

刘义存, 黄天启, 林顺权. 枇杷属若干野生种叶片愈伤组织诱导和再分化[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 32–35.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.008

枇杷属若干野生种叶片愈伤组织诱导和再分化

刘义存^{1,2}, 黄天启², 林顺权²

(1. 仲恺农业工程学院, 广东广州 510225; 2. 华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642)

摘要:以枇杷属 5 个野生枇杷种、1 个杂交后代的叶片为外植体, 研究植物生长调节剂配比以及环境培养条件对叶片愈伤组织诱导和再分化的影响。结果发现, 5 个种愈伤诱导率达到了 100%; 最佳的诱导条件: 在 18 ℃ 下暗培养 10 d 后再转至全光照, 培养基配方为 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+1.0 mg/L 2,4-D; KT 和 TDZ 的组合使栎叶枇杷叶片愈伤组织产生胚状体, 诱导率最高为 21.43%, 生根率为 20.0%。本试验结果将为枇杷野生种的离体再生等生物技术研究提供一定的技术支撑。

关键词:枇杷属植物; 野生种; 叶片愈伤组织; 生长调节剂; 诱导; 再分化

中图分类号: S667.304+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0032-04

枇杷属 (*Eriobotrya*) 隶属于蔷薇科 (Rosaceae) 苹果亚科 (Maloideae), 原产于我国南方地区以及我国西南毗邻的东南亚几个国家, 共约有 30 余个种或变种。我国的野生枇杷种数约占世界的 2/3, 但根据多年来的调查发现, 野生枇杷资源正逐渐减少^[1-4]。从 20 世纪 80 年代开始, 我国就开始了一些关于枇杷叶片细胞工程及离体培养的研究, 如原生质体培养^[5-7]、胚乳愈伤组织诱导^[8]、叶片培养和愈伤组织诱导不定芽^[9-11]。虽然不断取得一些新进展, 但迄今为止绝大多数报

道都是关于栽培枇杷研究, 而关于野生枇杷的叶片诱导愈伤组织、愈伤组织诱导再分化的系统研究还未见报道。为此, 通过借鉴前人对普通枇杷叶片诱导愈伤组织的经验, 将研究建立相对可靠而普适的野生枇杷叶片离体培养诱导愈伤组织和再分化技术体系, 旨在为枇杷属栽培枇杷之外的各种枇杷种质资源离体保存、离体再生、细胞工程、转基因等研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

以枇杷属植物 5 个种、1 个属间杂种为试材 (表 1), 所有材料均来自华南农业大学枇杷属种质资源圃。

1.2 方法

1.2.1 叶片的接种 从胚离体培养成功 3 个月后的试管苗中, 以栎叶枇杷、台湾枇杷、台湾枇杷恒春变型、南亚枇杷窄叶变型、香花枇杷和石斑木×台湾枇杷等 6 个种的叶片为试材,

收稿日期: 2016-10-22

基金项目: 广东省科技基础条件建设项目 (编号: 2014A030304057、2015A030303015); 广东省广州市科技创新委资助华南农业大学国家重点实验室项目 (编号: 201504010028)。

作者简介: 刘义存 (1979—), 男, 广东潮州人, 博士, 讲师, 主要从事园艺植物种质资源与生物技术研究。E-mail: 373821312@qq.com。
通信作者: 林顺权, 男, 福建莆田人, 博士, 教授, 主要从事园艺植物种质资源、遗传育种与生物技术研究。E-mail: loquat@scau.edu.cn。

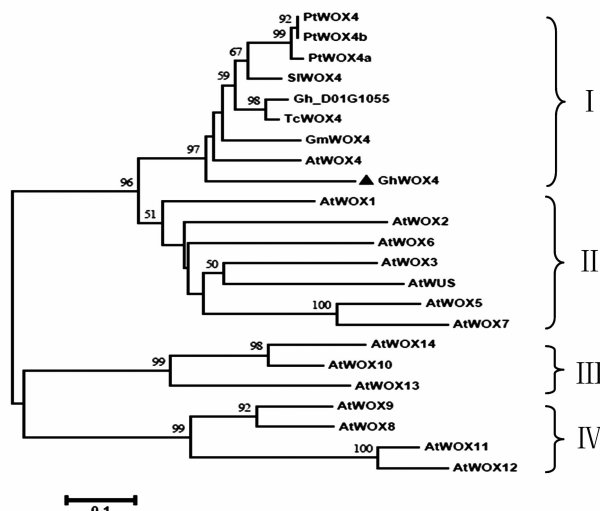


图5 陆地棉GhWOX4蛋白与其他植物WOXs蛋白系统进化树

表 1 试验材料

编号	中文名	学名	原产地
1	栎叶枇杷	<i>E. prinoides</i> Redh. & Wils	云南石屏
2	台湾枇杷	<i>E. deflexa</i> Nakai	台湾恒春
3	台湾枇杷恒春变型	<i>E. deflexa</i> f. <i>koshunensis</i>	台湾恒春
4	南亚枇杷窄叶变型	<i>E. bengalensis</i> f. <i>angustifolia</i> Vidal	云南昆明
5	香花枇杷	<i>E. fragrans</i> Champ	广东乳源
6	石斑木×台湾枇杷	<i>Rhaphiolepis indica</i> × <i>E. deflexa</i> Nakai	广东广州

在超净工作台上把无菌苗的叶片剪下来,切成约 0.5 cm × 0.5 cm 大小的叶块,叶背朝下,接种在胚培养基上。暗培养 10 d,再转为 24 h 全光照,第 20 天统计愈伤率。随后对愈伤组织进行再分化研究。

1.2.2 叶片的愈伤培养 光照条件及不同生长调节剂对叶片诱导愈伤组织试验的培养基本配方为:MS + (0.0.2 mg/L) 6-BA + (0.0.2 mg/L) KT + (0.1.0.3.0.6.0 mg/L) 2,4-D (单位下同),并做接种后全光照培养和接种后 10 d 暗培养的对比试验,选用材料为栎叶枇杷。

不同浓度 2,4-D 对 4 种枇杷属植物叶片诱导愈伤组织试验的培养基本配方:MS + 0.2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L KT + (1.0.3.0.6.0 mg/L) 2,4-D (单位下同),并黑暗培养 10 d,选用材料为台湾枇杷、台湾枇杷恒春变型、南亚枇杷窄叶变型、香花枇杷。

枇杷属植物与近缘属植物交杂后代叶片诱导愈伤组织试验培养基配方:MS + 1.0 mg/L 6-BA + (0.0.1 mg/L) NAA, MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + (0.1.0.8 mg/L) TDZ, MS + 0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ, MS + 0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L ZT, MS + 0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L 2IP, MS + 0.2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L KT + 1.0 mg/L 2,4-D。选用材料为石斑木×台湾枇杷。

1.2.3 叶片愈伤组织的再分化 不同生长调节剂对诱导叶片愈伤组织植株再生及生根试验培养基配方:MS + 1.0 mg/L 6-BA, MS + 1.0 mg/L KT, MS + 1.0 mg/L 2IP, MS + (1.0.2.0.3.0 mg/L) KT + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D, MS + (1.0.2.0.3.0 mg/L) ZT + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D,选用材料为台湾枇杷。

不同生长调节剂对枇杷属植物愈伤组织诱导胚状体及生根的试验培养基配方:MS + 0.5 mg/L TDZ + (0.0.5.1.0 mg/L) KT, MS + 0.5 mg/L TDZ + 0.5 mg/L 6-BA, MS + 0.1 mg/L TDZ + 1.0 mg/L 6-BA。选用材料为栎叶枇杷。

以上试验设置不同的试验组合,每处理 3 个重复。培养环境条件:温度(18 ± 1)℃,相对湿度 65% ~ 70%。本试验数据用 SPASS 11.0 软件进行方差分析,采用邓肯氏新复极差测验法进行平均数比较。

2 结果与分析

2.1 若干种枇杷属植物叶片愈伤组织的诱导研究

2.1.1 光照条件及不同生长调节剂对栎叶枇杷叶片诱导愈伤组织的影响 研究发现,单独使用 6-BA、KT、2,4-D 的处理,栎叶枇杷叶片愈伤率都相对较低;特别单独使用

2,4-D 的时候,愈伤率为 0;而 3 种生长调节剂的组合处理愈伤率都比较高,差异显著。在不同光照条件的处理中,10 d 的暗培养效果明显,愈伤率平均达到 57.78 百分点,比全光照下的平均高 17.78%。其中,0.2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L KT + 1.0 mg/L 2,4-D 组合经暗培养后,愈伤率达到 100%,差异性显著(表 2,图 1-A1)。结果表明,随着 2,4-D 浓度的升高,愈伤率产生下降趋势,高浓度的 2,4-D 对栎叶枇杷叶片愈伤组织诱导有抑制作用。

表 2 光照条件及不同生长调节剂对栎叶枇杷叶片诱导愈伤组织的影响

处理	生长调节剂浓度(mg/L)			愈伤率(%)	
	6-BA	KT	2,4-D	全光照	暗培养 10 d
1	—	0.2	—	0.00 ± 0.00c	40.00 ± 0.00c
2	0.2	—	—	39.50 ± 7.78b	50.00 ± 7.07b
3	—	—	1.0	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00d
4	0.2	0.2	1.0	80.00 ± 7.07a	100.00 ± 0.00a
5	0.2	0.2	3.0	80.00 ± 7.07a	96.67 ± 4.72a
6	0.2	0.2	6.0	40.00 ± 7.07b	60.00 ± 7.07b
平均				40.00	57.78

注:表中基本培养基为 MS,植物生长调节剂的浓度单位为 mg/L。表中同列数值后不同字母表示 0.05 水平上差异显著。下表同。

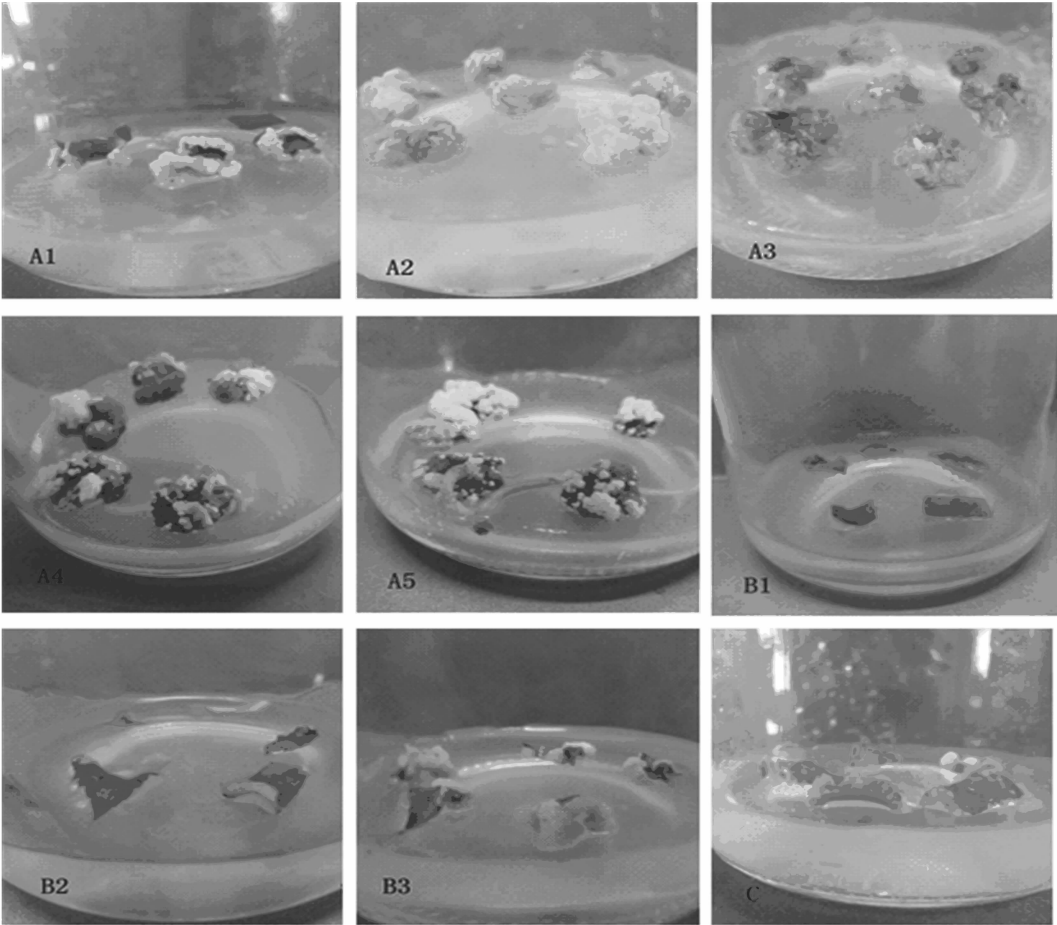
2.1.2 不同浓度 2,4-D 对几种枇杷属植物叶片诱导愈伤组织的影响 为了进一步验证 2,4-D 的最适浓度,本试验再以 4 种枇杷属植物叶片(图 1-B1)为试材,并黑暗培养 10 d。研究发现,随着 2,4-D 浓度的升高,愈伤组织的诱导率有下降的趋势。在 2,4-D 浓度为 1.0 mg/L 时,台湾枇杷(图 1-B2)、台湾枇杷恒春变型和香花枇杷的愈伤率都达到 100%;而南亚枇杷窄叶变型在所试的处理中愈伤率差异不显著;台湾枇杷愈伤率在所试的 2,4-D 浓度中均为 100%(表 3)。结合 4 个枇杷属植物叶片愈伤的生长情况及显著性分析,认为浓度为 1.0.3.0 mg/L 的 2,4-D 与 6-BA、KT 的组合配方适合枇杷属植物叶片愈伤组织的诱导。但通过愈伤组织的整体外观表现,浓度为 1.0 mg/L 的 2,4-D 愈伤组织更加有活力,与表 2 所得试验结论一致。

表 3 不同浓度 2,4-D 对 4 种枇杷属植物叶片诱导愈伤组织的影响

材料	不同 2,4-D 浓度下的愈伤率(%)		
	1.0 mg/L	3.0 mg/L	6.0 mg/L
台湾枇杷	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a
台湾枇杷恒春变型	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a	35.00 ± 21.21b
南亚枇杷窄叶变型	55.00 ± 21.21a	70.00 ± 14.14a	50.00 ± 14.14a
香花枇杷	100.00 ± 0.00a	87.28 ± 14.76ab	70.83 ± 5.89b

注:每处理添加 6-BA 和 KT 浓度均为 0.2 mg/L。

2.1.3 枇杷属植物与近缘属植物交杂后代叶片诱导愈伤组织 此次试验材料为石斑木×台湾枇杷杂交后代的叶片,因为石斑木属于蔷薇科苹果亚科,是枇杷属植物的近缘属植物,与野生台湾枇杷杂交的后代属于种质创新。结合表 3 的试验结果,进一步深化诱导的试验。研究发现,当单独使用 6-BA 时,无论是否加入生长素,石斑木×台湾枇杷叶片愈伤率都不高,分别为 0.4.16%;当 6-BA 与 TDZ 组合使用时,愈伤率显著提高,并且随着 TDZ 的浓度从 0.1 mg/L 升至 0.8 mg/L 时,愈伤率也从 45.83% 提高到 87.53%。浓度为 0.5 mg/L



A1—栎叶枇杷叶片诱导愈伤第 30 天(MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+1.0 mg/L 2,4-D); A2—栎叶枇杷叶片愈伤诱导的胚性细胞第 60 天(MS+0.5 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA); A3—栎叶枇杷叶片愈伤诱导的胚性细胞长根 60 天(MS+0.5 mg/L TDZ+KT 0.5+0.1 mg/L NAA); A4—栎叶枇杷叶片愈伤诱导的长根第 60 天(MS+1.0 mg/L KT+NAA0.1+0.1 mg/L 2,4D); A5—栎叶枇杷叶片愈伤诱导的长根第 60 天(MS+3.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4D); B1—台湾枇杷叶片暗培养诱导愈伤第 1 天(MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+1.0 mg/L 2,4-D); B2—台湾枇杷叶片暗培养诱导愈伤第 10 天(MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+1.0 mg/L 2,4-D); B3—台湾枇杷叶片转光培养诱导愈伤第 30 天 (MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+1.0 mg/L 2,4-D); C—香花枇杷叶片诱导愈伤第 25 天(MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+1.0 mg/L 2,4-D)

图1 枇杷属植物叶片愈伤组织的诱导和再分化过程

的 TDZ、ZT 和 2IP, 分别与 0.1 mg/L NAA 进行单独组合试验, 试验统计得出 TDZ 愈伤率达到 100%, ZT 为 83.33%, 2IP 为 91.67%, 愈伤率差异不显著; 而 0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+1.0 mg/L 2,4-D 的组合愈伤率为 90.52%, 与 0.5 mg/L TDZ 差异不显著(表 4)。结果表明, 0.2 mg/L 6-BA、0.2 mg/L KT、1.0 mg/L 2,4-D 的组合, 对于无论是创新的杂交种, 还是其他枇杷属植物而言, 都比较适合作为叶片愈伤诱导的通用配方; 此外, 0.5 mg/L TDZ 和 0.1 mg/L NAA 也可

表 4 石斑木×台湾枇杷叶片诱导愈伤组织的结果

处理	生长调节剂浓度(mg/L)							愈伤率 (%)
	6-BA	KT	TDZ	ZT	2IP	NAA	2,4-D	
1	1.0	—	—	—	—	—	—	0.00±0.00c
2	1.0	—	—	—	—	0.1	—	4.16±3.61c
3	1.0	—	0.1	—	—	0.1	—	45.83±40.18b
4	1.0	—	0.8	—	—	0.1	—	87.50±6.25a
5	—	—	0.5	—	—	0.1	—	100.00±0.00a
6	—	—	—	0.5	—	0.1	—	83.33±3.61a
7	—	—	—	—	0.5	0.1	—	91.67±9.55a
8	0.2	0.2	—	—	—	—	1.0	90.52±11.45a

以成为石斑木×台湾枇杷杂交后代诱导愈伤组织的最佳组合。

2.2 枇杷属 2 个野生种叶片愈伤组织诱导再分化

从以上试验成功诱导的叶片愈伤组织中取台湾枇杷和栎叶枇杷的愈伤组织作为胚状体诱导、分化芽苗和生根的试材。研究发现, 在台湾枇杷叶片愈伤组织的诱导再分化试验中, 虽然探索了各种各样的培养基配方, 但均尚未获得成功, 只能诱导部分愈伤组织分化生根, 而不能分化芽苗(即地上部)。其中, 1.0、2.0、3.0 mg/L KT 与 NAA、2,4-D 的组合都能直接使叶片愈组织分化生根, 生根率随着 KT 浓度的增加而增加, 生根分化率最高达 20%。而在 ZT 与 NAA、2,4-D 的组合中, 只有 2.0 mg/L ZT 能诱导少数叶片愈组织分化生根, 生根诱导率为 8.33%(表 5)。

研究还发现, 在栎叶枇杷的愈伤组织诱导再分化试验中, 产生了胚状体, 同时少部分愈伤组织分化生根。添加 TDZ 都能使栎叶枇杷愈伤组织诱导出胚状体, 但诱导率都比较低; KT 比 6-BA 更适合愈伤组织诱导胚状体(图 1-A2)。其中 0.5 mg/L KT 和 0.5 mg/L TDZ 的组合使胚状体诱导率最高,

表 5 不同生长调节剂对诱导台湾枇杷叶片愈伤组织
植株再生及生根的影响

处理	生长调节剂浓度 (mg/L)						芽苗率 (%)	生根率 (%)
	6-BA	KT	ZT	2IP	NAA	2,4-D		
1	1.0	—	—	—	—	—	0	0.00±0.00c
2	—	1.0	—	—	—	—	0	0.00±0.00c
3	—	—	—	1.0	—	—	0	0.00±0.00c
4	—	1.0	—	—	0.1	0.1	0	11.11±3.93b
5	—	2.0	—	—	0.1	0.1	0	12.51±4.42b
6	—	3.0	—	—	0.1	0.1	0	20.00±4.71a
7	—	—	1.0	—	0.1	0.1	0	0.00±0.00c
8	—	—	2.0	—	0.1	0.1	0	8.33±3.92b
9	—	—	3.0	—	0.1	0.1	0	0.00±0.00c

表 6 不同生长调节剂对栎叶枇杷愈伤组织
诱导胚状体及生根的影响

处理	生长调节剂浓度 (mg/L)			胚状体诱导率 (%)	生根率 (%)
	6-BA	KT	TDZ		
1	0.5	—	0.5	7.45±0.28ab	0
2	1.0	—	0.1	3.84±3.85b	0
3	—	0.5	0.5	21.43±7.14a	7.14
4	—	1.0	0.5	17.58±2.43ab	0

注:每处理添加 NAA 浓度均为:0.1 mg/L。

达 21.43%,这也是唯一同时能使愈伤分化产生根的组合(图 1-A3 至图 1-A5),生根率为 7.14%。

3 讨论与结论

关于枇杷属植物野生种的研究报道,近 10 年来才慢慢地变得多些^[1-3],但还是不够,特别是野生种质资源在生物技术等方面的运用和开发^[4,12-15]。枇杷属植物野生种的报道少,首先这些种质资源不多,收集难度大,即使收集到的种质资源,进行离体保存研究的也很少。可能由于野生种之间以及普通栽培种之间,在形态、生理和遗传等方面存在的差异,所以在研究过程中,尽管借鉴前人在栽培枇杷细胞工程研究中的方法技术,但还是碰到了许多困难,例如,本研究表明,不同种之间结果差异性较大,从而导致本试验结果看起来不是很完整和统一。

在枇杷属植物野生种的叶片愈伤组织诱导的研究结果中,以 1.0、3.0 mg/L 2,4-D 与 0.2 mg/L 6-BA、0.2 mg/L KT 的组合配方,对香花枇杷、台湾枇杷、台湾枇杷恒春变型、栎叶枇杷、南亚枇杷窄叶变型和石斑木×台湾枇杷等 6 个种的叶片进行培养,诱导出愈伤组织,其中有 5 个种的愈伤诱导率达到了 100%。经过大量试验验证枇杷属植物野生种的叶片诱导愈伤组织最佳的诱导条件为:在 18℃ 下暗培养 10 d 后再转至全光照,培养基配方为 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+1.0 mg/L 2,4-D。另外枇杷属植物与近缘属

植物交杂后代叶片诱导愈伤组织的结果显示,属间杂种后代材料叶片愈伤的诱导既有其他枇杷属野生种的共性,也有本身的一些特性,如 0.5 mg/L TDZ 和 0.1 mg/L NAA 是诱导石斑木×台湾枇杷叶片愈伤组织的最佳组合之一。本试验还做了温度对枇杷愈伤组织诱导的试验,发现无论是温度 18、22℃ 还是 25℃,其愈伤诱导率差异性不显著,但 18℃ 下的试验愈伤组织的外观表现为黄绿色更有活力,容易扩繁,其他温度下的愈伤组织为青绿色、粉红色或白色,不容易扩繁。

在对枇杷属植物野生种叶片愈伤组织诱导再分化的试验中,虽然诱导出了胚状体和根,但诱导率不高,未能分化出完整芽苗或植株,培养条件还得继续试验优化。笔者也对其他野生种如台湾枇杷恒春变型、南亚枇杷窄叶变型、香花枇杷和石斑木×台湾枇杷同样做了愈伤组织诱导再分化的试验,但都未能成功,说明野生种枇杷的叶片愈伤组织比较难诱导再分化,还须要再做大量的试验进行探索研究。

参考文献:

[1]林顺权,杨向晖,刘成明,等. 中国枇杷属植物的自然地理分布[J]. 园艺学报,2004,31(5):569-573.
[2]杨向晖,格拉贝,林顺权,等. 枇杷属植物种类数及东南亚原产枇杷种类[J]. 果树学报,2005,22(1):55-59.
[3]王云生,胡又厘,何小龙,等. 中国部分野生普通枇杷资源调查分析[J]. 福建果树,2012,04(4):11-15.
[4]刘义存,岑伟仪,黄天启,等. 枇杷属植物茎尖离体培养及褐化抑制研究[J]. 果树学报,2014,31(3):415-422+526.
[5]林顺权. 枇杷胚乳离体培养获得植株的研究[J]. 福建农学院学报,1985,14(2):117-125.
[6]林顺权,陈振光. 枇杷原生质体植株再生[J]. 园艺学报,1996,23(4):313-318.
[7]林庆良,林顺权,陈振光. 栎叶枇杷原生质体的分离与培养[J]. 福建农业大学学报,1994,23(1):26-29.
[8]彭晓军,王永清. 枇杷胚乳愈伤组织诱导和不定芽发生的研究[J]. 四川农业大学学报,2002,20(3):228-231.
[9]沈庆斌,赖钟雄,蔡汉权,等. 枇杷幼胚培养与体胚诱导植株再生[J]. 江西农业大学学报,2005,27(3):379-384.
[10]王芳,吕洪飞,徐红霞,等. 枇杷幼叶组织培养与植株再生研究[J]. 生物技术通讯,2011,22(1):53-56.
[11]王永清,崔文宁,孙靓,等. 成年枇杷植株叶片的植株再生[C]//第六届全国枇杷学术研讨会论文集,2013:107-110.
[12]刘义存,黄天启,林顺权. 枇杷属植物野生种的常温离体保存研究[J]. 中国南方果树,2016,45(4):95-98.
[13]刘义存,黄天启,林顺权. 枇杷属野生植物种胚离体培养和植株再生研究[J]. 亚热带植物科学,2016,45(2):112-116.
[14]樊佳奇,牛来春,庞磊. 云南地区不同园林植物对土壤重金属的吸收富集特征[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):467-472.
[15]杨瑞卿,杨学民,申晨. 21 种园林植物对大气重金属污染物的吸收能力比较[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):515-518.