

突尼斯软籽石榴组培快繁技术研究

张晓申,王慧瑜,李晓青

(郑州市农林科学研究所 生物技术中心, 河南 郑州 450005)

摘要:利用植物组织培养技术对突尼斯软籽石榴的组培快繁技术进行了研究。试验证明 3、4 月是 1 年内采集外植体的最佳时期,在此阶段对外植体进行培养时,有效萌芽率最高。以 MS 为基本培养基筛选出适合突尼斯软籽石榴组培各阶段的适宜激素浓度和配比,分别为:启动培养基 MS+6-BA 0.6 mg/l+NAA 0.1 mg/l;增殖培养基 MS+6-BA 1.0 mg/l+NAA 0.3 mg/l;生根培养基 1/2MS+IBA 0.5 mg/l+NAA 0.1 mg/l。

关键词:突尼斯软籽石榴;组织培养;快繁

石榴为石榴科、石榴属,落叶灌木或小乔木,原产中亚地区,在我国已有近 2000 年的栽培历史。石榴根系发达,须根多,对土壤要求不严,适宜范围较广,抗旱耐瘠薄,抗盐碱更强,在山地、平原、丘陵、沙滩等地都可以种植,石榴可以是发展农村经济,保护生态环境,增加农民收入的好树种。突尼斯软籽石榴是中国林业部 1986 年从突尼斯引进我国的优良品种,该品种成熟早、籽粒大、色泽鲜、果个大、果红色美观、果仁特软的特征,推广前景较大。笔者对优良突尼斯软籽石榴无性系进行组培快繁研究,为石榴组培快繁研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料和培养条件

试验材料来自郑州市农林科学研究所石榴品种园里生长健壮结果优的石榴树,采取新生长的茎段为外植体。所用基本培养基为 MS,所有培养基均加入 3% 的白砂糖和 0.6% 的琼脂, pH 值为 6.0,培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度为 1 500—2 000 Lx,光照时间为 14h/d。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体表面灭菌及不同杀菌时间对外植体诱导的影响 外植体去掉大叶,截成 2cm 左右的茎段,每段带一个腋芽,用稀释的洗洁精溶液浸泡 15min,用自来水冲洗干净,放在超净工作台上,先用 70% 的酒精表面杀菌 30s,无菌水冲洗 2 遍,用 0.1% 的升汞进行杀菌,杀菌时间选择 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0min,再用无菌水冲洗 3 遍,切除与药液接触过的伤口,接种于启动培养

基上。每处理 20 瓶,每瓶 3 个外植体,生长 30d,调查污染率和成活率。

1.2.2 不同采集时间对启动培养的影响 在选取外植体进行启动培养的时间上,选择 1—2 月、3—4 月、5—6 月、7—8 月、9—10 月五个不同时间。杀菌方法与启动培养条件一样,每处理 50 个芽,重复 3 次,生长 30d,调查生长情况。

1.2.3 不同培养基对启动培养的影响 本试验以带腋芽茎段为外植体,以 MS 为基本培养基,6-BA 取 0.3、0.6、0.9mg/l 3 个水平,NAA 取 0.1、0.3、0.5mg/l 3 个水平,设计 9 个处理,每处理接种 15 瓶,每瓶接 3 个茎段,重复 3 次,生长 30d,观察记录成活率。

1.2.4 不同培养基对突尼斯软籽石榴增殖系数的影响 将诱导成功的试管苗进行组培快繁,以 MS 为基本培养基,6-BA 取 0.5、1.0、1.5、2.0mg/l 4 个水平,NAA 取 0.1、0.3、0.5、0.8mg/l 4 个水平,设计 16 个处理,每处理接种 15 瓶,每瓶接 4 株试管小苗,重复 2 次,生长 30d,观察记录增殖系数。

1.2.5 试管苗生根培养基的选择 将试管苗长到 3cm 左右时,进行生根培养,以 1/2MS 为基本培养基,IBA 取 0.1、0.3、0.5mg/l 3 个水平,NAA 取 0.1、0.3mg/l 2 个水平,组合成 6 个处理,每处理接种 15 瓶,每瓶接 5 株试管苗,重复 3 次,生长 30d,观察记录生根率、根均长和平均生根条数。

2 结果与分析

2.1 外植体杀菌时间对启动培养的影响

外植体的杀菌过程中会出现污染、褐化、成活

三种情况,从表 1 可以看出突尼斯软籽石榴外植体 0.1% 的升汞杀菌不同时间出现成活数、污染数的情况,随着杀菌时间的延长,污染率逐渐降低,成活率随着杀菌时间的延长,逐渐提高,当 0.1% 的升汞杀菌 2.5min 时,成活率最高,随后

成活率又下降,这也许是时间过长,把芽冻死。褐化率主要是杀菌杀死造成。因此,突尼斯软籽石榴最佳外植体杀菌时间为 70% 的酒精 30s,0.1% 的升汞 2.5min。

表 1 外植体不同杀菌时间对启动培养的影响

0.1% 的升汞杀菌时间(min)	接种数(个)	成活数(个)	污染数(个)	污染率(%)	成芽率(%)
0	60	2	45	75.0	3.3
0.5	60	8	36	60.0	13.3
1.0	60	10	27	45.0	16.7
1.5	60	12	14	23.3	20.0
2.0	60	28	12	20.0	46.7
2.5	60	40	6	10.0	66.7
3.0	60	24	2	3.3	40.0

2.2 外植体不同采集时间对启动培养的影响

采用相同的培养基,在不同的时期采集外植体,启动培养有很大的差异。突尼斯软籽石榴外植体 3—4 月成活率最高,7—8 月成活率最低(见表 2),这原因可能是,在 5—6 月和 7—8 月,植株

体内的生理生化反应相对活跃,外植体在启动培养时分泌的内源物质较多,褐化严重,褐死率较高,同时由于环境温度和湿度都比较高,外植体的污染率较高。

表 2 外植体采集时间对启动培养的影响

取材时间	接种数(个)	褐死数(个)	褐死率(%)	成苗数(个)	污染率(%)	成活率(%)
1—2 月	50	40	80	5	10	10
3—4 月	50	10	20	30	20	60
5—6 月	50	32	64	8	20	16
7—8 月	50	28	56	2	40	4
9—10 月	50	30	60	7	36	14

2.3 启动培养

启动培养的成功除了灭菌外,还取决于外植体生长需要的营养与激素配比,从表 3 可以看出,在突尼斯软籽石榴启动培养中,当 6—BA 浓度为 0.6 mg/l 效果最好,随着浓度的升高,成芽率又下降,NAA 中浓度 0.3 mg/l 成芽率影响较大,成芽率最高。突尼斯软籽石榴启动培养的最佳培养基为 MS+ 6—BA0.6 mg/l+ NAA0.1 mg/l。

2.4 增殖培养

增殖系数直接关系到组培苗繁殖快慢,是反映增殖效果的一个指标,只有最佳的细胞分裂素与细胞生长素的浓度配比,才能达到理想的增殖效果。从表 4 的结果可以看出,随着 6—BA 浓度的增大,增殖系数不断增大,但 6—BA 浓度超过 1.0 mg/l 时,增殖系数又下降,在突尼斯软籽石榴的增殖过程中,当 6—BA 浓度为 1.0 mg/l 时,

增殖系数最大。因此,突尼斯软籽石榴的最佳增殖培养基为 MS+ 6—BA1.0 mg/l+ NAA0.0 mg/l。

表 3 不同培养基启动培养的影响

组合号	6—BA(mg/l)	NAA(mg/l)	成芽率(%)
1	0.3	0.1	31.1
2	0.3	0.3	44.4
3	0.3	0.5	26.7
4	0.6	0.1	53.4
5	0.6	0.3	35.6
6	0.6	0.5	17.8
7	0.9	0.1	33.3
8	0.9	0.3	20.0
9	0.9	0.5	22.2

表4 不同培养基增殖系数的影响

组合号	6-BA(mg/l)	NAA(mg/l)	增殖系数
1	0.5	0.1	2.30
2	0.5	0.3	2.60
3	0.5	0.5	3.20
4	0.5	0.8	3.40
5	1.0	0.1	2.70
6	1.0	0.3	4.20
7	1.0	0.5	3.85
8	1.0	0.8	3.70
9	1.5	0.1	3.42
10	1.5	0.3	3.10
11	1.5	0.5	3.23
12	1.5	0.8	3.90
13	2.0	0.1	3.70
14	2.0	0.3	3.50
15	2.0	0.5	3.45
16	2.0	0.8	3.30

2.5 生根培养

试验表明,在培养基中单一添加生长素 IBA 能使试管苗生根,但茎部生长较慢,并且根的侧根较少,当再加入生长素 NAA 时,茎部生长较好,

根部也有侧根出现,有利于移栽成活。从表 3 可以看出,IBA0.5mg/l 和 NAA0.1mg/l 配合使用,效果最佳,生根率达到 95%,平均每株生根 4 条左右,且根生长良好。

表5 不同生长素比对试管苗生根的影响

组合	平均生根率(%)	平均根长(cm)	平均生根数(条)
IBA0.1mg/l	12	1.0	1.2
IBA0.3mg/l	43	1.3	2.6
IBA0.5mg/l	85	1.1	2.8
IBA0.3mg/l+NAA0.1mg/l	56	1.5	2.5
IBA0.5mg/l+NAA0.1mg/l	95	2.1	3.5
IBA0.3mg/l+NAA0.3mg/l	50	1.9	2.4

3 结 论

在突尼斯软籽石榴的组培快繁中,外植体采集的最佳时间是 3~4 月份,最佳外植体杀菌时间为 70% 的酒精 30s,0.1% 的升汞 2.5min。适宜启动培养基为 MS+6-BA0.6 mg/l+NAA0.1mg/l;增殖培养基为 MS+6-BA1.0 mg/l+NAA0.3 mg/l;生根培养基为 1/2MS+IBA0.5 mg/l+NAA0.1 mg/l。

(上接第 31 页)

从表 5 中可以看出,用灰色多维隶属度评估与单用产量高低来考察品种,结果有一些不同,例如单从产量一个因子看农大 073 低于新花一号,属一般品种,但用灰色多维综合隶属度评估,从多个性状综合考察,农大 073 却优于新花一号,属于较好品种,同样郑农花 6 号如果单从产量看,属于一般品种,但从综合性状来评价,则属于较好品种,这与它们在大田生产中的实际表现相吻合。

3 讨 论

(1)灰色多维综合隶属度评估方法能够全面客观地分析各品种的综合表现,克服了以往只考虑产量一个因子数理评判方法的局限性,在试验中可以避免埋没优良品种。

(2)各性状权重的确定对综合评估至关重要,它直接影响了评估的结果,考察的性状数量不同,

权重向量就随之变化,育种目标不同,权重向量也不同,本文采用灰色关联度归一法来确定权重,应用这种方法,即使对育种工作毫无实践经验,也能比较合理地确定各性状的权重,从而对品种作出客观评定。

(3)选择考评的性状不同,评估的结果也不同,笔者用产量、主茎高、侧枝长、单株饱果数、饱果率、出仁率、蛋白质含量、含油量 8 个性状进行评估分析,来确定品种(系)的优差,是否合理,有待商榷。

参 考 文 献:

- [1]雷铁柱,郭瑞林,王新海,等.灰色系统理论在农业上的应用[M].郑州:河南科学技术出版社,1996.
- [2]郭瑞林.作物灰色育种学[M].北京:中国农业科技出版社,1995.