

椰子组织培养的研究进展

吴翼¹, 武耀廷², 马子龙¹, 周焕起¹, 周世叶¹

(¹ 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339;

² 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101)

摘要: 组织培养是椰子快速繁殖最有效的方法, 目前椰子组织培养技术尚属世界性难题。综述了国内外椰子胚培养和未成熟花序、嫩芽、嫩叶等外植体无性繁殖方面的研究进展, 同时还指出了椰子组织培养的研究意义以及当前存在的问题, 并结合存在的问题展望未来的研究, 为椰子组织培养技术的进一步研究提供参考。

关键词: 椰子; 组织培养; 胚培养; 未成熟花序

中图分类号: S667.4 **文献标识码:** A

Advances in Tissue Culture of Coconut

Wu Yi¹, Wu Yaoting², Ma Zilong¹, Zhou Huanqi¹, Zhou Shiye¹

(¹Coconut Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang, Hainan 571339;

²Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology of Chinese Academy of Tropical

Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

Abstract: It is the most effective method of rapid propagation on tissue culture of coconut. The tissue culture technique of coconut still belongs to the world difficult problem at present. The article reviewed the progress on clone proliferation from embryo, immature inflorescences, tender bud, tender leaf and so on at home and abroad. The significance and existing problem in coconut tissue cultures presently are also discussed at the same time. The prospects of future research was viewed to provide references for tissue cultures in coconut based the existing problem.

Key words: Coconut, Tissue culture, Embryo culture, Immature inflorescences

椰子(*Cocos nucifera* L.)属棕榈科椰子属单子叶多年生乔木, 是典型的热带木本油料作物和食品能源作物, 也是热带沿海生态防护林建设和园林绿化的重要植物之一, 在世界热带 93 个国家和地区广泛种植。联合国粮农组织(FAO)把椰子种植视为解决热带地区人民对蛋白质、脂肪和能源需要及增加农民就业机会, 帮助农民脱贫致富的重要途径。但是, 目前椰子产业发展中还存在许多问题, 品种单一、丰产性差、低产老化现象严重、病虫害发生严重。目前, 许多国家主要通过收集优良亲本、结合现代育种手段来培育新的高产、抗逆的优良品种, 以通过新品种的更新换代来改良现有椰

子种植园。到目前为止, 世界各国通过各种手段已经收集保存有高产、抗逆、抗病、外形美观等优良性状的椰子种质资源和新品种。但是椰子多为异花授粉植物, 生长周期长, 种子大, 运输困难, 没有休眠期, 一般用种果繁殖, 繁殖系数低, 杂种后代性状分离严重, 个体间差异较大, 很难获得同一性状后代群体, 同时椰子只有一个独立的茎干而不产生分枝, 侧芽只产生花序而顶芽为仅有的营养芽, 因而常规的营养繁殖手段如扦插、嫁接、高空压条等无法用于椰子的无性繁殖, 这些特性对椰子的种质资源收集、保存和交换带来很大困难。而通过组织培养技术才是椰子的快速繁殖最有效的无性繁

基金项目: 海南省自然科学基金项目“椰子无性系培育技术研究”(30611); 中国热带农业科学院基金项目“椰子组培苗的培育技术研究”(Rky0631)。

第一作者简介: 吴翼, 男, 1980 年出生, 海南文昌人, 在读硕士研究生, 主要从事椰子组织培养与椰子 SSR 分子标记开发方向研究。通信地址: 571339 海南省文昌市清澜开发区椰子研究所资源与育种研究室。Tel: 0898-63330917, E-mail: wuyi-scuta@163.com。

通讯作者: 马子龙, 男, 1963 年出生, 副研究员, 硕士生导师, 长期从事植物病理与椰子育种方向研究。通信地址: 571339 海南省文昌市清澜开发区椰子研究所。Tel: 0898-63330003, E-mail: mzl900@163.com。

收稿日期: 2007-06-11, **修回日期:** 2007-06-18。

殖方法。

1 椰子组织培养的研究意义

组织培养快繁技术是利用植物的根、茎、叶、花、果等外植体快速繁殖无性系的方法,已经在多种植物上获得成功。研究椰子组织培养技术不仅可以解决椰子用种果繁殖费时、费工和繁殖系数低等问题,也可使椰子种质资源的收集和保存简便化,同时可提高椰子种质资源交流的安全性,促进椰子生物多样性的开发和利用,使椰子种质资源缺乏的国家尤为受益。利用组织培养快繁技术对种质进行体外保存,与种植保存方法相比,其所占空间小,保存费用低廉,又可排除病虫害及植物病毒的侵染,便于种质的保存与交换。利用组织培养技术将推动椰子的遗传改良,从多方面弥补椰子传统育种的不足。通过无性繁殖技术,可固定某些优良性状,继而进行营养繁殖,可以在短时间内获得大量的同一性状的后代个体,有利于优良性状的开发利用以及标准化种植,有利于椰子低产园的改造,提高椰农收入,提高经济效益,同时也为椰子基因工程及椰子功能基因组研究提供一个研究平台。

2 椰子胚培养的研究

有关椰子胚培养的研究,国外开展的比较早。1971年,菲律宾 De Guzman 等首次进行了 Makapuno 品种的离体胚培养研究,并获得完整植株^[1]。随后,不少研究小组对不同品种的胚进行培养,以确定胚在培养基中的作用及测定杂交种的早期长势。尽管采用不同的基本培养基,但通常使用两种连续发育培养基,一种首先促进枝条发育,然后另一种促进根系旺盛生长。Noerhadi 和 Toruan (1975) 使用 Heller 培养基 (Heller, 1953) 和添加 IAA 的 MS 培养基^[2]。Fisher 和 Tsai (1978) 使用富含椰乳和各种生长素 (IAA, IBA, 2ip) 的液体 MS 培养基,以及添加活性炭的琼脂培养基^[3]。Iyer (1981) 首先在富含活性炭的固体培养基上培养,然后在液体培养基中生根。Ashburne 等 (1990) 则认为在液体培养基中,胚增长较大,萌芽较快,培养 24 周后,首先在液体培养基中培养的胚其根、茎生长速率最大,但液体培养时间过长也会减弱根茎生长且降低叶绿素含量^[4]。在以马来西亚黄矮×西非高种杂交种胚为外植体,比较不同培养基矿物盐效果的试验中发现 Saunders 和 Burkholder 培养基 (Saunders 和 Burkholder, 1948) 对胚发育最有利。然而 Rillo 和 Paloma (1990) 在胚培养的试验研究结果证明:采用 Y3 基本培养基 (Eeuwens) 要比 MS 基本培养基 (Murashige and Skoog) 的效果好,胚芽在不加任何激素的 Y3 培养基中生长最好^[5]。Weerakoon 和 Vidhanaarachchi 等人 (2002) 进行

3 种培养基 (Y3CRI, UPLB 和 CPCRI) 对 SLGD 品种胚培养的对比试验,结果表明 UPLB 培养基对胚萌芽最有利,但芽长得较差,而另外两种培养基对芽生长较有利;根在 Y3CRI 培养基上生长良好,而 UPLB 和 CPCRI 不利于根生长^[6]。

激素在椰子胚培养中起关键作用。Weerakoon 和 Vidhanaarachchi 等 (2002) 的研究显示 GA3 对胚的萌发有积极的影响,相对高压锅灭菌,过滤灭菌效果更优,他们的研究同时显示 ABA 能加快未成熟的胚发育成熟^[6]。Nurhaini Mashud (2002) 的研究结果与 Weerakoon 等人的相似,他们认为在培养基中加入 60 mg/L 的 GA3 能提高胚的萌发率和移栽的成活率,在培养基中同时加入 ABA 和 GA3 能促进未成熟胚萌发,但萌发率相对只加入 GA3 低^[7]。Karun 和 Sajini 等 (2002) 则认为 GA3 的浓度以及培养的持续时间对芽的生长没有相互的影响,芽的生长主要取决于胚的成熟度,然而对于根的生长,GA3 的浓度以及胚的成熟度对其影响较明显,他们同时还认为 ABA 对初培养时芽和根的生长效果显著^[8]。Rillo 和 Paloma (1990) 的研究结果表明 Y3 培养基在用来对椰子胚培养时没有必要添加 BAP 和 NAA^[5]。Rillo 和 Cueto 等 (2002) 也认为在 UPLB 培养基中不加肌醇、BAP 和 NAA 而对胚胎的生长发育无任何不良影响^[9]。Vu Thi My Lien (2002) 的研究表明在添加 2mg/L IBA 的改良 PCA 培养基中胚的生长发育表现最佳^[10]。

其他因素也起重要作用。陈幸华 (1999) 认为在椰子离体胚培养中,添加适量的活性炭可明显地改善培养基的营养条件,抑制椰子胚在培养过程中产生的褐化物质,从而使胚长久保持新鲜,提高出苗率^[11]。孙德权等人 (2001) 在椰子离体胚培养中以 MS 为基本培养基进行不同糖浓度试验的结果表明,糖浓度为 5% 的培养基最有利于椰子胚的离体培养,糖浓度为 3% 的培养基不适于椰子离体胚的培养^[12]。Ake 等 (2002, 2004) 试验了固、液体培养基及胚的接种方向对胚萌发的影响,结果表明采用固体培养基并使珠孔端向上接种,要比液体培养基 (胚浸没其中)、和采用固体培养基但接种方向为珠孔端水平或朝下萌发的要好,其原因可能是椰子胚初代接种在固体培养基上,并使珠孔端位于培养基平面上方的气相中,有利于胚的呼吸^[13,14]。Talavera 等 (2005) 的研究表明试管苗在温室条件下培养,光合效率、干重和叶片数量都表现较好,在标准培养室培养的试管苗不论是光合效率还是生长率都相对低;移栽后的 6 个月里,原先在在温室条件下培养的试管苗仍然保持高的成活率和生长率,在干重、鲜

重和叶片数量等方面都优于原先在标准培养室培养的试管苗,这可能与光照的强度和质量有关^[15]。

3 无性繁殖方面的研究

虽然可以从嫩芽^[16]、根^[17]、未成熟花序^[18,19]、嫩叶^[20]等外植体来诱导形成愈伤组织,但其继代培养却经常遇到困难,诱导器官发生的结果通常是产生根,而很少观察到萌动芽的发生。研究者们试图利用未成熟花序培养来绕过愈伤组织阶段,直接由花芽分生组织向营养枝条发育,这种可能性随花序幼嫩程度的增加而增加。利用未成熟花序来进行培养,可省去表面消毒这一环节,只要将佛焰苞洗净去掉即可在无菌条件下进行接种,此外,其数量丰富,每个花序有3000个以上的花芽分生组织。Branton和Blake在1983年首次报道可通过未成熟花序组织进行体细胞胚胎发生^[18]。Verdeil和Huet等(1994)也以椰子未成熟花序为外植体,经愈伤组织诱导后,由体细胞胚胎发生获得再生植株^[19],其后虽经多个研究小组的努力,但这种方法生产的试管苗仍然不可靠,重复性不强^[21]。Cueto-Ebert和Rillo等人(1997)在对Bago-Oshiro-Laguna和Rennel 3个品种的未成熟花序进行培养,最终获得单芽或重芽的实生苗,他们的研究结果进一步说明了从未成熟花序进行椰子无性繁殖是可行的^[22]。Carlos Perez等(2001)用椰子未成熟花序在附加2,4-D的MS培养基中培养,结果表明佛焰苞长度为1~2.5 cm长的外植体没有任何褐化现象,而佛焰苞长度超过17 cm的外植体却因褐化导致死亡,佛焰苞在7~13.5 cm为最佳长度,胚状体产生的数量随着2,4-D浓度的增大而增加^[23]。Verdeil等(1994)也有相似的研究,他们的研究表明椰子未成熟花序在附加2%活性炭和一定浓度 $(1.5\sim3.5)\times10^{-4}$ M 2,4-D的固体培养基上可以培养,未成熟花序分生组织产生球状白色的愈伤组织的百分率取决于花序的幼嫩程度和2,4-D浓度^[19]。Perera和Hochoer等(2006)也认为活性炭和2,4-D浓度对愈伤组织的诱导起关键性作用^[24]。Arachchi和Weerakoon(1997)以椰子未成熟花序为外植体在四种不同培养基(72培养基,改良的Y3培养基,椰子花药培养基和改良的Blake's培养基)进行愈伤组织的诱导,结果显示仅在72培养基中观察到愈伤组织,在改良的Y3培养基中只有极少的芽直接从花原基中产生^[25]。

不少研究者以嫩芽作为外植体进行培养。Chan等(1998)的研究结果显示,胚芽在2,4-D浓度为0.1 mM的Y3培养基中进行暗培养,且无转接,可获得较多的愈伤组织,然后愈伤组织转接到添加1 μ m 2,4-D和50 μ m 6-BAP的Y3培养基中进行光培养,每3个月

转接一次可实现再生植株,同时还发现,用胚芽外植体培养产生的愈伤组织和愈伤组织形成的体胚比用花序外植体培养生成的分别多2倍和10倍以上^[26]。Hornung^[27]和Fernando^[28]也以嫩芽作为外植体进行培养,最终获得完整植株。

花药培养方面的研究较少,1983年,Thanh Tuyen和De Guzman报道花药培养中花药胚可达到球形、心形和鱼雷形胚阶段,但未观察到有愈伤组织形成,这种从花粉粒直接胚胎发生对遗传稳定性影响程度最小,其它研究者也进行了同样的研究,但均未能获得单倍体植株^[2]。

其他方面也有研究,1982年Pannetier和Buffard-Morel以嫩叶外植体进行体细胞胚胎培养产生胚状体^[29]。幼叶外植体在无活性炭但附加低浓度的生长素(2,4-D或TCPP)的培养基上可产生根,继续培养可长出侧根。Fulford等从根外植体诱导出愈伤组织,当生长素不存在时可形成根。Karunaratne等(1989)利用6~7个月的椰子坚果切离的胚胎为离体培养材料,研究了椰子未成熟胚胎的培养、愈伤组织增殖及体细胞胚胎发生^[30]。Pimchai和Blake(1977)研究了以成龄椰子树茎干组织为外植体诱导愈伤组织发生的条件^[31]。Nguyen等(1983)研究了椰子花粉囊组织培养中胚胎的形成^[32]。

4 存在的问题

为了从外植体诱导愈伤组织,培养基中添加了高浓度的植物生长调节物质,同时为了防止褐化,添加了一定量的活性炭,活性炭能吸附培养基中的有害物质,并在植物组织培养的许多方面都有积极作用,但同时活性炭又能吸附其他培养基成分特别是植物生长调节物质,因此实际上未被吸收的植物生长调节物质的量很少,且其浓度随着培养基配制日数的增加而变化,致使难以控制植物生长调节物质的正确浓度。

褐变也是制约椰子组织培养因素之一。椰子属木本植物,已经报道(Zaid 1987)发生褐变的植物中,大部分都是木本植物^[31]。在用未成熟花序作外植体的情况下,由于所用未成熟花序的发育阶段不同,外植体褐变程度随花序成熟度增大而加重,并且不同品种之间也存在差异。BAP在椰子组织培养特别是在椰子胚培养中起重要作用,但BAP的使用也会导致褐变加重。

另外,由于某些外植体(未成熟花序和嫩叶等)生长在特殊部位,因此在取材时常会对母株造成极大的伤害。此外,繁殖系数低,增殖难,继代所需周期长等问题也有待解决。其他还有花药培养形成不定胚、从原生质体形成愈伤组织的报道,但目前都难以再现。

20世纪70年代,同样使用组织培养出油棕(E-

laeis guineensis Jacq.) 再生植株, 其后大规模培育小苗, 并移植于大田, 可是, 其植株因激素异常而发生开花变异。利用椰子组织培养技术生产的试管苗仍然不可靠, 试验重复性不强, 而且植株再生率也低。更令人担忧的是产生的再生植株是否会发生变异, 因此必须鉴定再生植株的变异出现率, 同时应该开发解决上述问题的技术。

5 展望

国内外对椰子组织培养进行了几十年的研究, 无论在理论上还是技术上都取得了长足发展, 已经初步建立了快繁体系, 但商品化生产还有众多问题需要解决。由此可见, 对椰子组织培养方面的研究尚未达到一定的深度和广度, 而且该项技术在生产中也尚未得到实际应用。为此, 有必要在前人研究的基础上继续进行深入研究, 并将该方面的研究推向一个更高的层次。椰子组织培养体系的完善, 对优良品种的保存和交换, 优良性状的固定, 遗传性状的改良, 种苗的工厂化生产以及椰子生物多样性的开发和利用有着重要意义。

参考文献

- [1] De Guzman, Del Rosario, Rosario AGD, et al. The growth development of makapuno coconut embryo in vitro III. Resumption of root growth in high sugar media. *Phil, Agric*, 1971, 52: 566-579.
- [2] 郑成木, 刘进平. 热带亚热带植物微繁殖. 湖南: 湖南科学技术出版社, 2002: 155-160.
- [3] Fisher JB, Tsai JH. In vitro growth of embryos and callus of coconut palm. *In Vitro*, 1978, 14(3): 307-311.
- [4] Ashburner GR. 固体和液体培养基对椰子胚培养的影响. 热带作物译丛, 1993, 1: 5-7.
- [5] Rillo EP, Paloma MBF. Comparison of three media formulations for in vitro culture of coconut embryos. *Oleagineux*, 1990, 45(7): 319-323.
- [6] Weerkoon LK, Vidhanaarachchi VRM, Fernando SC, et al. Increasing the efficiency of embryo culture technology to promote coconut germplasm collecting and exchange in Sri Lanka. In: Engelmann F, Batugal P, Oliver J, eds. *Coconut Embryo In Vitro Culture Part II*. Serdang, Malaysia: IPGRI-APO, 2002: 27-40.
- [7] Nurhaini Mashud. Increasing the efficiency of embryo culture technology to promote coconut germplasm collecting, conservation and exchange in Indonesia. In: Engelmann F, Batugal P, Oliver J, eds. *Coconut Embryo In Vitro Culture Part II*. Serdang, Malaysia: IPGRI-APO, 2002: 80-88.
- [8] Karun A, Sajini KK, Parthasarathy VA. Increasing the efficiency of embryo culture to promote germplasm collecting in India. In: Engelmann F, Batugal P, Oliver J, eds. *Coconut Embryo In Vitro Culture Part II*. Serdang, Malaysia: IPGRI-APO, 2002: 7-26.
- [9] Rillo EP, Cueto CA, Medes WR. Development of an improved embryo culture protocol for coconut in the Philippines. In: Engelmann F, Batugal P, Oliver J, eds. *Coconut Embryo In Vitro Culture Part II*. Serdang, Malaysia: IPGRI-APO, 2002: 41-66.
- [10] Vu Thi My Lien. Coconut embryo culture in Vietnam. In: Engelmann F, Batugal P, Oliver J, eds. *Coconut Embryo In Vitro Culture Part II*. Serdang, Malaysia: IPGRI-APO, 2002: 89-101.
- [11] 陈幸华. 活性炭在椰子离体培养中的效应初报. 热带作物科技, 1999, 1: 51-52.
- [12] 孙德权, 陆新华. 椰子离体胚培养基中的糖浓度试验. 福建热作科技, 2001, 26(1): 10-12.
- [13] Ake aepy, Souza R, Talavera C, et al. Changes in culture conditions and medium formulation to improve efficiency of in vitro culture of coconut embryos in Mexico. In: Engelmann F, Batugal P, Oliver J, eds. *Coconut Embryo In Vitro Culture Part II*. Serdang, Malaysia: IPGRI-APO, 2002: 122-137.
- [14] Ake aepy, Souza R, Maust B. Enhanced Aerobic Respiration Improves in Vitro Coconut Embryo Germination and Culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant*. Columbia, 2004, 40(1): 90-94.
- [15] Talavera C, Contreras F, Espadas F, et al. Cultivating in vitro coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves in vitro photosynthesis nursery survival and growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 83: 287-292.
- [16] Weerakoon LK. Coconut tissue and embryo culture in Sri Lanka: current developments and future challenges. In: Peiris TSG, Ranasinghe CS, eds. *Proceedings of the international conference of the Coconut Research Institute of Sri Lanka - Part I (Review papers and guest presentations)*. CRI, Lunuwila, Sri Lanka, 2004: 41-61.
- [17] Justin SHFW. Vegetative propagation of coconuts. Report East Malling Research Station, 1977: 75-176.
- [18] Branton RL, Brake. Development of Organized Structures in Callus Derived from Explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany*, 1983, 52: 673-678.
- [19] Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, et al. Plant regeneration from Cultured Immature inflorescences of Coconut (*Cocos nucifera* L.): Evidence for Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 1994: 218-221.
- [20] Buffard MJ, Verdeil JL, Pannetier C. Vegetative propagation of coconut palm through somatic embryogenesis, obtention of plantlets from leaf explant. In: Durand C, Bobichon L, Florent J, eds. *Proceedings of the 8th international biotechnology symposium*. Paris, 1988: 117.
- [21] Hornung R, Verdeil JL. Somatic Embryogenesis in Coconut from Immature Inflorescence Explants. In: Oropeza C, Verdeil JL, Ashburner GR, et al, eds. *Current advances in coconut biotechnology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999: 297-309.
- [22] Cueto CA, Ebert AW, Rillo EP, et al. In vitro regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from immature inflorescences of tall cultivars. *Acta-Horticulturae*, 1997, 447: 121-122.
- [23] Carlos Perez J, Gomez Kosky R, Perez Ponce J. Induction of somatic embryogenesis in *Cocos nucifera* L. from immature inflorescences. *Biotechnologia Vegetal*, 2001, 1(2): 97-101.
- [24] Perera PIP, Hoche V, Verdeil JL, et al. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. Springer Berlin/Heidelberg, 2006: 21-28.
- [25] Arachchi VRMV, Weerakoon LK. Callus induction and direct shoot

- formation in in vitro cultured immature inflorescence tissues of coconut. *COCOS*,1997,12:39-43.
- [26] Chan JL, Saenz L, Talavera C, et al. Oropeza C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*,1998,17:515-521.
- [27] Hornung R. Micropropagation of (*Cocos nucifera* L.) from plumular tissues excised from mature zygotic embryos. *Plant RechDev*, 1995,212:38-41.
- [28] Fernando SC, Verdeil JL, Hoher V, et al. Hirimburegama K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultute*,2003,72: 281-284.
- [29] Pannetier C, Buffard-Morel J. Production of somatic embryos from leaf tissues of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Tissue Culture*, 1982,5:755-756.
- [30] Karunaratne S, Periyapperuma K. Culture of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.):callus proliferation and somatic embryogenesis. *Plant Science*,1989,62(2):247-253.
- [31] Pimchai Apavatjirut, Blake J. Tissue culture of stem explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Oleagineux*,1977,32(6):267-271.
- [32] Nguyen T, Emerita V, Tuyen T. Formation of pollen embryos in cultured anthers of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science Letters*, 1983,29(1):81-88.
- [33] Zaid A. In vitro browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures-A review. *Acta Hort*,1987,212:561-566.

(责任编辑:陶冶之)