

博爱八月黄柿组织培养影响因素研究

王尚堃¹, 仝瑞霞², 翟宝黔³, 李留振³

(1.周口职业技术学院 生物工程系, 河南 周口 466001; 2.长葛市园林绿化管理处, 河南 长葛 461500; 3.许昌市林业科学研究所, 河南 许昌 461000)

摘要: 以博爱八月黄柿休眠芽、萌动芽和梢尖为外植体, 研究了取材时期、消毒时间、消毒剂和植物生长调节剂对其组织培养的影响. 结果表明, 休眠芽、萌动芽和梢尖的萌芽率最高分别为 70%、50%、30%, 休眠芽(休眠期外植体)的萌芽率最高, 且增殖能力强, 12 月 6 日前后为最佳取材时期, 以休眠芽、萌动芽为外植体可建立初代培养, 而梢尖不易建立初代培养. 0.1% HgCl₂ 对生长前期外植体消毒 5 min 的效果最好, 其污染率、褐化率较低, 成活率最高; 0.1% HgCl₂ 对萌动期外植体消毒 10 min 的效果较好, 其污染率虽高, 但褐变率最低, 成活率也最高; 比较消毒剂 NaClO 和 HgCl₂, 0.1% HgCl₂ 处理休眠期外植体 15 min 的效果最好, 成活率高达 70.2%. 博爱八月黄柿组织培养的适宜培养基为 1/2 MS+1 mg/L ZT+0.1 mg/L IAA+4.0 mg/L 6-BA.

关键词: 博爱八月黄柿; 组织培养; 褐变; 萌芽率; 增殖系数

中图分类号: Q936 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)02-0176-05

Effect factors on tissue culture of Boabayuehuang *Diospyros kaki*

WANG Shang-kun¹, TONG Rui-xia², ZHAI Bao-qian², LI Liu-zhen²

(1.Department of Bio-Engineering, Zhoukou Vocational and Technical College, Zhoukou, Henan 466001, China; 2. Garden Afforestation Administrative Office in Changege City, Changege, Henan 461500, China; 3.Forest Science Research Institute of Xuchang City, Xuchang, Henan 461000, China)

Abstract: Using Boabayuehuang *Diospyros kaki* dormant buds, sprout buds and shoot tips as explants, effect of sampling time, disinfection time, disinfectants and plant growth regulators on culture of their organizations. The results showed that highest germination ratio of dormant buds, sprout buds and shoot tip reached 70%, 50%, 30% respectively, that of dormant bud (dormant period explants) is the highest, and its proliferation ability is stronger; best sampling period is around December 6, using dormant buds, sprout buds as explants could establish the beginning of culture, while the beginning of shoot tip culture is not easy to be established. Using 0.1% HgCl₂ to disinfect 5 min will be best to explant at its earlier growing period, its pollution rate, the browning rate is relatively lower, while its survival rate is the highest; it would be better to use 0.1% HgCl₂ to disinfect explants for 10 min, although its pollution rate is higher, but its browning rate is the lowest, the survival rate is the highest; Comparison of disinfectants (NaClO and HgCl₂) indicated the optimal level of disinfectant to explant in the dormant period is 0.1% HgCl₂, the disinfection time is 15min, the survival rate is higher, reaching 70.2%. The most suitable culture medium for Boabayuehuang *Diospyros kaki* is 1/2 MS+1 mg/L ZT+0.1 mg/L IAA+4.0 mg/L 6-BA.

Key words: Boabayuehuang *Diospyros kaki*; tissue culture; browning; germination rate; multiplication coefficient

博爱八月黄柿(Boabayuehuang *Diospyros kaki* Linn.)是河南省特有地方名优品种, 其果实肉质细密而脆, 纤维粗, 汁中多, 糖含量 17%~20%, 味甜, 无核, 品质极佳; 营养丰富, 含有蛋白质、维

收稿日期: 2009-05-05

基金项目: 河南省科技攻关项目(0424070096)

作者简介: 王尚堃(1972—), 男, 河南商水人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事果树教学及果树与食用菌栽培技术研究, zkwsk@126.com

生素及磷、铁、钙等,适于制作柿饼,深受广大消费者的欢迎。博爱八月黄柿极易遭柿蒂虫危害,虫害严重时柿园大量减产甚至绝收。转基因技术有望从根本上抑制果实采后软化,而组织培养快繁技术是利用生物技术获得抗虫柿树研究中不可缺少的一部分。有关柿树快繁,日本学者一致认为玉米素(ZT)是柿离体培养的启动因子,但由其诱导增殖的嫩梢不易生根,且根条数(1~2条)少,根质量差,生根的试管苗长势弱,移栽不易成活^[1-5]。柿树含酚类物质较多,在离体繁殖过程中,外植体极易褐变死亡。孔祥生等^[6-7]选用 ZT 增殖的嫩梢诱导生根,其生根率可观,但其试验结果难以重复,与日本学者及艾鹏飞等^[8]的观点也不一样,因此,至今尚未有柿树组织培养方法在生产上广泛应用。取材品种和季节的不同,导致重复前人试验、建立初代培养物困难等,限制了利用生物技术改良柿树的研究进程。柿组织培养中普遍使用的激素是 ZT,但 ZT 价格偏高,不易提取。6-BA 价廉易得,但多数柿品种在含有 6-BA 的培养基中不能生长^[9-10]。笔者以博爱八月黄柿的休眠芽、萌动芽和梢尖为外植体,研究取材时期、外植体消毒和植物生长调节剂对其组织培养的影响,旨在为柿组织培养体系的建立提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为河南省焦作市博爱县林场柿园树龄约 30 年的博爱八月黄柿休眠芽(休眠期外植体)、萌动芽(萌动期外植体)和梢尖(生长前期外植体);培养基为改良 MS 培养基(1/2MS);外植体消毒液为 75% 的乙醇和 HgCl₂、NaClO 溶液;生长调节剂为 ZT、IAA、6-BA。

1.2 方 法

试验于 2007—2008 年在周口职业技术学院生物工程系组织培养室进行。

1.2.1 取材接种与外植体灭菌处理

(1) 休眠芽、萌动芽、梢尖每隔 7 d 取材 1 次,共取材 4 次。第 1 次取材时间,休眠芽为 2007 年 11 月 15 日,萌动芽为 2008 年 2 月 12 日,梢尖为

2008 年 3 月 15 日。每次取材后均立即接种到如下 5 种培养基。

培养基 I : 1/2MS+2 mg/L ZT+0.2 mg/L IAA ;

培养基 II : 1/2MS+ 1 mg/L ZT+0.1 mg/L IAA ;

培养基 III : 1/2MS+ 2 mg/L ZT+0.1 mg/L IAA ;

培养基 IV : 1/2MS+1 mg/L ZT+0.1 mg/L IAA+ 1 mg/L 6-BA ;

培养基 V : 1/2MS+1 mg/L ZT+0.1 mg/L IAA + 4.0 mg/L 6-BA 。

培养基琼脂质量浓度 6 g/L,蔗糖质量浓度 30 g/L,pH 5.7。培养基中均附加 500 mg/L 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40);培养温度(25±2)℃,光暗时间 16/8 h,光照度 2 000 lx^[11]。每种培养基为 1 个处理,每处理接种 30 个外植体。重复 3 次。随机区组排列。均在接种后 40 d 统计生长情况。

(2) 取 1 年生枝条,用肥皂水刷洗 2 遍,流水冲洗 30~60 min,转入超净工作台,置于 75%乙醇中表面灭菌 30 s。休眠芽分别用 0.1%HgCl₂、0.1%NaClO、3.0% NaClO、5.0% NaClO、8.0% NaClO 消毒 15 min,萌动芽分别用 0.1%HgCl₂、0.5%HgCl₂、1.0% HgCl₂、2.0% HgCl₂ 消毒 10 min;梢尖(顶端 3 mm 左右的幼芽)用 0.1% HgCl₂ 分别消毒 3、5、8 min,用去离子水冲洗 4~5 次,无菌条件下剥去外部鳞片和外层 3 片叶原基。

1.2.2 试验数据的统计分析

根据观察结果,计算如下指标:

萌芽率=(萌芽外植体数/接种外植体数)×100%。

丛生苗率=(产生侧芽的外植体数/接种外植体数)×100%。

增殖系数=转接得到的外植体数/原接种的外植体数^[12]。

用 SPSS12.0 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 取材时期对外植体萌芽率的影响

从图 1 可看出,取材时期不同,接种后的外植体萌芽率也不同,3 种外植体均是第 4 次取材的萌芽率最高,休眠芽、萌动芽、梢尖的萌芽率分别为 70%、50%、30%。休眠芽的萌芽率最高,说明 12 月 6 日前后为博爱八月黄柿的最佳取材时期;博爱

八月黄柿以休眠芽、萌动芽为外植体可建立初代培养，而梢尖不易建立初代培养。

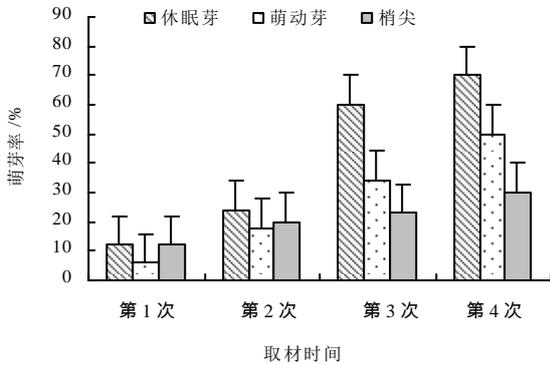


图1 不同取材时期的萌芽率
Fig.1 Germination rates at different sampling time

2.2 外植体消毒对外植体培养的影响

2.2.1 消毒时间对生长前期外植体培养的影响

4月为博爱八月黄柿新梢的旺盛生长期，此时进行梢尖培养，仅采用0.1%HgCl₂消毒就能达到预期的效果，其污染率低，成活率较高。图2结果表明，4月博爱八月黄柿梢尖培养采用0.1%的HgCl₂消毒5min较适宜，其污染率、褐化率较低，成活率最高。

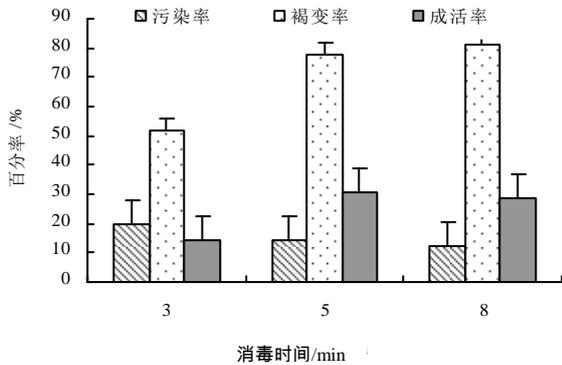


图2 消毒时间对生长前期外植体培养的影响
Fig.2 Effects of disinfection time on explant culture in its early growth

2.2.2 消毒剂浓度对萌动期外植体培养的影响

由图3可见，用0.1%~2.0%的HgCl₂对萌动期外植体消毒10min，2.0%HgCl₂的污染率最低，但褐变率最高；1.0%HgCl₂的次之；0.1%HgCl₂的污染率最高，褐变率最低。综合考虑成活率，萌动期外植体采用0.1%HgCl₂消毒10min的效果较好，其污染率虽高，但褐变率最低，成活率较高。

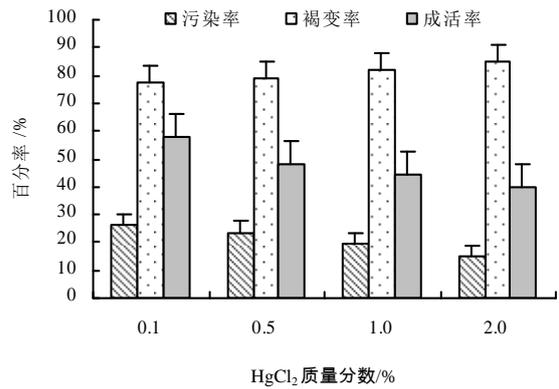
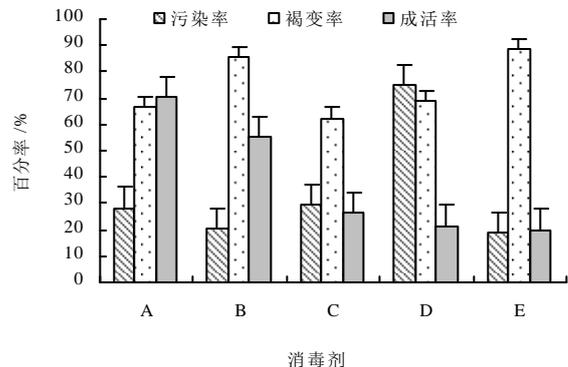


图3 不同浓度HgCl₂对萌动期外植体培养的影响
Fig.3 Effect of HgCl₂ concentrations on explant culture in its germination period

2.2.3 不同消毒剂对休眠期外植体培养的影响

休眠芽大量存在于芽鳞片及叶柄处。在培养过程中，由于真菌、细菌存在，外植体污染现象严重，接种2d就出现污染现象，7d后出现大量污染。对休眠期外植体采用0.1%HgCl₂、0.1%NaClO、3.0%NaClO、5.0%NaClO、8.0%NaClO消毒15min(图4)，其中8.0%NaClO消毒的污染率、成活率均最低，但褐变率最高；5.0%NaClO消毒的褐变率、成活率均较低，但污染率最高；3.0%NaClO消毒的污染率较低，褐变率最低，成活率较高；0.1%NaClO消毒的褐变率、成活率均较高，但污染率较低。结合图2可知，采用0.1%HgCl₂消毒的效果最好，其污染率和褐变率均较低，虽植株生长缓慢，但成活率(70.2%)最高。



A 0.1%HgCl₂ ; B 0.1%NaClO ; C 3.0% NaClO ; D 5.0% NaClO ; E 8.0% NaClO.

图4 不同消毒剂对休眠期外植体培养的影响
Fig.4 Effects of different disinfectants on explant culture in the dormant period

2.3 不同植物生长调节剂对外植体增殖与生长的影响

从表 1 可看出, 增殖系数以培养基 V 的最大, 为 1.66, 即 1.0 mg/L ZT、4.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L IAA 为最优植物生长调节剂组合. 培养基 V 的增殖系数比培养基 IV 高, 说明高浓度 6-BA 有利于柿树组织培养, 但抑制其丛生苗率. 培养基 I 和培养基 III 的增殖系数和丛生苗率差异不大, 说明 IAA 浓度对柿树外植体增殖与生长的影响不大. 培养基 II 和培养基 III 的增殖系数和丛生苗率差异较大, 说明柿树组织培养中, 高浓度 ZT 是提高增殖系数和丛生苗率的主要因素.

表 1 不同培养基对外植体增殖与生长的影响

Table 1 Effect of different culture medium on proliferation and growth of external plant

培养基	接种数/ 个	成活数/ 个	成活率 /%	分生后 芽数/个	增殖 系数	丛生苗 率/%
I	351	351	100	577	1.64	15
II	345	345	100	403	1.17	12
III	345	345	100	555	1.61	17
IV	339	339	100	475	1.40	13
V	351	351	100	584	1.66	12

3 结论与讨论

本研究结果表明, 休眠期为博爱八月黄柿建立初代组织培养的最佳取材时期. 取材时期不同, 博爱八月黄柿外植体萌芽率、增殖能力也不同, 休眠芽与萌动芽较易培养, 其增殖能力也较强, 但梢尖不宜进行培养, 其增殖能力极弱. 取材时期不同, 外植体的褐变率和成活率也不同. 休眠芽与萌动芽的褐变率较低, 萌芽率高, 但梢尖的褐变非常严重, 萌芽率极低. 造成这种季节性差异的主要原因可能是植物体内酚类物质含量和多酚氧化酶活性升高, 植物在生长季节含有较多的酚类化合物^[13]. 本试验中梢尖外植体褐变率、死亡率高是影响博爱八月黄柿在生长季节难以建立初代培养的直接因素, 因此, 博爱八月黄柿初代组织培养应避免在生长季节取材, 以获得良好的组织培养效果. 博爱八月黄柿初代培养的褐变与取材时期密切相关, 生长前期取材外植体褐变严重, 而冬季及早春季节取材外植体褐变轻. 此现象在苹果^[14]、桃^[15]、核桃^[16]上也有报

道. 造成这种季节性差异的主要原因可能是外植体内酚类含量和多酚氧化酶的季节性变化. 激素浓度使用不当也会引起褐变. 在本试验中, 在较高浓度 6-BA 的培养基中, 博爱八月黄柿外植体褐变加重. 这可能是由于高浓度的 6-BA 促进了酚类物质的合成, 酚类物质氧化加重了褐变. 防止外植体褐变, 最常用的方法是在培养基中加入抗氧化剂来抑制酚类化合物的氧化, 或用酚类物质吸附剂吸收这些物质^[17]. 活性炭是植物组织培养中常用的酚类物质吸附剂. 谷晓峰等^[18]在进行罗田甜柿幼胚培养时发现, 与 PVP、柠檬酸相比, 活性炭抗褐化效果最好, 除萌芽率稍有降低外, 成苗率、植株平均苗高都显著高于其他处理. 国外有研究^[19]发现活性炭不仅能吸附酚类物质, 而且能吸附培养基中的植物生长调节剂及营养物质, 从而影响外植体长势. 宋春丽等^[13]发现活性炭对磨盘柿梢尖和嫩茎的褐变有一定的抑制作用, 效果好于其他抗氧化剂和酚类物质吸附剂, 但不如 PVP-40. 本试验培养基中添加一定剂量的 PVP-40 能有效抑制休眠芽的褐变死亡, 是防止磨盘柿初代培养褐变的有效方法, 但 PVP-40 不能抑制生长中新梢外植体的褐变死亡, 因此应避免开生长前期取材.

博爱八月黄柿外植体消毒以 0.1% 的 HgCl₂ 较好. 生长前期外植体组织培养用 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 5 min 较适宜; 萌动期外植体组织培养用 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 10 min 效果较好; 而休眠期外植体组织培养用 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 15 min 效果最好. 污染率、褐变率、成活率是判断柿树外植体组织培养效果好坏的 3 个重要指标. 本试验中仅研究了消毒剂 NaClO 和 HgCl₂ 对博爱八月黄柿休眠期外植体消毒的影响, 其他消毒剂的消毒效果有待研究.

在植物组织培养中, 植物生长调节剂种类和配比是影响外植体生长的关键因素^[12, 20]. 本研究结果表明, 1.0 mg/L ZT、4.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L IAA 为最优生长调节剂组合; 6-BA 可有效诱导博爱八月黄柿芽的萌动生长, 可应用于博爱八月黄柿初代培养, 降低组织培养苗成本; 在含有 1.0 mg/L ZT 的培养基中加入 6-BA 可有效提高增殖系数; 萌动芽在较低浓度的激素条件下可启动生长, 激素浓度过高反而抑制生长, 但休眠芽在较高激素浓度条件

下萌芽率较高,说明休眠芽的组织培养需要激素浓度较高。

此外,不同果树种类取材器官不同,组织培养所需最佳培养基也存在一定差异^[21]。基本培养基也影响初代培养的建立。本试验中采用改良培养基(1/2)MS取得了较理想的效果,说明外植体启动生长需要较低浓度的矿质元素,尤其是较低浓度的氮素。

在本文的写作和修改过程中得到了周口职业技术学院生物工程系豆海港老师和动物科学系赵书景老师的热心帮助,在此表示衷心的感谢!

参考文献:

- [1] Murayama H, Tao R, Tanaka T, et al. *In vitro* shoot proliferation and rooting of several Japanese persimmon cultivars[J]. J Japan Soc Hort Sci, 1989, 58(1): 55-61.
- [2] Fukui H, Nishimoto K, Nakamura M. Varietal difference in rooting ability of *in vitro* subcultured Japanese persimmon shoots[J]. J Japan Soc Hort Sci, 1992, 60(4): 821-825.
- [3] Tao R, Sugiura A. Micropagation of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* L.)[M]//Bajaj Y P S. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin: Springer-Verlag, 1992: 424-440.
- [4] Tao R, Ito J, Sugiura A. Comparison of growth and rooting characteristics of micropagated adult plants and juvenile seedlings of persimmon (*Diospyros kaki* L.)[J]. J Japan Soc Hort Sci, 1994, 63(3): 537-541.
- [5] Tetsunura T. Effect of types of cytokinin used for *in vitro* shoot proliferation of Japanese persimmon on the subsequent rooting of shoots[J]. Acta Hort, 1997, 436: 143-146.
- [6] 孔祥生, 张妙霞, 张益民, 等. 柿离体繁殖研究[J]. 果树科学, 1998, 15(3): 232-238.
- [7] 孔祥生, 张妙霞, 杜爱玲, 等. 甜柿离体快繁技术研究[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(2): 178-186.
- [8] 艾鹏飞, 罗正荣. 甜柿试管苗生根条件的研究[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(2): 154-157.
- [9] 姬惜珠, 张爱军, 王红, 等. 不同调节剂处理对柿树试管苗增殖与生根的影响[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 35-37.
- [10] 刘恺, 贾春风. 甜柿品种“富有”组织培养技术研究[J]. 保定师范专科学校学报, 2007, 20(2): 51-52, 62.
- [11] 刘晓娜, 马俊莲, 张子德, 等. 上西早生甜柿离体快繁技术研究[J]. 河北农业大学学报, 2004(1): 61-63.
- [12] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998: 215-312.
- [13] 宋春丽, 马俊莲, 刘月英, 等. 取材时期和 BA 浓度对磨盘柿初代组织培养建立的影响[J]. 河北林果研究, 2007, 22(3): 309-313.
- [14] 王续衍, 林秦碧. 苹果组织培养研究简报[J]. 四川农业大学学报, 1988, 3(1): 46-48.
- [15] 江虎军, 潘季淑, 孟新法. 桃茎尖培养技术的研究[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(1): 47-52.
- [16] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996: 456-465.
- [17] 王月平, 洪霓. 果树的脱毒与组织培养[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 123-165.
- [18] 谷晓峰, 唐仙英, 罗正荣. 罗田甜柿幼胚培养条件研究[J]. 河北农业科学, 2001, 18(2): 80-83.
- [19] Sarthchandra S U, Burch G. Micropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) cv. Hiratanenishi[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1991, 19(2): 82-86.
- [20] 胡新喜, 敖小平, 邓子牛, 等. 大红甜橙遗传转化再生体系的建立[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(5): 576-579.
- [21] 梁美霞, 戴洪义. 苹果组织培养苗离体叶片诱导不定芽分化[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(5): 470-473.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠