

南果梨不同外植体诱导黄色愈伤组织的影响因素

田晓艳¹, 刘延吉², 丛楠楠²

(1. 辽宁石油化工大学 环境与生物工程学院, 辽宁 抚顺 113004; 2 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:研究了南果梨不同外植体诱导黄色愈伤组织的最佳培养基。结果表明:以子房为外植体诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D;以茎段为外植体诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS+2.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+2.0 mg/L 2,4-D;以叶片为外植体诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D。

关键词:南果梨; 外植体; 诱导; 愈伤组织; 影响因素

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)01-0019-03

南果梨是秋子梨系统 (*Pyrus ussuriensis* Maxim) 中的优良品种。由于其果实肉质细腻多汁, 香味浓郁, 口感极好, 而深受广大消费者的喜爱。梨树的童期较长, 实生苗通常需生长 5 a 才能结果, 因此生产上采用嫁接繁殖。但是, 嫁接繁殖会因病毒在植物体内传播与积累而影响产量和品质。利用植物组织培养技术不仅可以克服病毒病的危害, 而且可以快速繁殖优质苗木。梨的组织培养快繁已经引起人们的重视。目前, 虽然南果梨的组织培养研究逐渐增多, 但对诱导南果梨不同愈伤组织的最适植物调节物质及其使用浓度尚无报导。该试验旨在探索不同外植体诱导黄色愈伤组织的最佳培养基^[1-5]。

1 材料和方法

1.1 材料

于 2007 年 4 月采集沈阳农业大学果树试验园未萌发南果梨 2 a 生枝条, 25℃水培一周后, 分别取萌发的幼嫩茎段、嫩叶、子房 3 种外植体为材料进行接种。

1.2 供试材料的消毒处理

将外植体于清水中加几滴 Tween-20 冲洗 30 min 后, 超净工作台上先用 75% 的酒精浸泡 30 s, 用无菌水冲洗 3 次后, 用 0.1% 的升汞灭菌 1~2 min, 最后用无菌水冲洗 3~5 次^[2,9]。

1.3 单因素试验

将已彻底灭菌的梨花的子房取下, 用刀片在子房表面轻微划出伤口; 茎尖切成近 1 cm 的小茎段; 叶片上表面划伤, 分别接种在 MS 基本培养基上, 分别加

0.5 mg/L 6-BA、2,4-D、KT、IAA、IBA 不同激素, 培养温度 (25±1)℃, 光照强度为 2 000 lx。每个培养基内接种 2~3 块外植体, 10 次重复。5 d 后统计子房、茎段、叶片的愈伤组织的生长情况并统计发生愈伤的外植体块数^[2-4]。

1.4 正交试验

设计 L₉ (3⁴) 三因素三水平正交试验, 三因素分别为加入培养基中的 6-BA、2,4-D、IAA (其中叶的 B 因素为 IBA)。因素 A 设 0.5、1.5、2.5 三水平; 因素 B 设 0、0.1、0.5 三水平; 因素 C 设 0、1.0、2.0 三水平。每瓶接种数个外植体, 多次重复。观察愈伤组织形成情况并统计各处理外植体发生愈伤组织的块数。

1.5 愈伤组织生长曲线绘制

将继代培养 3 代后的愈伤组织接种于无激素的 MS 培养基上, 接种量控制在 0.15 g/瓶左右, 连续培养 27 d, 每 3 d 取样称重一次, 3 次重复, 取平均值。绘制愈伤鲜重随时间变化的生长曲线图。

2 结果与分析

2.1 不同激素对不同外植体愈伤组织诱导的影响

表 1 不同激素对南果梨子房愈伤组织的诱导情况

激素/ 0.5 mg · mL ⁻¹	愈伤组织状态	形成时间/ d	诱导率/ %
6 BA	黄色松散颗粒状	6	34.78
KT	白色松散水质状	7	25.00
IAA	白色松散水质状	8	20.83
2,4-D	黄色松散颗粒状	7	68.97
IBA	黄色紧密颗粒状	8	24.00

表 2 不同激素对南果梨茎段愈伤组织的诱导情况

激素/ 0.5 mg · mL ⁻¹	愈伤组织状态	形成时间/ d	诱导率/ %
6 BA	白色紧密水质状	8	41.66
KT	黄色松散颗粒状	6	17.39
IAA	黄色松散颗粒状	7	78.90
2,4-D	白色松散颗粒状	7	38.09
IBA	黄色紧密颗粒状	8	12.00

第一作者简介: 田晓艳(1971-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为细胞工程。E-mail: maggietian2002@163.com。

通讯作者: 刘延吉。E-mail: yanjiliu@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家企业博士后资金资助项目 (2006-1270)。

收稿日期: 2007-07-16

表 3 不同激素对南果梨叶片愈伤组织的诱导情况

激素/0.5 mg · mL ⁻¹	愈伤组织状态	形成时间/d	诱导率/%
6-BA	黄色松散颗粒状	7	61.90
KT	黄色紧密水质状	8	18.51
IAA	白色松散颗粒状	8	12.00
2,4-D	黄色紧密水质状	9	12.50
IBA	黄色松散颗粒状	8	34.61

由表 1~3 可以看出, 2,4-D 对子房的诱导效果最佳, 诱导率达 68.97%; IAA 对茎段的诱导效果最佳, 诱导率达 78.90%; 6-BA 对叶片的诱导效果最佳, 诱导率达 61.90%, 它们都形成黄色松散颗粒状的愈伤组织。根据上述试验结果, 选择 6-BA, IAA, 2,4-D 为正交试验的三因素。

2.2 不同激素配比对子房外植体愈伤组织诱导的影响

表 4 不同激素比例对南果梨子房愈伤组织的诱导情况

处理	愈伤组织状态	形成时间/d	诱导率/%
A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	透明松散水质状	5	73.8
A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	黄色松散颗粒状	5	96.9
A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	黄色松散颗粒状	3	92.3
A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	黄色松散颗粒状	5	94.6
A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	黄色绿色紧密水质或颗粒状	5	85.2
A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	黄白色紧密颗粒状	5	81.6
A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	白色或透明紧密状	5	83.9
A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	黄绿色水质或块状	7	75.0
A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	透明水质状	3	96.3

分析	因素			
	A	B	C	D
X ₁	87.67	84.10	76.80	85.10
X ₂	87.13	85.70	95.93	87.47
X ₃	85.06	90.07	87.13	87.30
R	16.84	17.70	32.46	2.37
F 值	1.08	5.47	52.61	2.67
F _{0.05}		19.00		
F _{0.01}		99.00		
	不显著	不显著	显著	

表 5 不同激素比例对南果梨茎段愈伤组织的诱导情况

处理	愈伤组织状态	形成时间/d	诱导率/%
A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	透明松散水质状	5	40.6
A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	绿色紧密块质状	5	60.0
A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	黄色松散颗粒状	5	40.9
A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	褐色紧密块质状	13	30.3
A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	黄绿色松散颗粒状	5	45.7
A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	黄色松散颗粒状	3	86.0
A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	黄色紧密颗粒状	6	59.5
A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	白色松散水质状	5	68.2
A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	乳白色松散颗粒状	8	84.2

分析	因素			
	A	B	C	D
X ₁	47.17	43.44	64.93	85.10
X ₂	52.99	57.96	38.17	87.47
X ₃	70.63	70.38	48.69	87.30
R	23.46	26.94	16.24	22.04
F 值	50.52	63.11	23.08	18.61
F _{0.05}		19.00		
F _{0.01}		99.00		
	显著	显著	显著	

由表 4 可以看出, 各激素对子房产生愈伤组织影响程度分别为 C(2,4-D)>>B(IAA)>>A(6-BA), 并且 2,4-D 对子房的诱导作用效果最显著。分析结果表明, A₁B₃C₂ 为最佳组合, 即子房外植体在 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D 培养基中形成的黄色愈伤组织最好(见图 1)。

2.3 不同激素对比对茎段外植体愈伤组织诱导的影响

由表 5 可以看出, 各激素对茎段产生愈伤组织影响程度分别为 B(IAA)>>A(6-BA)>>C(2,4-D), 并且三因素对茎段的诱导作用效果都显著。分析结果表明, A₃B₃C₁ 为最佳组合, 即茎段外植体在 MS+2.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+0 mg/L 2,4-D 培养基中形成的黄色愈伤组织最好(见图 2)。

2.4 不同激素对比对叶片外植体愈伤组织诱导的影响

表 6 不同激素比例对南果梨叶片愈伤组织的诱导情况

处理	愈伤组织状态	形成时间/d	诱导率/%
A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	黄绿色紧密颗粒状	10	75.0
A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	黄色偏透明松散颗粒状	12	100.0
A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	黄色偏透明松散颗粒状	12	88.2
A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	黄绿色松散颗粒状	12	100.0
A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	黄绿色偏透明松散颗粒状	8	100.0
A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	绿色偏白颗粒状	7	91.6
A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	黄色紧密颗粒状	7	95.3
A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	黄绿色紧密颗粒状	8	80.0
A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	黄绿色松散颗粒状	12	100.0

分析	因素			
	A	B	C	D
X ₁	74.33	76.70	52.13	78.27
X ₂	97.20	76.67	100.0	95.63
X ₃	75.10	93.27	94.50	72.73
R	22.90	16.60	47.87	22.90
F 值	24.95	13.56	101.49	21.12
F _{0.05}		19.00		
F _{0.01}		99.00		
	显著	不显著	极显著	

由表 6 可以看出, 各激素对叶片产生愈伤组织影响程度分别为 C(2,4-D)>>A(6-BA)>>B(IAA), 并且 2,4-D 对叶片的诱导作用效果极显著。分析结果表明, A₂B₃C₂ 为最佳组合, 即叶片外植体在 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D 培养基中形成的黄色愈伤组织最好(见图 3)。

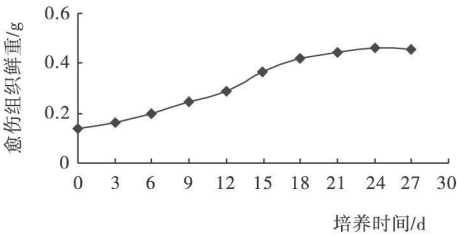


图 4 愈伤组织生长曲线



图 1 子房所产生的愈伤组织



图 2 茎段产生的愈伤组织



图 3 叶片产生的愈伤组织

2.5 愈伤组织生长曲线

如图 4, 在最初的 9 d 生长处于延滞期, 愈伤组织生长缓慢, 其鲜重平缓增长, 处于逐渐适应环境状态下。9~21 d 为对数增长期, 在营养充足的条件下, 愈伤组织快速分裂。21~27 d 愈伤组织生长处于平稳期, 此时由于培养基内营养物质的消耗, 有害物质积累, 生物量平稳甚至呈下滑趋势, 愈伤组织逐渐变黑。

3 讨论与结论

在植物组织培养中, 不同的激素对比对植物的生长影响很大。常用的激素有生长素和分裂素两类, 其中 6-BA 为应用最广的分裂素, 对愈伤组织的诱导起着重要的调节作用, 能促进细胞扩大^[9]。当 6-BA 浓度为 2.5 mg/L 时, 可能由于渗透压过大, 产生的愈伤组织呈水质状, 不利于愈伤组织的生长。IAA 和 2,4-D 均为生长素, 能促进细胞生长, 愈伤组织生物量的增加主要靠此来调节。

南果梨以上述外植体诱导黄色松散颗粒愈伤组织,

子房最适培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D+3%蔗糖, 7 g/L 琼脂, pH 5.8。茎段最适培养基为 MS+ 2.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+2.0 mg/L 2,4-D+3%蔗糖, 7 g/L 琼脂, pH 5.8。叶片最适培养基为 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D+3%蔗糖, 7 g/L 琼脂, pH 5.8。

参考文献

[1] 赵玉辉. 果实花青素研究进展[J]. 北方园艺, 2006(3): 46-47.
[2] 郑光植. 植物细胞培养及其次级代谢[M]. 昆明: 云南大学出版社, 1992. 1: 58-60.
[3] Mori T, Sakurai M, Shigeta J, et al. Formation of anthocyanins from cells cultured from different parts of strawberry plant[J]. Food Sci, 1993 58: 788-793.
[4] 李宗霖, 周燮. 植物激素及其免疫检测技术[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996: 114-134.
[5] 崔德才, 徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 53-54.
[6] 唐传核. 植物生物活性物质[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 218-249.

The Influencing Factors of Inducing Yellow Callus of Nanguo Pear with Different Explant

TIAN Xiao-yan¹, LIU Yan-jie², CONG Nan-nan²

(1. Environmental Technology and Biotechnology College, Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology, Fushun, Liaoning 113001, China; 2. Biotechnology College, Shenyang Agriculture University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: To obtain the optimum medium for inducing yellow callus of nanguo pear with different explants. The result showed that the optimum medium for inducing yellow callus with ovary was MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D; with shoot was MS+2.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+2.0 mg/L 2,4-D; with leaf was MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D.

Key words: Nanguo pear; Explant; Induce