

## 梨砧木 OH×F51 的离体组织培养研究

宋健坤, 黄曼娜, 王 然

(青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109)

**摘 要:**以梨砧木 OH×F51 为试材, 对其茎尖组织培养和叶片愈伤组织诱导进行了研究, 以获得 OH×F51 离体培养的最佳途径。结果表明: 适合 OH×F51 茎尖离体培养的培养基是 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L, 有较高的成苗率; OH×F51 叶片愈伤组织诱导的最佳培养基是 NN69+TDZ 3.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L, 叶片放置方式对愈伤组织诱导有一定影响, 叶片的远轴面接触培养基, 可以获得较高的出愈率。

**关键词:**梨砧木; OH×F51; 茎尖; 叶片; 离体组织培养

**中图分类号:**Q 813.1<sup>+</sup>2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)18-0107-03

OH×F51 属于梨属矮化砧木, 来源于 OH×F 系列砧木, OH×F 系列砧木是 20 世纪 60 年代由美国俄勒冈州立大学的 Westwood 等<sup>[1]</sup>从 ‘Old Home’ (故居) × ‘Farmingdale’ (法明德尔) 的杂种后代中选出的 9 个矮化、半矮化、半乔化的砧木类型。其中 OH×F51 为矮化类型, 做砧木的矮化程度与榲桲 A 相当; 20 世纪 80 年代由中国农业科学院果树研究所引进到我国, 并作为中间砧进行了试验研究<sup>[2]</sup>, OH×F51 矮化砧木抗梨衰退病和火疫病, 具有与梨属品种亲和良好、固地性好等优点, 尽管引入我国后由于不抗寒、易患梨树腐烂病等原因, 未在生产上进行推广<sup>[3]</sup>, 但是可以作为一种优良的矮化砧木资源, 为今后的梨砧木育种提供亲本。

目前, 关于梨组织培养的研究很多, 但主要集中在栽培品种上<sup>[4]</sup>, 梨砧木品种的组织培养研究较少, 特别是 OH×F51 的组织培养研究国内尚鲜见报道, 该研究对 OH×F51 的茎尖组织培养和叶片愈伤组织诱导进行了研究, 旨在探索 OH×F51 的最佳离体培养途径, 为今后梨砧木的繁殖和利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试 OH×F51 枝条采自青岛农业大学胶州胶莱镇农场梨砧木种质资源圃。4 月份将枝条在室内水培催芽, 待芽萌动抽生新梢后剥取茎尖和叶片进行培养。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 外植体的处理 茎尖处理: 用小刀切取长约

0.5 cm 大小的茎尖, 先用 75% 酒精溶液消毒 30 s, 用无菌水冲洗 4~5 次, 再用 0.1% 升汞溶液消毒 6 min, 然后用无菌水清洗 4~5 次, 用滤纸吸干表面水分, 以待接种。叶片处理: 摘取幼嫩叶片, 用自来水冲洗干净, 去除叶片表面灰尘及绒毛, 用剪刀将叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 大小的方块, 先用 75% 酒精溶液消毒 30 s, 用无菌水清洗 4~5 次, 再用 0.1% 升汞溶液消毒 6 min, 用无菌水清洗 4~5 次, 用滤纸吸干表面水分, 以待接种。

1.2.2 培养基的筛选 茎尖培养以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA、IBA 激素。共设 4 个处理, 分别以 A、B、C、D 表示 (表 1)。所有培养基均在 121℃ 下高温灭菌 20 min。叶片愈伤组织诱导以 MS 和 NN69 为基本培养基, 附加不同的激素组合, 共设 5 个处理, 分别以 a、b、c、d、e 表示 (表 2), 每瓶接种 6 片, 远轴面接触培养基和近轴面接触培养基各 3 片。所有叶片培养材料均置于暗箱中进行暗培养。

表 1 茎尖培养基配方

处理	培养基配方
Treatment	The mediums
A	MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
B	MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
C	MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
D	MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L

表 2 叶片愈伤组织诱导培养基配方

处理	培养基配方
Treatment	The mediums
a	MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
b	MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
c	MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
d	MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
e	NN69+TDZ 3.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L

**第一作者简介:**宋健坤(1978-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事梨育种等研究工作。E-mail: qausjk@126.com.

**基金项目:**青岛市科技计划基础研究资助项目(11-2-4-5-(2)-jch); 青岛农业大学高层次人才启动基金资助项目(630733)。

**收稿日期:**2014-04-18

## 2 结果与分析

### 2.1 茎尖培养

对接种后 OH×F51 的成苗率进行比较。从表 3 可以看出,OH×F51 在 4 种处理上都可以成苗,但成苗率不同,B 处理的成苗率最高,达到 58.33%,说明在这 4 个处理中 B 处理:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 比较适合 OH×F51 的茎尖离体培养。

表 3 不同处理对 OH×F51 茎尖的影响

Table 3 The effect of different treatments on shoot tips of OH×F51

处理	接种茎尖数	成苗数	成苗率
Treatment	Number of shoot tips/个	Number of seedlings/个	Rate of seedlings/%
A	60	17	28.33
B	60	35	58.33
C	60	34	56.67
D	60	32	53.33

### 2.2 叶片愈伤组织诱导

对接种后叶片的出愈率进行比较,从表 4 可以看出,接种 30 d 后,在暗培养条件下 5 个处理都有愈伤组织产生,其中 E 处理的出愈率最高,达到 98.33%,远远高于其它处理。由此可见,MS 培养基并不适合 OH×F51 的叶片愈伤组织诱导,而培养基 NN69+TDZ 3.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 是叶片愈伤组织诱导较理想的培养基。

表 4 不同培养基对 OH×F51 叶片愈伤组织诱导的影响

Table 4 The effect of different treatments on the induction of leaf callus of OH×F51

处理	叶片总数	接种后 30 d 30 days later	
		出愈数	出愈率
Treatment	Number of leaves	Number of callus/个	The rate of callus/%
a	60	16	26.67
b	60	40	66.67
c	60	26	43.33
d	60	27	45.00
e	60	59	98.33

对不同叶片放置方式的出愈状况进行比较,从表 5 可以看出,接种 30 d 后,远轴面接触培养基的叶片出愈率较高,而近轴面接触培养基的叶片出愈率较低,并且远轴面接触培养基的叶片愈伤组织排布密集。由此可见,叶片的远轴面接触培养基是最佳的叶片放置方式,可以获得较高的出愈率。

表 5 不同叶片放置方式对 OH×F51 叶片愈伤组织诱导的影响(30 d 后)

Table 5 The effect of different placing manner of leaves on the induction of leaf callus of OH×F51(30 days later)

处理	叶片总数	出愈数	出愈率
Treatment	Number of leaves/片	Number of callus/个	The rate of callus/%
远轴面接触培养基	150	107	71.33
Abaxial surface touching medium			
近轴面接触培养基	150	61	40.67
Adaxial surface touching medium			

## 3 讨论与结论

从茎尖诱导培养结果可以看出,OH×F51 茎尖离体培养的最佳培养基是 B 处理,即 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 培养基,茎尖诱导成苗率最高。该试验仍选用传统的 MS 培养基为梨茎尖诱导的培养基,曾斌等<sup>[5]</sup>对库尔勒香梨砧木 S 系、F 系的组织培养结果表明,MS 培养基较 AS、B5 等其它培养基更有利于矮化砧木的增殖。梨组织培养中常用到不同的激素浓度组合,细胞分裂素和生长素是梨组织培养中最常用的激素组合,如李丹丹等<sup>[6]</sup>研究表明,适合杜梨试管苗生长阶段的激素组合为 6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L;而郑亚杰等<sup>[7]</sup>认为,适宜山梨茎尖诱导及增殖的激素组合为 6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L。不同研究的结果也不尽相同,这可能与所研究的品种和材料不同有关。

从叶片愈伤组织诱导结果可以看出,培养基 NN69+TDZ 3.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 可以获得很高的出愈率,说明 NN69 培养基比 MS 培养基更适合梨叶片的诱导,这与韩继成等<sup>[8]</sup>的研究结果相符。梨叶片在培养基中的放置方式对愈伤组织诱导有一定影响,叶片远轴面接触培养基可以获得更高的出愈率。这可能与叶片的组织结构有关,叶片背面栅栏组织和海绵组织发达,更容易形成愈伤组织。因此,叶片愈伤组织诱导以远轴面接触培养基效果较好。

孙清荣等<sup>[9]</sup>发现,NN69 培养基附加 TDZ 2.0 mg/L 及 NAA 0.1 mg/L 可以直接从西洋梨叶片再生体细胞胚,而该研究中 OH×F51 叶片在培养过程只产生愈伤组织,没有观察到体细胞胚的产生。获得的愈伤组织能否进一步分化产生体细胞胚或植株需要进一步的研究。

### 参考文献

- [1] Westwood M N, Lombard P B, Bjorstand H O. Performance of Bartlett pear on standard and Old Home×Farmingdale clonal rootstocks[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1976, 101(2): 161-164.
- [2] 罗娅, 汤浩茹. 梨矮化砧木选育与离体繁殖研究进展[J]. 中国南方果树, 2004, 33(4): 46-49.
- [3] 贾敬贤. 梨砧木育种矮化潜力鉴定研究初报[J]. 中国果树, 1983(2): 40-43.
- [4] 曹霞, 柴明. 良梨组织培养的回顾与展望[J]. 中国南方果树, 2005, 34(4): 73-76.
- [5] 曾斌, 李疆, 张孝霖, 等. 库尔勒香梨砧木组织培养[J]. 经济林研究, 2006, 24(2): 41-43.
- [6] 李丹丹, 王忆, 韩振海, 等. 应用正交设计对组培杜梨快速繁殖的研究[J]. 北方园艺, 2009(1): 47-48.
- [7] 郑亚杰, 张茂君, 姚寰宇, 等. 山梨组织培养及快繁技术研究[J]. 吉林农业科学, 2010, 35(1): 45-46.
- [8] 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.
- [9] 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): 85-86.

# 正交实验法优选橡胶树花药愈伤组织诱导的研究

黄凤翔, 管 艳, 桂明春, 梁国平, 李 玲, 田 海

(云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

**摘 要:**以橡胶树品种 RRH105 花药为外植体, 研究了不同浓度 2,4-D、KT、NAA 及 TDZ 组合对橡胶树花药愈伤组织诱导的影响。结果表明:最适合诱导橡胶树花药愈伤组织的培养基配方为 MS+0.8 mg/L 2,4-D+0.8 mg/L KT+1.2 mg/L NAA+0.0 mg/L TDZ+60 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂, 诱导率达 94.00%, 出胚率为 14.25%。

**关键词:**正交实验; 橡胶树; 花药; 愈伤组织

**中图分类号:**S 794.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)18-0109-03

在植物组织培养中, 激素是影响植株再生的决定性因素, 培养基中植物生长调节剂的种类、浓度和配比的差异直接影响到植株的再生率。在橡胶树花药离体培养报道中常常使用不同浓度的 2,4-D、KT、NAA 进行组合诱导产生胚性愈伤组织<sup>[1-2]</sup>, 而鲜见使用噻二唑苯基脲(TDZ)的报道。TDZ 是一种具有很强细胞分裂素活性的苯基脲类衍生物, 目前它作为一种特殊的植物生长调节剂普遍用于植物组织培养中<sup>[3-5]</sup>, 与其它激素相比, 极低浓度的 TDZ 能使多种植物再生体系中产生的愈伤组织生长速度增加数十倍<sup>[6]</sup>。

该试验以橡胶树品种 RRH105 花药为外植体, 采用正交实验设计, 研究 2,4-D、KT、NAA 和 TDZ 这 4 种激素对橡胶树花药愈伤组织诱导的影响, 筛选出花药愈伤组织诱导的最佳培养基配方, 以期为橡胶树花药再生植株的培育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为橡胶树品种 RRH105 未成熟的春花, 于 2013 年 3 月 28 日采集于云南省热带作物科学研究所试验基地。选取花粉发育时期为单核期和少数进入双核期的雄花为外植体(颜色为黄绿色)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体的处理 在超净工作台上, 将已选取的雄花置于体积分数为 75% 乙醇中浸泡 30 s, 无菌水清洗 1 次, 再用 0.1% 升汞灭菌 10 min, 期间不时摇动, 最后用无菌水清洗 5~6 次后置于玻片上, 用医用解剖针将雄花剥离, 取其雄蕊接种于盛有愈伤组织诱导培养基的培养瓶中。

**第一作者简介:**黄凤翔(1962-), 女, 农艺师, 现主要从事植物组织培养等研究工作。E-mail: 782205527@qq.com.

**基金项目:**国家科技支撑计划资助项目(2011BAD30B01); 云南省产业重大关键技术开发专项计划资助项目(云发改[2008]1657号); 云南省应用基础研究自筹经费资助项目(2013FZ169); 2014 云南省热带作物科技创新体系建设资金资助项目(RF2014); 云南省科研院所技术开发研究专项资助项目(2013DC013)。

**收稿日期:**2014-04-21

## Research on *in vitro* Tissue Culture of Pear Rootstocks OH×F51

SONG Jian-kun, HUANG Man-na, WANG Ran

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract:** Taking pear rootstock OH×F51 as material, the shoot tips tissue culture and leaf callus induction of OH×F51 were studied, in order to gain the optimum way of *in vitro* culture. The results showed that the suitable medium for shoot tips culture was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+sugar 30 g/L+agar 6 g/L, with a higher rate of seedling. The optimum medium for leaf callus induction of OH×F51 was NN69+TDZ 3.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+sugar 30 g/L+agar 6 g/L. The placing manner of leaf had a certain influence on the callus induction. The leaves which abaxial surface touched the medium had a higher rate of callus.

**Keywords:** pear rootstock; OH×F51; shoot tips; leaves; *in vitro* tissue culture