

试验研究 与 简 报

秋子梨叶片植株再生研究*

杨 芳, 王 忆, 许雪峰, 韩振海, 李天忠

(中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094)

摘 要 以秋子梨的春梢茎段和无菌叶片为试材, 探讨不同激素配方对叶片再生的影响。结果表明, 适宜诱导外植体不定芽的初代培养基为 MS 培养基 + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L + GA₃ 0.6 mg/L; 增殖培养基为 MS 培养基 + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.6 mg/L + GA₃ 0.6 mg/L; 诱导叶片产生愈伤组织培养基为 MS 培养基 + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L + 6-BA 6.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L + TDZ 1.0 mg/L, 诱导不定梢培养基为 MS 培养基 + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L + 6-BA 5.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L + TDZ 1.5 mg/L; 生根培养基为 1/2MS 培养基 + IBA 1.0 mg/L。

关键词 秋子梨 组织培养 叶片植株再生

我国梨的栽培历史悠久, 是东方梨的主要生产国, 同时也是世界梨的原产中心之一。我国梨栽培品种主要有白梨 (*Pyrus bretschneideri* Reha)、砂梨 (*P. pyrifolia* Nakai)、秋子梨 (*P. ussuriensis* Maxim) 和洋梨 (*P. communis* L.), 其中前 3 种为原产我国的东方梨。秋子梨 (*Pyrus ussuriensis*) 又名山梨、酸梨、花盖梨, 原产于我国的东北、华北和西北地区, 日本、朝鲜也有分布, 是梨属植物中最抗寒的栽培种, 此外, 还具有耐旱、耐涝、耐瘠薄、抗病等优点, 其野生种在我国东北地区主要用作梨树砧木, 生产上多采用种子繁殖。种子繁殖易出现整齐度差等问题, 并影响接穗品种的生长发育及果实品质, 而组织培养繁殖, 既能保证砧木苗整齐一致, 又可以达到快速繁殖的目的。国内外有关梨组织培养的报道集中在白梨、砂梨和西洋梨等系统品种^[1-7], 对秋子梨的组织培养则尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料秋子梨带腋芽茎段取自中国农业科学院果树研究所。

1.2 方法

(1) 材料处理 将秋子梨春梢剪成 1~2 cm 带腋芽的茎段, 灭菌后接种到诱导芽分化的培养基中。1 瓶接种 5 个, 1 瓶为 1 次重复, 重复 3 次。

以秋子梨试管苗为材料, 每隔 35~40 天继代 1 次, 剪取上、中部叶片作为不定芽诱导材料。在超净工作台上, 将叶片用手术刀横切 3~5 刀, 切口长为叶宽的 2/3, 然后将远轴面向上平铺于再生培养基上, 首先进行暗培养, 然后进行光培养。

(2) 培养基 本试验采用的培养基为 MS, 添加蔗糖 30 g/L、琼脂粉 6 g/L, pH 值 5.8~6.0, 附加不同种类和浓度的生长调节剂, 培养基灭菌后备用 (在 120~125 ℃、1.2 个标准大气压下灭菌 18~30 分)。培养条件均为 (25±2) ℃、空气相对湿度 75% 左右、光周期 14 小时/天, 光照强度 2 000~3 500 lx。

本文于 2008-03-20 收到。

*北京市重点实验室“果树逆境生理与分子生物学实验室”资助项目, 北京市自然科学基金重点项目资助 (6071002)。

李天忠为通讯作者, 电话: (010) 62732853

(3) 芽分化生长调节剂配比 将外植体接种于附加 6-BA (0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/L)、IBA (0.1、0.5 mg/L) 和 GA₃ (0.6 mg/L) 的 13 个组合的基础 MS 培养基中, 40 天后统计外植体的分化率和生长情况。

(4) 增殖培养生长调节剂配比 剪取 1.0 cm 左右的茎段, 转接到采用 3 因素 (6-BA、IAA、GA₃)、3 水平 (6-BA 0.5、1.0、1.5 mg/L, IAA 0.1、0.3、0.6 mg/L, GA₃ 0、0.3、0.6 mg/L) 正交设计的 9 个激素处理组合的 MS 培养基中, 培养条件同前。35~40 天继代增殖 1 次, 统计生长情况和增殖系数。

(5) 叶片再生生长调节剂配比 剪取继代培养 35 天组培苗上、中部叶片, 分别转接到附加 6-BA (3.0、4.0、5.0、6.0 mg/L)、TDZ (0、0.5、1.0、1.5 mg/L)、NAA (0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L) 的 MS 培养基中, 先暗培养 2 周, 然后转移到培养架上光培养。光培养 40 天后, 统计生长情况和再生率。

(6) 生根 剪取发育正常新梢 (长 2.0 cm 以上), 接种到生根培养基中, 生根培养基用 1/2MS + 琼脂 6 g/L, 附加 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 的 IBA, 培养温度 (25 ± 2) °C, 每天光照时间 8~10 小时, 光强度同前, 1 个月 after 统计生根率及根数、根长。

(7) 幼苗移栽 将生根苗移植到装有蛭石的塑料容器内, 上罩塑料薄膜, 空气湿度 80%~90%、温度 22~25 °C。30 天后长出新叶, 逐渐降低湿度并进行光照锻炼, 移栽到温室中。

2 结果与分析

2.1 芽分化

在 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L 中添加 6-BA 或 IBA 均可诱导芽分化, 但再在其中添加 GA₃ 愈伤组织分化率明显提高, 并且有明显芽分化现象。外植体在 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.5

mg/L + GA₃ 0.6 mg/L 中分化率最高 (表 1), 刚接种时外植体均有不同程度的褐变, 但第 8 天后绝大部分开始转绿, 第 15 天后开始膨大分化, 25 天后部分开始出现叶片, 该培养基为秋子梨芽分化最佳配方。

表 1 秋子梨在 13 种培养基中的芽分化率

试验号	生长调节剂 (mg/L)			分化率 (%)
	6-BA	IBA	GA ₃	
1	0.5	0	0	31.5 ef
2	0	0.5	0	31.5 ef
3	1.0	0.1	0	36.6 e
4	1.0	0.5	0	30.8 f
5	1.5	0.1	0	42.2 d
6	1.5	0.5	0	51.6 c
7	2.0	0.1	0	50.7 c
8	2.0	0.5	0	49.8 c
9	3.0	0.1	0	52.3 c
10	3.0	0.5	0	51.5 c
11	1.0	0.5	0.6	62.5 b
12	1.5	0.5	0.6	58.6 b
13	2.0	0.5	0.6	69.6 a

注: 表中数据为平均值, 显著性水平为 0.05。

2.2 芽继代增殖

各培养基秋子梨继代培养的增殖系数见表 2。对各因素的增殖系数进行方差分析, 3 种激

表 2 各种配方培养基中秋子梨继代培养的增殖系数

试验号	激素配方 (mg/L)			增殖系数	其他
	6-BA	IAA	GA ₃		
1	0.5	0.1	0	0.6	植株高度在 1.8~2.0 cm, 生长点旺盛, 节间正常
2	0.5	0.3	0.3	3.0	植株高度在 1.2~1.8 cm, 叶片紧簇, 丛芽较多
3	0.5	0.6	0.6	4.0	植株高度在 1.0 cm 左右, 节间粗短
4	1.0	0.1	0.3	4.7	植株高度在 1.0 cm 左右, 节间粗短, 丛芽较多
5	1.0	0.3	0.6	3.3	植株高度在 0.6~1.0 cm, 节间粗短
6	1.0	0.6	0	3.8	植株高度在 1.6~1.8 cm 左右, 叶片舒展
7	1.5	0.1	0.6	3.9	植株高度在 0.8 cm 以下, 叶片较小
8	1.5	0.3	0	1.0	植株高度在 1.0 cm 以下, 增殖丛枝粗壮, 但叶片较小
9	1.5	0.6	0.3	2.1	植株高度在 1.4 cm 左右, 叶片较小
K1	2.53	3.07	1.8		
K2	3.93	2.43	3.27		
K3	2.33	3.30	3.73		
R	1.60	0.87	1.93		

素浓度差异均不显著(表3),可不考虑主效因素关系。对增殖系数进行正交直观分析,可得秋子梨继代培养最佳培养基配方为:MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.6 mg/L+GA₃ 0.6 mg/L,但这一配方并未在试验中出现。据R值,GA₃起的作用最大,但添加GA₃后,植株的高度随着GA₃浓度的升高而降低,说明高浓度GA₃对植株伸长有抑制作用。综合植株生长情况,最佳激素浓度配比中的GA₃浓度应该适当降低。

表3 秋子梨继代培养激素的方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F	F _{0.05}
6-BA	4.56	2	1.15	5.14
IAA	1.20	2	0.31	5.14
GA ₃	6.10	2	1.54	5.14
误差	11.87	6		

2.3 叶片再生

愈伤组织增殖系数以MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L和MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 6.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+TDZ 1.0 mg/L最优。不定梢再生率以MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 5.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+

TDZ 1.5 mg/L最优。其中,MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 6.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+TDZ 1.0 mg/L愈伤组织增殖系数、不定梢再生率均高于MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 5.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+TDZ 1.5 mg/L不定梢再生率虽略高于MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 6.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+TDZ 1.0 mg/L,但愈伤组织增殖系数明显低于MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 6.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+TDZ 1.0 mg/L,因此选择MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 6.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+TDZ 1.0 mg/L作为秋子梨叶片再生最优培养基组合(表4)。不过秋子梨叶片再生是先形成愈伤组织,然后通过愈伤组织诱导不定梢,因此可以先在MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 6.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+TDZ 1.0 mg/L中诱导愈伤组织,然后在MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L+6-BA 5.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+TDZ 1.5 mg/L中诱导不定梢。

叶片再生植株见图版2。

表4 秋子梨叶片在13种培养基中的再生率

试验号	生长调节剂 (mg/L)			平均形成愈伤数 (个)	愈伤组织增殖系数 (倍)	平均不定梢再生数 (个)	不定梢再生率 (%)
	6-BA	TDZ	NAA				
1	3.0	0	0.5	138	2.56 a	0	0 f
2	3.0	1.0	1.5	103	1.87 c	9	0.167 b
3	4.0	1.0	1.5	76	1.41 e	5.9	0.111 cd
4	5.0	0	1.5	96	1.78 c	0	0 f
5	5.0	0.5	1.5	117	2.17 b	3.9	0.074 de
6	5.0	1.0	1.5	92	1.67 cd	8	0.148 bc
7	5.0	1.5	1.5	78	1.44 e	11.9	0.222 a
8	5.0	1.0	0.5	78	1.44 e	4.8	0.093 de
9	5.0	1.0	1.0	111	2.05 b	3	0.056 ef
10	5.0	1.0	2.0	45	0.83 f	4.8	0.093 de
11	6.0	1.0	1.5	143	2.65 a	7	0.130 bcd
12	4.0	0.5	1.5	77	1.43 e	4.8	0.093 de
13	4.0	1.0	1.0	72	1.31 e	3	0.056 ef
14	5.0	0.5	1.0	108	2.00 b	3.9	0.074 de

注:表中数据为平均值,显著性水平为0.05。

2.4 生根培养

叶片再生茎尖培养后, 植入 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L + IBA 0.5 mg/L 或 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L + IBA 1.0 mg/L 中培养均可诱导试管苗生根, 以后一种培养基生根株率较高, 达 45%; 生根条数也较多, 接近 3 条, 部分苗在基部产生愈伤组织。

2.5 生根苗移栽

生根苗移栽时, 洗净残留在植株上的培养基, 否则影响成活。基部无愈伤组织的无菌苗移栽成活率高于基部有愈伤组织的, 移栽成活率可达 85%。根系条数多的, 移栽成活率较高。

3 小结与讨论

梨不同品种组织培养适宜培养基及激素各异^[8-10]。本文试验研究结果为: 秋子梨芽分化培养基为 MS 培养基 + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L + GA₃ 0.6 mg/L; 增殖培养基为 MS 培养基 + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.6 mg/L + GA₃ 0.6 mg/L; 叶片愈伤组织诱导适宜的培养基为 MS 培养基 + 6-BA 6.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L + TDZ 1.0 mg/L, 不定梢诱导培养基为 MS 培养基 + 6-BA 5.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L + TDZ 1.5 mg/L。

研究发现, 秋子梨外植体诱导分化过程中, 6-BA、IAA、GA₃ 都起着重要作用, 其中 6-BA 对茎段的分化增殖影响最大, 浓度为 2.0 mg/L 时比较适宜, 过高不利于分化增殖。IAA 对茎的伸长有促进作用, GA₃ 则对分化和增殖都有促进作用。不过同一组合的外植体在诱导分化中差异较大, 还需要进一步研究, 以提高整齐度和诱导率。在继代增殖试验中, GA₃ 能促进外植体增殖, 但却抑制其伸长, 而在金花梨的组织培养过程中, GA₃ 能明显促进外植体增殖和伸长^[11]。对于 GA₃ 在秋子梨和金花梨组织培养过程中的相反作用, 还

需要进一步研究。TDZ 在秋子梨叶片形成愈伤组织时起抑制作用, 而在愈伤组织形成再生植株时起促进作用, TDZ 在叶片再生过程中起着不同作用, 在以后的试验中可以进一步研究添加 TDZ 的时期对叶片再生的影响。

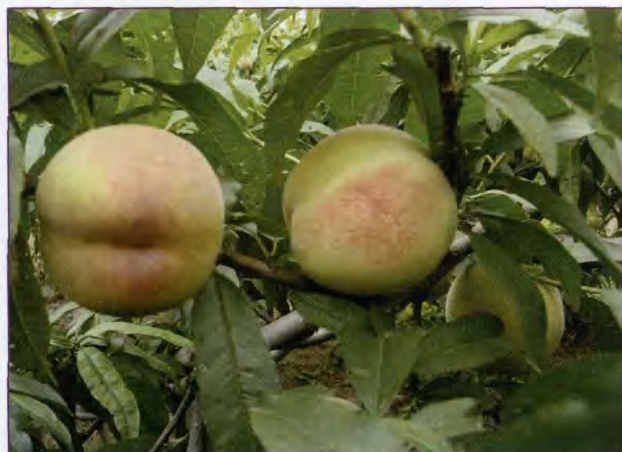
参考文献

- 1 Hiratsuka S, Katagiri M. Shoot and callus formation in explants from immature seeds of Japanese pear. *Sci Hort*, 1988, 34: 193 - 199
- 2 赵惠祥. 梨茎尖离体培养. *植物学报*, 1982 (4): 392 - 393
- 3 赵惠祥. 梨种胚离体培养的研究. *山西果树*, 1984 (2): 8 - 10
- 4 Browning G, Ognjanov V, Passey A J, et al. Multiple shoot and root regeneration from pear embryocotyledon explants in vitro. *J Hort Sci*, 1987, 62: 305 - 311
- 5 Mehra P N, Jazdka K. In vitro morphogenetic studies in pear (*Pyrus communis*). *Phytomorphology*, 1979, 29: 286 - 289
- 6 Mehra P N, Jazdka K. Experimental induction of embryogenesis in pear. *Phytomorphology*, 1985, 35: 1 - 10
- 7 Berardi G, Infante R, Neri D. Micropropagation of *Pyrus calleryana* Den. from seedlings. *Sci Hort*, 1993, 53: 157 - 165
- 8 孙清荣. 金花梨叶片不定梢诱导研究. *落叶果树*, 2000 (3): 8 - 10
- 9 赵炫博, 徐凌飞, 马锋旺, 等. 砀山酥梨叶片培养和植株再生. *西北农业学报*, 2007, 16 (2): 153 - 157
- 10 汤绍虎, 孙 敏, 周启贵, 等. '雪青' 梨叶片高频再生体系的建立. *园艺学报*, 2005, 32 (6): 1 084 - 1 087
- 11 韩文璞, 袁明莲. 黄金梨的组织培养和快繁研究. *落叶果树*, 2001 (2): 7 - 8

· 书 讯 ·

《国家审定西瓜品种推广应用指南》一书介绍了 53 个西瓜品种及果实照片、栽培技术及病虫害防治等, 适合瓜农、推广部门、管理部门阅读。每册定价 60 元, 另加邮费 3 元。地址: 辽宁省兴城市中国农业科学院果树研究所《中国果树》编辑部, 邮编: 125100, 联系人: 赵进春, 电话: 13942950976。

图 版 2



桃早熟新品系塔桥 (见第 66 页)

A new early ripening peach line 'Taqiao'
(see page 66)



桃品种莱州仙桃 (见第 67 页)

A peach cultivar 'Laizhou xiantao' (see page 67)



杨桃新品种甜杨桃 3 号 (见第 76 页)

A new carambola cultivar 'Tianyangtao 3'
(see page 76)



桃极晚熟新品系九月红脆

(见第 73 页)

A new very late ripening peach line 'Jiuyue hongcui'
(see page 73)



山地苹果园覆盖玉米秸秆

(见第 54 页)

The hill apple orchard covered with cornstalk
(see page 54)



秋子梨叶片愈伤组织诱导的试管苗

(见第 13 页)

Tube seedling from leaf callus of *Pyrus ussuriensis*
(see page 13)