

耐盐彩叶杜梨茎尖繁育影响因素研究

王莹¹, 唐季云², 李玉娟^{1*}, 谈峰¹, 郭聪¹, 李敏¹

(1. 江苏沿江地区农业科学研究所, 江苏南通 226541; 2. 江苏省通州区林业技术指导站, 江苏南通 226300)

摘要 [目的]建立耐盐彩叶杜梨的茎尖组培快繁技术体系。[方法]以耐盐彩叶杜梨茎尖为试材,对影响茎尖离体培养的取材时期、外植体消毒、培养基和激素配比等因素进行研究。[结果]休眠期水培促萌发的嫩芽污染率较低,最利于茎尖诱导成活。采用正交试验设计筛选出最佳灭菌处理为75%乙醇+0.1% HgCl₂ 8 min,污染率和发芽率分别为27.36%和57.47%;适于茎尖增殖培养的培养基和激素组合为MS+1.0 mg/L 6-BA+1 mg/L IBA,增殖系数为9.23。[结论]通过耐盐彩叶杜梨茎尖繁育技术的优化,为建立其优良无性系和进行遗传转化奠定基础。

关键词 耐盐彩叶杜梨;茎尖培育;组织培养;快繁技术

中图分类号 S604⁺.3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)13-0056-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.13.018



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Influencing Factors of Stem Tip Breeding of Salt-Tolerant *Pyrus betulaefolia*

WANG Ying¹, TANG Ji-yun², LI Yu-juan¹ et al (1. Jiangsu Riverine Institute of Agricultural Sciences, Nantong, Jiangsu 226541; 2. Tongzhou Forestry Technical Instruction Station, Nantong, Jiangsu 226300)

Abstract [Objective] To establish a rapid propagation technique system of stem tip tissue culture for salt-tolerant *Pyrus betulaefolia*. [Method] The stem tip of *Pyrus betulaefolia* was used to study the influencing factors such as the period of sampling, the disinfection of explants, the medium and the ratio of hormones. [Result] The contamination rate of young shoots promoted by hydroponic culture in dormant stage was lower, which was most beneficial to stem tip induction and survival. The optimal sterilization treatment was 75% alcohol for 30s+0.1% HgCl₂ for 8 min, and the contamination rate and germination rate were respectively 27.36% and 57.47%. The suitable multiplication culture medium and hormone combination for stem tip tissue was MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IBA, the multiplication coefficient was 9.23. [Conclusion] Through the optimization of stem tip breeding technology of salt-tolerant *Pyrus betulaefolia*, it laid a foundation for establishing its excellent clone and genetic transformation.

Key words Salt-tolerant *Pyrus betulaefolia*; Stem tip culture; Tissue culture; Rapid propagation technology

杜梨为蔷薇科梨属落叶乔木,别名棠梨、灰梨、海棠梨等,原产我国北部,长江流域以及辽宁南部、河北、山西、河南、陕西、甘肃、安徽、江西、湖北均有分布,常生于海拔50~1 800 m的平原或山坡上^[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,由于杜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^[3]。随着生物技术的不断进展,杜梨的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。笔者以杜梨为试材,采用正交设计法,获得杜梨快速生长及扩繁培养基,旨在为建立其优良无性系和进行遗传转化奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 试验材料为露地栽培于江苏沿江地区农业科学研究所苗圃中的耐盐彩叶杜梨。

1.2 外植体的采集与处理 以耐盐彩叶杜梨的茎尖作为外植体,分别在3个不同时期进行取材:①休眠期枝条于温室水培催芽(S1);②新梢生长初期顶端新芽(S2);③盛花期

的枝条顶端茎尖(S3)。

1.3 消毒灭菌 用细毛软刷将枝条表面清洗干净,剪取1.5 cm长的带芽茎段,用洗洁精浸泡30 min,再用流水冲洗1 h以上,在超净工作台上用75%乙醇消毒30 s,再分别用0.1%的HgCl₂灭菌6、8、10 min,无菌水冲洗5~6遍接种到启动培养基上,10 d后统计污染率,20 d后统计萌发率。培养基pH为5.7,培养温度(25±2)℃,光照强度为2 000 lx,光照时间12 h/d。

1.4 丛生芽诱导和增殖培养 选取在启动培养基上继代3次以上生长健壮的无菌芽,接种到丛生芽诱导和增殖培养基中。设计L₉(3⁴)正交设计:6-BA(0.5、1.0、1.5 mg/L), IBA(0.25、0.50、1.00 mg/L), NAA(0、0.2、0.4 mg/L), 30 d后统计增殖系数及生长状况。

1.5 壮苗生根 选择生长健壮、长势均一的丛生芽,转接至壮苗生根培养基中。壮苗生根培养基用MS+(0.1、0.5、1.0) mg/L IBA, 30 d后统计生根率、根数和生长状况。

1.6 炼苗与移栽 将继代培养45 d、高度超过3 cm、生长健壮、根系发育良好的无菌苗,在组培室中进行炼苗。首先去掉瓶子的橡皮筋炼苗2 d,然后将封口膜打开一半炼苗2 d,最后完全去封口膜炼苗7 d。炼苗结束后,取出组培苗,用无菌水将根系上的琼脂清洗干净,并用800倍的多菌灵浸泡15 min。移栽到草炭:珍珠岩=3:1(体积比)的混合基质中。移栽前,基质用高锰酸钾消毒,放置一个晚上后使用,移栽后浇透水使基质和根部紧密结合,放置在25℃的人工气候箱中培养7~14 d,之后放置在温室内常规培养。

基金项目 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(17)1004)。

作者简介 王莹(1986—),女,江苏南通人,助理研究员,硕士,从事彩叶苗木引选、繁育、栽培、推广研究。唐季云(1962—),女,江苏南通人,高级工程师,从事园林苗木引选和推广方面的研究。王莹和唐季云为共同第一作者。*通信作者,副研究员,从事园林植物的育种、繁殖与栽培研究。

收稿日期 2018-12-23; **修回日期** 2019-01-16

2 结果与分析

2.1 最佳取材时期的选择 由表 1 可知,取材时间对茎尖的诱导效果有显著差异。休眠期枝条于温室内水培外植体与其他取材时期相比,茎尖污染率最低,而发芽率与成活率最高,成活率与其他各组差异达极显著水平。盛花期的枝条顶端茎尖诱导效果较其他 2 组较差,污染率接近 50%,发芽率仅为 33.51%。对 3 次取材结果进行评价得出,污染率由低到高依次为休眠期枝条于温室内水培催芽、新梢生长初期顶端新芽、盛花期枝条顶端茎尖。前 2 个时期取材,茎尖污染率相对较低,诱导成活率和发芽率较高,是较适宜的取材时期。

表 1 不同取材时期对杜梨茎尖诱导的影响

Table 1 Effects of different sampling periods on induction of stem tip of pear %

取材时期 Sampling periods	污染率 Contamination rate	发芽率 Germination rate	成活率 Survival rate
S1	13.61 aA	74.32 aA	84.32 aA
S2	23.56 bB	63.67 aA	75.29 bB
S3	48.96 cB	33.51 bA	46.92 cC

注:同列不同小写字母表示不同取材时期间差异显著($P < 0.05$);不同大写字母表示不同取材期间差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level; different capital letters in the same column indicate extremely significant differences at 0.01 level

2.2 启动培养 由表 2 可知,用 HgCl₂ 消毒不同时间,随着

灭菌时间的延长,污染率逐渐降低,相应的萌发率先升高后降低。综合考虑污染情况和发芽结果,杜梨灭菌最适宜的方法为 75%乙醇 30 s,0.1% HgCl₂ 灭菌 8 min,此时的污染率为 27.36%,发芽率为 57.47%,其发芽率与其他灭菌方式差异达极显著水平。

表 2 茎段不同灭菌效果比较

Table 2 Comparison of sterilization effects of different stem segments %

0.1%HgCl ₂ 处理时间 Treatment time//min	污染率 Contamination rate	发芽率 Germination rate
6	54.63 aA	26.32 bB
8	27.36 aA	57.47 aA
10	23.86 bB	46.91 cB

注:同列不同小写字母表示不同处理时间间差异显著($P < 0.05$);不同大写字母表示不同处理时间间差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level; different capital letters in the same column indicate extremely significant differences at 0.01 level

2.3 丛生芽诱导和增殖培养 由表 3 可知,高浓度 IBA 和 NAA 均能促进丛生芽的增殖生长,而过高浓度的 6-BA 对植株生长及丛生芽增殖不利,6-BA 浓度 1 mg/L 时,随着 IBA 浓度的增加,增殖系数升高。极差分析结果表明,丛生芽诱导和增殖培养效果影响因素由大到小依次为 IBA、6-BA 和 NAA。6-BA 与 IBA 的浓度比为 1:1 时效果最好,明显优于其他组合。最适宜诱导丛生芽的组合为 1 mg/L 6-BA+1 mg/L IBA,此时的增殖系数为 9.23,丛生芽长势最好,叶色鲜艳(图 1)。

表 3 丛生芽诱导和增殖培养效果比较

Table 3 Comparison of the effect of cluster bud induction and proliferation culture

编号 No.	6-BA mg/L	IBA mg/L	NAA mg/L	增殖系数 Growth coefficient	生长状况 Growth conditions
1	0.5	0.25	0	4.98	叶色正常,长势一般
2	0.5	0.50	0.2	7.13	叶色正常,长势较好
3	0.5	1.00	0.4	5.65	叶色正常,长势一般
4	1.0	0.25	0.2	4.67	叶色暗沉,长势弱
5	1.0	0.50	0.4	7.21	叶色鲜艳,长势较好
6	1.0	1.00	0	9.23	叶色鲜艳,长势强壮
7	1.5	0.25	0.4	7.46	叶色鲜艳,长势强壮
8	1.5	0.50	0	5.34	叶色鲜艳,长势一般
9	1.5	1.00	0.2	6.63	叶色鲜艳,长势较好
k ₁	5.92	5.70	6.52		
k ₂	7.04	5.65	6.14		
k ₃	6.78	7.17	6.77		
R	0.86	1.52	0.63		



图 1 丛生芽诱导和增殖培养

Fig. 1 Cluster bud induction and multiplication culture

2.4 无菌苗生根培养 从表 4 可以看出,IBA 在一定浓度范围内均可诱导外植体生出不定根,但浓度过高会使平均生根数和平均根长降低,且 3 种浓度的 IBA 平均根长差异极显著。但 IBA 浓度为 1.0 mg/L 时,诱导的不定根数较少,根系

表 4 无菌苗生根培养情况

Table 4 Rooting culture condition of sterile seedlings

IBA 浓度 IBA concentration mg/L	生根率 Rooting rate//%	平均根数 Average root number//条	平均根长 Average root length//cm	生长情况 Growth condition
0.1	93 bB	6.74 bA	5.32 bB	良好
0.5	100 aA	8.32 aA	6.41 aA	良好
1.0	100 aA	5.17 cB	3.69 cC	不良

张河湾水库区域景观生态体系起主导作用的拼块主要是荒草地和有林地,这表明作为模地,二者很容易维护自己在区域生态环境中的地位,从而达到增强生态体系稳定性的作用,因此维持荒草地、有林地的优势度显得极其重要。

3 对策及建议

张河湾水库本身的自然地理环境特征决定了其生态环境具有一定的脆弱性,属中、低土石山区地貌。库区植被覆盖状况一般,而且以林地、草地为主,固土保水能力一般,抵抗自然环境的变化能力也较弱。库区内啮齿类动物占比较大,容易危害林地、草地,影响生态系统的稳定性。针对张河湾水库生态环境现状建议:一是加强水库周边生态系统的保护和建设,选择适生的树草种等植物措施,增加植被面积,提高物种多样性,保持生态系统的完整性;二是因地制宜,建设生物缓冲带,发挥生态与经济作用;三是制定合理的经济发展计划,禁止各种破坏自然资源的项目上马^[10-11]。

(上接第 57 页)

变粗且短,植株生长不良。IBA 浓度为 0.5 mg/L 时,生根的数量最多且根长最长,为最适宜的生根浓度。

2.5 试管苗移栽 移栽后前 7 d 每天喷水 2~3 次,之后每天喷水 1 次,保持空气湿度在 80% 左右,14 d 后即可移出培养箱,直接放置在温室中进行常规管理,移栽成活率达 90% 以上,之后在气候合适时可移栽大田。

3 结论与讨论

适宜的取材时期是降低茎尖污染率、提高茎尖诱导成活率的重要因素^[4]。李艳霞等^[5]在建立越橘品种‘Koralle’茎尖繁殖体系中发现,利用休眠期水培后萌发出的嫩芽为外植体时,材料的污染最低。范世杰等^[6]对 3 种越橘(桔)茎尖初代培养与增殖进行研究,结果表明不同取材时期茎尖污染率和诱导成苗率有很大差异。该试验也获得了相似的研究结果,用休眠期水培后萌发出的嫩芽可显著降低接种的污染率,提高茎尖诱导成活率,为最适宜取材时期。新梢生长初期顶端新芽和盛花期的枝条顶端茎尖由于长时间暴露在室外,污染严重,接种后不易灭菌,导致污染率较高;另外茎尖顶端分生组织分化相对缓慢,以致于诱导成活率较低,应尽量避免这些时期取材。

在茎尖培养过程中,培养基是影响茎尖成活率以及苗木状态的主要因素之一,当然,同一属的不同种以及不同品种对培养基的反映有所不同,使用的培养基不能同一而论^[7-9]。植物激素是影响茎尖诱导和增殖的关键因子之一,在组织培养中起重要作用。林静等^[10]利用杜梨子叶诱导不定芽,结果显示,培养基和激素浓度对丛生芽诱导起关键性作用,而

参考文献

- [1] 白翠玲,鲁绍伟,杨建朝.水利旅游资源开发研究:以张河湾水库为例[J].安徽农业科学,2008,36(14):6013-6015.
- [2] 黄瑞,曹光宏,唐建维.西双版纳州曼兴村生态环境调查分析[J].环境科学导刊,2016,35(S1):27-29.
- [3] 河北省环境科学研究院生态文明研究所.张河湾抽水蓄能电站竣工环境保护验收调查报告[R].石家庄:河北省环境科学研究院,2017:72-88.
- [4] 景露阳.基于旅游开发的红安天台山景区生态环境调查与评价[D].武汉:湖北大学,2018:17-25.
- [5] 王福峰.锦凌水库生态环境现状调查与评价[J].黑龙江水利科技,2014,42(1):237-239.
- [6] 杨文斌,李亦秋,屠玉麟.赤水桫欏自然保护区生态环境调查与分析[J].林业资源管理,2011(5):94-100.
- [7] 马莹,董阳.陕西周至老县城自然保护区生态环境调查分析[J].资源节约与环保,2018(8):27-28.
- [8] 张宪洲.我国自然植被净第一性生产力的估算与分布[J].自然资源,1993(1):15-21.
- [9] 米乃瓦尔·木依提,牛建功.新疆阿卡尔河水生生态环境调查与评价[J].河北渔业,2019(3):31-34.
- [10] 刘超贤.基于 RS 与 GIS 技术的丹江口库区土地生态安全变化及影响因素研究[D].武汉:中国地质大学,2018:9-11.
- [11] 卞京军.白石水库生态环境问题及保护对策研究[J].水资源开发与管理,2017(11):40-43.

生长素 NAA 对愈伤组织的生长起主要作用。只有选用合适的激素及质量浓度,才能获得理想的结果。该研究中对丛生芽诱导和增殖培养效果影响最大的是 IBA,其次为 6-BA,尤其 6-BA 与 IBA 的浓度比接近 1 时效果最好,这可能因品种的基因型而有所差异。

耐盐彩叶杜梨作为一种新型的适合沿海滩涂利用的彩叶树种,具有极高的观赏价值和市场前景。该试验以彩叶杜梨茎尖为外植体,初步建立了茎尖组培快繁技术体系,在保证生根成活率的同时,大大缩短了育苗周期,为实现耐盐彩叶杜梨优质组培苗工厂化生产和规模化开发提供了参考。

参考文献

- [1] 张祺超,桂炳中,赵丽丽.华北地区盐碱地杜梨栽培[J].中国花卉园艺,2018(10):57.
- [2] 刘振廷,牛鹏斐,潘文明,等.杜梨砧木苗二次移植培育嫁接苗技术探讨[J].河北果树,2018(2):7-8.
- [3] 张盼飞.中条山 65 份杜梨资源遗传多样性分析及矮化特性评价[D].太谷:山西农业大学,2016.
- [4] 桂平.珍稀观赏树种红豆树组织培养技术研究[D].贵阳:贵州大学,2018.
- [5] 李艳霞,刘忠玲,刘建明,等.越橘品种‘Koralle’茎尖繁殖体系建立[J].东北林业大学学报,2018,46(3):37-39,44.
- [6] 范世杰,杨忠华,尹文龙,等.3 种越橘(桔)茎尖初代培养与增殖研究[J].林业科技,2018,43(3):5-9.
- [7] 杨丽萍.卓尼县马铃薯培养基制作与组织培养[J].农业科技与信息,2017(23):93-94.
- [8] 赵会芳,陈姣.不同培养基对勿忘我组织培养的影响[J].农技服务,2017,34(23):42,41.
- [9] 秦梅,张燕,徐美恩,等.甘薯茎尖脱毒及组培快繁技术[J].安徽农业科学,2014,42(32):11238-11239,11258.
- [10] 林静,李疆,田嘉,等.杜梨子叶离体再生体系的建立[J].中国农学通报,2015,31(19):41-47.