

石开明,方响亮. 贡水白柚组织培养快速繁殖技术[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):31-33.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.009

贡水白柚组织培养快速繁殖技术

石开明¹,方响亮²

(1. 湖北民族学院林学院园艺学院,湖北恩施 445000; 2. 湖北民族学院生物科学与技术学院,湖北恩施 445000)

摘要:为了探明贡水白柚组织培养快速繁殖高效系统的培养基类型和培养基配方,以沙田柚、蜜柚、红心柚、玉环柚 4 个品种为材料,研究柚组织培养过程中的关键技术。以 4 种柚成年嫁接树梢尖、带芽茎段为外植体,研究柚组织培养各环节的主要影响调控因子,建立有效贡水白柚组织培养快速繁殖体系。结果表明,柚种子发苗的最佳方案是成熟种子在半固体 1/2MS 培养基萌发后,再转至固体 MS 培养基上培养为宜;在激素配比中,最适合贡水白柚幼嫩茎段的 6-BA 浓度为 0.5mg/L, NAA 浓度以 0.2mg/L 为佳;不同外植体的培养诱导率表明,用春梢嫩茎段进行组织培养时出芽率高,生长迅速。

关键词:柚;组织培养;快速繁殖

中图分类号: S666.304+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0031-03

柚子是芸香科植物柚的成熟果实,柚果实清香、酸甜、凉润,营养丰富,药用价值很高,是人们喜食的名贵水果之一。柚果实是柑橘类果实中生长周期最长的品种,采摘期避开了柑果上市“洪峰”,加上柚果大而皮厚,非常适合贮藏,生产上辅以适当保鲜条件和贮藏调控库的特殊处理,便可周年供应,风味不减,成为柑果类中的“天然罐头”。

目前,国内柚苗木繁殖技术还相对落后,各种保护技术措

施不能得到落实,田间繁殖的柚苗木携带有很多病毒和病原体,在推广过程中容易造成病原传播,往往使得柚株生长不良,树势衰弱,产量减少,品质退化,给柚类生产带来严重影响。植物组织培养技术可以克服传统苗木繁殖方法易带毒的不足,同时能获得基因型统一、表型优良的一致性群体,应用植物组织培养技术对良种柚的苗木进行快速繁殖具有重要的意义。柑橘类组织培养快速繁殖研究,目前以甜橙和宽皮柑橘较多,关于柚的报道较少,一般也都是使用由种子萌发而产生的试管实生苗,并不能解决脱毒问题。在已有的试管苗的组培微繁殖研究中,涉及到有关不同外植体、上下胚轴、子叶和根尖等不同部位对芽苗分化的影响。目前,我国在研究柚类组培方面的试验材料已有沙田柚、砧板柚、文旦柚、下河蜜柚、酸柚^[1-5]等。通过实生繁殖要克服种子发芽的困难,嫁接无性繁殖用工成本高,不能适应良种柚苗木的快速大量推广和

收稿日期:2014-04-03

基金项目:湖北省教育厅项目(编号:Q20122902)。

作者简介:石开明(1980—),男,湖北大冶人,博士,讲师,主要从事林学院园艺植物遗传育种研究。E-mail:skm331@163.com。

通信作者:方响亮,硕士,实验师,主要从事野生动植物保护与利用研究。E-mail:94486529@qq.com。

- [10] Schachtman D P, Schroeder J I, Lucas W J, et al. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis KATI* cDNA [J]. Science, 1992, 258 (5088): 1654-1658.
- [11] Loqué D, Ludewig U, Yuan L, et al. Tonoplast intrinsic proteins *AtTIP2;1* and *AtTIP2;3* facilitate NH_3 transport into the vacuole [J]. Plant Physiology, 2005, 137 (2): 671-680.
- [12] Szczerba M W, Britto D T, Ali S A, et al. NH_4^+ -stimulated and -inhibited components of K^+ transport in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59 (12): 3415-3423.
- [13] Ludewig U, von Wirén N, Frommer W B. Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter *LeAMT1;1* [J]. Journal of Biochemistry, 2002, 277 (16): 13548-13555.
- [14] D'apuzzo E, Rogato A, Simon-Rosin U, et al. Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation spatial expression [J]. Plant Physiology, 2004, 134 (4): 1763-1774.
- [15] Sasakawa H, Yamamoto Y. Comparison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings [J]. Plant Physiology, 1978, 62 (4): 665-669.

- [16] Kronzucker H J, Britto D T, Davenport R J, et al. Ammonium toxicity and the real cost of transport [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6 (8): 335-337.
- [17] 丛郁, 杨顺瑛, 金曼, 等. 豆梨铵转运蛋白基因 *PcAMT1-1* 和 *PcAMT1-2* 的克隆与功能鉴定 [J]. 园艺学报, 2013, 40 (11): 2115-2126.
- [18] Loqué D, Mora S I, Andrade S L, et al. Pore mutations in ammonium transporter AMT1 with increased electrogenic ammonium transport activity [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284 (37): 24988-24995.
- [19] Wang M Y, Siddiqi M Y, Ruth T J, et al. Ammonium uptake by rice roots II. kinetics of NH_4^+ influx across the plasmalemma [J]. Plant Physiology, 1993, 103 (4): 1259-1267.
- [20] Xu J, Li H D, Chen L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2006, 125 (7): 1347-1360.
- [21] 张和臣, 叶楚玉, 夏新莉, 等. 逆境条件下植物 CBL-CIPK 信号途径转导的分子机制 [J]. 分子植物育种, 2009, 7 (1): 143-148.

应用。通过建立一套高速有效组织培养快速繁殖体系,才能克服上述弊端,从而为柚种质资源的基础研究、生产应用提供一条更好的途径。本研究分别以 4 个品种柚消毒的种子、营养器官外植体为材料,研究种子组织培养、激素浓度配比以及不同部位对柚组培快速繁殖的交互影响。

1 材料与方法

1.1 材料

柚组织培养快速繁殖系统的建立以沙田柚、蜜柚、红心柚、玉环柚成熟种子为试材。取成年柚子树上嫩叶、嫩茎尖、带芽茎段为外植体。柚嫁接树外植体组织培养供试品种取材为已挂果的 5 年生蜜柚、红心柚、沙田柚和玉环柚,取其梢尖、带芽茎段为外植体。沙田柚由湖北民族学院柚子园提供,蜜柚、玉环柚、红心柚由湖北省恩施市巴东县园艺场提供。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养 以 MS 和 1/2MS 培养基培养各品种柚成熟和未成熟种子。

1.2.2 不同激素浓度诱导不定芽 以 MS 培养基为基础,添加不同浓度 6-BA 和 NAA,具体培养基组成见表 1。

表 1 培养基激素浓度

序号	激素浓度 (mg/L)	
	6-BA	NAA
1	0	0.2
2	0	0.5
3	0	1.0
4	0.5	0.2
5	0.5	0.5
6	0.5	1.0
7	1.0	0.2
8	1.0	0.5
9	1.0	1.0

1.2.3 不同外植体培养 柚外植体的培养参见邹金美等的方法^[4],在 MS 培养基上辅以 0.5 mg/L 6-BA,0.2 mg/L NAA。4 个品种柚茎尖、茎段各设 40 个外植体处理,在组织培养条件下进行不定芽诱导。

1.3 材料消毒

研究培养条件为白天 25 ℃,夜晚 18 ℃;光照强度 1 000 ~ 2 000 lx;光暗周期 16 h/8 h;相对湿度 80%。琼脂用量为 6.0 g/L,培养基 pH 值 5.8。相关化学试剂的配制:75%的乙醇、0.1% 氯化汞、蒸馏水、MS 培养基、1/2MS 培养基。茎尖消毒:一般先取较大的茎尖,表面消毒后,再在无菌条件下借助解剖显微镜取出所需大小的茎尖培养。茎尖表面消毒:从柚母株上剪下带萌动的饱满芽嫩茎,作为外植体。先用蒸馏水浸泡 3 min,再用流水冲洗 30 min,用 6% NaClO 漂洗 10 min,然后转入超净工作台,用等体积 75% 乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次后,用 0.1% L 氯化汞灭菌 10 min。剥取生长点,切取茎尖顶端 1.5 mm 分生组织,转入无菌培养皿内,无菌滤纸吸干水,接种至 MS 培养基上进行培养。茎尖的剥离:在剥取茎尖时,把茎芽置于解剖镜下,1 只手用镊子将其按住,另 1 只手用解剖针将叶片和叶原基剥掉,解剖针蘸入 90% 乙醇并用火焰灼烧进行消毒。用解剖刀片切取分生组织时宜带 1 ~ 2 张幼叶,接种微茎尖时确保不与其他物体接触,只用解剖针接种即可。剥离茎尖时,应尽快接种,防止茎尖变干。茎段消毒:取健壮无病虫的幼嫩茎,去叶片剪成 3 ~ 4 cm 小段。在自来水中冲洗 1 ~ 3 h,用 75% 乙醇灭菌 30 ~ 60 s,再用 0.1% 氯化汞泡 25 min,最后用无菌水冲洗 4 ~ 5 次后接种。取材时优先利用顶部的外植体,其次也可利用腋芽,取茎上部的腋芽培养效果较好。

2 结果与分析

2.1 不同品种柚种子培养条件对种子萌发的影响

在固体和半固体的 MS、1/2MS 培养基上接种不同品种柚的成熟与未成熟种子做对比,试验结果见表 2。固体 1/2MS 培养基是常用于种子萌发的培养基。柚子在种子萌发阶段,种子在半固体培养基中比在固体培养基中更容易启动萌发,这可能与半固体培养基有更好的流动性有关,使营养成分能与种子充分的接触,更容易充分吸收营养的 MS 培养基作为组培常用的培养基,萌发出的无菌苗比 1/2MS 培养基上萌发的无菌苗更粗壮,这可能与 MS 培养基含有较高的无机元素有关。发苗的最佳方案是成熟种子在半固体 1/2MS 培养基上萌发后,转至固体 MS 培养基上培养。

表 2 不同培养条件对种子萌发的影响

试验号	培养基	培养基状态	种子类型	品种	萌发率 (%)	生长情况
1	MS	固体	成熟	沙田柚	78.0bc	萌发晚,生长良好
2	MS	固体	成熟	蜜柚	67.0c	萌发较早,部分黄化
3	MS	固体	成熟	红心柚	86.6ab	萌发早,生长良好
4	MS	固体	成熟	玉环柚	72.0a	萌发较早,生长较好
5	MS	半固体	未成熟	沙田柚	82.0ab	萌发早,生长良好
6	MS	半固体	未成熟	蜜柚	76.0bc	萌发早,生长缓慢
7	MS	半固体	未成熟	红心柚	81.3b	萌发早,生长较好
8	MS	半固体	未成熟	玉环柚	78.0bc	萌发早,生长缓慢
9	1/2MS	固体	未成熟	沙田柚	88.0ab	萌发较晚,幼苗较瘦弱
10	1/2MS	固体	未成熟	蜜柚	96.0a	萌发早,幼苗黄化、瘦弱
11	1/2MS	固体	未成熟	红心柚	84.3b	萌发较晚,幼苗较瘦弱
12	1/2MS	固体	未成熟	玉环柚	85.2b	萌发较晚,幼苗瘦弱
13	1/2MS	半固体	成熟	沙田柚	89.0ab	萌发较早,幼苗瘦弱
14	1/2MS	半固体	成熟	蜜柚	90.0a	萌发较晚,幼苗瘦弱
15	1/2MS	半固体	成熟	红心柚	92.4a	萌发较早,幼苗瘦弱
16	1/2MS	半固体	成熟	玉环柚	91.4a	萌发较晚,幼苗瘦弱

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。表 3、表 4 同。

2.2 不同激素组合对诱导不定芽的影响

不同激素浓度组合对幼嫩茎段诱导不定芽的影响见表 3。当培养基中 6-BA 和 NAA 的浓度搭配处于较低范围时,对外植体的出芽诱导影响不明显;随着激素浓度提高,外植体的诱导成活率却有一定程度降低,激素浓度为最大组合 1.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L NAA 时,外植体的芽诱导率为 27.5%~30.0%。结果表明,在未添加激素的基本 MS 培养基中,出芽诱导率很低,为 3.1%~4.8%,观察到出芽的基本是由腋芽分化形成,未有通过不定芽诱导出芽的;在低浓度范

围内,随着 6-BA 浓度的上升,出芽率也随之提高,当 6-BA 增加到 0.5 mg/L、NAA 浓度为 0.2 mg/L 时,诱导出芽率达到 90% 以上,当增加至 1.0 mg/L 时,出芽率下降至 30% 左右;单独分析 NAA 的影响可知,当添加 1 种激素 NAA 时,40 个外植体最多诱导产生 42 个不定芽,诱导分化率很低,只有搭配合适的 6-BA 和 NAA 配比才能有效促进不定芽的诱导和分化。结果表明,在基本培养基上添加 2 种激素的最佳组配浓度为 0.5 mg/L 6-BA、0.2 mg/L NAA 时,诱导效果与其他处理间差异明显。

表 3 不同激素组合对幼嫩茎段诱导不定芽的影响

激素 (mg/L)		蜜柚		沙田柚		红心柚		玉环柚	
6-BA	NAA	出芽率 (%)	总芽数 (个)	出芽率 (%)	总芽数 (个)	出芽率 (%)	总芽数 (个)	出芽率 (%)	总芽数 (个)
0	0.2	4.1d	2	4.8d	1	3.5d	0	3.1d	1
0	0.5	37.5bc	39	31.5bc	22	28.1bc	30	35.5bc	30
0	1.0	47.5b	38	47.5b	34	36.5b	42	55.5b	38
0.5	0.2	90.0a	98	92.5a	122	92.0a	111	91.0a	110
0.5	0.5	87.5a	109	77.5a	127	75.5a	129	76.0a	74
0.5	1.0	42.5b	65	55.0b	75	57.0b	73	50.0b	72
1.0	0.2	37.5bc	41	42.5bc	43	40.5bc	44	39.5bc	42
1.0	0.5	30.0bc	34	35.0bc	33	33.5bc	35	34.0bc	33
1.0	1.0	27.5bc	28	30.0bc	31	28.5bc	30	29.5bc	32

2.3 不同外植体的培养对不定芽发生的影响

通过对 4 个品种柚茎尖和茎段的外植体进行培养,研究对不定芽产生的影响,试验结果见表 4。通过前部分建立的柚最优体系培养的研究结果看出,各种类柚均能有效诱导出芽,出芽率均在 80% 以上,诱导形成的芽丛生且生长势强;不同外植体不同取材部位对诱导出芽率有较大影响,茎段最高的达 95.0%,高于茎尖最高的 87.5%,一般情况下,茎段可诱导形成 3~4 个丛生不定芽,茎尖则只有 2~3 个,有明显的差距。

表 4 不同外植体对不定芽发生的影响

品种	外植体部位	外植体数量 (个)	形成芽		芽生长情况	出芽所需时间 (d)
			出芽外植体数 (个)	不定芽诱导率 (%)		
沙田柚	茎段	40	38	95.0a	丛生	20
蜜柚	茎段	40	34	85.0b	丛生	24
红心柚	茎段	40	36	90.0a	丛生	23
玉环柚	茎段	40	34	85.0b	丛生	22
沙田柚	茎尖	40	35	87.5ab	丛生	15
蜜柚	茎尖	40	32	80.0c	丛生	17
红心柚	茎尖	40	34	85.0b	丛生	18
玉环柚	茎尖	40	33	82.5bc	丛生	16

3 结论与讨论

本研究通过对柚种子萌发条件、培养基激素组合以及不同外植体诱导的对比,研究贡水白柚组织培养各环节的主要影响调控因子,以期建立有效贡水白柚组织培养快速繁殖体系。结果表明,柚种子发苗的最佳方案是成熟种子在半固体 1/2MS 培养基上萌发后,再转至固体 MS 培养基上培养为宜;在激素配比中,最适合贡水白柚幼嫩茎段的 6-BA 浓度为 0.5 mg/L、NAA 浓度以 0.2 mg/L 为佳;不同外植体培养诱导率表明,春梢嫩茎段组织培养时出芽率高,生长迅速,可能与春梢外植体内含大量促进细胞生长分裂的激素和其他某些促进生长的调节物质有关。

相同品种不同取材部位外植体的再生能力不同,各品种柚茎段直接出芽能力均高于茎尖。相关研究表明,最初来自根段的茎尖外植体发生侧枝的数量和发生根的数量、长度、干质量及鲜质量都高于来自茎段的茎外植体和侧芽外植体^[6-7]。本试验对柚茎段、茎尖外植体直接出芽能力作了分析,结果表明,2 份品种均以茎段直接出芽能力最高,有利于快速繁殖和培养,从远离基部的表面诱导出芽苗的数目较多。

在离体繁殖时,多年生木本植物选择外植体的取材时期非常重要。耿文娟等研究表明,野生欧洲李组织培养时以 5~6 月的半年生枝梢为材料效果最好^[8]。本研究中进行组织培养的柚外植体主要取自发育成熟的春梢和部分早秋梢,时间因物候期稍有差异,本试验结果基本与前人研究结果一致。可能与新梢自身的发育状况有关,也可能与新梢发育过程中随季节变化体内内源激素种类、含量的变化有关。

参考文献:

[1] 韩美丽,吴耀军,黄华艳,等. 沙田柚不同外植体离体培养再生体系建立研究[J]. 广西林业科学,2001,30(4):166-168.
[2] 董高峰,黄涛,李耿光,等. 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):440-444.
[3] 梁倩华,王任翔,陈腾土,等. 砧板柚的组织培养[J]. 植物生理学通讯,1994,30(3):204-205.
[4] 邹金美,余金富,叶国利,等. 文旦柚和下河蜜柚组织培养快速无性繁殖[J]. 漳州师范学院学报:自然科学版,2006,18(2):74-77.
[5] 王任翔,梁倩华,陈腾土,等. 酸柚的组织培养[J]. 植物学通报,1996,13(S1):72-73.
[6] 张海平,周建峰,任目瑾. ‘海沃德’猕猴桃组织培养快速繁育技术研究[J]. 陕西林业科技,2011(2):8-11.
[7] 吴秀华,张艳玲,周月,等. ‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立[J]. 植物生理学报,2013,49(8):759-763.
[8] 耿文娟,吴玉霞,袁海英,等. 野生欧洲李组织培养技术[J]. 经济林研究,2009,27(1):45-48.