

曾令达, 李彩华, 翟秋艳. 淡水砂梨离体快繁技术研究 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (11): 1224—1227.

ZENG L-D, LI C-H, JU Q-Y. *In Vitro* Propagation of Dan-Shui Pear[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32(11): 1224—1227.

淡水砂梨离体快繁技术研究

曾令达, 李彩华, 翟秋艳

(惠州学院生命科学院, 广东 惠州 516007)

摘要: 为建立淡水砂梨离体培养体系, 以淡水砂梨品系香水梨为试验材料, 以 MS 为基本培养基, 研究生长调节剂不同组合和浓度对腋芽诱导、增殖培养的影响, 以及不同生长调节剂的种类和浓度对生根培养的影响。结果表明, 香水梨腋芽诱导的最佳培养基配方为 MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹, 诱导率为 71.7%; 增殖最适宜的培养基配方为 MS+6-BA 3.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.20 mg · L⁻¹, 增殖系数为 3.2; 生根培养基配方为 1/2MS+IBA 0.3 mg · L⁻¹, 香水梨生根率为 63.3%。研究表明 MS 为基本培养基添加生长调节剂适于淡水砂梨的离体快繁。

关键词: 淡水砂梨; 离体快繁; 培养基; 增殖

中图分类号: S 661.2

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2017) 11—1224—04

In Vitro Propagation of Dan-Shui Pear

ZENG Ling-da, LI Cai-hua, ZHAI Qiu-yan

(School of Life Science, Huizhou University, Huizhou, Guangdong 516007, China)

Abstract: To establish an *in vitro* culture system for propagating Dan-Shui pear, Xiangshui pear was used on Murashige and Skoog medium (MS) as the basal medium for the experimentation. Conditions of the tissue culture, such as hormone combination and concentration on explant induction and proliferation culture, as well as hormone types and concentrations on rooting culture, were studied. The optimal combination for the axillary bud induction was found to be MS+ 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ that yielded a germination rate of 71.7%. For the bud proliferation, it was MS+6-BA 3.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.20 mg · L⁻¹ to deliver a multiplication coefficient of 3.2. For the optimal rooting performance, the combination of 1/2 MS+IBA 0.3 mg · L⁻¹ to result in a rooting rate of 63.3% was selected. Thus, addition of the growth regulators to MS medium benefitted the *in vitro* propagation of Dan-Shui pear.

Key words: dan-Shui pear; *in vitro* propagation; culture medium; multiplication

砂梨属于蔷薇科 Rosaceae 梨亚科 Pomoideae 梨属 *Pyrus* 植物^[1], 在我国栽培历史悠久, 分布区域广。淡水砂梨原主产在惠州市惠阳区淡水, 是以产地命名的著名砂梨, 其果实色泽朗润, 爽脆、多汁, 在港澳和东南亚地区深受人们的青睐, 曾享誉岭南^[2]。淡水砂梨除淡水红梨品种外, 还有香水梨、青梨、蜜梨等品系, 但随着惠阳区农业生产结构的变化, 淡水砂梨栽培面积进一步减少, 淡水砂梨产业渐趋衰落^[3]。研究淡水砂梨的组织培养, 对保存和利用地方特有经济作物的种质资源, 促进砂梨产业的发展, 均具有重要意义。

近年来研究发现梨的组织培养效果与配方中生长调节剂的种类、浓度和配比密切相关^[4-7]。茎段离体快繁中不同砂梨品种的培养基配方亦有较大差异^[8-9]。而淡水砂梨的组织培养仅宋冠华等^[10]研究过红梨的外植体培养, 有关淡水砂梨离体快速繁殖技术研究至今未见报道。本研究采用淡水砂梨品系香水梨为试验材料, 探讨生长调节剂组合和浓度对淡水砂梨腋芽诱导、继代增殖培养的影响, 以及不同生长调节剂种类和浓度对生根培养的影响, 旨在建立淡水砂梨快速繁殖离体培养体系, 为淡水砂梨的种质保存、品种复壮和改良提供理论依据和技

收稿日期: 2017—06—13 初稿; 2017—08—27 修改稿

作者简介: 曾令达 (1974—), 博士, 副教授, 研究方向为植物生理生态和生物技术 (E-mail: hzlingda@139.com)

基金项目: 国家自然科学基金 (31272117); 广东省科技计划项目 (2013B020304010); 惠州市科技计划项目 (2013B040009001)

术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为香水梨秋季萌发的无病充实的幼嫩新梢，梢长 4~7 cm，材料于 2015 年 9 月 28 日采自惠州市惠阳曾记水果专业合作社在花果管理区栽培的具有香水梨典型性状的淡水砂梨结果母株。

1.2 试验方法

1.2.1 诱导培养和增殖培养 参考宋冠华等^[10]的方法对材料进行消毒，材料消毒后剪取约 1 cm 左右的带 1 个腋芽的茎段进行接种。以 MS 为基本培养基，添加 6-BA 和 NAA 等 2 种生长调节剂。诱导培养 6-BA 选用 0.5、1.0、1.5 mg · L⁻¹ 等 3 个质量浓度条件，NAA 选用 0.1、0.2、0.3 mg · L⁻¹ 等 3 个质量浓度条件，按照正交试验设计 9 个不同的试验处理 (Ty1~Ty9) (表 1)，每瓶接种 2 个茎段，每个处理接种 30 瓶，每个处理重复 3 次。接种 20 d 后观察并测定茎段在不同培养基上的腋芽出芽数，并计算诱导率 (诱导率/% = 出芽数/接种数 × 100%)。增殖培养 6-BA 采用 1.0、2.0、3.0 mg · L⁻¹ 等 3 个质量浓度条件，NAA 采用 0.1、0.2、0.3 mg · L⁻¹ 等 3 个质量浓度条件，按照正交试验设计成 9 个不同的试验处理 (Tz1~Tz9) (表 2)。每瓶接种 1 个试管苗，每个处理接种 30 瓶，每个处理重复 3 次。培养基中添加砂糖 30 g · L⁻¹ 和琼脂 6 g · L⁻¹，pH 值 5.8。接种后放入温度为 (25 ± 1) °C、光照强度 2 000 lx 和光照 16 h · d⁻¹ 的光照培养箱进行培养 (下同)。接种 20 d 后观察并测定茎段在不同培养基上的腋芽出芽数、腋芽的生长情况。增殖培养 20 d 按下列公式计算增殖系数。

增殖系数 = 继代 20 d 芽 (芽高 ≥ 0.5 cm) 总数/继代接种前的芽数。

1.2.2 生根培养 切取约 2.5 cm 长势较一致芽接种到分别含 IBA (0.2、0.3、0.4 mg · L⁻¹) 和 NAA (0.2、0.3、0.4 mg · L⁻¹) 的 1/2MS 生根培养基上，共 6 个处理 (Tg1~Tg6) (表 3)，附加蔗糖 30 g · L⁻¹ 和琼脂 6 g · L⁻¹，pH 为 5.8，每瓶接种 1 个芽，每个处理接种 20 瓶，重复 3 次。30 d 后观察和测定生根情况，并统计生根率 (生根率/% = 生根芽数/接种总芽数 × 100%)、平均生根数 (平均生根数 = 生根总条数/生根总株数)、平均根长 (平均根长 = 所有根的长度之和/生根条数)。

1.3 数据处理

利用 Excel 2013 软件对试验数据进行统计，采用邓肯氏新复极差检验进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同生长调节剂比对淡水砂梨腋芽诱导的影响

腋芽诱导培养中，有些外植体茎段在接种后 2 h 后发现开始褐化，而各处理中均发现外植体变褐的情况。外植体最早在第 6 d 时可见叶腋处芽体萌动，20 d 后腋芽可长至 3 cm 高。不同生长调节剂浓度的比对腋芽诱导效果不同，如表 1，每个处理接种 60 个芽，Ty1、Ty2 和 Ty3 诱导率均低于 50%，而 Ty3 的诱导率最低，为 18.33%。Ty4~Ty9，当 6-BA 质量浓度相同时，随着 NAA 的质量浓度增加，诱导率下降。9 个处理中 Ty4 和 Ty5 这 2 个处理的诱导率较高，分别为 71.7% 和 66.1%，两者差异不显著，但与其他处理的诱导率呈显著差异。处理 Ty4 较 Ty5 的 NAA 为最主要因素，Ty4 中 NAA 用量少，显示作用效果较佳，而腋芽的生长情况来看，以处理 Ty4 较 Ty5 中茎段较少变褐，诱导率最高，腋芽启动较快，叶片舒展，生长状况较优。因此，综合腋芽的诱导、生长情况来看腋芽诱导的最佳培养条件为 MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.1 mg · L⁻¹。

表 1 不同生长调节剂浓度比对淡水砂梨腋芽诱导的影响
Table 1 Effect of growth regulator additions in medium on axillary bud induction of Dan-Shui pear

处理	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	接种数 /个	出芽数 /个	诱导率 /%
Ty1	0.5	0.1	60.0	14.7 ± 2.5	24.4e
Ty2	0.5	0.2	60.0	20.7 ± 1.5	34.4d
Ty3	0.5	0.3	60.0	11.0 ± 2.0	18.3f
Ty4	1.0	0.1	60.0	43.0 ± 2.0	71.7a
Ty5	1.0	0.2	60.0	39.7 ± 2.1	66.1a
Ty6	1.0	0.3	60.0	33.3 ± 1.5	55.6bc
Ty7	1.5	0.1	60.0	34.0 ± 2.0	56.7b
Ty8	1.5	0.2	60.0	31.0 ± 1.7	51.7bc
Ty9	1.5	0.3	60.0	30.0 ± 1.0	50.0c

注：诱导率后面不同英文小写字母，表示邓肯氏新复极差测验差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

2.2 不同生长调节剂比对淡水砂梨试管苗增殖的影响

试管苗接种在含 6-BA 和 NAA 不同配比质量

浓度的增殖培养基中，在培养箱中培养第 10 d 可见茎段基部有丛芽长出，20 d 长成最高可达 2 cm 的芽苗，可再进行增殖培养。增殖培养试验结果如表 2。当 6-BA 为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，随着 NAA 质量浓度的增加，苗的增殖系数不存在显著性差异。6-BA 为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的增殖系数比 Tz1、Tz2 和 Tz3 等 3 个处理的增殖系数高，其中，NAA 为 $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 Tz5，增殖系数较高，为 2.90，且与 6-BA 为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的各处理的增殖系数差异显著。6-BA 为 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的增殖系数较 6-BA 其他浓度的处理高，在处理 Tz8 中，NAA 为 $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，增殖系数最大，为 3.2，与其他处理差异显著。增殖出来的试管苗叶色翠绿，叶片伸展，生长健壮，因此，最适宜香水梨继代增殖培养的配比是 MS+6-BA $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 2 不同生长调节剂比对淡水砂梨试管苗增殖的影响
Table 2 Effect of growth regulator additions in medium on proliferation of Dan-Shui pear

处理	6-BA/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	增殖系数
Tz1	1.0	0.1	1.2e
Tz2	1.0	0.2	1.2e
Tz3	1.0	0.3	1.1e
Tz4	2.0	0.1	2.3cd
Tz5	2.0	0.2	2.5c
Tz6	2.0	0.3	2.2d
Tz7	3.0	0.1	2.8b
Tz8	3.0	0.2	3.2a
Tz9	3.0	0.3	2.7b

2.3 不同生长调节剂种类和含量对淡水砂梨试管苗生根的影响

将生长健壮，叶片展开的试管苗接种在生根培养基中，试管苗在生根初期，会出现粉红状的根原基，最早经过 7 d 可见有根长出，第 12 d，有几条粉红色条状根从芽底部的伸出（表 3），处理 Tg2 中 IBA 为 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，香水梨的生根率为 63.3%，生根数为 6.3，根长为 4.3 cm，为各处理中生根率最高，生根数最多且根长最长，生根率与其他各处理差异显著。含有 IBA 的培养基中 IBA 为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，生根率为 36.7%，生根数为 4.0，根长为 3.3 cm，而 IBA 为 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，生根率为 48.3%，生根数为 4.0，根长为 3.4 cm。因此，随着 IBA 质量浓度的增加，生根率由小变

大，超过一定质量浓度后则对生根不利，生根率再由大变小。Tg6 含有 NAA 的培养基中，当 NAA 为 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，生根率在 Tg4、Tg5 和 Tg6 处理中生根率最高，为 21.7%，根长最长，为 1.9 cm。但 Tg6 生根数为 1.6 条，较 Tg4、Tg5 两个处理少。含有 NAA 的生根培养各处理中，在生根率、生根数和根长均比含有 IBA 的生根培养处理低，显示 IBA 较 NAA 更适合用来促进香水梨的生根。因此，最适香水梨的生根配方为 1/2MS+IBA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 3 不同生长调节剂种类和含量对淡水砂梨试管苗生根的影响
Table 3 Effect of types and concentrations of growth regulators added to medium on rooting of Dan-Shui pear

处理	IBA/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	生根率 /%	生根数 /条	根长 /cm
Tg1	0.2	0.0	36.7c	4.0 ± 1.0	3.3 ± 1.0
Tg2	0.3	0.0	63.3a	6.3 ± 1.5	4.3 ± 2.0
Tg3	0.4	0.0	48.3b	4.0 ± 1.7	3.4 ± 0.9
Tg4	0.0	0.2	6.7e	2.0 ± 2.6	1.5 ± 0.2
Tg5	0.0	0.3	16.7de	2.0 ± 1.0	1.4 ± 1.2
Tg6	0.0	0.4	21.7d	1.6 ± 0.6	1.9 ± 0.7

3 讨论与结论

利用木本植物的幼嫩新梢进行组培快繁，能够减少材料的褐化，提高诱导的成功率，还能减少遗传变异，让组培苗保持亲代的优良性状。本试验通过淡水砂梨品系香水梨的新梢诱导腋芽萌发，然后进行增殖扩繁，并筛选出了适宜的生根培养基，基本建立了淡水砂梨的离体快繁体系。本试验发现香水梨最佳腋芽诱导培养基配方为 MS+6-BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，诱导率可到 71.7%，宋冠华等^[10]在淡水砂梨的外植体培养中以红梨为材料，以 MS+6-BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为基础培养基，发现腋芽的出芽诱导率为 30.3%，比本试验的诱导率低，可能与红梨形成较多的愈伤组织有关，红梨的愈伤组织形成率为 51.5%。不同品种梨的增殖培养配方不同，本试验发现香水梨增殖的培养基配方为 MS+6-BA $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，增殖系数为 3.2。宋梅等^[11]在砀山梨组织培养研究中，筛选出适宜砀山梨增殖的培养基配方为 MS+6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA3 2.0

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，平均繁殖数为 2.23，结果与本试验的增殖培养基较为一致。受基因型的限制，梨在不同基本培养基条件下，生根状况不同，李嫦艳^[12]发现 1/2MS 诱导早熟梨的生根效果优于 MS。除基本培养基外，不同的生长调节剂对根的生长影响也不同。本试验中香水梨生根培养基含有 IBA 的配方中最高生根率为 63.3%，而含有 NAA 最高的生根率为 21.7%。从生根率来看，比较 NAA 和 IBA 2 种生长素的生根效果，IBA 要明显优于 NAA。不同的梨品种中，在相同的基本培养基 1/2MS 上添加不同生长调节剂及其质量浓度，对生根效果不同，尹婷^[13]在黄金梨的生根培养基中添加了 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA，生根率可达 91.6%。而上饶早梨理想的生根培养基为 1/2MS+NAA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + PP₃₃₃ $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 活性炭 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[8]，蔡猛^[14]对梨砧木“中矮 1 号”进行生根诱导，其适宜培养基为 1/2MS+NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，生根率为 50.1%，梨砧木“OHF333”生根诱导的适宜培养基为 1/2MS+NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，生根率为 52.6%。本研究发现香水梨最适生根培养基为 1/2MS+IBA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献：

- [1] 蒲富慎，黄礼森，李树玲. 梨品种 [M]. 北京：农业出版社，1989：279.
- [2] 陈英豪，谢炳全. 淡水沙梨栽培技术调查报告 [J]. 华南农业大学学报，1959，1（1）：56—65.
- [3] 赵飞，倪根金，章家恩. 惠阳淡水沙梨栽培历史考述 [J]. 农业考古，2013，33（3）：158—165.
- [4] 刘翠琼，汤浩茹，罗娅. 不同基因型梨叶片离体培养和植株再生 [J]. 园艺学报，2005，32（6）：180—183.
- [5] 宗娟. 梨茎尖和叶片高效离体繁殖再生体系建立 [D]. 合肥：安徽农业大学，2010.
- [6] 李嫦艳，吴翠云. 新梨七号茎段组织培养再生植株的研究 [J]. 西北农业学报，2011，20（5）：130—134.
- [7] 冉昆，王宏伟，王少敏. 梨组织培养与遗传转化研究进展 [J]. 中国农学通报，2017，33（4）：74—79.
- [8] 夏华炎，徐路，肖虹，等. 上饶早梨主栽品种离体快繁体系的建立 [J]. 南方农业学报，2016，47（9）：1547—1552.
- [9] 蔺经，李晓刚，李慧，等. 沙梨新品种苏翠 1 号组培快繁体系研究 [J]. 江苏农业科学，2014，42（11）：66—67.
- [10] 宋冠华，沙洁，王绍芬，等. 淡水沙梨外植体培养技术研究 [J]. 韩山师范学院学报，2016，37（6）：45—48.
- [11] 宋梅，王淑娟，刘振江，等. 香梨、杨山梨组织培养及脱毒快繁技术 [J]. 新疆农业科学，2003，40（6）：376—377.
- [12] 李嫦艳. 早熟梨组织培养再生体系建立的研究 [D]. 阿拉尔：塔里木大学，2011.
- [13] 尹婷. 砂梨离体再生体系的建立及 chit42 基因的研究 [D]. 长沙：湖南农业大学，2008.
- [14] 蔡猛. 梨硬枝扦插和离体快繁研究 [D]. 杨凌：西北农林科技大学，2014.

（责任编辑：黄爱萍）