

凯特杏愈伤组织的诱导

田毅 王艳 赵宇瑛

(长江大学园艺园林学院,湖北襄樊 434025)

摘要 以凯特杏带腋芽茎段为材料,MS为基本培养基,进行了凯特杏愈伤组织诱导研究。结果表明:在凯特杏愈伤组织培养中,采用0.1%升汞溶液对凯特杏带腋芽茎段消毒5min,以MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 1.5mg/L为培养基,培养基pH值为6.0,愈伤组织生长良好,增殖快,出愈率达到93.10%。

关键词 凯特杏;组织培养;愈伤组织;激素

凯特杏为蔷薇科李属多年生木本植物,是从美国加州引进的新品种杏树,是一种丰产性强、经济效益好、食用性极佳的果树^[1-2]。目前杏的繁殖主要以嫁接为主,而杏的嫁接繁殖速度慢,且嫁接苗生长不整齐,难以满足规模化、商品化生产和发展的需要。采用愈伤组织诱导进行快速繁殖,可快速提供生产用的生长健壮、不带病的苗木,加快凯特杏的推广速度。本试验通过对凯特杏愈伤组织的诱导培养,以期获得较好的愈伤组织诱导方案,为今后进行细胞悬浮培养、快繁体系的建立、通过生物技术改良品种及实现试管工厂化育苗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于2005年5月至2006年4月进行,凯特杏(*Prunus armeniaca* L.)取自长江大学西校区种质资源圃内,取其一年生枝的幼嫩带腋芽茎段为材料。采用MS为基本培养基,每升培养基中加蔗糖30g,琼脂粉7g,每250mL玻璃瓶内装培养基40mL,用封口膜封口,灭菌压力为98kPa、121.3℃,灭菌时间20min,灭菌后取出玻璃瓶,让其中的培养基自然冷却凝固,放置1~2d后再使用。

1.2 方法

取凯特杏一年生枝的幼嫩带腋芽茎段,去除叶片,用洗衣粉水刷洗,而后用自来水流水冲洗30min以上,在无菌超净工作台上剪成约1~2cm长的茎段,每段带1个腋芽,经不同消毒剂消毒后将其接种于灭菌后不同pH值、不同种类及浓度的植物激素的MS培养基中进行比较培养,在培养过程中温度保持25±1℃,光照10h,光照强度1500~2000lx,培养室相对湿度为78%左右。

1.2.1 不同消毒剂与消毒时间对凯特杏带腋芽茎段生长的影响。实验中,选择MS+6-BA 1.0mg/L+IAA 0.5mg/L,pH值6.0^[3],外植体为凯特杏带腋芽茎段。采用2种消毒剂:①0.1%升汞溶液,设4个处理消毒2min、5min、8min、10min,接种培养基瓶数分别为30个、30个、30个、29个;每瓶接种1个茎段。②10%安替福民溶液,设4个处理即消毒2min、5min、8min、10min,接种培养基瓶数分别为30、30、29、30;每瓶接种1个茎段。

1.2.2 培养基pH值对凯特杏愈伤组织诱导的影响。以凯特杏带腋芽茎段经组织培养诱导出的无菌叶为外植体,接种

在MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 1.0mg/L的诱导培养基上,在其他培养条件相同的情况下,设6个处理,即诱导培养基的pH值分别为5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6,接种培养基瓶数分别为19个、20个、19个、20个、20个、20个,每瓶接3个。

1.2.3 不同浓度NAA或IAA对凯特杏愈伤组织诱导的影响。在超净工作台上将凯特杏带腋芽茎段经组织培养所得的无菌叶切成0.5cm×0.5cm的小块,分别接种于pH值为6.0、6-BA 1.0mg/L的附加不同浓度NAA或IAA的MS培养基上^[4],实验方案如下:

培养基附加不同浓度NAA,设7个处理,即NAA的浓度为0mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L、1.5mg/L、2.0mg/L、2.5mg/L、3.0mg/L,接种培养基瓶数分别为19个、20个、19个、20个、20个、20个、19个,每瓶接3块。

培养基附加不同浓度IAA,设7个处理,即IAA的浓度为0mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L、1.5mg/L、2.0mg/L、2.5mg/L、3.0mg/L,接种培养基瓶数分别为19个、20个、20个、19个、20个、19个、19个,每瓶接3块。

1.2.4 数据计算处理

污染率(%)=(污染外植体数/接种外植体数)×100%;

死亡率(%)=(死亡外植体数/接种外植体数)×100%;

出愈率(%)=(形成愈伤组织外植体数/接种外植体数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂与消毒时间对凯特杏带腋芽茎段生长的影响

实验中,选择MS+6-BA 1.0mg/L+IAA 0.5mg/L,pH值6.0,外植体为凯特杏带腋芽茎段,在70%的乙醇溶液中消毒10s。分别在10%安替福民溶液和0.1%的升汞溶液中消毒2min、5min、8min、10min,取出后用无菌水冲洗3~4次后接种。

结果为接种后第2周统计(见表1、见表2)。接种2周后观察发现:

以0.1%升汞溶液消毒2min时,外植体污染严重,污染率达到了56.66%,但对外植体的毒害很小,死亡率为0;而以0.1%升汞溶液消毒5min时,污染率仅为6.66%,死亡率为0,对外植体的毒害也很小;当将0.1%升汞溶液的消毒时间延长到8min时,污染率为3.33%,但同时因0.1%升汞溶液对外植体毒害作用的增强,致使外植体的死亡率显著提高到40%;随着消毒时间继续延长到10min,污染率由3.33%下降至0,但同时0.1%升汞溶液对外植体毒害作用也增强,

基金项目 长江大学校基金资助项目。

致使外植体的死亡率从40%上升到了65.51%。

以10%安替福民溶液消毒2min时,外植体污染严重,污染率达到了70%,但对外植体的毒害很小,死亡率为0;而以10%安替福民溶液消毒5min时,污染率下降到53.33%,死亡率为0,对外植体的毒害也很小;当将10%安替福民溶液的消毒时间延长到8min时,污染率下降到34.48%,但同时又因10%安替福民溶液对外植体毒害作用的增强,致使外植体的死亡率显著提高,由0上升到31.03%;随着消毒时间继续延长到10min,污染率由34.48%下降至10%,但同时10%安替福民溶液对外植体毒害作用也增强,致使外植体的死亡率从31.03%上升到了46.66%。

比较了2种消毒剂的消毒效果,综合考虑几种因素,认为0.1%的升汞溶液是一种较好的消毒剂,消毒5min为较理想的消毒处理时间。消毒处理后,在培养过程中污染率只有6.66%,且死亡率为0,生长状态良好。这与杏品种“龙王帽”的组织培养研究结果是一致的^[5-7]。

表1 0.1%的升汞溶液消毒对凯特杏带腋芽茎段生长的影响

编号	消毒时间//min 0.1%升汞	接种数 瓶	污染数 瓶	死亡数 瓶	污染率 %	死亡率 %
1	2	30	17	0	56.00	0.00
2	5	30	2	0	6.66	0.00
3	8	30	1	12	3.33	40.00
4	10	29	0	19	0.00	65.51

表2 10%安替福民溶液消毒对凯特杏带腋芽茎段生长的影响

编号	消毒时间//min 0.1%升汞	接种数 瓶	污染数 瓶	死亡数 瓶	污染率 %	死亡率 %
1	2	30	21	0	70.00	0.00
2	5	30	16	0	53.33	0.00
3	8	29	10	9	34.48	31.03
4	10	30	3	14	10.00	46.66

2.2 不同pH值对凯特杏愈伤组织诱导的影响

在实验中,以凯特杏带腋芽茎段经组织培养诱导出的无菌叶为外植体,研究MS培养基的不同pH值,即pH值分别为5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6对凯特杏愈伤组织诱导的影响。结果为接种后30d统计(见表3)。观察发现:pH值为5.6时,培养基不凝固,不能正常诱导愈伤组织,出愈率为0;pH值5.8时,培养基凝固不良,出愈率仅为41.07%,且诱导出的愈伤组织体积小、增殖慢;当pH值6.0时,培养基凝固良好,出愈率达到83.33%,且诱导出的愈伤组织体积大、增殖快;而当pH值继续增大时,培养基逐渐变硬,不利于愈伤组织的诱导,出愈率逐渐下降。

结果表明:培养基的pH值偏高或偏低都不利于凯特杏愈伤组织的生长,培养基的pH值一般在6.0~6.6之间愈伤组织都能够生长;但pH值为6.0时凯特杏愈伤组织的出愈率最高,生长状况最好,生长速度最快。因此,培养基pH值为6.0较适宜凯特杏愈伤组织的诱导。

2.3 不同浓度NAA或IAA对凯特杏愈伤组织诱导的影响

以凯特杏带腋芽茎段经组织培养诱导出的无菌叶片为外植体,采用MS培养基并设pH值6.0,6-BA 1.0mg/L。在其他培养条件相同的情况下,比较NAA和IAA两种植物激素对凯特杏愈伤组织诱导的效果,并从中筛选出最适宜凯

表3 不同pH值对凯特杏愈伤组织诱导的影响

编号	pH	接种外植体数	出愈数	培养基状况	出愈率//%
1	5.6	53	0	不凝固	0
2	5.8	56	23	凝固不良	41.07
3	6.0	34	45	凝固良好	83.33
4	6.2	58	41	凝固较硬	70.68
5	6.4	57	28	凝固很硬	49.12
6	6.6	59	18	凝固很硬	30.50

注:接种外植体数不包括污染的外植体数。

特杏愈伤组织诱导的激素种类和浓度。结果为接种后30d统计(见表4、表5)。观察发现:

不同浓度的NAA对愈伤组织诱导的影响存在明显的差异,NAA 1.5mg/L时,愈伤组织呈黄绿色,增殖快,生长良好,出愈率为93.10%,比其他的处理明显要高;当NAA的浓度高于1.5mg/L,随着NAA浓度的增加,出愈率逐渐减小,且愈伤组织增殖速度变慢,易褐化,不利于以后的继代培养;当NAA的浓度低于1.5mg/L,随着NAA浓度的减小,出愈率也逐渐减小,且愈伤组织增殖速度逐渐变慢;而无激素的对照组无愈伤组织产生。

不同浓度的IAA对愈伤组织诱导的影响也存在明显的差异,IAA 1.0mg/L时,愈伤组织出愈率为60.71%,但增殖较慢;当IAA的浓度高于1.0mg/L,随着IAA浓度的增加,出愈率逐渐减小,愈伤组织生长状况不好,呈黄褐色,且叶片褐化严重;当IAA的浓度达到2.5mg/L时,叶片在几天内迅速褐化,没有愈伤组织产生;当IAA的浓度为0.5mg/L时,出愈率仅为18.33%,且愈伤组织增殖速度很慢,体积很小,但叶片保持嫩绿色;而无激素的对照组无愈伤组织产生。

结果表明,植物激素在愈伤组织诱导过程中起着决定性作用,比较NAA和IAA两种植物激素对凯特杏愈伤组织诱导的效果,NAA的诱导效果明显好于IAA,其中NAA 1.5mg/L的诱导效果最好,出愈率最高,形成的愈伤组织性状好,增殖快。

表4 不同浓度NAA对凯特杏愈伤组织诱导的影响

编号	NAA mg/L	接种外植 体数//个	出愈数 个	愈伤组织生长状况	出愈率 %
0	0	57	0	无	0
1	0.5	60	43	增殖较慢	71.66
2	1.0	56	46	增殖较快	82.14
3	1.5	58	54	增殖快,生长良好	93.10
4	2.0	58	51	增殖较快,生长良好	87.93
5	2.5	55	44	增殖较快,但易褐化	80.00
6	3.0	57	43	增殖较快,但易褐化	75.43

注:接种外植体数不包括污染的外植体数。

表5 不同浓度IAA对凯特杏愈伤组织诱导的影响

编号	IAA mg/L	接种外植 体数//个	出愈数 个	愈伤组织生长状况	出愈率 %
0	0	57	0	无	0
1	0.5	60	11	体积很小,增殖很慢	18.33
2	1.0	56	34	增殖较慢	60.71
3	1.5	52	21	增殖较慢,呈黄褐色	37.50
4	2.0	58	6	增殖较慢,呈黄褐色	10.34
5	2.5	55	0	叶片迅速褐化	0
6	3.0	57	0	叶片迅速褐化	0

注:接种外植体数不包括污染的外植体数。

3 结论与讨论

(下转第13页)

表2 不同土壤管理方法与土壤化学性状的关系

处理	有机质/%	全氮/%	速效氮/mg/kg	速效磷 10^{-6}	速效钾 10^{-6}
1	1.399cC	0.080cC	72.0aA	72.5abAB	123cC
2	1.765aA	0.121aA	71.5aA	74.0aA	248aA
3	1.536bB	0.088bB	73.0aA	69.5bcAB	234bB
4	1.153dD	0.075cC	43.5bB	68.0cB	102dD

量较对照有所增加,但增加幅度不高,仅处理2与对照的差异达显著水平,这与其土壤理化性状改善有显著关系。而生草法和绿肥法与对照差异不明显,可能是由于杂草和绿肥作物与果树争肥水所致。冠幅的生长量各处理均较对照明显增加,不同的土壤管理方法对金柑冠幅影响较大,与对照差异达到极显著水平,这除了与肥水有关外,可能还与光照的分布有关。树干干周也较对照有所增加,与对照的差异达显著水平。这与树高的变化相近。

表3 不同土壤管理方法对金柑树冠生长的影响

处理	树高/cm	冠幅/cm	干周/cm
1	66bB	62bB	1.8bB
2	73aA	71aA	2.2aA
3	65bB	58cC	1.7bcB
4	62bB	52dD	1.6cB

2.4 对金柑产量和品质的影响

表4表明,不同的土壤管理方法的金柑产量与对照有明显的增加,处理2和处理1与对照的差异达极显著水平,这可能与土壤含钾量较高有关,且土壤保水供肥力较强,从而有利于果实的增大。不同的土壤管理方法对金柑的单果重较对照有所增加,各处理与对照的差异达极显著水平,可溶性固形物上,几个处理较对照有明显的增加,这可能与土壤的

表4 不同土壤管理方法对金柑产量和品质的影响

处理	产量/kg/株	单果重/g	可食率/%	可溶性固形物/%
1	3.4aA	19.8aA	93.6	14.3aA
2	3.4aA	19.7aA	93.8	14.2abAB
3	3.1bAB	18.0bB	93.4	14.0bcAB
4	3.0bB	16.8cC	93.6	13.9cB

含钾量较高有关。可食率,几个处理与对照的差异均不显著。

3 结论与讨论

(1)果园的不同土壤管理方法对果园土壤的理化性状有不同的影响。试验结果表明,在改良土壤理化性状方面,各处理均比对照优越,以覆盖法最佳;其次为生草法、绿肥法。土壤化学性状的改善,改善了土壤的肥水气热状况,为金柑的生长创造了良好的土壤条件,从而促进了金柑树冠的扩展和产量的提高。以覆盖法最佳,其次为绿肥法。

(2)由于果园一般位于山上,交通不便,稻草上山需耗费大量的人力和财力。因此,虽然覆盖法可提高果品的质量和产量,但其原料和生产成本都较高。因此,作为果园土壤管理最佳方案仍为绿肥法。它不仅可减少水土流失,还可提高果品的质量和产量;同时,它的投入少产出大,大大提高了果园的经济效益,改善了果园的生态环境。(收稿日期:2006-07-10)

4 参考文献

- [1] 刘星辉.金柑[M].北京:中国林业出版社,1991.
- [2] 陈映琦.金柑的栽培[M].南京:江苏科学技术出版社,1988.
- [3] 中国科学院南京土壤研究所.土壤理化分析[M].上海:上海科学技术出版社,1978.
- [4] 贾乃光.数理统计[M].北京:中国林业出版社,1997.

(上接第11页)

3.1 结论

试验结果表明,凯特杏愈伤组织培养中,0.1%升汞溶液对外植体消毒5min效果最好,培养基最适pH值为6.0,诱导愈伤组织培养基为MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 1.5mg/L,愈伤组织生长良好,增殖快,出愈率达到93.10%。

3.2 讨论

在凯特杏愈伤组织培养中,菌类污染是阻碍其成功的关键问题。它通常是由于培养器皿、培养基、培养材料、操作器械等消毒不彻底、操作不谨慎、接种环境和培养环境不清洁等因素引起的。而主要的因素是培养材料的消毒,消毒时间短,污染率则高;消毒时间过长,易杀死外植体。本试验只研究了0.1%升汞溶液和10%安替福民溶液两种消毒剂对外植体的消毒效果,而其他种类的消毒剂对外植体消毒的效果还有待进一步的试验研究。

试验结果表明,凯特杏愈伤组织诱导培养基最适pH值为6.0,但目前关于培养基pH值对培养物影响的机制尚不清楚,一般认为培养基pH值影响培养物细胞质膜透性、细胞呼吸代谢、多胺代谢和蛋白质合成以及生长调节物质进出细胞及其在胞内的存在方式。因此间接影响培养物生长、分化和物质积累。

植物激素对愈伤组织诱导有非常重要的影响。试验结

果表明,不添加植物激素的外植体未见愈伤组织形成;NAA比IAA更适合凯特杏愈伤组织的诱导,这与对许多木本植物愈伤组织诱导的研究结果相同^[10],而添加不同浓度的NAA,诱导结果也存在显著的差异。本试验仅比较了NAA和IAA两种植物激素对凯特杏愈伤组织诱导的效果,很有必要继续深入探讨其他种类的植物激素对凯特杏愈伤组织生长的影响。(收稿日期:2006-06-28)

4 参考文献

- [1] 徐永芳,王进成.凯特杏[J].中国农村科技,2000(2):25.
- [2] 赵玲.杏优良新品种:凯特杏[J].农村新技术,2001(2):31.
- [3] 赵淑清,郭剑波,常留印.特早熟杏的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2001(2):20.
- [4] 马锋旺,李嘉瑞.山杏原生质体培养再生植株[J].园艺学报,1998,25(3):24.
- [5] 孙清荣,孙洪雁.仁用杏的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2003(6):65.
- [6] 孙清荣,孙洪雁,刘鹏,等.杏品种龙王帽茎尖培养试验[J].中国果树,2005(1):14.
- [7] 马锋旺,张军科,李嘉瑞.杏离体繁殖的研究[J].西北农业大学学报,1999,27(4):12.
- [8] 李孟玲,李嘉瑞,马锋旺.杏的茎尖培养研究[J].干旱地区农业研究,1998,15(1).
- [9] 李梦玲,李嘉瑞,陶正平,等.杏叶片离体繁殖研究[J].中国农学通报,2001(2):22.
- [10] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986:265-278.