

文章编号:1007-4961(2007)03-0309-05

取材时期和 BA 浓度对磨盘柿初代组培建立的影响

宋春丽¹, 马俊莲², 刘月英³, 周平平¹, 徐立强²

(1 河北农业大学 中兽医学院, 河北 定州 073000; 2 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001;

3 河北经贸大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050061)

摘要:以磨盘柿休眠芽、萌动芽或梢尖为外植体,研究了取材时期和 BA 浓度对磨盘柿初代组培建立的影响。结果表明,1~3月上旬、9~12月休眠芽外植体萌芽率达80%以上,且增殖能力强,为取材最佳时期,4、5月份梢尖褐变死亡率达80%以上,不宜建立初代培养;BA5.0 mg/L适于磨盘柿初代组培建立;培养基中附加500 mg/L的聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40)可有效防止休眠芽外植体褐变。

关键词:柿;离体快繁;取材时期;褐变

中图分类号:S 665.2

文献标识码:A

The effect of sampling time and concentration of BA on culture establishment of *Mopan persimmon*

SONG Chun-li¹, MA Jun-lian², LIU Yue-ying³, ZHOU Ping-ping¹, XU Li-qiang²

(1 College of Chinese Veterinary, Agricultural University of Hebei, Dingzhou 073000, China;

2 College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

3 College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: The effect of culture establishment with buds or young shoots taken at different time was compared. Of test tube plantlets the effect of different concentration of BA were discussed. The main results were as follows: 1. Necrosis of actively growing shoots tips was over 80%, which limited the culture establishment. Compared with shooting tips, buds taken in January to March or September to December were the much better explants, of which more than 80% survived and started growing in the first generation. 2. The culture of *Mopan persimmon* could be established in medium with BA5.0~7.5 mg/L. 3. PVP-40 500 mg/L could prevent dormant bud from browning in the process of tissue culture.

Key words: persimmon; in vitro propagation; sampling time of explant; browning

柿(*Diospyros kaki* L. f.)原产我国亚热带森林,是我国北方重要的经济树种。磨盘柿是河北省的主栽品种,营养丰富并具有药用价值,深受消费者的欢迎。但柿果采后极易软化,贮运性能差,严重影响了它的经济收益。转基因技术将有望从根本上抑制果实的采后软化,组培快繁技术的研究是利用生物技术获得抗软化柿果的研究中不可缺少的一部分。关于柿树快繁国内外已有不少报道^[1-3],但一直没有

在生产上广泛应用。原因是柿树含酚类物质较多,在离体繁殖过程中,外植体极易褐变死亡,由于品种和取材季节不同,重复前人试验建立初代培养物十分困难,限制了利用生物技术改良柿果贮运性能的研究进程。柿组织培养中普遍使用的激素是玉米素(ZT),但 ZT 价格偏高,与之相比,BA 廉价易得,可是有研究报道,多数柿树品种在含有 BA 的培养基中不能生长^[3,4]。本研究选择了河北省的优质主栽品

收稿日期:2006-12-02;修改稿收期:2007-01-20

基金项目:河北省科技厅项目(303196)。

作者简介:宋春丽(1975-),女,河北沧县人,讲师,在读博士生,从事果蔬生物技术研究。

通讯作者:马俊莲(1964-),女,山西太原人,博士,教授,从事果蔬生物技术研究。

种磨盘柿为材料,研究取材时期和 BA 浓度对磨盘柿初代组培建立的影响,为柿组培体系建立提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材取自河北保定曲阳县大西旺村柿园,供试品种为磨盘柿,树龄约 30 a。

1.2 试验方法

1.2.1 取材方法 从 2005 年 2 月至 2006 年 1 月,每月取材 1 次,其中 2005 年 3 月份取材 2 次,上旬、下旬各取材 1 次。3 月上旬取即将萌动的休眠芽,3 月下旬取萌动芽。4、5 月份为生长中的梢尖,6~9 月取鳞片包裹的腋芽,其余月份为休眠芽。各时期的外植体分别在含 BA 2.5 mg/L、5.0 mg/L、7.5 mg/L 和 10 mg/L 的改良 MS 培养基(MS(1/2N))中进行培养,每处理接种 30 个外植体,40 d 后统计生长情况,试验重复 2 次。

1.2.2 外植体的灭菌处理 肥皂水刷洗新梢或 1 a 生枝条 2 遍→在流水中冲洗 30 min~1 h→转入超净台中,75% 乙醇中表面灭菌 30 s→2% NaClO (含 0.1% 吐温-80) 中灭菌 10 min→0.1% HgCl₂ (含 0.1% 吐温-80) 中灭菌 10 min,灭菌过程中摇动数次→无菌水冲洗 5 遍→无菌条件下剥去外部鳞片和外层 3 片叶原基后,切下顶端 3 mm 左右的幼芽→接种于相应培养基上。

梢尖或嫩茎段在 NaClO 和 HgCl₂ 各灭菌 4 min,

其他灭菌处理与新梢或 1 a 生枝相同,无菌条件下剪切成 1 cm 左右,芽端向上接种到相应的培养基中。

1.2.3 培养条件 以改良 MS 培养基为基本培养基,琼脂浓度为 6 g/L,蔗糖含量是 30 g/L,pH 为 5.7。培养基中均附加 500 mg/L 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40)。培养温度 25℃,光暗时间 16/8 h,光照强度 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 。

1.2.4 统计方法

萌芽率 = 萌芽的外植体数量/接种的外植体数量

丛生苗率 = 产生侧芽的外植体/接种的外植体数量

增殖系数 = 转接得到的外植体数量/原接种的外植体数量

试验结果采用方差分析和邓肯氏差异显著性测验。

2 结果与分析

2.1 取材时期和 BA 浓度对萌芽率的影响

取材时期和 BA 浓度对萌芽率的影响见图 1。由图 1 数据可知,取材时期不同,接种后的萌芽率不同。一年当中的萌芽率以 12 月、1~3 月休眠芽最高,各处理萌芽率均在 90% 以上,显著高于其他月份;其次是 8~11 月份,萌芽率达 80% 以上;3 月萌动芽和 6、7 月份外植体萌芽率较低,但也达到 70% 以上,以这些时期的柿芽为外植体,可以建立初代培养;4、5 月份梢尖或嫩茎段萌芽率仅为 10% 左右,不能有效建立初代培养。

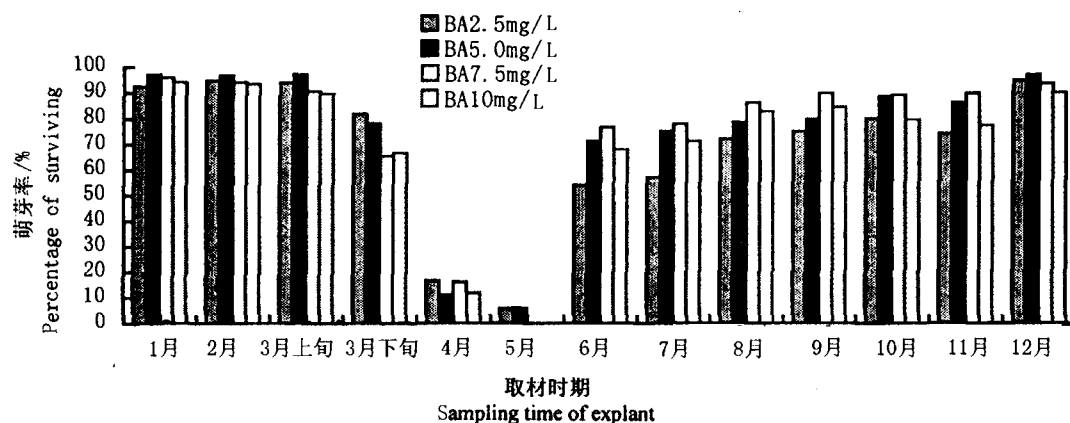


图 1 取材时期和 BA 浓度对磨盘柿初代培养萌芽率的影响

Fig.1 Effect of sampling time and concentration of BA on survival rate of *Mopan persimmon*

BA 浓度对萌芽率也有影响。3 月份萌动芽在 2.5 mg/L、5 mg/L 的 BA 中培养萌芽率显著高于 7.5 ~ 10 mg/L BA 中萌芽率,这说明较低浓度的激素就

可启动萌动芽的生长,激素浓度过高反而会抑制生长。而取自不同时期的休眠芽在含 BA 5.0 ~ 7.5 mg/L 的培养基中生长萌芽率较高,说明休眠芽的启

动培养需要较高的激素浓度。

2.2 取材时期和BA浓度对丛生苗率的影响

取材时期和BA浓度对丛生苗率的影响见图2。由图2数据可知,不同浓度的BA中,以BA 5.0 mg/L的丛生苗率最高,在该浓度下,丛生苗率的变化趋势为:1~3月份休眠芽的丛生苗率在36%~38%之间,变化不大;3月萌动芽丛生苗率与3月上旬相比

显著降低,而4、5月梢尖或嫩茎段无侧芽生成,在培养过程中多数褐变死亡;6~9月份外植体的丛生苗率呈上升趋势,其中9月份的丛生苗率显著高于6月份,与7、8月份差异不显著;9~12月份丛生苗率趋于平稳,约为30%~35%。这说明越接近新梢生长期,外植体越不易分化,秋、冬季及早春取材适宜浓度的BA中培养利于侧芽分化。

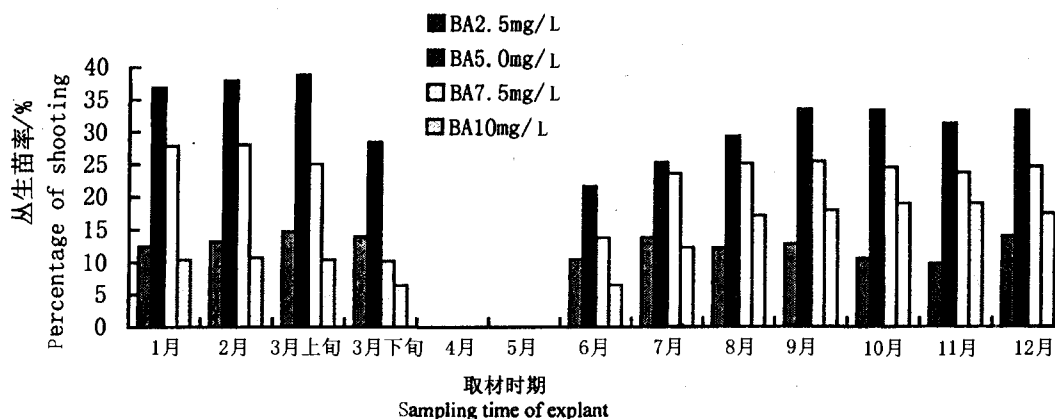


图2 取材时期和BA浓度对磨盘柿初代培养丛生苗率的影响

Fig.2 Effect of sampling time and concentration of BA on percenyage of shooting of *Mopan persimmon*

2.3 取材时期和BA浓度对增殖系数的影响

取材时期和BA浓度对增殖系数的影响见图3。由图3数据可知,除4、5月份梢尖或嫩茎段不能增殖外,其他月份的柿芽都可增殖。1~5月外植体增殖系数呈下降趋势,5~12月增殖系数呈上升趋势。说明越接近生长季节,外植体越不易增殖。不同浓

度BA处理,BA 5.0 mg/L好于其他处理。而9~12月增殖系数BA 5.0 mg/L与BA 7.5 mg/L处理差异不显著,说明萌动芽或即将萌动的休眠芽生长增殖所需激素浓度较低,而随着腋芽休眠程度的加深,启动培养所需激素浓度升高。

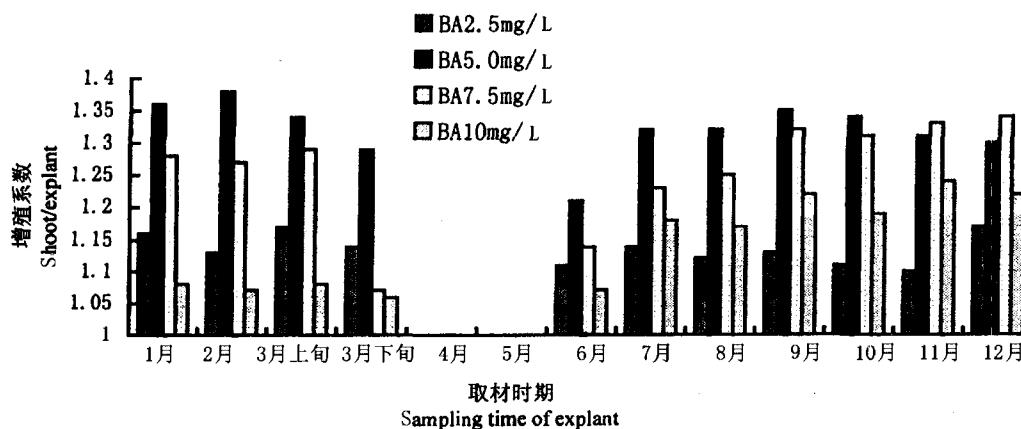


图3 取材时期和BA浓度对磨盘柿初代培养增殖系数的影响

Fig.3 Effect of sampling time and concentration of BA on BA on shoot/explant of *Mopan persimmon*

2.4 取材时期和BA浓度对平均苗高的影响

取材时期和BA浓度对平均苗高的影响见图4。

由图4可知,1~3月和6月取材在BA 5.0~7.5 mg/L中进行培养组培苗平均苗高在6.5~6.8 mm之

间,显著高于其他月份(平均苗高在 5.0~6.0 mm 之间),说明接近生长季节取材,有利于苗的长高,但 3 月份萌动芽和 6 月份芽接种后易褐变,萌芽率低,辅

以适当的抗氧化剂或酚类物质吸附剂,也可取得较好的培养效果。BA 浓度对平均苗高的影响不大,总体来看,BA 5.0~7.5 mg/L 时组培苗较高。

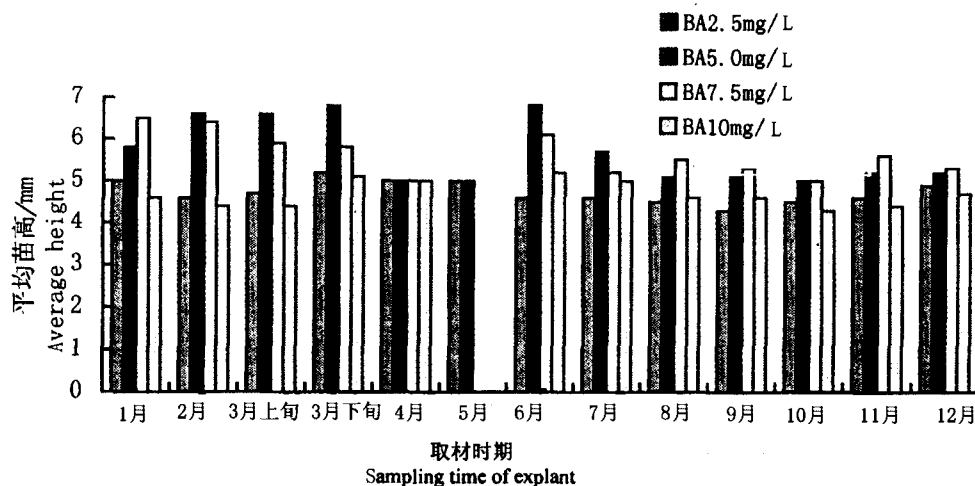


图4 取材时期和 BA 浓度对磨盘柿初代培养苗高的影响

Fig.4 Sampling time and concentration of BA on average height of Mopan persimmon

3 讨论

3.1 取材时期对磨盘柿初代组培建立的影响

本试验中取材时期对磨盘柿初代组培建立的影响主要体现在两方面。

(1)取自不同时期的外植体在萌芽率、增殖能力等方面存在显著差异,1~3月上旬、9~12月外植体易培养,且增殖能力强。但取材时期对平均苗高的影响不大。

(2)取自不同时期的外植体褐变程度不同,冬季及早春季节取材进行培养,褐变轻,萌芽率高。生长季节取材,褐变以不同程度加重,尤其用4、5月份梢尖或嫩茎段中进行培养时,褐变非常严重,萌芽率极低,且不能增殖。造成这种季节性差异的主要原因可能是植物体内酚类含量和多酚氧化酶活性的季节性变化,植物在生长季节含有较多的酚类化合物^[5]。本试验中发现生长季节褐变死亡率高是影响磨盘柿在某些月份初代组培建立困难的直接因素。因此,以磨盘柿建立初代培养时应避免生长季节尤其4、5月份取材,以取得良好的组培效果。综合来看,1~3月上旬、9~12月份为取材最佳时期。

3.2 外植体褐变的可能原因、影响因素及褐变的控制

本试验发现磨盘柿初代培养过程中各月取材都有褐变发生,只是褐变的严重程度不同。这可能与柿树本身酚类物质含量较高有关。磨盘柿初代培养

中的褐变与取材时期有密切关系,生长季节取材外植体褐变严重,而冬季及早春季节取材外植体褐变轻。此类现象在苹果^[6]、桃^[2]、核桃^[7]上也有报道。造成这种季节性差异的主要原因可能是由于植物体内酚类含量和多酚氧化酶的季节性变化^[8]。激素浓度使用不当也会引起褐变。试验中发现,对磨盘柿,含较高浓度 BA(7.5~10 mg/L)的培养基中,外植体褐变加重。这可能是由于高浓度的 BA 促进了愈伤组织的过度生长,愈伤组织生长的同时又促进了酚类物质的合成,酚类物质氧化加重了褐变。

防止外植体褐变,最常用的方法是在培养基中加入抗氧化剂来抑制酚类物的氧化,或用酚类物质吸附剂吸收这些物质^[3]。活性炭是植物组培中常用的酚类物质吸附剂,但研究结果不一。谷晓峰等^[9]在进行罗田甜柿幼胚培养时发现,与 PVP、柠檬酸相比,活性炭抗褐化效果最好,除萌发率稍有降低外,成苗率及植株平均苗高都显著高于其他处理。而 Burch^[10]则认为活性炭不仅能吸附酚类物质,而且也能吸附培养基中的生长调节剂及营养物质,从而影响外植体长势。宋春丽等试验中发现^[11],活性炭对磨盘柿梢尖和嫩茎段的褐变有一定的抑制作用,效果好于其他抗氧化剂和酚类物质吸附剂,但不如 PVP-40。本试验中在培养基中添加一定量的 PVP-40 能有效地抑制休眠芽的褐变死亡,是防止磨盘柿初代培养褐变的有效方法。尽管如此,PVP-40 也不能抑制4、5月份生长中的新梢外植体的褐变死

亡,所以应避开4、5月份取材。

3.3 激素种类和浓度对磨盘柿初代组培建立的影响

在植物组培中,激素种类和配比是影响外植体生长的关键因素。柿组织培养中普遍使用的激素是ZT,但ZT价格偏高,相对来讲,BA廉价易得,可是有研究报道,多数柿树品种在含有BA的培养基中不能生长^[3,4]。本研究证明BA可以有效诱导磨盘柿柿芽的萌动生长,可应用于磨盘柿的初代培养,降低组培苗成本。后续研究中又发现单一的BA对磨盘柿继代培养效果较差。主要表现在组培苗生长减弱,丛生苗率低,不能长高,甚至有死苗现象,而ZT在磨盘柿继代培养中效果较好。因而BA只适于初代使用,降低成本。孔祥生在以富有、次郎为试材进行试验时发现在含1 mg/L的ZT培养基中加入1 mg/L的BA使有效新梢率降低,却显著提高了增殖倍数。说明BA对促进柿组培苗继代增殖有一定效果,而ZT可促进组培苗的分化和长高。

试验中发现,随着BA浓度升高,愈伤组织形成增多。愈伤组织过度生长会使组培苗生长受抑制,因而初代培养中也应调节激素浓度,减少愈伤组织生成。因此BA 5.0 mg/L比BA 7.5 mg/L更适于磨盘柿初代组培建立。

此外,基本培养基也可能影响初代组培建立。有报道说初代组织培养需要较低的盐浓度^[12],本试验采用改良培养基(MS(1/2N)),取得了良好效果,这说明外植体的启动生长需要较低浓度的矿质元素,尤其是较低浓度的氮素。

参考文献:

- [1] 张妙霞,孔祥生,郭秀璞,等.柿树组织培养防止外植体褐变研究[J].河南农业大学学报,1999,33(1):87-91.
- [2] Wang Q C, Tang H R, Quan Y, et al. Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explants of 'Fuji' apple and 'Jinhua pear' cultured in vitro[J]. Journal of Hort Science, 1994, 69(5): 833-839.
- [3] Tao R, Sugiura A. Micropropagation of Japanese persimmon[J]. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1992, 18:424-440.
- [4] Fukui H, Sugiyama M, Nakamura M. Shoot tip culture of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thun.)[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1989, 58(1):43-47.
- [5] 吴国栗,陈国秀.苹果及其砧木茎尖研究进展[J].北方园艺, 1992,(5):23-28.
- [6] 王续衍,林秦碧.苹果组织培养研究简报[J].四川农业大学学报,1988,3(1):46-48.
- [7] 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,1986.456-465.
- [8] Biedermann E C. Factors affecting establishment and development of *Magnolia* hybrids in vitro[J]. Acta Hort, 1987, 212:625-629.
- [9] 谷晓峰,唐仙英,罗正荣.罗田甜柿幼胚培养条件研究[J].果树学报,2001,18(2):80-83.
- [10] Sarathchandra SU, Burch G. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thun.) cv. Hiratanenashi[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1991, 19(2):113-120.
- [11] 宋春丽,马俊莲,张子德,等.磨盘柿初代组织培养技术研究[J].河北农业科学,2002,6(1):1-7.
- [12] Biasi L A, Carvalho D C, Andrade A, et al. In vitro establishment of Japanese persimmon cv. Fuyu through shoot tip culture[J]. Kevista Brasileira de Fruticultura, 1999, 21(3):279-283.

(编辑 郭丽娟)