

6-BA、NAA 植物激素对富民枳组织培养的影响*

杨曼¹, 张敏²

(1. 文山州林业局林业调查规划设计队, 云南 文山 663000; 2. 文山农业学校, 云南 文山 663000)

摘要: 对富民枳 *Poncirus polyandra* 茎段分别采用 MS + 不同浓度的 6-BA 和 NAA 植物激素进行分化培养, 结果表明, MS 培养基 6-BA 浓度为 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA 浓度为 $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时富民枳茎段生长、分化、愈伤情况最佳。

关键词: 富民枳; 6-BA; NAA; 组织培养

中图分类号: S66-33; Q949.752.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3168 (2007) 06-0149-03

Influence of 6-BA and NAA upon Tissue Culture of *Poncirus polyandra*

YANG Man¹, ZHANG Min²

(1. Team of Forest Inventory and Planning, Forestry Bureau of Wenshan Prefecture, Wenshan 663000 Yunnan;

2. Wenshan Agricultural Technique School, Wenshan 663000 Yunnan, China)

Abstract: MS + different densities of 6-BA and NAA plant hormone respectively were adopted to culture stem parts of *Poncirus polyandra*. The result indicated that $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ density of 6-BA and $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ density of NAA were optimum to stem parts' growth, differentiation and coalescence of *Poncirus polyandra*.

Key words: *Poncirus polyandra*; 6-BA; NAA; tissue culture

富民枳 (*Poncirus polyandra* S. Q. Ding et al), 芸香科枳属, 是 1984 年丁素琴等在云南省富民县发现的一个新种^[1]。

柑桔优良品种繁多, 其果实风味怡人, 营养价值高。近几年来云南省从四川、湖南等引进了大量的柑桔优良品种苗木, 其中大多未经嫁接的苗木常常因携带病虫、水土不服以及繁殖周期较长等原因对以后的柑桔品质、产量等造成不良影响。而组织培养可以在短期内快速繁殖大量的脱毒苗木。

本试验以富民枳的茎段为试材, 研究不同浓度的 6-BA 和 NAA 植物激素对外植体的芽和愈伤组织的分化、形成的影响, 以期为富民枳的快速繁殖和种质资源的保存提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

制备外植体的材料为秋初采集生长健壮的一年生春梢上带有顶芽的茎尖和带有侧芽的茎段。

1.2 方 法

1.2.1 培养基配方^[2]

A 组是在 MS 和 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 中加入不同浓度的 6-BA 进行处理, 各处理如下:

A1 MS + $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

A2 MS + $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

A3 MS + $1.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

A4 MS + $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

A5 MS + $2.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

B 组是在 MS 和 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 中加入不同浓度的 NAA 进行处理, 各处理如下:

B1 MS + $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.01\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

B2 MS + $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.04\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

B3 MS + $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.16\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

B4 MS + $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.64\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

B5 MS + $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA

1.2.2 培养条件^[3]

温度条件为: 白天恒温 26°C , 晚上为恒温 16°C 。

* 收稿日期: 2007-05-22

作者简介: 杨曼 (1979 -), 女, 云南砚山人, 助理工程师, 从事林业调查规划设计工作。

光照条件为：白天 14h，光照 3 000Lux，采用 22h 制。

1.2.3 培养方法

在春季发梢时剪取富民枳新梢，用自来水冲洗，去叶整理，用浓洗衣粉水仔细刷洗，切成 2~3cm 长的茎段。用无菌水冲洗 3 次，置于 75% 酒精中浸泡处理 30s，移入 0.5% HgCL 溶液中振荡消毒 8min^[4]，取出后用无菌水冲洗 3 次，用无菌滤纸吸干材料表面的水分。然后，接种于 A1、A2、A3、A4、A5 和 B1、B2、B3、B3、B4、B5 中，重复 4 次，每次重复为 5 个茎段。每隔 3d 观察一次各小组的分化情况。当分别从 A、B 组中获得较佳的 6-BA 和 NAA 的浓度时，将其组合成另一配方进行外植体转接，每隔 3d 观察一次其分化情况。

1.2.4 主要观测记载项目

萌芽开始日；发芽率；芽成枝率（成枝芽所占发芽总数中的百分率）；愈伤日（愈伤组织开始出现日）；愈伤率；死亡率。

2 结果与分析

2.1 6-BA 对外植体的影响

2.1.1 6-BA 对萌芽的影响

表 1 6-BA 对富民枳茎段生长的影响

处理	发芽日 月—日	平均发芽率%	成枝率%	死亡率%
A1	04-23	60	55	15
A2	04-23	70	80	0
A3	04-23	80	48.8	10
A4	04-23	75	59.1	10
A5	04-23	80	42.3	5

从表 1 可看出，富民枳茎段在 A 组 5 个配方中的发芽开始日都是 4 月 23 日外，其余各值均不同。

表 2 6-BA 对富民枳茎段发芽率的影响 %

处理	A1	A2	A3	A4	A5
重复 1	80	80	100	100	100
重复 2	80	60	40	600	60
重复 3	60	100	100	80	100
重复 4	20	40	80	60	60
各处理平均数	60	70	80	75	80
0.05% 显著水平	a	a	a	a	a
0.01% 显著水平	A	A	A	A	A

从发芽率分析（新复极差法测验^[4]）得，各浓度对发芽率无明显差异，见表 1 和表 2。

2.1.2 6-BA 对芽成枝的影响

从表 1 和表 3 中看到富民枳茎段在各浓度组中的成枝情况：A1 的重复中只有 2 个重复有成枝的情况。

表 3 6-BA 对外植体成材枝率的作用 %

处理	A1	A2	A3	A4	A5
重复 1	57.1	66.7	41.2	83.3	83.3
重复 2	77.8	80	75	42.8	0
重复 3	0	83.3	25	80	33.3
重复 4	0	100	80	25	50
\bar{x}	33.7	82.5	55.3	57.8	41.7
SS	4 763.7	562.8	2 115.08	2 212.8	3 442.3
Se ²	887.8	446.3	462.6	333.8	
S $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	21.07	14.90	15.20	18.30	
t	2.31	61.825	1.625	2.229	

这表明 A1 的 6-BA 浓度 ($0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 A5 的 6-BA 浓度 ($2.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对外植体成枝（茎段生长）的促进作用不明显，其中 2 个重复出现成枝现象可归咎于其它偶然随机因素影响；A2 中 4 个重复均有成枝情况，而且各重复均有高于 66% 的成枝率，最高成枝率达 100%，A2 中的成枝率平均值明显大于其它 4 个浓度组；A3、A4 中虽然每个重复均有成枝现象，但整齐性差：有较高的成枝率（80%，83.3%），又有极低的成枝率（25%）。出现这种高低不均衡现象的原因可能是有茎段上的芽在采前就已完成分化成熟，从而有此表现。因此，就其低成枝率来看不太适宜作培养基的配方。

进行 t 测验时当 $\alpha = 0.10$ 时用 A2 与其它组进行比较，发现 $|t|$ 均大于 $t_{0.1} = 1.440$ （表 3）。得出 A2 的成枝率明显高于其它组的成枝率，表明 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 对茎叶生长的促进作用是明显的。

2.1.3 6-BA 对富民枳茎段死亡的影响

在表 1 和表 4 中，试验只有 A2 浓度中各重复均无死亡情况，而在 A1、A3、A4、A5 均有 2 个重复出现不同程度的死亡情况。试验表明 A2 的浓度较优于其它 4 个浓度。

表 4 6-BA 各浓度的死亡情况 %

A1	A2	A3	A4	A5
0	0	0	0	0
0	0	20	20	20
20	0	0	0	0
40	0	20	20	0

2.2 NAA 浓度对外植体的影响

2.2.1 NAA 浓度对外植体发芽开始日的影响

从表 5 来看，B2、B5 的发芽初始日均晚于其它 3 个浓度的发芽初始日，这表明在 NAA 为 $0.04\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \sim 0.64\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时对富民枳茎段的芽的分化有一定的促进作用。

表5 NAA 对富民枳茎段生长的影响

处理	发芽日	发芽率	成枝率	愈伤日	愈伤率	死亡率
	月一日	%	%	月一日	%	%
B1	03-30	50	20	04-26	5	40
B2	03-27	50	20	04-23	10	25
B3	03-27	65	20	05-5	35	10
B4	03-27	46.7	20	05-5	53.3	6
B5	03-30	53.3	33.3	04-23	86.7	20

2.2.2 NAA 浓度对外植体发芽率的影响

在对各浓度的发芽率的比较中,发现 B3 的发芽率最高为 65%, B5 的发芽率次之为 53.3%, B1、B2 均为 50%, B4 发芽率最低为 46.7% (表 5)。说明 B3 的浓度 ($0.16\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对芽的发生具有一定的促进作用, B5 的浓度次之。

2.2.3 NAA 浓度对外植体成效率的影响

从表 5 可以看到 B1、B2、B3、B4 的成效率均为 20%, 在现象观察中以上 4 个浓度都有顶端“自剪”现象和新枝细小较弱的情况, 这说明 NAA 在 $0.01 \sim 0.64\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对富民枳茎段的生长不理想。当 NAA 为 $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 在试验中茎段成枝率比其它各浓度高出 13.3 个百分点, 而且新生枝生长比较正常, 细弱校极少。表明 NAA 为 $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对富民枳外植体的茎段生长的促进作用强于 $0.01 \sim 0.64\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度。

2.2.4 NAA 对外植体产生愈伤组织的影响

从表 5 来看, 各浓度组出现愈伤组织时间以 B2 与 B5 为最早 (4 月 23 日), B1 出现愈伤组织为 4 月 26 日, 其它两个浓度出现愈伤组织为 5 月 5 日。从愈伤率来看, B5 的愈伤率高达 86.7%, 为 5 个浓度之最, 而且明显高于第二高愈伤率 (53.3%)。从愈伤组织个体大小来看, B1 的愈伤组织的平均直径为 0.55cm; B2 的愈伤组织的平均直径为 0.65cm; B3、B4 愈伤组织的平均直径分别为 0.45cm、0.40cm; B5 的愈伤组织的平均直径为 0.95cm (原接种时茎段直径为 0.2~0.3cm), 而且愈伤组织表面上圆球状的胚状体多而且明显。这表明当浓度为 $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 NAA 对富民枳茎段伤口细胞恢复分裂能力、形成愈伤组织的诱导作用更强, 更适于作为配合一定量细胞分裂素共同诱导芽及胚状体的分化产生的配方。

2.3 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 与 $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 对外植体的影响

经过 16d 的培养与观察, 转接入 $\text{MS} + 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 培养基中的外植体有以下现象与结果: 外植体的死亡率仅为 5%;

芽分莫数多, 平均每芽的分枝数为 2.6 枝, 最多为 7 枝小枝, 最少为 1 枝, 枝条健壮、叶片完整嫩绿, 小枝上有较多的新芽而且饱满; 愈伤组织虽然在数量上没有变化, 但大部分外植体植入培养基的末端伤口有钝化、木质部消失、皮层细胞增多变厚的现象, 表明伤口细胞正处于伸长生长和分裂阶段。因此, $\text{MS} + 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的培养基较适于富民枳茎段的生长。

3 讨论与小结

(1) 虽然试验时间有些短 (9 月 11 日~5 月 5 日), 但是从成效率、死亡率来分析, $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的成枝速度、茎段的生长速度快于其它浓度, 而且无死亡情况。试验证明 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的生长条件优于其它 4 个浓度。

(2) 经过近 8 个月的试验, 从各项指标的数值来分析, $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 在 5 个浓度中应为培养基中 NAA 浓度的首选。

(3) 转接后外植体的生长情况表明富民枳茎段作外植体进行组织培养时, MS 与 6-BA 及 NAA 的配比应为 $\text{MS} + 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $2.56\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, 其外植体的生长、分化、愈伤能力表现较好。

(4) 本试验较为恰当地研究了 5 组浓度, 并从中选出最适浓度, 但仍有不足之处。在各激素浓度选择上变化过大, 而且范围过窄, 不能排除在选择的范围之内或之外存在更适宜的激素浓度, 试验时间较短, 因而有仓猝下结论之嫌; 试验没有做到生根成苗, 导致这种原因有两个: 一是时间短; 二是培养基中的激素种类少或者缺少其它物质 (如: 活性炭)。笔者认为在组培富民枳茎段试验时, 激素浓度变化要多而细, 范围要广, 时间要长, 培养基中的附加物质要充分。

参考文献:

- [1] 丁素琴, 张显努, 暴卓然. 中国枳属一新种[J]. 云南植物研究, 1984, 6(3): 292~293.
- [2] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991. 75, 61~66.
- [3] 章文才. 果树研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1979. 171.
- [4] 沈德绪. 柑桔遗传育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 301.
- [5] 南京农业大学. 田间试验和统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1978. 96~100.