维普资讯 http://www.cqvip.com

热带亚热带植物学报 2008,16(2):179~183
Journal of Tropical and Subtropical Botany

费约果外植体灭菌及愈伤组织的诱导

周丽娟， 王 丹*， 黄海涛， 袁 涛， 张晓雪
(西南科技大学生命科学与工程学院，四川 绵阳 621000)

摘要：以费约果(*Feijoa sallowiana* Berg.)嫩叶和带芽茎段作为外植体，研究费约果愈伤组织诱导的最佳条件和方法。结果表明：(1)最佳基本培养基是MS；(2)二步灭菌法优于一步灭菌法；(3)嫩叶和带芽茎段愈伤组织诱导的最佳活性炭浓度分别为2.0 g L^{-1}和3.0 g L^{-1}；(4)最佳青霉素浓度分别为200 mg L^{-1}和50 mg L^{-1}；(5)光培养方式优于暗培养方式。(6)费约果嫩叶诱导愈伤组织的最佳培养基是MS+2.0 mg L^{-1} 2,4-D+1.0 mg L^{-1} KT(或0.1 mg L^{-1} NAA)；(7)带芽茎段的最佳培养基是MS+1.0 mg L^{-1} 6-BA+0.5 mg L^{-1} NAA+1.0 mg L^{-1} GA或MS+2.0 mg L^{-1} 6-BA+0.1 mg L^{-1} NAA+1.0 mg L^{-1} GA。

关键词：费约果；组织培养；嫩叶；带芽茎段
中图分类号：Q943.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1005-3395(2008)02-0179-05

Sterilization of the Explant and Callus Induction of *Feijoa sallowiana* Berg. *in vitro* Culture

ZHOU Li-juan, WANG Dan*, HUANG Hai-tao, YUAN Tao, ZHANG Xiao-xue
(*Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology*, Mianyang 621010, China)

Abstract: The optimum conditions for the tissue culture of Feijoa (*Feijoa sallowiana* Berg.) were investigated. The leaves and shoot with bud were used as explants. The results showed that the optimal basal medium was MS medium. Two-step sterilization was better than One-step sterilization. The optimal concentration of active carbon for callus induction from leaves and shoot with bud were 2.0 g L^{-1} and 3.0 g L^{-1}, respectively, and penicillin were 200 mg L^{-1} and 50 mg L^{-1}, respectively. The culture under light was better than under dark. The optimal medium for callus induction from tender leaves was MS+2.0 mg L^{-1} 2,4-D+1.0 mg L^{-1} KT (or 0.1 mg L^{-1} NAA), and from shoot with bud was MS+1.0 mg L^{-1} 6-BA+0.5mg L^{-1} NAA+1.0 mg L^{-1} GA, or MS+2.0 mg L^{-1} 6-BA+0.1 mg L^{-1} NAA+1.0 mg L^{-1} GA.

Key words: *Feijoa sallowiana* Berg.; Tissue culture; Leaf; Shoot with bud

费约果(*Feijoa sellowiana* Berg.)为桃金娘科(Myrtaceae)植物[1]，别名为凤梨番石榴(pineapple guava)、巴西番石榴(Brazilian guava)和无花果番石榴(fig guava)。费约果为常绿亚热带果树，植株优美，四季常青，株型紧密，既可观花，又可观果。同时它的果实味道鲜美，其用途主要为鲜食，也被加工成为果汁、果酒等。

费约果分布于巴西的最南端，阿根廷的北端，巴拉圭和乌拉圭的西端，一般在山区以野生状态生长[2]。目前，主要分布于巴西、乌拉圭、阿根廷北部、美国等国家和地区，但主要商品生产国有新西兰、巴西、美国等。在我国浙江、上海和南京等地也有少量引种。

费约果采用常规方法进行繁殖较困难、增殖速度较慢，利用组织培养技术繁殖是一个较好的途径，然而费约果的组织培养技术在国内报道很少。

收稿日期：2007-07-12 **接受日期**：2007-10-15
基金项目：四川省科技厅国际科技合作项目(2007H 12-004)资助
* 通讯作者 Corresponding author

维普资讯 http://www.cqvip.com

本试验利用嫩叶和带芽茎段进行愈伤组织诱导研究,为费约果组织培养技术的发展提供依据。

1 材料和方法

材料 2004年从新西兰林肯大学引种的4 a生费约果(*Feijoa sellowiana* Berg.)实生树(种植于西南科技大学西山校区温室中),以嫩叶和带芽茎段为外植体诱导愈伤组织(图1A,B),全部试验在四川省西南科技大学生命科学与工程学院实验室完成。

外植体消毒方法和培养条件 在晴天从田间选取嫩叶和带芽茎段,用湿沙布保湿带回实验室。用洗衣粉将其洗刷干净后,用自来水冲洗30 min,然后将材料转移到超净工作台内,用75%酒精浸泡30 s,无菌水洗两次,用0.1%升汞加1~2滴吐温,不断摇动,表面消毒6~15 min后用无菌水洗5次,最后用无菌滤纸吸干材料表面水分。将已消毒的嫩叶和带芽茎段在无菌操作台上进行接种。每升培养基中均含30 g L^{-1}蔗糖、8.5 g L^{-1}琼脂,pH 5.8,培养温度25℃,光强28~37 μmol $m^{-2}s^{-1}$,光照时间12 h d^{-1}。

培养基的选择 费约果的嫩叶和带芽茎段分别培养在添加1.0 mg L^{-1} 6-BA和0.5 mg L^{-1} NAA的MS、1/2MS、B_5、WPM培养基中,对培养50 d后的褐化率、污染率和愈伤组织诱导率进行统计,以确定最佳的基本培养基。

单因素试验 灭菌方法设计有2个水平(一步灭菌法和二步灭菌法)、活性炭浓度有5个水平(0 g L^{-1}、0.5 g L^{-1}、1.0 g L^{-1}、2.0 g L^{-1}、3.0 g L^{-1})、青霉素浓度有5个水平(0 mg L^{-1}、10 mg L^{-1}、20 mg L^{-1}、30 mg L^{-1}、40 mg L^{-1})和光处理方式有2个水平(光培养和暗培养)分别进行单因素试验设计,以确定最佳的灭菌方法、活性炭浓度、青霉素浓度和光处理方式。

生长调节剂试验 将嫩叶分别培养在添加2,4-D、NAA、KT 3种生长调节物质的培养基中;将带芽茎段分别培养在添加6-BA,NAA,GA 3种生长调节物质的培养基中,均采用三因素三水平$L_9(3^3)$正交试验设计方案(详见(1)和(2))。每个处理接种20枚外植体,重复3次,对培养后的褐化率、污染率和诱愈率进行统计,以确定最佳的生长调节剂组合。

(1)嫩叶愈伤组织诱导试验的培养基配方为:

① MS+0.5 mg L^{-1} 2,4-D;② MS+0.5 mg L^{-1} 2,4-D+0.1 mg L^{-1} NAA+0.5 mg L^{-1} KT;③MS+0.5 mg L^{-1} 2,4-D+0.5 mg L^{-1} NAA+1.0 mg L^{-1} KT;④ MS+1.0 mg L^{-1} 2,4-D+0.5 mg L^{-1} KT;⑤ MS+1.0 mg L^{-1} 2,4-D+0.1 mg L^{-1} NAA+1.0 mg L^{-1} KT;⑥ MS+1.0 mg L^{-1} 2,4-D+0.5 mg L^{-1} NAA;⑦ MS+2.0 mg L^{-1} 2,4-D+1.0 mg L^{-1} KT;⑧ MS+2.0 mg L^{-1} 2,4-D+0.1 mg L^{-1} NAA;⑨ MS+2.0 mg L^{-1} 2,4-D+0.5 mg L^{-1} NAA+0.5 mg L^{-1} KT.

(2)带芽茎段愈伤组织诱导试验的培养基配方为:

① MS+1.0 mg L^{-1} 6-BA;② MS+1.0 mg L^{-1} 6-BA+0.1 mg L^{-1} NAA+0.5 mg L^{-1} GA;③MS+1.0 mg L^{-1} 6-BA+0.5 mg L^{-1} NAA+1.0 mg L^{-1} GA;④ MS+2.0 mg L^{-1} 6-BA+0.5 mg L^{-1} GA;⑤ MS+2.0 mg L^{-1} 6-BA+0.1 mg L^{-1} NAA+1.0 mg L^{-1} GA;⑥ MS+2.0 mg L^{-1} 6-BA+0.5 mg L^{-1} NAA;⑦ MS+3.0 mg L^{-1} 6-BA+1.0 mg L^{-1} GA;⑧ MS+3.0 mg L^{-1} 6-BA+0.1 mg L^{-1} NAA;⑨ MS+3.0 mg L^{-1} 6-BA+0.5 mg L^{-1} NAA+0.5 mg L^{-1} GA.

2 结果和分析

2.1 基本培养基

由表1可看出,以嫩叶作为外植体时,在4种基本培养基上的褐化率差异不显著;在1/2MS、B_5和WPM培养基上的污染率均在35%以上,而在MS培养基上的污染率只有16.67%;在MS培养基上的愈伤组织诱导率为51.67%,与B_5、WPM相比存在显著性差异,愈伤组织诱导率依次为MS>1/2MS>B_5>WPM。以带芽茎段为外植体时,在MS培养基上的褐化率显著低于B_5和WPM,1/2MS上的褐化率显著低于B_5;MS和B_5上的污染率显著低于WPM;MS培养基的愈伤组织诱导率显著高于B_5、WPM,而1/2MS显著高于WPM,愈伤组织诱导率依次为MS>1/2MS>B_5>WPM。嫩叶和带芽茎段的愈伤组织诱导率均以MS培养基最高,因此,本试验选择MS培养基作为最佳基本培养基。

2.2 适宜灭菌方法和光处理方式

一步灭菌法为用升汞消毒10 min;二步灭菌法为用升汞依次消毒6 min和4 min。从表2可见,采用二步灭菌法灭菌的外植体其褐化率和污染率均比

维普资讯 http://www.cqvip.com

一步灭菌法略低,而愈伤组织诱导率却比一步灭菌法高,因此,二步灭菌法优于一步灭菌法。经过一周暗培养后再进行光培养,其褐化率比在全光照下培养更低,可能与暗培养抑制了酚类化合物的合成有关。

表1 基本培养基对费约果不同外植体愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of basal medium on the induction of callus from different explants of *Feijoa*

基本培养基 Basal medium	褐化率 Browning (%)		污染率 Rate of contamination (%)		愈伤组织诱导率 Rate of callus induced (%)	
	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud
1/2MS	25.00a	30.00bc	36.67ab	40.00ab	38.33ab	30.00ab
MS	31.67a	26.67c	16.67b	30.00b	51.67a	43.33a
WPM	33.33a	40.00ab	53.33a	48.33a	13.33c	11.67c
B_5	35.00a	48.33a	40.00ab	33.33b	25.00bc	18.33bc

同列数据后不同小写字母表示0.05显著差异水平。Data following different small letters in the same column present significant difference at 0.05 level.

表2 灭菌方法和光处理方式对费约果不同外植体愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of sterilization method and light on induction of callus from different explants of *Feijoa*

		褐化率 Browning (%)		污染率 Rate of contamination (%)		愈伤组织诱导率 Rate of callus induced (%)	
		嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud
灭菌 Sterilization	一步法 One-step method	25	21.67	30	40	45	38.33
	二步灭菌法 Two-step method	16.67	20	26.67	35	56.67	45
光照 Light	全光照培养 Culture in light	23.33	25	10	30	66.67	45
	暗培养一周再光培养 Culture in dark a week, then in light	20	5	6.67	45	73.33	50

2.3 适宜的活性炭浓度和青霉素浓度

从表3可看出,以嫩叶为外植体时,除对照外,随着活性炭(AC)浓度的增加褐化率有降低的趋势,当AC浓度达到3.0 g L^{-1}时,嫩叶的褐化率最小。2.0 g L^{-1}时的污染率显著低于对照、1.0 g L^{-1}和3.0 g L^{-1};其愈伤组织诱导率的高低依次为2.0 g L^{-1} > 3.0 g L^{-1} > 0 g L^{-1} > 0.5 g L^{-1} > 1.0 g L^{-1}。以带芽茎段为外植体时,最低褐化率、最低污染率和最高愈伤组织诱导率均出现在AC浓度为3.0 g L^{-1}时,分别为20%、15%和65%,与其它处理存在显著差异。因此,嫩叶和带芽茎段愈伤组织诱导的最佳活性炭浓度分别为2.0 g L^{-1}和3.0 g L^{-1}。

以嫩叶为外植体时,不同青霉素浓度处理之间的褐化率不存在显著性差异。当青霉素浓度为200 mg L^{-1}时,污染率仅为6.67%,显著低于其它处理;最高愈伤组织诱导率(76.67%)也出现在青霉素浓度为200 mg L^{-1}时,且显著高于其它处理。以带芽茎段为外植体时,青霉素浓度为200 mg L^{-1}时的褐化率最低(10%),与100 mg L^{-1}和150 mg L^{-1}处理的存在显著性差异。除对照外,随着青霉素浓度的升高,污染率也有升高的趋势,当青霉素浓度为50 mg L^{-1},污染率只有10.00%;50 mg L^{-1}浓度下的污染率显著低于对照、150 mg L^{-1}和200 mg L^{-1}浓度处理的;50 mg L^{-1}浓度下的愈伤组织诱导率最高,达到65%。因此,嫩叶和带芽茎段愈伤组织诱导的最佳青霉素浓度分别为200 mg L^{-1}和50 mg L^{-1}。

2.4 适宜的生长调节剂组合

从表4可见,以嫩叶为外植体时,培养基7和9的褐化率仅为6.67%,而其它组合均在10%以上,且培养基7和9与培养基2、3、4、6存在显著性差异。最低污染率(6.67%)出现在组合6。培养基7和8的愈伤组织(图1A)诱导率最高,已达到了76.67%,且培养基7、8、9的愈伤组织诱导率显著高于培养基1和4。因此,嫩叶的最佳生长调节剂组合为培养基7和8。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 活性炭和青霉素对费约果不同外植体愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of contents of actived charcoal and penicillin on induction of callus from different explants of *Feijoa*

		褐化率 Browning (%)		污染率 Rate of contamination (%)		愈伤组织诱导率 Rate of callus induced (%)	
		嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud
活性炭 Actived charcoal (g L^{-1})	0	23.33b	25.00bc	10.00a	30.00ab	66.67bc	45.00a
	0.5	43.33a	28.33ab	3.33ab	43.33a	53.33c	28.33b
	1	26.67b	41.67a	13.33a	31.67a	60.00c	26.67b
	2	18.33b	30.00ab	0.00b	45.00a	81.67a	25.00b
	3	15.00b	20.00c	10.00ab	15.00b	75.00ab	65.00a
青霉素 Penicillin (mg L^{-1})	0	23.33a	25.00bc	30.00a	30.00bc	46.67b	45.00ab
	50	16.67a	25.00bc	30.00a	10.00d	53.33b	65.00a
	100	10.00a	45.00a	36.67a	20.00cd	53.33b	35.00b
	150	16.67a	28.33ab	23.33ab	43.33ab	60.00b	28.33b
	200	16.67a	10.00c	6.67c	50.00a	76.67a	40.00ab

同列数据后不同小写字母表示0.05显著差异水平。Data following different small letters in the same column present significant difference at 0.05 level.

表4 不同生长调节剂组合对费约果不同外植体愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of combination of different growth regulators on induction of callus from different explants of *Feijoa*

处理 Treatments*	褐化率 Browning (%)		污染率 Rate of contamination (%)		愈伤组织诱导率 Rate of callus induced (%)	
	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud	嫩叶 Leaf	带芽茎段 Shoot with bud
1	10.00bc	30.00ab	43.33a	40.00b	46.67b	30.00bc
2	30.00a	13.33d	10.00c	40.00b	60.00ab	46.67ab
3	26.67a	15.00cd	16.67bc	35.00b	56.67ab	50.00a
4	23.33ab	30.00ab	30.00ab	35.00b	46.67b	35.00ab
5	16.67abc	13.33d	20.00bc	36.67b	63.33ab	50.00a
6	26.67a	25.00abcd	6.67c	70.00a	66.67ab	5.00e
7	6.67c	38.33a	16.67bc	46.67b	76.67a	15.00d
8	13.33abc	18.33bcd	10.00c	48.33b	76.67a	33.33abc
9	6.67c	28.33abc	20.00bc	53.33b	73.33a	18.33cd

* 处理1~9依次为嫩叶和带芽茎段诱导试验的培养基。Treatments 1~9 present mediums for callus induction from leaf and shoot with bud, respectively. 同列数据后不同小写字母表示0.05显著差异水平。Data following different small letters in the same column present significant difference at 0.05 level.

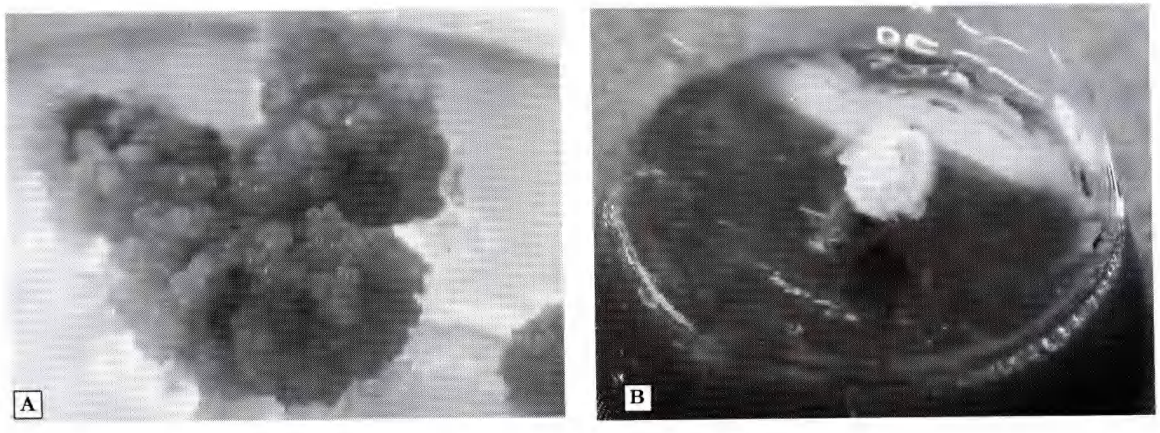

图1 费约果嫩叶(A)和带芽茎段(B)诱导的愈伤组织

Fig. 1 The callus tissues introduced from leaf (A) and shoot with bud (B) of *Feijoa*

维普资讯 http://www.cqvip.com

以带芽茎段为外植体时,培养基2和5的褐化率最低,仅为13.33%,与培养基1、4、7、9存在显著性差异。培养基6的污染率高达70%,与其它培养基存在显著性差异。培养基3和5的愈伤组织(图1B)诱导率最高,其次是培养基2,培养基3和5显著高于1、6、7、9。因此,带芽茎段的最佳生长调节剂组合为培养基3和培养基5。

3 讨论

以嫩叶为外植体时,愈伤组织诱导率最低为32.08%,最高为70%,平均为57.54%。而以带芽茎段为外植体时,愈伤组织诱导率最低为25.83%,最高为47.5%,平均为37.86%。由此可见,嫩叶比带芽茎段更适合作为外植体。

Bhojwani等[3]报道以2 a生费约果实生苗的带芽茎段为外植体时可发生100%萌芽率;当用3 a生的实生苗为外植体时,其萌发率降至12%。由此可见,植株年龄越大,其外植体的愈伤组织诱导率越低。本试验所采用的材料为4 a生费约果实生树,其植株年龄偏大,对试验结果有较大的影响。因此,应尽量选择幼龄植株作为外植体。

由于费约果属异花授粉木本植物,叶片和带芽茎段诱导再生的能力通常受到限制。Canhoto和Cruz研究了费约果的嫩叶形成能力,把嫩叶接种到加有2,4-D和BAP的培养基中诱导愈伤组织,50 d后愈伤组织诱导率不到10%[5]。而本试验的嫩叶平均愈伤组织诱导率为57.54%,明显高于Canhoto等[5]以嫩叶为外植体时的平均愈伤组织诱导率(20%);外植体污染率、平均褐化率也比王丹等[6]报道的更低。

尽管本试验采用了多种灭菌和培养方式,添加了不同浓度的活性炭、抗生素和抗氧化剂等物质,对组织培养过程中褐化率和污染率的降低起到了一定的效果,但并没有从根本上解决其问题,嫩叶和带芽嫩茎的褐化率和污染率均在20%以上,可能与植物体内的酚类化合物和内生菌等有关。这两个因素都与诱导率存在着直接的联系,因此,只有更进一步寻求降低褐化率和污染率的措施,才能从本质上提高愈伤组织诱导率。可考虑将酚类化合物和内生菌通过组织学等方法分离后鉴别其种类,选择有效的一种或多种抗氧化剂和抗生素,以从根本上解决褐化和污染问题。

参考文献

[1] David Bateman Ltd. *Feijoas* — Origins, Cultivation and Uses [M]. New Zealand: The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd, 2002: 7-79.

[2] 福井正夫, 陈石榕. 费约果的生物特性与栽培技术[J]. 福建热作科技, 1985(2): 42-46, 50.

[3] Bhojwani S S, Mullins K, Cohen D. Micropropagation of *Feijoa sellowiana* Berg. [C]// ISHS Acta Horticulture 212: Symposium on *in vitro* Problem Related to Mass Propagation of Horticultural Plants. Brussels: ISHS, 1997: 69-76.

[4] Stefanello S, Luiz L, Vesco D, et al. Somatic embryogenesis from floral tissues of *Feijoa* [J]. Sci Hort, 2005, 105: 117-126.

[5] Canhoto J M, Cruz G S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg.) [J]. Protoplasma, 1996, 191(1-2): 34-35.

[6] Wang D(王丹), Liu R D(刘仁道), Zhang D X(张冬雪), et al. Preliminary study on the technique of tissue culture in *Feijoa*, the new species of fruit tree for edible and ornament [J]. Chin South Fruit Tree(中国南方果树), 2007, 36(2): 21-23.(in Chinese)