

应用正交设计对组培杜梨快速繁殖的研究

李丹丹, 王 忆, 韩振海, 许雪峰, 孔 瑾, 李天忠

(中国农业大学 园艺植物研究所, 北京市果树逆境生理与分子生物学重点实验室, 北京 100193)

摘 要:以杜梨试管苗为材料,应用正交试验法研究不同植物激素及其配比对试管苗生长与增殖生长的影响。结果表明:适合杜梨试管苗生长阶段的培养基为 MS 培养基+ 6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L; 适合杜梨增殖生长的培养基为 MS 培养基+ 6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.6 mg/L+GA₃ 0.6 mg/L。

关键词:杜梨;组织培养;激素

中图分类号: S 661.203.6 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2009)01—0047—02

梨是世界性的重要落叶果树,在我国仅次于苹果和柑桔为第三大果树。采用传统育种手段,梨的许多性状已经得到了改良,但现有的类型对多种胁迫及生理病害仍存在着许多弱点。一些问题虽然可通过栽培管理方式进行缓解,但若从根本上解决则需要靠常规育种和分子改良途径^[1]。杜梨是梨树砧木中抗寒、抗旱、耐涝、耐盐碱综合抗性最强的砧木,对所有的白梨、砂梨、秋子梨系统品种具有亲和力,为我国梨树砧木最佳选择^[2]。与其他木本果树一样,由于梨的高度杂合性以及童期较长等特点,使常规育种周期较长,在田间繁殖也相对费时费力、占用较多土地。随着生物技术的不断进展,梨树离体培养取得了长足进展,并为种苗工厂化及种质资源离体保存提供了有效途径,且通过基因工程可缩短育种周期,定向引入有经济价值的外源基因^[3]。该试验以杜梨为试材,采用正交设计法,以期获得杜梨快速生长及扩繁培养基,为建立其优良无性系和进行遗传转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验外植体材料带腋芽杜梨茎段采自中国农业科学院果树研究所。采回的杜梨当年生枝条用洗涤精清洗后,流水反复冲洗 30 min。超净工作台上将枝条剪成 1~2 cm 带腋芽的茎段,无菌水冲洗 2 次后置于 75%酒精中浸泡 30 s,再用 0.1% HgCl₂消毒 10 min,然后用无菌水冲洗,接种到诱导芽分化的培养基(MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L)中,30 d 后获得无菌苗。

试验所用培养基为 MS 培养基,附加琼脂粉 6 g/L,将 pH 5.8~6.0 经高压蒸汽灭菌 15~20 min (120~125℃,1.2 个标准大气压)。培养条件为(25±2)℃,空气

气相对湿度 75%左右,光周期 14 h/10h,光照强度 1 800~2 000 lx。

1.2 方法

选用 L₉(3⁴)正交表进行试验设计,研究不同浓度组合对杜梨试管苗生长及增殖的影响。试验因素水平分别为: 6-BA (0.5、1.0、2.0 mg/L)、IBA (0.1、0.3、0.6 mg/L)和 GA₃ (0.1、0.3、0.6 mg/L)。每个处理接种 5 瓶,每瓶 3 株苗,重复 2 次。30 d 后统计不同处理下试管苗的高度和分蘖数,计算平均高度及平均增殖倍数(丛生芽数量/原始芽数量)。

2 结果与分析

应用 L₉(3⁴)正交表进行试验结果如表 1 所示,9 种组合均能较好使植株生长及增殖,在生长高度及增殖倍数上不同组合差异较明显。对不同指标分别进行直观分析,结果见表 2、表 3。

表 1 不同浓度激素配比对杜梨试管苗生长的影响
Table 1 Effect of different hormone rate on the growth in *Pyrus betuli folia*

编号 Treatment Number	6 BA 浓度 Concentration /mg · L ⁻¹	IBA 浓度 Concentration /mg · L ⁻¹	GA ₃ 浓度 Concentration /mg · L ⁻¹	生长高度 Length /cm	增殖 倍数 Propagation rate
1	0.5	0.1	0.1	1.55	8.7
2	0.5	0.3	0.3	1.77	7.0
3	0.5	0.6	0.6	1.57	10.0
4	1.0	0.1	0.3	1.78	9.3
5	1.0	0.3	0.6	1.63	8.3
6	1.0	0.6	0.1	2.37	16.0
7	2.0	0.1	0.1	2.58	10.8
8	2.0	0.3	0.6	2.31	14.5
9	2.0	0.6	0.3	1.17	7.6

对 3 种植物激素对杜梨生长高度的影响进行趋势性分析发现,在试验范围植株高度内随各因素含量不同而明显发生变动。对于杜梨生长的最优组合应为 BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L。根据因素内水平级差大小可见参试的 3 个激素因素对杜梨增殖倍数影响的主次关系为 GA₃>6-BA>IBA,即 GA₃对于杜梨高度的增加有着更为重要的作用。

第一作者简介:李丹丹(1986-),女,本科,研究方向为果树学。
通讯作者:李天忠。
基金项目:北京市自然科学基金重点资助项目(6071002)。
收稿日期:2008-09-30

表 2 不同激素对比对杜梨生长高度影响指数分析

Table 2 Analysis of available length of plant growth by different hormone rate

各因素水平 Levels of factors	6 BA	IBA	GA ₃
T1	1.630	1.970	2.077
T2	1.927	1.903	1.573
T3	2.020	1.703	1.927
极差	0.390	0.267	0.504

注 T1、T2、T3 分别为各因素逐步递增的 3 个水平(下同)。

表 3 不同激素对比对杜梨芽增殖倍数影响的指数分析

Table 3 Analysis of proliferation bud index by different hormone rate

各因素水平 Levels of factors	6 BA	IBA	GA ₃
T1	8.567	9.600	13.067
T2	11.200	9.933	7.967
T3	10.967	11.200	9.700
极差	2.633	1.600	5.100

采用直观分析法分析不同激素配方所得的植株生长高度,可见 6-BA 水平为 2、IBA 水平为 3、GA₃ 水平为 1 的时候植株生长高度达最大值,其中 GA₃ 浓度对植株增殖同样影响较大,这与秦改花等在杜梨上的研究结果相同^[4],但该试验中浓度偏低。适宜于杜梨增殖培养的激素浓度为 BA 1.0 mg/L+IBA 0.6 mg/L+GA₃0.1 mg/L。应用此浓度可在 30 d 内使植株增殖 16 倍,快速获得苗木,但也存在着一定玻璃化的影响,需要在后期生长过程通过调节激素加以改善。

3 讨论

使用正交试验法能够大幅度减少试验次数而且并不会降低试验可行性,利用排列整齐的正交表来对试验进行整体设计、综合比较、统计分析,实现通过少数的试验次数找到较好条件的目的。一般试验结果的分析方法为两类,方差分析法和直观分析法。该试验主要使用直观分析法,若希望指标越大(越小)越好,那么只要在每个因素选效应最大(最小)的水平即可。统计级差可反应因素的重要性,极差越大,说明该因素的水平改变时对指标的影响越大,这个因素就影响显著^[5]。

梨的组织培养国内外早有报道,从 20 世纪 30 年代 Tukey 等用梨的胚培养获得成功后,至今组织培养工作已有广泛的发展,采用的外植体也涉及茎尖、腋芽、胚

乳、子叶、胚珠等多种,其中多数研究集中在茎尖培养、胚培养和叶片培养方面^[6]。梨茎尖培养中,不同的品种对于培养基有不同的要求。丰水梨采用 1/2MS 或 LE 培养基进行培养时,增殖系数可达 5 倍,优于 MS 培养基^[7]。但大多梨组织培养应用的仍为传统 MS 培养基,因此该试验直接选用其作为植株生长基本培养基,重点研究附加不同激素及激素对比对植株生长及扩繁的影响。细胞分裂素有助于使腋芽从顶端优势的抑制下释放出来,特别是与生长素的共同作用有利于促进茎芽的发生和增殖。另外在芽的继代培养过程中,随着继代次数的增加,芽的增殖和伸长都明显减慢,一定浓度的 GA₃能显著促进芽的增殖和伸长生长。李昌珠等用西洋梨 12 个基因型的茎尖为外植体进行组培研究,发现基因型间的差异明显,其中“Koporeka”仅经过 28 d 便增殖 5.6 倍;而“Vila”连续培养 60 d 后仅少量外植体形成愈伤组织,12 个基因型中仅有 5 个类型可以进行规模离体繁殖,基因型不同外植体增殖和形态分化显著不同^[8]。应用梨的叶片进行再生和转基因的研究也早已有报道^[9],该试验可迅速获得杜梨大量无菌外植体,为这一优质梨砧木无性系扩繁和今后的基因遗传转化奠定了良好基础。

参考文献

[1] 曹霞,柴明良.梨组织培养的回顾与展望[J].中国南方果树,2005 24(4): 73-76.
[2] 向永枢,张少华,陈玉华.优质杜梨苗木育苗方法及其对比试验[J].新疆农业科学,2002 39(4): 247-248.
[3] 张虹.梨树组织培养研究的进展[J].广西热带农业,2004(5): 12-16.
[4] 秦改花,余义琴,王甜甜,等.杜梨离体培养技术的研究[J].安徽农学通报,2007,13(6): 96-97.
[5] 盖钧镒.试验统计方法[M].北京:中国农业出版社,2000.
[6] 曾云英,范丕湘,王婷.梨组织培养与遗传转化研究进展[J].九江学院学报(自然科学版),2006(1): 42-45,50.
[7] Lane W D. Regeneration of pear plants from shoot meristem tips[J]. Plant Science Letters 1979 16: 337-342.
[8] 李昌珠, Jiri S. Blazek J. 不同基因型欧洲梨离体繁殖研究[J].果树学报 2002 19(4): 227-230.
[9] ZHU L, WELANDER M. Adventitious shoot regeneration of two dwarfing pear rootstocks and the development of transformation protocol[J]. Hort. Sci. Biotech, 2000, 75(6): 745.

Studies on Rapid Propagation Tissue Culture in *Pyrus betuli folia* Bunge by Applying Orthogonal Design

LI Dan-dan, WANG Yi, HAN Zhen-hai, XU Xue-feng, KONG Jin, LI Tian-zhong
(Institute for Horticulture Plants, China Agriculture University, Key Laboratory of Beijing Municipality of Stress Physiology and Molecular Biology for Fruit Tree, Beijing 100193, China)

Abstract: Using orthogonal design methods, the effects of different hormone concentration and rate on the rapid propagation of *Pyrus betulaefolia* Bunge. were studied. The results showed that the best culture medium for the growth of *Pyrus betulaefolia* was MS with BA 2.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L + GA₃0.1 mg/L. The results also indicated that MS supplied with BA 1.0 mg/L + IBA 0.6 mg/L + GA₃0.1 mg/L was good for the propagation of *Pyrus betulaefolia*.
Key words: *Pyrus betulaefolia* Bunge; Tissue culture; Hormone