

枇杷不同外植体组织培养比较

郝红丽, 张春晓 (江苏省太湖常绿果树技术推广中心, 江苏苏州 215107)

摘要 [目的] 为缩短枇杷繁育周期及利用转基因技术培育枇杷新品种奠定基础。[方法] 以“冠玉”枇杷的种子、茎尖、幼嫩茎段为外植体进行无菌苗研究。[结果] 种子萌发率高, 可达 100%。茎尖在培养基 MS + 6-BA 1.2 mg/L + NAA 0.6 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L 上展叶最好。茎段在培养基 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L 上萌芽最好, 萌芽率达 68.9%, 其次为 MS + 6-BA 1.2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L。茎段在培养基 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L 上诱导不定芽最好, 其次为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + GA₃ 0.2 mg/L。初代无菌苗在培养基 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L 上增殖最好。[结论] 培养基成分的调配对外植体的萌发、增殖有很大影响, 尤其是激素浓度。

关键词 “冠玉”枇杷; 种子; 茎尖; 茎段

中图分类号 S603.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)08-03407-02

Tissue Culture Experiment on Different Loquat Explants

QIE Hong-li et al (Taihu Technical Expanding Center of Evergreen Fruit Trees in Jiangsu Province, Suzhou, Jiangsu 215107)

Abstract [Objective] The aim was to lay a foundation for shortening the crossing-breeding period of loquat and breeding new loquat cultivar by transgenic technology. [Method] With seeds, shoot-tips and tender stem-segments of Guanyu loquat as explants, the sterile seedlings were studied. [Result] The germination rate of seeds, which could be up to 100%, was high. The leaves from shoot-tips expanded best on the medium MS + 6-BA 1.2 mg/L + NAA 0.6 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L. The stem-segment germinated best on the medium MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L, its germination rate reached 68.9% and that was secondary on the medium MS + 6-BA 1.2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L. The effect of inducing adventitious bud from stem-segment was best on the medium MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L and that was secondary on the medium MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + GA₃ 0.2 mg/L. The proliferation effect of initial sterile seedlings was best on the medium MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L. [Conclusion] The allocation of medium components had very great influences on the germination and proliferation of explants, especially for hormone concn.

Key words Guanyu loquat; Seed; Shoot-tip; Stem-segment

“冠玉”枇杷是由江苏省太湖常绿果树技术推广中心选育的优良品种, 其果大、质优、丰产性好, 但常规的繁殖方法速度慢, 不利于“冠玉”品种的快速推广, 通过组织培养技术能快速繁殖^[1-2]。笔者在前人工作的基础上试找出一种适合“冠玉”枇杷快速繁殖的方法, 并通过种子培育无菌苗, 为缩短枇杷繁育周期及利用转基因技术培育新品种打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 试验材料取自江苏省太湖常绿果树技术推广中心枇杷园, 品种为“冠玉”枇杷, 6年生, 土壤有机质含量 2.1%, pH 值为 5~6, 管理水平良好, 于果实成熟时收集其种子, 于春季取“冠玉”枇杷饱满顶芽, 于夏季截取当年生 4~5 cm 长的嫩茎, 材料均随用随取。

1.2 方法 参照前人方法并改良处理外植体(包括种子)的方法, 将室外采取的材料带回实验室, 在流水下冲洗 60 min (茎段 2~3 h) 后带入无菌室, 在超净工作台上, 用无菌滤纸吸干水分, 然后用 75% 乙醇消毒 30 s (茎段 1 min), 无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1% 升汞 (茎段 0.2% 升汞) 消毒 12~15 min, 用无菌水冲洗 5~6 次, 种子剥除种皮, 芽剥除外部鳞片, 茎段切成 1~1.5 cm 带腋芽的茎段, 置于培养基中培养, 以 MS 为基本培养基, 附加琼脂 6 g/L, 蔗糖 30 g/L, pH 值调至 5.8, 添加不同种类和浓度的激素, 接种后的种子直接置于光照 (1 500 lx, 10~12 h) 中培养, 而芽与茎段先置于黑暗中培养, 待萌动后再置于光照 (1 500 lx, 10~12 h) 下培养, 培养温度在 (25 ± 1) °C, 湿度在 80%, 统计成活率。

基金项目 江苏省农业科技自主创新资金 (cx(08)138)。

作者简介 郝红丽 (1976-), 女, 江苏东海人, 农艺师, 从事园艺方面的研究。

收稿日期 2008-12-18

2 结果与分析

2.1 初代培养

2.1.1 种子萌发。 在无菌条件下, 接种后 6~10 d, 种子萌动, 发芽, 陆续成苗, 20 d 后苗高 2 cm, 45 d 后, 苗高 8~10 cm, 每株 6~8 片叶, 最大叶片长可达 5 cm, 宽 1.5 cm。种子萌发率高, 可达 100%, 甚至一颗种子能萌发 3~4 株幼苗, 并长出比较多的须根, 这与田间播种枇杷具有明显的优势, 既能降低成本又便于管理, 既能为外植体的诱导提供基础, 获得无菌苗, 又能加快杂交育种周期, 其在不同激素下表现差异不显著。

2.1.2 芽的诱导。 芽接种后, 黑暗培养, 7~8 d 后, 芽开始膨大萌动, 再经过 2 个星期培养, 芽长出 1~1.5 cm, 并长出新子叶后转入光照培养, 但有些芽不萌动, 内心枯死, 这可能是剥除鳞片时创伤过大造成的。培养基对萌芽有很大影响, 由表 1 可知, MS + 6-BA 1.2 mg/L + NAA 0.6 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L 培养基萌芽情况最好, 萌芽率达 68.9%, 萌芽时间较早, 其次为 MS + 6-BA 1.2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L 的培养基较好。激素对芽的影响很大, 6-BA 过高或过低不利于萌芽, 这与前人报道相似。

表 1 不同培养基对展芽的影响

培养基 Culture medium	浓度 Concentration // mg/L			接芽数 Number of inoculation	展芽数 Number of germination	展芽率 Germination rate %
	6-BA	NAA	GA ₃			
①	0.5	0.1	0.1	78	27	34.6
②	1.0	0.2	0	65	25	38.4
③	1.0	0.2	0.2	82	33	40.7
④	1.2	0.2	0.2	76	34	44.7
⑤	1.2	0.4	0.5	126	79	62.7
⑥	1.2	0.6	0.5	148	102	68.9
⑦	1.5	0.3	0.4	68	28	41.1

2.1.3 茎段不定芽的诱导。茎段不定芽的诱导很难,接种后有 2 种情况易发生,一种是灭菌很难彻底,极易发霉,另外一种容易褐变,通过延长流水冲洗时间、提高消毒液浓度和延长灭菌时间进行处理,效果并不理想,加入青霉素和及时转移培养基并在黑暗中培养,可缓解这一现象,待芽萌动后转入光照下培养,但时间较长,需要 40~50 d。不同激素配比对芽形成的效果不同,这与芽的萌动相似,NAA 和 6-BA 变化要相适应。由表 2 可知,茎段诱导不定芽以 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L 为最好,其次为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + GA₃ 0.2 mg/L。

表 2 不同培养基对茎段展芽的影响

Table 2 Effects of different culture medium on the germination

培养基 Culture medium	浓度 Concentration //mg/L			接芽数 ↑ Number of shoot	展芽数 ↑ Number of germination	展芽率 % Germination rate
	6-BA	NAA	GA ₃			
①	0.5	0.1	0.2	36	8	22.2
②	1.0	0.2	0.2	69	32	46.3
③	1.2	0.6	0.5	47	16	34.0
④	1.5	0.3	0.5	54	26	48.1
⑤	2.0	0.5	0.6	65	18	27.7

2.1.4 不同材料的最适配方对比。以不同材料的最适培养基、最佳的消毒方法、最适的培养条件为基础的试验结果如表 3 所示。

表 3 不同材料对展芽的影响

Table 3 Effects of the different stuff on germination

外植体 Explant	最适培养基//mg/L Optimum culture medium	萌动时间//d Days of bud	2片叶龄时间//d Days of two laminas	6片叶龄时间//d Days of six laminas	污染率//% Polluted rate	展(发)芽率//% Germination rate
种子 Seed	MS	2~3	15~21	30~42	0	100
茎尖 Shoot-tip	6号	8~10	35~45	70~90	7~12	68.9
茎段 Stem	4号	16~40	78~100	120~160	32~46	48.1

由表 3 可知,以种子、茎尖、茎段都能得到无菌苗,种子的污染率很低、萌动时间早、发芽率高,能够最早进入增殖培养阶段;而茎段的污染率较高、萌动慢、所需时间较长;以茎尖为培养材料,其污染较低、萌动时间也只需 8~10 d,达到 2 叶龄的时间为 5~6 周,时间适中,易于运用于实践。

2.2 增殖培养 选健壮的初代无菌苗接种至增殖培养基中培养,其增殖系数相似,但早期种子萌发的苗增殖快,其增殖系数较高,而芽和茎段诱导的无菌苗相对较少。由表 4 可知,在 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L 中增殖效果最好。6-BA 和 NAA 对增殖系数影响很大,随着 6-BA 和 NAA 浓度增加,其增殖系数加大,但玻璃化苗也逐渐增多。

表 4 不同培养基对增殖的影响

Table 4 Effects of the different culture medium on proliferation

培养基 Culture medium	浓度 Concentration //mg/L		接种苗数//个 Number of shoot	增殖系数//% Proliferation rate
	6-BA	NAA		
①	1.0	0.1	19	1.42
②	1.0	0.2	16	1.62
③	1.5	0.3	11	2.0
④	2.0	0.3	17	1.76

3 讨论

(1)“冠玉”枇杷是优良的鲜食品种^[3],由于常规繁殖材

料来源少、速度慢,影响了其在市场的大规模推广,而通过组织培养可有望解决这些问题。

(2)根据国内外的经验,采用不同外植体进行培养,种子培养速度快,但由于其变异性较大,不能保持母本优良的性状,只能作为理论研究;茎段诱导难度大,不易掌握,从试验中得到的无菌苗较少,且材料消耗大,人力消耗大,目前也不宜推广。因此,现有条件下通过芽的诱导是最切实可行的。

(3)芽诱导在前期采取科学的消毒方法,后期调节不同激素配比,找到合适的培养基是关键,其培养效果最好、萌芽率高、增殖较好,且相对易操作、途径简易、材料用量少,能得到品质优良、性状较稳定的大量枇杷幼苗,为果树生产带来一定的效益,唯一不足是采芽时间有阶段性。

(4)培养基成分的调对外植体的萌发、增殖影响很大,尤其是激素浓度的调节,试验处理量仍不够大,这些问题有待进一步研究。

参考文献

[1] 李春瑶,吴国团,唐莲英,等. 枇杷成年茎段离体培养及植株再生[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,1995,13(2):77-80.
 [2] 王志刚,宋卫平,顾福根,等. 良种白沙枇杷“冠玉”的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2000(4):338-339.
 [3] 徐春明,黄福山,蒋建华,等. 果大质优白沙枇杷新品种——冠玉[J]. 中国南方果树,2000(1):33-34.
 [4] 柳闽生,陈晔,徐常龙. 银杏叶有效成分的研究与资源的开发利用[J]. 江西林业科技,2006(2):28-31.
 [5] 庞启深,郭宝江,阮继红. 螺旋藻抗辐射多糖的提纯和分析[J]. 生物化学与生物物理学报,1989,2(5):445-449.
 [6] 周岩冰,于红,赵磊. 螺旋藻多糖对体外培养胃肠道癌细胞抑制作用[J]. 中华实验外科杂志,2004,21(5):537.
 [7] 于红,张学成. 螺旋藻多糖对Hela细胞生长的影响[J]. 中国海洋药物杂志,2003(1):26-29.
 [8] SZAHO M E, DROY-LEFAIX M T, DOLY M, et al. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1991,32(5):1471-1473.
 [9] 张凤,杨桂文,张金凤,等. 银杏叶类黄酮对人胃癌细胞 BGC823 体外的增殖抑制作用[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(21):2627-2629.

(上接第 3368 页)

成分按此比例搭配,可以使复合制剂中的甙、羟基、酚羟基和糖苷键等活性基团相互促进产生最大的协同增效作用,但其详细机理还有待进一步研究证实。

参考文献

[1] 刘宇峰,张成武,沈海雁,等. 极大螺旋藻胞内多糖对人癌细胞的影响[J]. 中草药,1999,30(2):115-119.
 [2] 徐年军,范晓,韩丽君. 藻类抗肿瘤活性物质的研究[J]. 中国海洋药物,2000,19(6):30-36.
 [3] 于红,张学成. 螺旋藻多糖抗肿瘤作用的实验研究[J]. 高技术通讯,2003(7):83-86.