季取材的赤霉素浸泡比不浸泡高了 30%。

2.1.2 不同温度对茎尖诱导率的影响(表 3)。 培养温度对

基金项目 辽宁省农业生物技术重点实验室资助。

作者简介 马慧(1972-), 女, 辽宁鞍山人, 博士, 讲师, 从事植物生物技术研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-01-11

外植体影响很大,且材料特异性很强,这主要受材料的生物学特性的影响。该试验对 3 个培养温度范围进行了研究。试验结果表明:温度对南果梨茎尖的诱导有明显的影响。在一定的温度范围内诱导率随着温度的升高而增加($23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$),而超过这一范围温度再升高诱导率反而下降。试验结果表明:适宜的培养温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

表 3 不同温度对茎尖诱导的影响

温度	茎尖再生率//%
$23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$	55
$25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$	80
$27\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$	50

2.1.3 不同光照强度对茎尖诱导的影响(表 4)。试验结果表明,在自然光照下,茎尖诱导率和生长量均较低,2 指标随着光照强度的增加而呈上升趋势。在光照为 $2\text{ }000\text{ lx}$ 时,其茎尖诱导率和茎尖生长量为最高值,这表明南果梨离体培养要求高光强。

表 4 不同光照强度对茎尖诱导的影响

光照强度//lx	30 d 后茎尖生长量//cm	茎尖诱导率//%
自然光	2.5	55
1 000	2.8	62
2 000	3.4	79

2.2 不同激素浓度对比对南果梨茎尖增殖的影响 图 1 表明:随着 6-BA 浓度的增加,茎尖的增殖系数呈上升趋势,同时对 6-BA 与 NAA 的比值有一定的要求。从试验结果来看,在不同 6-BA 浓度下以 6-BA/NAA 的比值为 10 时茎尖的增殖系数最高;在 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时随着 6-BA/NAA 比值的降低茎尖增殖系数变化不显著。在每一浓度梯度内 6-BA/NAA 的值过大过小均得不到最高的分化率。结果可看出,南果梨茎尖的诱导对细胞分裂素和生长素的浓度及其配比有一定的要求。该试验所选用的培养基中以 6-BA 4.0 mg/L 、NAA 0.4 mg/L 为最佳增殖培养基。

3 讨论

3.1 虽然大多数经组织培养的植物材料在温度 $20\sim 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下生长良好,但相对于自然生长的植株来说它对温度要求是严格的。该试验所设计的 3 个温度范围中,以 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为最适生长温度,温度过高或过低均不利于南果梨茎尖的离体生长。这可能是由于温度过高或过低都会影响某些酶的活性,改变原生质结构状态,打破生理代谢平衡,所以

(上接第 3172 页)

养的研究中认为,浓度为 2 mg/L 的 6-BA 可以有效地促进芦荟茎尖的分化^[9]。该研究也表明, 2 mg/L 的 6-BA 对野葛的茎尖培养起到较大的促进作用。生长素是植物生长发育必不可少的一类物质,它能促进生长点细胞的分裂和非生长点细胞的伸长,诱导根原基的发生和根系的生成。符文英等在对海南粗榧愈伤组织的诱导的研究中发现,NAA 的添加有利于海南粗榧愈伤组织的生成,不利于茎尖成苗^[9]。而在该试验中,NAA 的使用(特别与 6-BA 的组合使用)可以促进野葛茎尖的分化成苗,这可能与植物基因型有关。PP₃₃₃ 是一种高效低毒的植物生长延缓剂,现已应用于植物的组织培养领域,并取得了明显的效果,对提高植物的抗逆性,促

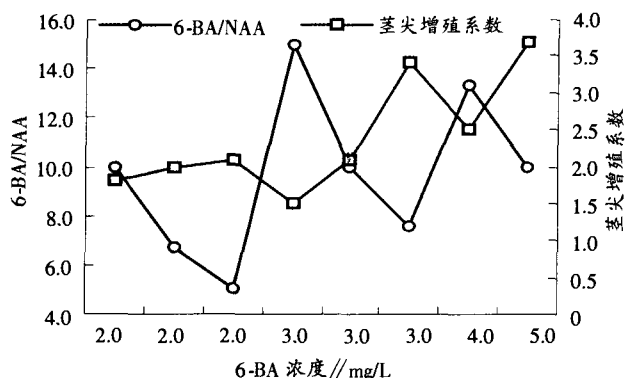


图 1 不同激素浓度对比对茎尖增殖的影响

不利于茎尖生长。在最适温度,茎尖从培养基中吸收营养物质较快,各种酶活性高,代谢强,生长旺盛,增值系数高。

3.2 很多植物发育与季节的变化有密切关系,结果这种季节的影响也反映在组织培养的再生特性上^[2]。特别是植物在生长发育的整个过程中受到内源激素的调控,这也影响到了组织培养中材料的增殖。内源激素随植物的生长时期而变化。因此,在进行器官分化及再生试验或试图利用组培这一技术加速植物繁殖时,必须考虑到组织来源的器官的类型、培养组织的大小、器官的生理或个体发育年龄,以及取材的季节等。就取材的季节而言,它影响材料的激素水平,进而影响组培的质量。

3.3 组织培养中合适的激素配比是非常重要的,它关系到试验的成败与否。在芽增殖的培养基中,细胞分裂素是必不可少的,而且以 6-BA 对芽的大量增殖最为有效。生长素在大多数情况下用 NAA 或 IAA,但浓度不易过高;有时还加进低浓度的 GA,以促进芽的分化。细胞分裂素/生长素的比例高时,有利于芽分化;比例低时,有利于根的分化;在两者比例适当时,则利于愈伤组织的形成。因此要根据培养的目的来选择细胞分裂素/生长素的比例。该试验选用 6-BA、NAA 的浓度分别为 4.0 mg/L 和 0.4 mg/L ,比值为 10,取得了较好的分生效果。

参考文献

- [1] 许智宏.植物生物技术[M].上海:上海科技出版社,1998.
- [2] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986.

进壮苗生根等都有重要作用。该试验表明,一定浓度的 PP₃₃₃ 在野葛茎尖苗的生根方面具有重要作用,这与朱道圩等人将 PP₃₃₃ 运用到大花高代组培苗上的试验结果一致^[9]。

参考文献

- [1] 邹宽生.江西葛资源的利用及栽培技术[J].福建林业科技,2004,31(3):110-112.
- [2] 薛建平,张爱民,李明军,等.怀地黄茎尖培养和植株再生技术的研究[J].新乡医学院学报,2000,17(1):18-20.
- [3] 马瑞霞,张坤朋,路志芳.芦荟茎尖离体培养与快繁技术研究[J].安徽农业科学,2004,32(6):1173-1277.
- [4] 符文英,杜道林,符木均,等.海南粗榧愈伤组织的诱导和培养[J].植物生理学通讯,2004,40(1):34-55.
- [5] 朱道圩,张会丽,王锦,等.多效唑对大花高代组培苗生长的效应[J].植物生理学通讯,2006,42(2):232-234.