

荷兰青瓜组织培养正交试验

陈惠阳, 乐素菊

(仲恺农业技术学院, 广东广州 510225)

摘要: 通过正交实验, 研究了 BA(6-苄氨基嘌呤)、NAA(α -萘乙酸)及外植体 3 种不同因素及其组合对荷兰青瓜愈伤组织及丛生芽诱导的影响。结果表明: 子叶、胚轴及顶芽均能诱导出愈伤组织, 但只有顶芽能诱导出丛生芽。诱导愈伤组织和诱导芽的最优组合均为 BA0.5 mg/L+NAA0.05 mg/L(毫克/升)+顶芽, 此时 NAA 与 BA 配比为 1:10, 诱导的愈伤组织质量最好, 丛生芽最壮。

关键词: 荷兰青瓜; 组织培养; 正交法

中图分类号: S642.203.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2005)04-0083-03

目前, 华南地区无土栽培主要栽培的小黄瓜品种均是从荷兰进口的北欧型温室荷兰青瓜, 该类型小黄瓜对无土栽培有很强的适应性, 鲜果瓜表皮柔嫩光滑, 色泽均匀, 口感脆嫩, 瓜味浓郁, 深受人们喜爱。针对该类型瓜种子价格昂贵, 笔者首次以荷兰青瓜无菌苗的顶芽为外植体进行了组织培养, 试验结果表明无菌苗的顶芽在一定条件下可以诱导出愈伤组织和丛生芽^[1]。为进一步探讨荷兰青瓜其它外植体及外源激素(BA、NAA)对荷兰青瓜组织培养的影响, 本文运用正交设计方法研究了不同外植体及不同激素浓度对荷兰青瓜愈伤组织及芽诱导的影响, 以期找出荷兰青瓜愈伤组织诱导及芽诱导的最佳外植体和最佳激素组合, 从而为荷兰青瓜幼苗的工厂化生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

荷兰青瓜种子来源于深圳果蔬公司。

1.2 方法

荷兰青瓜种子用 0.1% 升汞灭菌 10 min(分钟)。无菌水冲洗 4~6 次后, 移至 MS 基础培养基中培养无菌苗。

在无菌条件下切取无菌苗的子叶 5 mm×5 mm(毫米)大小、胚轴 5 mm(毫米)长及顶芽, 分别接种于不同组份培养基中。其中子叶和胚轴每瓶接 6 块, 芽接 3 块, 每种组合接种 20 瓶, 于 25±2℃光照培养室培养。15 d(天)后统计愈伤组织数和芽数。正交表选用 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$, 各因素的不同水平见表 1。

2 结果与分析

第一作者简介: 陈惠阳, 1972 年生, 现为仲恺农业技术学院农业与生物学院实验师, 主要从事温室无土栽培、土壤农化的教学与管理工作, 目前参与纵横向课题多项, 以第一作者发表论文 9 篇。



表 1 试验因子及水平

因子水平	因子种类及代号		
	A6-苄氨基嘌呤	B α -萘乙酸	C 外植体
	BA(mg/L)	NAA(mg/L)	
1	0.5	0.01	顶芽
2	1.0	0.02	子叶
3	2.0	0.05	胚轴

2.1 正交试验结果与分析

因素不同水平间的极差越大, 表明该因素越重要, 由表 2 中的极差值可知, 愈伤组织诱导率的极差值差异不大, 说明 NAA、BA 及外植体对愈伤组织诱导同等重要; 丛生芽诱导率的极差差异很明显, 其中外植体的极差最大, 为 255, NAA 和 BA 的极差值较小, 为 29, 表明外植体是芽诱导成功与否的关键。

由表 2 可看出, 所有组合均能诱导出愈伤组织, 但愈伤组织数量和质量差异较大。把因素对愈伤组织及芽诱导影响的相对程度排成主次顺序, 用几何直观图表示出来(图 1、2)。由图 1 看出, 诱导愈伤组织的最佳组合为 $A_1B_2C_1$ 或 $A_1B_2C_3$, 即 BA0.5 mg/L(毫克/升), NAA0.02 mg/L(毫克/升), 外植体为胚轴或顶芽。几何直观图提供的是数量上的信息, 这个信息还需在试验中验证。 $A_1B_2C_1$ 、 $A_1B_2C_3$ 这两个组合在试验中出现过, 其诱导的愈伤组织数量较多, 但愈伤组织的质量不太理想, 表现为结构较疏松, 色泽较浅, 因而并非诱导愈伤组织的理想组合。组合 $A_1B_3C_1$ 诱导愈伤组织的数量虽然比组合 $A_1B_2C_1$ 、 $A_1B_2C_3$ 少, 但其诱导的愈伤组织颜色呈黄绿色, 结构紧密, 可认为 $A_1B_3C_1$ 为诱导愈伤组织的较好组合。

对比各组合, 顶芽为外植体的组合才能诱导出丛生芽, 其余组合不能诱导出丛生芽。由图 2 可看出, $A_1B_3C_1$ 是诱导芽的最佳组合。从本实验结果看, 也证实了诱导芽的较好组合是 $A_1B_3C_1$, 即 BA0.5 mg/L(毫克/升), NAA0.05 mg/L(毫克/升), 外植体为顶芽, 其芽诱导率最高, 为 100%, 诱导的丛生芽较健壮。

* 基金项目: 广州市科技攻关项目(2004Z3-E0111)

收稿日期: 2005-03-21

表 2 正交设计 $L_9(3^4)$ 试验结果

组合号	因子种类及代号			愈伤组织诱导率 (%)	芽诱导率 (%)	接种 15 天后观察结果
	A	B	C			
	6-苄氨基嘌呤 BA (mg/L)	α -萘乙酸 NAA (mg/L)	外植体			
1	0.5(1)	0.01(1)	胚轴(3)	100	0	浅黄色愈伤组织, 较疏松, 数量少; 无丛生芽
2	1.0(2)	0.01(1)	顶芽(1)	100	71	浅黄色愈伤组织, 数量多, 较疏松; 有丛生芽, 芽细长
3	2.0(3)	0.01(1)	子叶(2)	92	0	褐色愈伤组织, 长得一般; 无丛生芽
4	0.5(1)	0.02(2)	子叶(2)	100	0	褐色愈伤组织, 长得较好; 无丛生芽
5	1.0(2)	0.02(2)	胚轴(3)	100	0	浅黄色愈伤组织, 疏松, 数量多; 无丛生芽
6	2.0(3)	0.02(2)	顶芽(1)	100	84	黄绿色愈伤组织, 数量较多, 较紧密; 丛生芽较矮小
7	0.5(1)	0.05(3)	顶芽(1)	100	100	黄绿色愈伤组织, 数量较少, 紧密; 有丛生芽, 芽壮
8	1.0(2)	0.05(3)	子叶(2)	81	0	褐色愈伤组织, 长得很差; 无丛生芽
9	2.0(3)	0.05(3)	胚轴(3)	100	0	浅黄色愈伤组织, 疏松, 数量较多; 无丛生芽
水平				总和		
I ¹⁾	300(100)	292(71)	300(255)	873	255	
II	281(71)	300(84)	273(0)			
III	292(84)	281(100)	300(0)			
极差	19(29)	19(29)	27(255)			

注: 括号内的数据为丛生芽诱导率

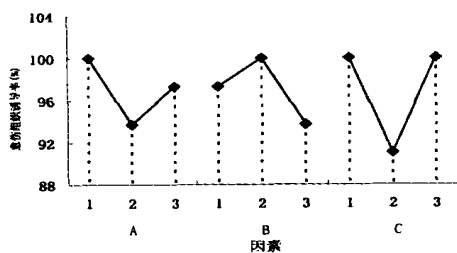


图 1 因素与愈伤组织诱导关系趋势示意图

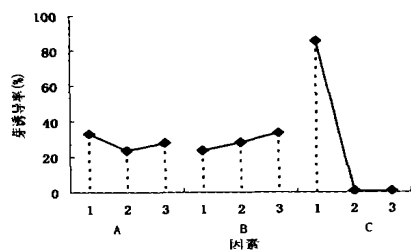


图 2 因素与芽诱导率关系趋势示意图

2.2 影响愈伤组织形成及芽诱导的因素

2.2.1 外源激素的配比 由表 2 可看出, NAA、BA 的浓度分别在 0.01 mg/L ~ 0.05 mg/L (毫克/升)、0.5 mg/L ~ 2.0 mg/L (毫克/升) 范围时, 愈伤组织的质地、颜色及丛生芽的诱导效果与激素配比有很大关系。当 NAA 和 BA 配比(NAA : BA)在 1 : 10 ~ 1 : 200 范围内, 所有组合均能诱导出愈伤组织, 激素配比的变化对外植体愈伤组织诱导率影响不大, 当 NAA : BA 为 1 : 10 ~ 1 : 50 范围内, 愈伤组织诱导率较高。由图 3 看, NAA 和 BA 配比(NAA : BA)在 1 : 10 ~ 1 : 100 范围内, 顶芽均能诱导出丛生芽, 但以 NAA : BA 为 1 : 10 为佳, 其丛生芽诱导率为

100%。而其它激素配比的组合诱导丛生芽的效果均不太理想, 激素配比过高不利于丛生芽的诱导。

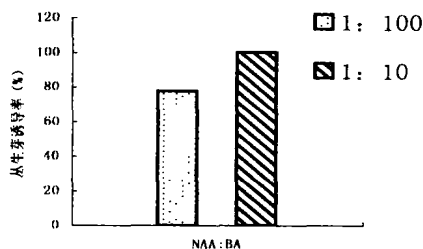


图 3 不同激素配比(NAA : BA)对诱导芽的影响

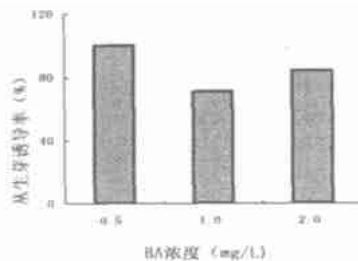


图 4 BA 对诱导芽的影响

2.2.2 外源激素的浓度 愈伤组织的质量及丛生芽的诱导效果除与激素配比有很大关系外, 还与外源激素浓度有关。由表 2 看, NAA : BA 配比均为 1 : 50 的 1、5 组合, 两者的愈伤组织诱导率都为 100%, 但组合 1 诱导的愈伤组织质量差于组合 5。愈伤组织表现为疏松, 数量少, 这是因为组合 5 中 NAA、BA 浓度均高于组合 1 所致。由图 4、5 可知, BA、NAA 浓度对丛生芽的诱导差异较大, 当培养基中 BA 为 0.5 mg/L (毫克/升) 时, 芽诱导率最高, BA 浓度升高并不利于丛生芽的

2% 菌克毒克水剂防治番茄病毒病药效研究

黄晶, 张海涛, 于洪坤

番茄病毒病是发生在番茄上的重要病害, 近几年来在伊春市番茄产区发生和危害越来越重, 严重影响番茄的品质和产量, 给广大菜农带来了严重的经济损失。为了有效控制病毒病的发生, 2003 年我们用生物农药 2% 菌克毒克水剂对其进行了田间药效防治试验。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试药剂 2% 菌克毒克水剂(有效成分: 宁南霉素 黑龙江省强尔生化技术开发有限公司生产); 20% 病毒 A 可湿性粉剂(齐齐哈尔生化研究所生产)。

供试作物: 番茄, 品种为佳粉 15。

1.2 试验地基本情况

试验设在伊春区青风农场战强大棚进行, 壤土, 667 m²(平方米)施有基肥 5 000 kg(公斤)。1 月 17 日温室育苗, 4 月 20 日定植, 秧苗 7~8 片叶, 大部分现蕾, 较整齐, 地表面无杂草, 管理水平较好。

2 试验方法

2.1 田间设计及施药方法

试验设 5 个处理, 3 次重复, 随机区组排列, 共设 15 个试验小区, 小区面积 30 m²(平方米)。试验的栽培条件力

求基本均匀一致, 在番茄病毒病发生初期施药, 于 5 月 10 日、5 月 17 日、5 月 24 日各喷一次, 采用卫士牌背负式喷雾器常量叶面均匀喷雾, 力求整个番茄株上、叶背、叶面均匀着药。具体处理如下: A 2% 菌克毒克水剂 200 倍; B 2% 菌克毒克水剂 260 倍; C 2% 菌克毒克水剂 320 倍; D 20% 病毒 A 可湿性粉剂 500 倍; E 清水对照。

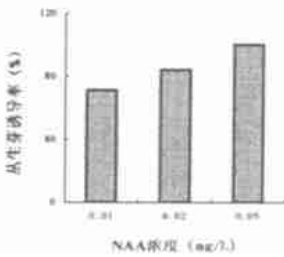


图 5 NAA 对诱导芽的影响

诱导, 而 NAA 浓度增加则有利于丛生芽的诱导。

3 结论与讨论

通过正交实验综合分析影响荷兰青瓜愈伤组织及丛生芽诱导的影响因素, 筛选出最佳培养基为 BA0.5 mg/L(毫克/升)+NAA0.05 mg/L(毫克/升)+顶芽, 这种培养基对荷兰青瓜愈伤组织及丛生芽诱导有较好的效果。

组织培养的成功, 除了提供的培养基比较适宜外, 所选用的外植体也很重要, 不同植物器官, 其形态发生能力颇不相同。本试验证实, 只有顶芽才能诱导出丛生芽, 胚轴和子叶不能诱导形成丛生芽, 因而顶芽是荷兰青瓜组织培养的最佳外植体。

2.2 调查时间及方法

于施药前及最后一次施药后 7 d(天)各调查一次。调查采用对角线五点法, 每小区定株调查 15 株, 调查发病株数, 发病程度, 计算发病率及病情指数。病毒病分级标准(以株为单位): 0 级: 全株无症; 1 级: 轻花叶; 3 级: 叶皱缩, 扭曲, 花叶明显; 5 级: 叶变细, 轻度矮化, 花叶明显; 7 级: 线状叶, 明显矮化, 重花叶; 9 级: 植株极度矮化, 最后死亡。

2.3 药效计算

调查结束后用各处理区与对照区的病情指数相比较, 计算防治效果。用“DMRT”法检验药效的差异显著水平。

病情指数= $\frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总株数} \times 9} \times 100$

防效(%)= $[1 - (\text{CK}_0 \times \text{P}_{t_0}) / (\text{CK}_1 \times \text{P}_{t_1})] \times 100$

式中, CK₀、CK₁ 为对照区施药前、后病情指数, P_{t₀}、P_{t₁} 为处理区施药前、后病情指数。

2% 菌克毒克水剂防治番茄病毒病试验结果表

处理	药前指数			药后指数			防效(%)			平均防效(%)
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
A	2.1	1.9	2.1	1.6	1.5	2.1	79	78	76	77.7b
B	1.8	1.6	1.8	0.6	0.6	0.5	91	90	94	91.7a
C	1.9	1.8	2.1	2.2	2.1	3.3	68	69	65	67.3bcd
D	2.0	1.8	2.0	1.8	2.0	2.4	75	70	73	72.7bc
E	2.1	2.0	1.8	7.6	7.3	8.1				

3 结果分析与讨论

试验结果(见表)表明: 于番茄病毒病发生初期开始药剂防治, 3 次施药后, 2% 菌克毒克水剂 260 倍液防效达 91.7%, 极显著优于 20% 病毒 A 可湿性粉剂 500 倍液和 2% 菌克毒克水剂 200、320 倍液的防治效果。在使用过程中没有出现药害及其它不良反映。

生物农药 2% 菌克毒克水剂对番茄病毒病具有较好的抑制、钝化病毒和防治作用。喷药后皱叶变展叶, 黄叶变绿叶, 病症不再扩展, 失去浸染能力。菌克毒克对番茄及环境污染小, 适合无公害番茄生产。在大面积推广应用时, 建议 2% 菌克毒克水剂用药浓度为 260 倍。

(黑龙江省伊春市农业技术推广中心, 153000)

试验结果表明, 外源激素浓度 BA 为 0.5 mg/L(毫克/升)时, 芽诱导率最高, BA 的浓度升高并不利于芽的诱导, 这与侯爱菊^[2]研究结果相符。张承妹^[3]、Leah R 等^[4]研究发现, 黄瓜外植体在基本培养基为 MS、NAA 浓度极低的条件下即能启动去分化形成愈伤组织, 当 NAA 浓度在 0.5 mg/L(毫克/升)以上时, 愈伤的诱导率都在 98% 以上, 但分化培养时出苗率不如来自较低浓度的 NAA 培养基上生成的愈伤组织。本试验结果表明, 当培养基中 NAA 浓度为 0.05 mg/L(毫克/升)时, 顶芽的愈伤组织和芽诱导率均达到 100%。

参考文献:

[1] 陈惠阳, 罗思琼. 荷兰青瓜组织培养初报[J]. 农业与技术, 2005, (1): 140~141.
[2] 侯爱菊, 朱延明, 杨爱馥, 等. 诱导黄瓜直接器官发生主要影响因素的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 101~103.
[3] 张承妹, 陆家安. 黄瓜组织培养与诱导四倍体再生植株[J]. 上海农业报, 1995 11(3): 31~36.
[4] Leah R, Tommerup H, Svendsen Ib, et al. Biochemical and Molecular Characterization of Three Bael Seed Proteins With Antifungal Properties[J]. J Biol Chem, 1991, 266: 1564.
[5] 赵秀娟, 吴定华. 黄瓜的组织培养[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(4): 125~126.