

翠冠梨茎段组织培养的研究

何志祥, 曾艳玲, 谭晓风

(中南林业科技大学 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 湖南长沙 410004)

[摘要] 以翠冠梨茎段为外植体进行组织培养研究, 筛选出了较为适合该品种离体繁殖的基本培养基为 1/2MS, 并通过无芽茎段培养获得了愈伤组织, 通过有芽茎段培养获得了无菌苗。

[关键词] 梨; 翠冠; 有芽茎段; 无芽茎段; 组织培养

[中图分类号] S722.3+7; S661.2 **[文献标识码]** A

Research on Tissue Culture of Cuiguan Pear Stems and Leaves

HE Zhi-xiang, ZENG Yan-ling, TAN Xiao-feng

(Key Lab. of Non-wood Forest Product of Forestry Ministry, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: Using the stems of Cuiguan pear as tissue culture materials, we screened out the basic medium which adapts to the tissue culture of Cuiguan pear stems. This medium is 1/2MS. Moreover, we obtained some fine calli by culturing the stems without bud and gained some aseptic seedlings in the same way.

Key words: pear; Cuiguan pear; stems with bud; stems without bud; tissue culture

翠冠梨是我国南方重要早熟优质高产梨品种。该品种果形圆正, 果皮细薄, 色泽漂亮, 果肉白色, 细嫩松脆, 无渣, 汁多味甜; 含可溶性固形物 12.5%~13.5%; 果心较小, 其风味超过日本品种“幸水”; 且耐贮运, 是符合出口标准深受海内外消费者喜爱的优良品种。梨及转基因育种国内外均有成功报道^[1~18], 但翠冠梨的组织培养研究尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验采用的外植体为中南林业科技大学梨资源圃提供的翠冠梨树茎段。

1.2 方法

将采集的新鲜翠冠枝条用饱和的洗衣粉水清洗干净, 在自来水下冲洗 3~4 h, 去掉叶片, 将枝条剪成 8 cm 左右长短, 用蒸馏水冲洗 2 次后在超净工作台上进行常规消毒, 70% 的酒精浸泡 30 s, 不断地摇动以便充分杀菌。倒掉酒精, 加入 0.1% 的升汞溶液和 1 滴吐温 80 浸泡 8 min, 倒掉升汞溶液, 用无菌水摇洗 3~5 次, 每次摇洗不得少于 1 min。切取带芽茎段长约 2~3 cm, 基部切成斜面, 插入已灭菌培养基中培养; 无芽茎段则纵切去表皮后平铺接种于培养基上。每种培养基接种 6~10 瓶, 每瓶接种 2~3 个茎段。本实验进行茎段培养所选用的

[收稿日期] 2005-08-10

[作者简介] 湖南省三项基金项目“湖南沙梨主要栽培品种的自交不亲和性研究”(COOJZY2155)的部分内容。

[作者简介] 何志祥(1971-)男, 湖南汝城人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学。

基本培养基主要是 1/2MS、WPM、AS, 实验设计见表 1。

所用培养基调 pH 值 5.8, 激素均在高压灭菌前加入, 高压灭菌条件为 121 ℃ 保持 20 min。培养条件为光照强度为 2000 lx, 日光灯光源, 温度为 (25±2) ℃, 光照时间 14 h·d⁻¹, 25 d 更换 1 次培养基。

2 实验结果与分析

2.1 翠冠梨茎段培养基基本培养基的筛选

表 1 茎段培养基基本培养基筛选方案

Table 1 The basic medium screening scheme of stem culture

基本培养基	生长激素/(mg·L ⁻¹)	分裂激素/(mg·L ⁻¹)	蔗糖含量/%	琼脂含量/%
1/2MS	6-BA2.0	IBA0.2	3.0	6.5
WPM	6-BA2.0	IBA0.2	3.0	6.5
AS	6-BA2.0	IBA0.2	3.0	6.5

将外植体接种到培养基

上, 1 周后观察, 有芽茎段有 1 枝切口处出现少量的黄绿色愈伤组织, 无芽茎段还没有明显变化, 但部分开始褐化。15 d 后观察, 有芽茎段萌发较好, 有的出芽约高 0.8 cm, 出真叶, 但还未完全展开(见图 1); 部分无芽茎段表皮变粗糙, 两端出现黄绿色愈伤组织(见图 2)。30 d 后观察, 有芽茎段新芽生长良好(见图 3), 但是无芽茎段愈伤组织未见分化。



图 1 翠冠梨有芽茎段出芽
Fig. 1 The stem with bud of Cuiguang pear budding



图 2 翠冠梨无芽茎段愈伤
Fig. 2 The stem without bud of Cuiguang pear callus



图 3 翠冠梨有芽茎段无菌新苗
Fig. 3 The stem with bud of Cuiguang pear new asepsis seedling

接种 30 d 后综合统计出芽绿率和再生率, 如表 2 所示。

由表 2 可知, 翠冠梨茎段组织培养在激素水平为 6-BA2.0 mg·L⁻¹ 和 IBA0.2 mg·L⁻¹ 的情况下, 选取 1/2MS 为基本培养基可以获得高于以 WPM 或 AS 为基本培养基的外植体再生率。

2.2 翠冠梨有芽茎段与无芽茎段培养的差异

为了区别有芽茎段与无芽茎段组织培养不同要求, 本实验在综合统计分析的情况下, 还对它们在不同培养基中的不同生长表现进行了观察分析(如表 3 和表 4)。

表 3 有芽茎段在不同培养基中的生长表现

Table 3 The different growing representation of stem with bud in different medium

培养基配方	接种数	愈伤数	愈伤颜色	愈伤率/%	出芽数	再生率/%
1/2MS+6-BA2.0 mg·L ⁻¹ +IBA0.2 mg·L ⁻¹	16	1	黄绿	6.25	15	93.75
WPM+6-BA2.0 mg·L ⁻¹ +IBA0.2 mg·L ⁻¹	18	—	—	—	9	50
AS+6-BA2.0 mg·L ⁻¹ +IBA0.2 mg·L ⁻¹	18	—	—	—	12	66.67

由表 2、3 可以看出, 有芽茎段倾向于直接出芽, 可以省略诱导愈伤阶段, 而无芽茎段培养则必须先进行愈伤诱导, 就本研究所选用的 3 种基本培养基而言, AS 较适合无芽茎段的愈伤诱导, 愈伤组织较健康, 但是需要另外寻找适合的分化培养基。另外, 该培养基组合诱导愈伤组织的得率偏低, 仅 25%, 因此需要就激素配比进行优化选择。

表4 无芽茎段在不同培养基中的生长表现

Table 4 The different growing representation of stem without bud in different medium

培养基配方	接种数	愈伤数	愈伤颜色	愈伤率/%	出芽数	再生率/%
1/2MS+6-BA2.0 mg·L ⁻¹ +IBA0.2 mg·L ⁻¹	18	2	黄白	11.11	—	—
WPM+6-BA2.0 mg·L ⁻¹ +IBA0.2 mg·L ⁻¹	16	2	黄褐	12.5	—	—
AS+6-BA2.0 mg·L ⁻¹ +IBA0.2 mg·L ⁻¹	16	4	绿	25	—	—

3 讨论

在翠冠梨茎段组织培养中,有芽茎段和无芽茎段具有不同的再生方式,需要不同的培养条件.芽是植物体生长的中心,同时也是植物体合成生长素的重要场所.有芽茎段和无芽茎段在生理生化状况,尤其是在内源激素的水平上存在较大的差异,因而决定其具有各自不同的离体培养表现.虽然有芽茎段容易直接出芽再生,但是很难获得较高的增殖倍数,而无芽茎段培养则必须寻找合适的芽分化培养基.

一般认为矿物元素浓度较高有利于茎叶生长,而较低时有利于生根.本实验选用的培养基为中盐或低盐型培养基,均获得了一定的再生频率,但是不同的培养基再生情况有明显的差别.在激素水平为6-BA2.0 mg·L⁻¹和IBA0.2 mg·L⁻¹的情况下,选取1/2MS为基本培养基培养外植体获得了高于以AS和WPM为基本培养基培养外植体的不定芽再生率.相对于WPM培养基而言,1/2MS和AS培养基的显著特点是硝态氮含量较高,大约是WPM培养基的4倍.硝态氮含量的不同是否是影响翠冠梨茎段培养再生的制约因子尚待进一步确证.

[参 考 文 献]

- [1] 孙清荣,石荫坪,孙洪雁.梨成熟胚子叶不定梢诱导[J].河北农业大学学报,1999(22):50-52.
- [2] 曾艳玲,谭晓风,乌云塔娜,等.梨不同杂交和自交组合幼胚组织培养的研究[J].中南林学院学报,2005,25(1):29-32.
- [3] 水蔡明,李树贵.晶梨茎段再生植株的培养[J].河北果树,2001(3):43-44.
- [4] 韩文璞,袁明莲.黄金梨的组织培养和快繁研究[J].落叶果树,2001(2):7-8.
- [5] 蒋 琴,祁陈文,刘淑玉.新梨7号组织培养快繁技术研究[J].落叶果树,2002(4):4.
- [6] 王定康,王琼芳.玉香梨的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,1999,35(3):207.
- [7] Chevreau E, Mourgues F, Neveu M, et al. Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from in vitro leaves of pear [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 1997, 33(3):173-179.
- [8] 孙清荣,孙洪雁.西洋梨“丰产”叶片不定梢再生[J].落叶果树,1999(4):9-10.
- [9] 徐凌飞,马峰旺,王醋之,等.八月红梨叶片不定芽诱导研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(4):73-75.
- [10] 孙清荣,刘庆忠,赵瑞华.西洋梨叶片直接再生体细胞胚[J].园艺学报,2003,30(1):185-86.
- [11] Lane W D, Iketani H, Hayashi T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 54:9-14.
- [12] 韩继成,冯志红,陈霜莹.梨离体叶片诱导不定芽的研究[J].河北果树,1998(2):12.
- [13] Shibli R A, Ajlouni M M A, Obeidat A A. Direct regeneration from pear (*Pyrus syriaca*) leaf explant [J]. Advances in Hort Science, 2000, 14(1):12-18.
- [14] 刘翠琼,汤浩茹.梨叶片培养与转基因研究进展[J].果树学报,2003,20(5):374-378.
- [15] Caboni E, Tonelli M. G, Lauri P. et al. In vitro shoot regeneration from leaves of Wild Pear (*Pyrus communis* var. *pyraster*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 59(1):1-7.
- [16] 张 虹.梨树组织培养研究的进展[J].广西热带农业,2004,5:12-16.
- [17] 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.
- [18] 曾艳玲,谭晓风,乌云塔娜.自交新高梨叶片的培养繁殖技术 [J].中南林学院学报,2005,25(4):50-52.

[本文编校:谢荣秀]