

文章编号: 1008-7826 (2006) 02-0074-04

文旦柚和下河蜜柚组织培养快速无性繁殖

邹金美, 余金富, 叶国利, 李长选, 吴玲玲, 林荣福, 潘一山

(漳州师范学院 生物科学与技术系, 福建 漳州 363000)

摘 要: 对两种柚类的茎尖和幼嫩的茎段进行组织培养快速无性繁殖, 研究结果表明: 不同柚类的培养结果不同, 文旦柚的繁殖系数大于蜜柚的, 为 386.2%; 文旦柚不同外植体的培养结果是带腋芽的茎段的繁殖系数大于茎尖, 差异达到极显著; 茎段在附加激素的基本培养基 MS 上培养诱导形成不定芽, 低浓度的奈乙酸 (NAA) 和 6-苄基嘌呤 (6-BA) 对外植体的成活率没有显著影响, 激素浓度升高则会显著影响外植体的成活率; 培养基以 MS 添加 6-BA 0.5 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 的培养效果最好, 繁殖系数达到 407.1%, 与其它处理差异达到极显著水平;

关键词: 文旦柚; 蜜柚; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号:

S663.3; Q943.1

文献标识码:

A

1 引言

柚 (*Citrus grandis* Osbeck cv.), 为芸香科柚属的一个重要的经济果树, 柚原产中国, 具营养、保健、医疗、加工和绿化等综合利用价值。目前我国柚类栽培面积和产量均居世界第一位, 面积已达 19.93 万 hm^2 , 占我国柑桔总面积的 11.9%, 产量 128 万 t, 占全国柑桔总产量的 11.7%; 但柚类早、中、晚熟品种搭配不合理现象十分突出, 10 月中旬至 11 月上中旬成熟的柚类占 78% 左右, 极早熟和早熟柚类仅占 21%^[1]。漳州市是福建省乃至全国柚类主产区之一, 年产柚类约 $8.5 \times 10^4 \text{t}$, 也是以中晚熟品种为主, 早熟柚类极少。所以必须加强培育早熟的柚类品种适应市场的需求。文旦柚: 福建漳州、浙江玉环和台湾为主要产区; 文旦柚果实圆锥状扁圆形, 果形指数 0.90, 单果重 1000–1500g, 果皮黄色光滑, 果肉黄白色, 脆嫩化渣, 多汁, 富清香, 风味酸甜偏甜, 味较浓; 品质上等; 果实早熟于 10 月上中旬成熟, 较耐贮运, 丰产。蜜柚: 福建云霄县为主要产区; 果实倒卵形或梨形, 果形指数 1.04, 单果重 1000–2000g, 果皮黄色, 果肉细嫩化渣, 汁多, 风味酸甜, 较浓; 果实较早熟性于 10 月下旬采收, 耐贮运, 丰产稳产性好^[1]。所以增大文旦柚和蜜柚的种植面积, 对促进柚类的早、中、晚熟品种搭配及产品结构调整, 延长市场供应期, 形成优势产业具有重要的实践意义。

柚类传统繁殖方式存在种子播种发芽率低, 需要解除限制因素等弊端, 且其遗传性状易产生较大变异, 扦插成活率低, 嫁接成活率较高但成本太高。所以不能适应市场上对柚类良种大规模发展需要。通过组织培养进行良种柚快速繁殖可以克服传统方法费工费时的缺点, 又能获得具有高度一致和优良表型的群体; 而且高效、稳定的快速繁殖体系是后继育种的基础 (如为苗木繁育、诱变育种和遗传转化^[2]等创造条件)。柚类属多年生木本植物, 其组织培养的难度远比草本植物大, 尤其是成年树的组织进行离体培养时, 诱导不定芽和根系的分化方面难度更大; 目前仅有沙田柚等有少量研究^{[3][4][5]}, 文旦柚和蜜柚的组织培养快速繁殖系统研究少见报道。此外繁殖系数因材料不同或其它原因重复性差, 因此从遗传育种角度出发, 有必要对文旦柚和蜜柚进行组织培养建立快速繁殖体系进行研究。

收稿日期: 2006-03-10

作者简介: 邹金美(1973-), 福建浦城人, 讲师, 硕士。

2 材料与方法

2.1 植物材料

供试材料: 文旦柚采自福建长泰县文旦柚产区, 下河蜜柚采自福建云霄县下河蜜柚主产区; 取两种柚类成年树上的嫩枝作为试验材料。

2.2 方法

2.2.1 取材

取文旦柚和下河蜜柚成年树幼嫩枝条上的健壮且饱满的茎尖和幼嫩茎段(带有腋芽的)进行组织离体培养。

2.2.2 组织培养

灭菌: 在超净工作台上, 将取好的茎尖和茎段用消毒剂灭菌后, 用无菌水冲洗三至五次, 再置于已灭菌(高压灭菌: 121℃、20 min)的滤纸上用小刀分割材料, 取1 cm长茎尖和茎段接种。

接种: 将已消毒的茎尖或茎段接种到优化的MS培养基中。每处理一般接种30个, 培养50 d后进行统计分析。

诱导培养: 以MS为基本培养基, 均添加蔗糖3%、琼脂0.7%、PH5.8左右, 不同处理结合添加不同浓度配比的细胞分裂素和生长素进行配方筛选。

培养条件: 接种好的培养基放置到培养室中培养, 培养室温度保持在(25±2)℃, 每天光照12 h, 光照强度1200-1800 Lx。

3 结果与分析

3.1 材料基因型对培养结果的影响

本试验中均采用基本培养基MS添加6-BA0.5 mg/L和NAA0.2 mg/L, 对文旦柚和蜜柚的幼嫩茎段进行组织培养快速繁殖, 比较不同基因型的培养情况。外植体接种后放于培养室培养, 培养过程中观察: 外植体接种一周后, 其茎段切口处逐渐有少量乳白色至淡黄色致密的愈伤组织出现, 三周左右开始从切口处陆续产生不定芽, 形成丛生芽, 30 d后外植体不定芽达到最高峰。其培养结果列于表1。

表1: 不同基因型繁殖系数的比较

基因型	外植体数(个)	出芽外植体数(个)	芽生长情况	总芽数(个)	繁殖系数(%)
文旦柚	30	29	丛生较壮	112	386.2
蜜柚	30	28	丛生较壮	87	310.7

由表1可见: 柚类组织培养不定芽的诱导率(即繁殖系数)受供体材料基因型的影响较大。文旦柚的繁殖系数为386.7%, 显著优于蜜柚的繁殖系数。可见基因型不同, 不定芽的诱导能力不同。因此可通过筛选繁殖系数较高的基因型进行快速繁殖, 提高柚类组织培养的不定芽诱导的效率。

3.2 不同外植体的培养结果

本试验以文旦柚为试材, 采用相同的培养基(基本培养基MS添加6-BA0.5 mg/L和NAA0.2 mg/L)比较不同外植体的培养情况。培养结果列于表2。

从表2可知: 文旦柚茎尖和茎段离体培养中, 大部分的外植体都可以出芽, 而且都能够形成丛生芽, 丛生芽生长势较强; 其繁殖系数受外植体的影响较大, 茎段的繁殖系数355.2%大于茎尖256.7%, 差异达到显著水平。

表 2: 不同外植体对繁殖系数的影响

外植体	外植体数	出芽外植体数	芽生长情况	总芽数	繁殖系数(%)
茎尖	30	30	丛生较壮	77	256.7
茎段	30	29	丛生较壮	103	355.2

3.3 不同激素组合对培养结果的影响

本次实验采用文旦柚茎段为外植体诱导不定芽,以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA 和 NAA,比较两种激素不同浓度的配比对文旦柚快速繁殖的影响.接种 50 d 后,统计不定芽,统计结果列于表 3.

表 3: 不同激素组合对快速繁殖的影响

激素浓度(mg/L)		外植体数	出芽外植体数	总芽数	繁殖系数(%)
6-BA	NAA				
0	0	30	30	30	100.0
0.25	0	30	30	79	263.3
0.25		30	27	61	225.9
0.2		30	19	22	115.7
0.25					
0.5					
0.5	0	30	29	95	327.6
0.5		30	28	114	407.1
0.2		30	24	51	212.5
0.5					
0.5					
0.75	0	30	27	79	292.6
0.75		30	26	88	338.5
0.2		30	21	43	204.8
0.75					
0.5					
1.0	0	30	22	57	259.1
1.0		30	20	56	280.0
0.2		30	16	25	156.3
1.0					
0.5					

由表 3 还可以看出:当培养基中添加低浓度的 6-BA 和 NAA 时,对外植体的成活率没有显著的影响,但随着两种激素浓度增加,外植体的成活率明显降低,当激素浓度达到最大(6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L)时,只有 16 个外植体出芽,将近一半的外植体死亡.数据还表明:在不添加激素的培养基中培养,茎段只有其本身的腋芽原基分化形成腋芽,均未有不定芽的生成;在只添加 6-BA 的情况下,低浓度时,随着 6-BA 浓度的增加,繁殖系数随之增大,6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时,其繁殖系数最大达到 327.6%,进一步增加 6-BA 的浓度时,繁殖系数反而降低;当在培养基中同时添加两种激素时,以 6-BA 0.5 mg/L、NAA 0.2 mg/L 激素配比的培养基的繁殖系数最高,达到 407.1%,与其它处理的差异达到极显著;当细胞分裂素浓度/生长素的小于 1 (6-BA 0.25 mg/L、NAA 0.5 mg/L) 时,繁殖系数很小只有 115.7%.因此,初步认为细胞分裂素 6-BA 与生长素 NAA 以大于 1 且浓度配比适当时,有利于丛生芽的诱导和分化.

4 讨论

本研究中, 对文旦柚和下河蜜柚带腋芽的茎段进行离体培养, 文旦柚的繁殖系数为 386.7%, 显著优于蜜柚的繁殖系数。可见柚类组织培养不定芽的诱导率(即繁殖系数)受供体材料基因型的影响较大, 即存在明显的基因型效应; 因此可通过筛选较高繁殖系数的基因型进行快速繁殖, 提高柚类组织培养的不定芽诱导的效率。

对不同的外植体茎尖段和茎段进行离体培养, 发现茎段的快速繁殖系数高于茎尖段的, 笔者认为这可能是由于茎尖端本身的内源生长素浓度高于茎段的, 形成顶端优势影响了柚类不定芽的诱导, 从而降低了繁殖系数。所以笔者建议在进行快速繁殖时以除去茎尖端的茎段(带有腋芽的)作为外植体进行不定芽的诱导。

一直以来柚类组织培养快速繁殖都难以达到生产实用阶段, 其原因之一是柚属于木本植物, 在组培上有一定难度, 其繁殖系数不高, 不定芽成苗困难^[5]; 另一个原因是试管苗生根困难, 目前, 国内外大多数学者采用茎尖微芽嫁接技术来克服柑橘离体快繁生根困难的问题^{[6] [7] [8]}。本试验只对柚类不同的基因型、文旦柚不同的外植体和不同激素配比对文旦柚繁殖系数的影响进行了初步研究; 在外植体的选择上, 有的研究人员采用子叶^{[3] [9]}、上下胚轴^{[3] [6]}或叶片^[10]进行快速繁殖, 取得了一定成效, 但相关研究还有待进一步开展。

参考文献:

- [1] 何天富主编. 中国柚类栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999, 13-38.
- [2] Pena L, Cervera M, Juarez J, et al. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus[J]. Plant Sci, 1995, 104(2).
- [3] 董高峰, 黄涛, 李耿光, 张兰英. 沙田柚不同外植体离体培养与植株再生的研究[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(5).
- [4] 韩美丽, 吴耀军, 黄华艳, 唐玉贵. 沙田柚不同外植体培养再生体系建立研究[J]. 广西林业科学, 2001, 30(4).
- [5] 董高峰, 黄涛, 李耿光, 张兰英. 沙田柚茎尖嫁接苗离体培养的研究[J]. 生态科学, 2001, 20(3).
- [6] Singh S, Pay BK, Deka PC. Micropropagation of Citrus jambhiri cultivar ough lemon[J]. Journal of Interacademia, 1999, 3(2).
- [7] 陈菁英, 宋瑞琳, 陈景耀. 枳和枳橙的茎尖培养与增殖研究[J]. 福建农业学报, 1991, 6(1).
- [8] 林柏年, 胡春根, 沈德绪. 甜橙成年树侧芽离体繁殖诱导成苗研究[J]. 园艺学报, 1997, 19(3).
- [9] 黎众魁, 徐罕伦, 汪德耀. 芦柑子叶培养中过氧化物酶活性及其同功酶的变化[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2003.
- [10] 黄涛, 董高峰, 李耿光, 张兰英. 影响沙田柚叶片离体培养因素研究[J]. 广西植物, 2003, 23(6).

Studies on the Technique of Tissue Culture in Vitro and Rapid Propagation of Citrus Grandis cv. Wendan and Citrus Grandis cv. Miyou

ZOU Jin-mei, YU Jin-fu, YE Guo-li, LI Chang-xuan, WU Ling-ling, LIN Rong-fu, PAN Yi-shan

(Department of Biological Science & Technology, Zhangzhou Normal college, zhangzhou, Fujian 363000, China)

Abstract: Citrus grandis cv. Wendanyou and Citrus grandis cv. Miyou were used in the study of Tissue Culture in vitro. The main results were as follows: The shoots induction frequency varied significantly among different genotypes. The optimal explant was stem with axillary buds. Cultural media on adventitious shoots induction were investigated. The results showed that MS medium supplemented with 6-BA 0.5 mg/L and NAA 0.2 mg/L was the best to induce the adventitious shoots, and induction percentage of rapid propagation was 407.1%.

Key word: citrus grandis cv. wendanyou; citrus grandis cv. miyou; tissue culture; rapid propagation.