

文章编号:1002-2724(2007)02-0032-02

木瓜海棠组织培养技术的研究

张庆田^{1,2}, 夏 阳^{2*}, 孙仲序¹, 王太明²

(1. 山东农业大学园艺学院, 泰安 271018; 2. 山东省林业科学研究院)

摘要:以木瓜海棠当年生嫩枝上带有腋芽的茎段为外植体,运用对比试验和正交设计等方法,对木瓜海棠试管苗的快繁、生根、叶片和茎段愈伤组织的诱导进行研究。结果表明:快繁最适培养基为:MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1mg/L+2,4-D0.2mg/L,增殖系数可达8.7;采用一步生根法最佳培养基为:1/2MS+IBA1mg/L+NAA0.2mg/L;在MS+6-BA4.0mg/L+2,4-D0.5mg/L的培养基上愈伤组织生长的较快,结构正常。

关键词:木瓜海棠;组织培养;正交设计

中图分类号:S722.3

文献标识码:A

随着我国经济的持续发展,人民生活水平的不断提高,花卉已逐渐成为大、中城市的一大重要消费品和城郊农业的支柱产业之一^[1]。据不完全统计^[2],1999年全国花卉种植面积达12.24万hm²,销售额540亿元,出口创汇2.6亿元,种植面积比1998年增长34.5%,销售额增长48.7%,出口创汇增长215%。能出现如此可喜局面,主要是因为在我国农业结构进行战略性调整的推动下,花卉业已成为农业结构调整的重要内容,基地、市场的建设迅速增加,各部门、各行业多元化的投资也促进了花卉业的迅速发展。但是,我国花卉业与发达国家,甚至一些发展中国家相比,还存在着较大差距。其主要原因在于我国花卉业起步较晚,花卉生产布局不合理,经营分散,栽培技术落后,繁育手段简单,还不能完全进行专业化、规模化生产。

目前,我国绝大多数花卉植物主要采用传统的种子繁殖和无性繁殖(扦插、嫁接、压条等)。种子繁殖不仅难以保持品种的优良特性,而且对难于得到种子的远缘杂种、非整倍体植株及基因工程的名贵花卉植物根本就无能为力。虽然常规无性繁殖方法可以保持母本的优良性状,但是对一些新选育或新引进的优良品种,由于生产上需求的苗木多而急,用常规无性繁殖速度慢,短时间内无法提供大量苗木;另一方面,采用常规无性繁殖法,不可避免地使其病毒在植物体内逐级传递、积累,不仅严重地影响了花卉植物的产量和品质,而且大大地减弱了名贵花卉的经济效益和生态效益^[3]。因此如何提高名贵花卉的繁育速度,保证植物遗传性的一致性,做到周年连续生产并及时供应市场,已成为当前花卉业发展所面临的新的课题。木瓜海棠是最新兴起的一种观赏植物,以其花色艳丽,色系丰富,花期较早以及春观花秋观果的独特观赏价值而倍受青睐。目前其组织培养技术未见有报道本试验以此为切入点对其进行研究以期为本观赏海棠的组织培养及遗传转化提供技术支持^[3,4]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验材料为3年生盆栽木瓜海棠品种世界一,购于山

东临沂蒙山木瓜海棠研究所,以当年新生嫩茎为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 材料消毒

将新生嫩茎用滴有几滴洗洁净的自来水浸泡15~20min,再用自来水冲洗1~2h,去除肉眼可见的灰尘及泡沫。再用75%酒精消毒30s后转入0.1%的氯化汞(HgCl₂)溶液中浸泡8~15min,材料要完全浸入溶液中,无菌去离子水冲洗3~5次将材料放于无菌滤纸上,吸干接种材料表面多余水分,用无菌剪刀剪去茎段两端少许,再截成带有1个腋芽的小茎段,使腋芽处于小茎段的2/3处,接种于预先准备好的MS+蔗糖30g/L+琼脂5.5g/L的培养基上。

1.2.2 培养基的配制及灭菌

根据试验设计制备各阶段所需培养基。培养基配制好后,进行认真严格的消毒灭菌,在11kg/cm²(121℃)压力下消毒20~25min,激素为6-BA,IBA,2,4-D,NAA。待培养基冷却凝固后使用。初代消毒培养为了避免材料因不可预见的原因而引起交叉感染,因此每一试管最好接种一块材料。

1.2.3 培养条件

光照强度1500~2000LX,每天光照14h;培养室温度为25±1℃,光照自动调控。除说明外,培养基中,蔗糖:30g/L、琼脂:5.5g/L、pH:5.8。

1.2.4 快繁培养

将初代培养获得的无菌新生芽接种于MS+琼脂5.5g/L+蔗糖30g/L+不同激素种类,不同浓度梯度的培养基中进行快繁培养。激素组合按L9(3⁴)正交表试验设计,共9个处理,每处理接10瓶,每瓶接入3个芽,重复2次,每周调查1次生长状况。

表1 木瓜海棠增殖培养正交试验因素水平表

因素水平	6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)	2,4-D(mg/L)
1	0.5	0.1	0.05
2	1	0.5	0.2
3	1.5	1	0.5

1.2.5 不定根的诱导

收稿日期:2007-01-11

* 通讯作者

将继代培养得到的无根苗(高 1.5cm 以上,生长健壮)接种于生根培养基中,进行生根培养,按基本培养基为 1/2MS (大量元素减半)制定下表中所示的 9 种培养基。每处理 10 瓶,每瓶接种 1 个无根苗,重复 2 次。20d 后调查生根情况。

表 2 木瓜海棠生根正交试验因素水平表

因素水平	IBA(mg/L)	NAA(mg/L)	6-BA(mg/L)
1	0	0.2	0
2	1	0.5	0.1
3	2	1	0.2

1.2.6 愈伤组织的诱导

以叶片、嫩茎为外植体,分别接入 MS+6-BA4.0mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂 5.5g/L+不同激素的培养基中,进行愈伤组织诱导研究。激素组合见表 3。共 9 个处理,每个处理接 10 瓶,每瓶各接 3~4 块叶片或 3~4 块基茎。重复 2 次。20 天后观察愈伤组织的生长情况。

表 3 不同激素配比对木瓜海棠愈伤组织诱导

激 素 编号	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)
1	0.1		
2	0.5		
3	1		
4		0.01	
5		0.1	
6		0.5	
7			0.01
8			0.1
9			0.5

1.3 测定指标

诱导率:能够萌发芽的外植体数与接种外植体数的百分比。

污染率:没有被真菌和细菌污染的外植体数占接种数的百分比。

分化芽数:接种外植体分化产生的芽数。

苗高:指从培养基表面以上的茎高,本实验中只统计苗茎高在 0.5cm 以上的嫩梢。

生根率:产生根的嫩梢数与接种数的百分比。

2 结果与分析

2.1 最佳快繁培养基的筛选

对 I9(3⁴)的正交试验所得数据进行极差分析,结果见表 4,对于增殖系数,6-BA 极差最大,为 3.3,是主要影响因素,2,4-D 次之,NAA 第 3。最佳组合:MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1 mg/L+2,4-D0.2 mg/L。

2.2 最佳生根培养基的筛选

试管苗生根有一步生根法、两步生根法、瓶外生根法等。本试验采用一步生根法,采用极差分析法研究各因素的主次顺序,并找出参试因素对木瓜海棠的最佳组合。试验结果见表 5。

表 4 木瓜海棠增值培养正交设计结果分析

组合	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	增值系数
1	1(0.5)	1(0.1)	1(0.05)	6.2
2	1	2(0.5)	2(0.2)	7.1
3	1	3(1)	3(0.5)	9.1
4	2(1)	1	2	8.7
5	2	2	1	6.8
6	2	3	3	8.5
7	3(1.5)	1	3	7.4
8	3	2	1	6.5
9	3	3	2	8
K1	19.4	22.3	19.5	
K2	24.0	20.4	22.6	
K3	20.7	21.4	22.0	
R	3.3	1.9	3.1	

表 5 木瓜海棠生根试验正交设计结果表

组 合	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	生根率 (%)	平均根长(cm)
1	1(0)	1(0.2)	1(0)	17.5	2.2
2	1	2(0.5)	2(0.1)	5	2.1
3	1	3(1)	3(0.2)	7.5	1.6
4	2(1)	1	2	57.5	3.1
5	2	2	1	27.5	3.3
6	2	3	3	22.5	2.7
7	3(2)	1	3	50	3
8	3	2	1	35	2.4
9	3	3	2	20	2
k1	10	41.7	26.7		
k2	35.8	22.5	27.5		
k3	35	16.7	26.7		
R1	25.8	25	0.8		
t1	2	2.8	2.6		
t2	3	2.6	2.4		
t3	2.5	2.1	2.4		
R2	1.1	0.7	0.2		

由生根率和平均根长的极差大小来看各激素对生根影响因素的主次关系为:IBA>NAA>6-BA。对生根率和平均根长进行差异显著性分析,经方差分析知各激素对木瓜海棠生根率和平均根长的影响趋势一致,差异性大小符合各激素对生根影响因素的主次关系:IBA>NAA>6-BA。其中 IBA 在平均根长的影响中呈显著性,6-BA 效果不显著。因此得到最佳生根配方:1/2MS+IBA1mg/L+NAA0.2mg/L。

2.3 愈伤组织的诱导

按 1.2.6 愈伤组织诱导试验设计,观察 20 天后愈伤组织的生长情况,激素配比见表 4。从试验诱导愈伤组织的观察结果看,1~6 号培养基产生的愈伤组织松散,呈水浸状 20 天后变褐死亡。在培养基为 MS+6-BA4.0mg/L+2,4-D0.01~0.1mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂 5.5g/L 的培养基上可诱导出正常的愈伤,但生长缓慢开始淡黄色,似菜花状,逐渐变为淡绿色。MS+6-BA4.0mg/L+2,4-D0.5mg/L 的培养基上愈伤组织生长的较快,干燥,致密,表面粗糙结构正常^[5]。

(转第 3 页)

5.2 DNA 测序结果

GAATTCCTCGACTGCTAAGCCTCGTCTTCTTGAGCCTGTCTACTTG
GTGGAGATCCAGGCTCCTGAGCAAGCCCTTGCTGCTATTTACAG
TGTTCTGAATCAGAAGCGTGGACACGTGTTGAGGAGATGCAGA
GGCCAGGAACGCCACTGTACAACATCAAGGCTTACCTTCCTGTT
GATGAGTCGTTTGGATTCTCCGGAACCTTGAGAGCTGCAACATC
TGGCAAGCTTT

5.3 BLAST 结果及分析

gi|10798636|emb|CAC12818.1| elongation factor 2 [Nicotiana
tabacum]

Length = 147

Score = 145 bits (366), Expect = $5e-34$

Identities = 72/74 (97%), Positives = 72/74 (97%), Gaps =
0/74 (0%)

Frame = +3

Query 9 TAKPRLLPEVYLVEIQAPEQALGGIYSVLNQKRGHVFE
EMQRPCTPLYNKAYLPVDES

F 188

TAKPRLLPEVYLVEIQAPEQALGGIYVLNQKRGHVFEEMQRPCTPL
YNKAYLPV ESF

Sbjct 24 TAKPRLLPEVYLVEIQAPEQALGGIYGVNLNKRGHVFEE
MQRPCTPLYNKAYLPVIES

F 83

Query 189 GFSGTLRAATSGQA 230

GFSGTLRAATSGQA

Sbjct 84 GFSGTLRAATSGQA 97

由 BLASTX 分析可以看出,在补血草中存在着一段 cDNA
片段与烟草延长因子 2 高度同源。期望值为 $5e-34$,同一性

达到 97%,实际值为 97%。

6 讨论

真核生物中 EF-2 只有一条多肽链,相对分子量 95 ~ 110kDa,相当于原核生物的 EF-G。EF-2 是单体蛋白质分子。能与 GTP 结合,GTP 为其发挥功能所必需的。GTP 结合位点位于 eEF2 分子的 N 段区域。eEF2 具有 GTP 酶的活性,该活性由 60S 亚基的核糖体某一区域在移位后激活。eEF2 催化 GTP 水解和使 aa-tRNA 从 A 位转移至 P 位,并且使原有的肽链延长一个氨基酸。延长因子的表达与蛋白质的翻译有关。

研究植物中 eEF2 基因的表达及其活性将有助于阐明核糖体、eEF2 和植物核糖体失活蛋白(ribosome inactivating proteins, RIPs)(植物特有的一种保内毒素蛋白,可以抵御病毒、细菌和真菌等的入侵)之间的内在关系。植物核糖体之所以对 RIPs 有较高的抗性,也许就是 eEF2 在其中发挥了重要作用之故。

参考文献:

- [1] 于凤池. EST 技术及其应用综述. 农业生物技术科学. 中国农学通报, 2005, 21(2): 54 ~ 58
- [2] 李虹, 卢孟柱, 蒋湘宁. 表达序列标签(EST)分析及其在林木研究中的应用. 林业科学研究, 2004, 17(6): 804 ~ 809
- [3] Kinzy TG, Ripmaster TL, Woolford JL Jr. Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 gamma in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(13): 2703 ~ 2707
- [4] 陈建中, 戴剑, 章镇, R. Slomski. 黄羽扇豆翻译延伸因子 2 的序列分析. 中国农业科学, 2002, 35 (1): 102 ~ 105

~~~~~

(接第 33 页)

## 3 结论与讨论

对于来自自然环境中的外植体(茎尖、芽茎段、花、果实、根等)既要保证灭菌彻底,又要不损伤植物体,这是一个非常困难的过程,因为来自于自然环境中的外植体,无法避免要受到各种细菌和真菌的浸染。为了获得无菌材料,科学工作者经过多年努力,研究出了许多灭菌方法,其中化学药品灭菌是较为有效的方法。本试验用 75% 的酒精溶液进行预消毒 30s 后转入氯化汞( $HgCl_2$ )溶液中浸泡 8 ~ 15min 效果较好,具体要根据材料的结构,幼嫩程度等经试验控制。Skoog 和 Miller 在 50 年代提出的“激素平衡”理论只有当生长素与细胞分裂速达到一定合适的配比后植物材料才能够反映出最大的生产效率。本试验在在快繁培养中得到的最佳配方为:MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1 mg/L+2,4-D0.2 mg/L,增殖系数可达 8.7。木本植物的不定根诱导在组培快繁技术中是很关键的一步,最常用的是瓶内直接一步生根,这种方法适用于大多数植物的生根,而对于一些难生根的木本植物近年来研究出了滤纸桥法、气培生根法及有瓶外生根法。相比

较而言瓶外生根工序简单,培养周期短,不需要炼苗,直接插入培养基中生根,本试验有待进一步进行研究,以减少移栽工序,节约培养成本。试验采用正交设计节省了试验量,提高了组织培养的工作效率与准确性<sup>[6]</sup>。

## 参考文献:

- [1] 张健, 潘远智. 四川花卉业产业化发展及其对策. 四川林业科技, 1999, 20(1): 46 ~ 48
- [2] 陶可金, 于杰等. 从花卉消费特点, 浅析入世后我国花卉产业发展对策. 北方园艺, 2001, 2: 38 ~ 40.
- [3] 陈正华主编. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986. 526 ~ 529.
- [4] 董志渊, 郑思乡. 百合的组织培养及其在育种中应用[J]. 西部林业科学, 2004, 33(2): 64 ~ 68
- [5] 李艳红, 马宝琨. 苹果砧木 M26 离体叶片愈伤组织发生及分类研究. 果树科学, 1999, 16(4): 259 ~ 262.
- [6] 袁志发, 周静芋. 实验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000