

番荔枝组织培养初步研究

张振霞, 郑玉忠 (韩山师范学院生物系, 广东潮州 521041)

摘要 对番荔枝的组织培养技术进行了研究。结果表明:以幼叶为外植体,采用 NB+2,4-D 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 作为愈伤诱导培养基以及 12 h 光照处理,出愈率可达到 87.50 %;最佳分化培养基为 NB+TDZ 1 mg/L+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L,分化率为 28.89 %。
关键词 番荔枝;组织培养;愈伤组织
中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)14-04110-02

Preliminary Study on Tissue Culture of *Annona squamosa* L.
ZHANG Zhen-xia et al (Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041)
Abstract Tissue culture technology of *Annona squamosa* L. was studied. Results showed that burgeon of *Annona squamosa* L. was good explants and the optimal medium for callus inducement was NB+2,4-D 1 mg/L +6-BA 0.5 mg/L with 12 h light. And the callus induction rate was up to 87.50 %. The optimal differentiation medium was NB +TDZ 1 mg/L+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L and the differentiation rate was 28.89 %.
Key words *Annona squamosa* L.; Tissue culture; Callus

番荔枝(*Annona squamosa* L.)属番荔枝科番荔枝属,其果实不仅营养丰富,且药用价值极高。随着人们生活水平的提高和保健意识的增强,对番荔枝的需求量也就越来越大。为了满足人们的需求,推广番荔枝优良品种势在必行。番荔枝目前主要依赖种子及切接等方式来进行繁殖。但是作为雌雄异花植物,番荔枝的种子量少且萌发率低;另外种子繁殖容易丧失母体的某些优良性状。而传统的切接技术又易受气候、季节影响,种植成活率低。这些因素极大地影响了番荔枝的产业化开发。

采用组培快繁技术能克服上述传统繁育方式中的不利因素^[1]。组培苗能够保持母株优良性状,减少病虫害传播,实现全天候育苗,节省时间和空间,为工厂化育苗提供理论和技术基础。笔者初步建立起一套高效稳定的番荔枝组培快繁技术体系,旨在加速番荔枝优良品种的应用与推广,实现其产业化开发。

1 材料与方法

1.1 供试材料 番荔枝品种为“樟林番荔枝”,采自广东澄海盐鸿镇樟林果园。选取生长良好、无病虫害的优良母株的带叶嫩梢作为试验材料。

1.2 培养基 基本培养基:MS^[2]和 NB^[3];愈伤诱导培养基:基本培养基+2,4-D +6-BA;分化培养基:基本培养基+NAA+KT +6-BA;生根培养基:1/2 MS 基本培养基+NAA+MET。

1.3 方法

1.3.1 基本培养基对番荔枝愈伤组织诱导频率的影响。 分别使用 MS、1/2 MS、NB 基本培养基,对番荔枝幼叶、较成熟叶、茎段进行愈伤组织诱导。

1.3.2 不同浓度 2,4-D 对番荔枝愈伤组织诱导率的影响。 分别设定 0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L 7 个不同浓度的 2,4-D,在 NB 培养基上对番荔枝幼叶进行愈伤组织诱导。

1.3.3 不同浓度 6-BA 对番荔枝愈伤组织诱导率的影响。 在添加 2 mg/L 2,4-D 的 NB 基本培养基的基础上,设定了 0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L 7 个不同浓度 6-BA 作为试验处理,研究其对番荔枝幼叶愈伤组织诱导率的影响。

1.3.4 不同光照时间对番荔枝愈伤组织诱导率的影响。 12 h 光照和全黑暗条件下培养,比较番荔枝幼叶的愈伤诱导情况。

1.3.5 不同细胞分裂素对番荔枝愈伤分化的影响。 在添加 2.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 的培养基上,比较了 1 mg/L TDZ 和 1 mg/L KT 对番荔枝愈伤分化率的影响。

1.4 培养条件 每月继代 1 次。培养条件为:温度(26±2)℃,光照 12 h/d,光照强度 2 000 lx。

1.5 评价指标 诱导率(%)=出愈外植体数/接种外植体数×100;分化率(%)=出芽愈伤数/接种愈伤数×100。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对番荔枝不同外植体愈伤组织诱导率的影响 不同培养基中的碳源、无机元素、有机添加剂等含量不同,导致对植物材料愈伤诱导的影响也各不相同。由表 1 可见,NB 基本培养基的愈伤诱导率最高,MS、1/2 MS 基本培养基的愈伤诱导率较低,可见 NB 培养基优于 MS 培养基,两者差异极显著(P<0.01)。

表 1 不同基本培养基对番荔枝愈伤组织诱导频率的影响

培养基	外植体	接种外植体数	出愈外植体数	出愈时间//d	出愈率//%
MS	幼叶	45	24	38	53.12 aA
	叶	44	13	41	30.01 cC
	茎段	42	16	37	38.47 bB
1/2 MS	幼叶	36	21	35	57.22 aA
	叶	40	13	38	32.56 bB
	茎段	40	11	40	28.14 bB
NB	幼叶	30	22	30	72.22 aA
	叶	48	16	38	34.27 cC
	茎段	30	12	36	40.85 bB

注:表中不同大小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。下表同。

3 种外植体的比较中,幼叶较好,在接种后 10 d 就出现初始愈伤化,30 d 左右完全愈伤化;而成熟叶则容易褐化,严重的甚至死亡,出愈率低,且出愈时间长;茎段的出愈率和出愈时间则介于两者之间。

2.2 不同浓度 2,4-D 对番荔枝愈伤组织诱导率的影响 由表 2 可见,在没有添加 2,4-D 时,无法诱导出愈伤组织;随着 2,4-D 浓度的升高,番荔枝愈伤组织的诱导率增加,在 2 mg/L 时达到最高峰,为 87.88 %;然后随着 2,4-D 浓度的增加,出愈呈下降趋势,到 10 mg/L 时出愈率降为 20.00 %。考

基金项目 国家星火计划项目(2005EA780080)。
作者简介 张振霞(1975-),女,甘肃兰州人,博士后,副教授,从事分子生物学研究。
收稿日期 2007-02-06

虑到过高浓度的 2,4-D 会影响后期愈伤组织的分化和发育,而且 1 mg/L 2,4-D 时的愈伤组织诱导率已达到 87.50 %。因此,该研究在后期的试验中采用了 1 mg/L 2,4-D 作为番荔枝幼叶的愈伤诱导剂浓度是合理的。

表 2 不同浓度2,4-D 对番荔枝愈伤组织诱导率的影响			
培养基//mg/L	接种数	出愈数	出愈率//%
NB+6-BA 0.5	18	0	0
NB+6-BA 0.5+2,4-D 0.2	30	20	66.67 bB
NB+6-BA 0.5+2,4-D 0.5	36	24	80.00 aA
NB+6-BA 0.5+2,4-D 1.0	32	28	87.50 aA
NB+6-BA 0.5+2,4-D 2.0	33	29	87.88 aA
NB+6-BA 0.5+2,4-D 5.0	32	28	87.50 aA
NB+6-BA 0.5+2,4-D 10.0	25	5	20.00 cC

2.3 不同浓度 6-BA 对番荔枝愈伤组织诱导率的影响 由表 3 可见,在 1 mg/L 2,4-D 的情况下,6-BA 的存在对番荔枝愈伤诱导的作用很重要,不添加 6-BA 时的愈伤诱导率是 0,而 0.5 mg/L 的 6-BA 对愈伤诱导有较明显的促进作用,此时的诱导率为 87.88 %。随着 6-BA 浓度继续增加,番荔枝的愈伤诱导率的增加不明显,同时愈伤却逐渐出现褐化现象。在诱导愈伤过程中,6-BA 的促进作用在于提高叶组织的细胞分裂能力,使得愈伤生长加快。高浓度时导致愈伤的褐化更加严重,这可能是由于细胞快速分裂生长,代谢产物过多造成的。低浓度的 6-BA 对番荔枝愈伤诱导有促进作用,而高浓度则容易影响愈伤组织的质量。因此,该试验中采用了 0.5 mg/L 6-BA 作为番荔枝幼叶的愈伤诱导剂浓度。

表 3 不同浓度 6-BA 对番荔枝愈伤组织诱导率的影响			
培养基//mg/L	接种数	出愈数	出愈率//%
NB+2,4-D 1.0	33	0	0
NB+2,4-D 1.0+6-BA 0.2	37	29	78.38 bB
NB+2,4-D 1.0+6-BA 0.5	33	29	87.88 aA
NB+2,4-D 1.0+6-BA 1.0	34	28	82.35 bB
NB+2,4-D 1.0+6-BA 2.0	37	27	72.97 cC
NB+2,4-D 1.0+6-BA 5.0	31	26	83.87 bB
NB+2,4-D 1.0+6-BA 10.0	34	23	67.65 dD

由表 2、3 可以看出,诱导番荔枝愈伤组织激素的适宜浓度为 1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA,此条件下的出愈率可以达到 87.50 %。

2.4 不同生长素对番荔枝愈伤组织诱导率的影响 在番荔枝愈伤诱导过程中,比较了 2,4-D、NAA、IBA、IAA 这 4 种不同生长素的作用。从表 4 可以看出:4 种激素对愈伤的诱导效果为 2,4-D>NAA>IAA>IBA;除了 IBA 外,其余 3 种激素对愈伤诱导都有较好的促进作用,1 mg/L 的 2,4-D、NAA 和 IAA 的愈伤诱导率分别是 87.50 %、84.85 %和 61.29 %;IAA 浓度为 2 mg/L 时,对番荔枝愈伤诱导率较低,为 21.88 %。

表 4 不同生长素对番荔枝愈伤组织诱导率的影响			
激素种类	激素浓度//mg/L	接种数	出愈数 出愈率//%
2,4-D	1	32	28 87.50 aA
	2	33	29 87.88 aA
NAA	1	33	28 84.85 aA
	2	33	26 78.79 bB
IBA	1	31	7 22.58 aA
	2	33	4 12.12 bB
IAA	1	31	19 61.29 aA
	2	32	7 21.88 bB

2.5 不同光照条件对番荔枝愈伤组织诱导率的影响 从表 5 可以看出,愈伤的出愈率在 12 h 光照条件下较高,为

86.84 %;在 2 种光照条件下,番荔枝愈伤组织的生长状况良好,12 h 光照条件下为绿色,而黑暗条件下愈伤组织为淡黄色。

表 5 不同光照条件对番荔枝愈伤组织诱导率的影响			
光照时间//h	接种数	愈伤数	出愈率//%
12	38	33	86.84 aA
0	32	18	56.25 bB

2.6 不同细胞分裂素对番荔枝愈伤组织分化率的影响 较高浓度的生长素用于诱导形成愈伤组织,当愈伤组织长到一定程度时,可除去生长素或用适当浓度活性较低的生长素,同时添加细胞分裂素,诱导愈伤组织形成芽。该试验比较了 TDZ 和 KT 2 种细胞分裂素的分化效果。TDZ (Thidiazuron,N-苯基-N'-1,2,3-噻二唑-5-脲)是一种合成的杂环芳香脲,作为一种苯脲代替物,在植物组织培养中表现出很高的细胞分裂素活性。TDZ 能诱导细胞内源分裂素的产生,抑制乙烯产物的积累。在苹果组织培养中已表明,TDZ 能促进芽的形成^[4]。从表 6 可以看出:番荔枝愈伤组织在含有 1 mg/L TDZ 的培养基上,生长 1~2 周后就开始分化出小芽,分化率为 28.89 %;而在含有 1 mg/L KT 的培养基上的分化率仅为 17.39 %。可见,1 mg/L TDZ 对番荔枝愈伤的分化效果好于 1 mg/L KT。

表 6 不同细胞分裂素对番荔枝愈伤组织分化率的影响				
培养基//mg/L	外植体	愈伤数	分化数	分化率//%
NB+NAA 0.5+6-BA 2+TDZ 1	幼叶	45	13	28.89 aA
NB+NAA 0.5+6-BA 2+KT 1	幼叶	46	8	17.39 bB

2.7 再生植株的生根培养 胚状体发育成小植株最初是从具有胚状结构的胚芽出现开始,紧接着叶和根发育形成完整的再生植株。在植物离体培养中,促根生长的基本培养基大多数使用低浓度的 MS 培养基,因此,该试验采用了 1/2 MS 基本培养基以降低无机盐浓度,促进生根。将诱导分化的丛生不定芽切割成具有 2~3 个不定芽的小块,分别接入附加了 1 mg/L NAA 和 1 mg/L MET 的 1/2 MS 培养基,9 d 后不定芽开始生根,30 d 生根率达到 95 %,幼苗株高达 1~3 cm。

3 小结

番荔枝的愈伤组织诱导、分化和植株再生受多种因素制约,这些因素包括基本培养基、培养基中各种激素种类和浓度、外植体、培养条件等。就该研究的范围内,最适于番荔枝的组织培养体系是:以 NB 为基本培养基,以幼叶为外植体,2,4-D 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 的激素浓度进行愈伤组织诱导;采用添加了 1 mg/L TDZ+2 mg/L 6-BA +0.5 mg/L NAA 的分化培养基作为愈伤组织分化培养基;使用 1/2 MS 培养基作为诱导生根培养基。

参考文献

[1] 赵沛基,彭丽萍,甘烦远,等.刺果番荔枝的组织培养[J].植物生理学通讯,2000,36(2):137.
[2] MURASHIGE T,SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J].Plant Physiol,1962, 15:473-497.
[3] 丁力,丁月云,曹守云,等.应用农杆菌转化水稻的研究[J].高技术通讯,1998,8(11):49-52.
[4] FASOLO F,ZIMMERMAN R H,FORDHAM.Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult,1989(16):75-87.