不同生长调节因子对耐寒柑橘愈伤组织诱导效应研究

胡选萍[1,2]

(1.陕西理工学院 生物科学与工程学院,陕西 汉中 723000;2.陕西省资源生物重点实验室,陕西 汉中 723000)

摘 要:以耐寒柑橘子叶为试验材料,研究了不同浓度的2,4-D、NAA、6-BA与KT对柑橘子叶愈伤组织诱导的影响作用。结果表明:2,4-D、NAA、6-BA与KT对柑橘子叶愈伤组织诱导具有重要效应,其综合贡献率分别为86.4%、93.9%、93.9%与94.5%。4种生长调节因子对柑橘子叶愈伤组织诱导的膨大率、膨大速度、出愈率、出愈速度的效应大小分别为2,4-D>NAA>6-BA>KT、KT>2,4-D>NAA>6-BA、2,4-D>NAA>6-BA>KT与2,4-D>KT>NAA>6-BA。综合考虑测量指标效应,对于柑橘子叶愈伤组织诱导的最适生长调节因子组合配比为2,4-D 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L。

关键词:柑橘;子叶;生长调节因子;愈伤组织

中图分类号:S 666.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1001－0009(2014)09－0109－04

柑橘(*Citrus rutaceae*)属芸香科柑橘属植物,营养成分丰富,富含植物化学物类黄酮[1],具有抗氧化、抗病毒、抗炎症、抗癌活性、预防动脉硬化等作用[2-3]。柑橘是世界四大水果之一,其国际贸易值居世界第3位,仅次于小麦和蔬菜[4-5],柑橘作为中国南方最重要的经济作物之一,在我国区域经济发展中起着重要作用。陕西省汉中市城固县作为陕南最大的柑橘生产基地,通过国家绿色食品发展中心认证的绿色食品柑橘基地面积达6 667 hm^2,被国家林业部命名为"中国柑橘之乡"[6],并在农业区域规划中将柑橘作为果业之首,放在重点优先发展的地位。由于柑橘对低温比较敏感,而汉中地区处于亚热带北缘,冬季低温和秋季多雨导致柑橘局部冻害一直是制约柑橘产业发展的重要因素,因此提高柑橘的抗逆性对于柑橘产业可持续发展具有重要意义。近年来生物技术被广泛的应用于柑橘抗性资源的研究与开发利用中,并取得了显著成果[7]。该研究以耐寒柑橘为试材,研究不同生长调节因子对柑橘子叶外植体离体启动脱分化与愈伤组织诱导的效应方式与效应程度,以期为深入研究耐寒柑橘体细胞胚胎发生及抗寒机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为陕西汉中城固柑橘生产基地的早熟耐寒品种"日南1号",子叶外植体来源于成熟柑橘果实种子,剥离出未受精败育种子胚作为研究试材。

作者简介:胡选萍(1975-),女,硕士,讲师,现主要从事植物生物技术研究工作。E-mail:huxuanping@163.com.

基金项目:陕西省科技厅自然科学专项计划资助项目(S2012JC7034)。

收稿日期:2013－12－12

1.2 试验方法

1.2.1 材料预处理 选择饱满圆润、大小均一的柑橘种子,用自来水冲洗掉表面的杂质,在流水下冲洗1～2 h。在超净工作台将柑橘种子先用75%乙醇漂洗30 s,再用0.1%升汞浸泡12 min,处理过程中不断摇动,然后用无菌水漂洗5～6次,每次2～3 min,在铺有滤纸的培养皿中分别剥去外种皮与内种皮,然后将子叶无菌切分为长宽约为0.5 cm的小块作为试验用外植体。

1.2.2 培养基设计 以MT为基本培养基,内含蔗糖30.0 g/L,琼脂粉6.0 g/L,附加2,4-D、NAA、6-BA与KT 4种生长调节因子,其中2,4-D与NAA选择1.0、2.0、3.0 mg/L 3个水平,6-BA与KT选择0、0.5、1.0 mg/L 3个水平,按照$L_9(3^4)$正交表设计9种生长调节因子组合配比(表1),调节pH为5.8。

表1 耐寒柑橘子叶愈伤组织诱导试验设计

Table 1 Medium of callus induction on cotyledon from growth-regulators mg/L

培养基编号 No. of medium	生长调节因子组合配比 Growth-regulator category and concentration			
	2,4-D	NAA	6-BA	KT
YS 1	1.0	1.0	0.0	0.0
YS 2	1.0	2.0	0.5	0.5
YS 3	1.0	3.0	1.0	1.0
YS 4	2.0	1.0	0.5	1.0
YS 5	2.0	2.0	1.0	0.0
YS 6	2.0	3.0	0.0	0.5
YS 7	3.0	1.0	1.0	0.5
YS 8	3.0	2.0	0.0	1.0
YS 9	3.0	3.0	0.5	0.0

1.2.3 材料处理与诱导 无菌操作条件下,将耐寒柑橘子叶外植体随机接种至试验设计的9种培养基中,在温度(25±1)℃,相对湿度50%～60%条件下培养30 d,观察愈伤组织的发生与形态变化,定期统计外植体膨大数

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

与出愈数,并依此计算出相应的二级变量。

1.2.4　计算方法　膨大率=膨大外植体数/接种外植体总数×100%;膨大速度=$(Nx-Ny)/[(X-Y)\times K]$,Nx 代表第 X 天膨大的外植体数,Ny 代表第 Y 天膨大的外植体数,K 代表接种外植体总数。出愈率=诱导出愈伤组织的外植体数/接种外植体总数×100%;出愈速度=$(Nx-Ny)/[(X-Y)\times K]$,Nx 代表第 X 天出愈的外植体数,Ny 代表第 Y 天出愈的外植体数,K 代表接种外植体总数。

1.3　数据分析

采用 SPSS 16.0 统计分析软件平台,对试验数据进行多因素方差分析,探索不同生长调节因子对耐寒柑橘子叶外植体愈伤组织诱导的效应方式与效应大小。

2　结果与分析

2.1　不同生长调节因子对耐寒柑橘膨大率的效应

膨大是外植体对不同生长调节因子配比所作出的最初的形态反应特征,而膨大率在一定程度上反映外植体细胞启动脱分化的潜力与能力。以 4 种生长调节因子为自变量,以耐寒柑橘子叶外植体膨大率为因变量作多因素方差分析,由表 2 可知,试验选择的 4 种生长调节因子对柑橘子叶外植体愈伤组织诱导起着重要的调控作用,其总贡献率达 86.4%($R^2=0.864$)。其中 2,4-D 和 NAA 对柑橘子叶外植体膨大率的贡献效应极显著($F_{2,4\text{-D}}=10.687$,$F_{\text{NAA}}=8.801$,$P<0.01$);6-BA 对柑橘子叶外植体脱分化效应显著($F=7.521$,$P<0.05$);相比较而言 KT 对柑橘子叶外植体膨大率的贡献不显著($P>0.05$)。另外,由 $\eta^2_{2,4\text{-D}}$(0.704)>η^2_{NAA}(0.662)>$\eta^2_{6\text{-BA}}$(0.626)>η^2_{KT}(0.267)可知,4 种生长调节因子对于柑橘子叶外植体启动脱分化的贡献程度,从大到小依次是 2,4-D>NAA>6-BA>KT。

表 2　不同生长调节因子对耐寒柑橘子叶膨大率的多因素方差分析

Table 2　Multiple factor ANOVA of the rate of expanding from growth-regulators

多因素方差分析 Multiple factor ANOVA	均方 MS	方差值 F	显著性 Sig	贡献效应 η^2
模型 Model	0.038	7.163	0.004	0.864
2,4-D	0.056	10.687	0.004	0.704
NAA	0.046	8.801	0.008	0.662
6-BA	0.040	7.521	0.012	0.626
KT	0.009	1.643	0.246	0.267

注:$R^2=0.864$。

2.2　不同生长调节因子对耐寒柑橘膨大速度的效应

膨大速度是反映柑橘子叶外植体脱分化的动态变化指标,以 4 种生长调节因子为自变量,以膨大速度为因变量,进行多因素方差分析,由表 3 可知,除 6-BA 外,试验选择的其余 3 种生长调节因子对柑橘子叶膨大速度的效应均处于显著水平($F_{2,4\text{-D}}=31.750$,$F_{\text{KT}}=32.564$,$P<0.01$;$F_{\text{NAA}}=4.293$;$P<0.05$),其综合效应为 93.9%($R^2=0.939$),属于典型的高综合效应水平,由此可见 2,4-D、NAA 与 KT 对柑橘子叶外植体脱分化动态增长过程同样具有显著的生理调控效应。从 4 种生长调节因子的独立贡献程度上分析,2,4-D 与 KT 的贡献程度基本相当($\eta^2_{2,4\text{-D}}=0.876$,$\eta^2_{\text{KT}}=0.879$),NAA 的效应作用次之($\eta^2_{\text{NAA}}=0.488$),6-BA 统计学效应不明显。

表 3　不同生长调节因子对柑橘子叶膨大速度影响的多因素方差分析

Table 3　Multiple factor ANOVA of expanding speed from growth-regulators

多因素方差分析 Multiple factor ANOVA	均方 MS	方差值 F	显著性 Sig	贡献效应 η^2
模型 Model	0.001	17.382	0.000	0.939
2,4-D	0.001	31.750	0.000	0.876
NAA	0.000	4.293	0.049	0.488
6-BA	0.000	0.922	0.432	0.170
KT	0.001	32.564	0.000	0.879

注:$R^2=0.939$。

2.3　不同生长调节因子对耐寒柑橘出愈率的效应

出愈率是衡量外植体愈伤诱导效果的一项重要指标,它能够从数量角度确定愈伤组织发生的最佳条件[8]。以 4 种不同生长调节因子为自变量,以柑橘子叶外植体的出愈率为因变量,进行多因素方差分析,分析不同生长调节因子对柑橘子叶外植体愈伤组织诱导的效应大小与贡献程度。由表 4 可以看出,试验选择的 4 种生长调节因子对柑橘子叶外植体愈伤组织诱导起着重要的调控作用,总贡献率达 93.9%($R^2=0.939$)。其中 2,4-D、NAA 和 6-BA 对柑橘子叶愈伤组织诱导的单独贡献作用十分明显,均表现在 99%水平上差异显著($F_{2,4\text{-D}}=30.350$,$F_{\text{NAA}}=19.568$,$F_{6\text{-BA}}=14.133$,$P<0.01$);KT 对柑橘子叶外植体出愈率的效应在 95%水平上差异显著($F_{6\text{-BA}}=4.765$,$P<0.05$)。另外,由 $\eta^2_{2,4\text{-D}}$(0.871)>η^2_{NAA}(0.813)>$\eta^2_{6\text{-BA}}$(0.758)>η^2_{KT}(0.514)可知,4 种生长调节因子对于柑橘子叶外植体出愈率的贡献程度,从大到小依次是 2,4-D>NAA>6-BA>KT。

表 4　不同生长调节因子对柑橘子叶出愈率的多因素方差分析

Table 4　Multiple factor ANOVA of callus inducing rate from growth-regulators

多因素方差分析 Multiple factor ANOVA	均方 MS	方差值 F	显著性 Sig	贡献效应 η^2
模型 Model	0.099	17.204	0.000	0.939
2,4-D	0.175	30.350	0.000	0.871
NAA	0.113	19.568	0.001	0.813
6-BA	0.081	14.133	0.002	0.758
KT	0.027	4.765	0.039	0.514

注:$R^2=0.939$。

2.4　不同生长调节因子对耐寒柑橘出愈速度的效应

出愈速度是评价柑橘子叶外植体在不同生长调节

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

因子组配下愈伤组织诱导数量动态增长程度的一个重要变量,能够从动态变化的角度衡量外植体愈伤形成与积累快慢程度。以4种生长调节因子为自变量,出愈速度为因变量,作多因素方差分析,由表5可知,2,4-D、NAA和KT对柑橘子叶外植体出愈速度的贡献程度均极显著($F_{2,4\text{-D}}=36.449$,$F_{NAA}=11.855$,$F_{KT}=25.227$,$P<0.01$),而6-BA对柑橘子叶外植体出愈速度的效应作用不明显($P>0.05$)。综合分析各生长调节因子的效应,其对柑橘出愈速度的总贡献率为94.5%($R^2=0.945$),且由 $\eta^2_{2,4\text{-D}}(0.890)>\eta^2_{KT}(0.849)>\eta^2_{NAA}(0.725)>\eta^2_{6\text{-BA}}(0.454)$可知,其贡献程度从大到小依次是2,4-D>KT>NAA>6-BA。

表5 不同生长调节因子对柑橘子叶出愈速度影响的多因素方差分析

Table 5 Multiple factor ANOVA of callus accumulating velocity from growth-regulators

多因素方差分析 Multiple factor ANOVA	均方 MS	方差值 F	显著性 Sig	贡献效应 η^2
模型 Model	0.001	19.319	0.000	0.945
2,4-D	0.001	36.449	0.000	0.890
NAA	0.000	11.855	0.003	0.725
6-BA	0.000	3.745	0.066	0.454
KT	0.001	25.227	0.000	0.849

注:$R^2=0.945$。

2.5 耐寒柑橘子叶愈伤组织诱导条件的综合选择

对柑橘子叶外植体脱分化与愈伤组织诱导不同培养条件下的膨大率、膨大速度、出愈率和出愈速度,采用归一化法进行极值标准化处理,对9种培养基中的柑橘子叶外植体愈伤组织诱导进行综合评价,由表6可以看出,耐寒柑橘子叶外植体在试验处理YS2中的各效应变量的综合指数明显高于其它8种处理,因此从宏观上综合膨大率、膨大速度、出愈率和出愈速度4个测量指标效应,对于柑橘子叶外植体而言,诱导外植体脱分化形成愈伤组织的最适生长调节因子组合配比为2,4-D 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L。

表6 4种效应变量的归一化综合计算

Table 6 The result of normalization from the four dependent variable of growth-regulators

处理编号 No. of treatment	膨大率 Expanding rate	膨大速度 Expanding speed	出愈率 Callus inducing rate	出愈速度 Callus accumulating speed	总和 Summation
YS 1	0.1250	0.1699	0.0000	0.1042	0.3991
YS 2	0.2500	0.2500	0.1584	0.2279	0.8863
YS 3	0.0879	0.0277	0.0932	0.0646	0.2734
YS 4	0.1719	0.0000	0.1089	0.0000	0.2808
YS 5	0.1250	0.0101	0.1613	0.0788	0.3752
YS 6	0.0000	0.0878	0.0006	0.1042	0.1926
YS 7	0.1607	0.1642	0.2212	0.2500	0.7961
YS 8	0.1979	0.0502	0.2500	0.1421	0.6402
YS 9	0.1875	0.0898	0.1452	0.1042	0.5267

3 讨论

相关研究报道愈伤组织的形成过程是一个受培养基成分、外植体类型、光照条件、植物基因型等诸多因素之间互动作用影响的复杂过程[9]。其中植物生长调节物质是细胞分化、分裂、形态建成等过程的关键因子,只有在培养基中加入适当的植物生长调节因子后,才能诱导细胞分裂启动愈伤组织的形成[10]。该研究是以MT为基本培养基,通过添加2,4-D、NAA、6-BA与KT 4种生长调节因子组合配比,分析其对耐寒柑橘子叶外植体愈伤组织诱导的效应程度与效应大小。结果表明,4种生长调节因子对柑橘子叶外植体启动脱分化与诱导愈伤组织具有重要的影响作用,无论是静态的膨大率与出愈率,还是动态的膨大速度与出愈速度,均表现出明显的生理调控效应,其综合效应程度均在较高水平(>85%)。虽然4种生长调节因子对柑橘子叶外植体的膨大率、膨大速度、出愈率与出愈速度的综合贡献作用显著,但是不同类型的生长调节因子贡献程度存在差异;其中2,4-D对柑橘子叶外植体启动脱分化与脱分化诱导形成愈伤组织均表现出明显的优势调控作用,NAA次之;而6-BA与KT则趋向于对柑橘子叶外植体脱分化诱导形成愈伤组织的静态指标与动态指标之间起着差异性调控作用。耐寒柑橘子叶脱分化诱导愈伤组织是一个复杂的生理调控过程,涉及到各种生长调节因子的综合作用,诱导结果也表现在多方面的效应指标变化,因此实际操作过程中需要对变量的效应进行简约化处理,综合分析各种因变量的综合效应,筛选总效应相对最佳的生长调节因子组合配比。通过4种因变量的归一化处理,综合效应最高的生长调节因子组合配比为2,4-D 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L。

参考文献

[1] Yao L H,Jiang Y M,Shi J,et al. Flavonoids in food and their health benefits[J]. Plant Foods for Human Nutrition,2004,59:113-122.

[2] 彭燕,盛雪飞,吴丹,等. 柑橘属中黄铜类化合物的研究与应用进展[J]. 食品与发酵工业,2009,35(7):113.

[3] 吴桂苹,苏学素,焦必宁,等. 柑橘活性成分检测技术研究进展[J]. 食品与发酵工业,2006,32(9):117-121.

[4] Liu J H,Xu X Y,D X. Advances on citrus somatic hybrids and inheritance of their nuclear and cytoplasmic components [J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2004,12(3):237-246.

[5] 邓秀新. 世界柑橘品种改良的进展[J]. 园艺学报,2005,32:1140-1146.

[6] 刘治才,敖义俊,王侠,等. 城固县柑橘产业发展成就及前景展望[J]. 浙江柑橘,2011,27(4):2-5.

[7] 方治军,杨义伶,黄春辉,等. 生物技术在柑橘砧木上的应用[J]. 中国农学通报,2010,26(10):226-229.

[8] 胡选萍. 山药不同外植体诱导愈伤组织研究[J]. 江苏农业科学,2009(4):75-76.

[9] 申秋秀,胡根海,赵伟伟,等. 3不同浓度激素处理对棉花愈伤组织诱导的影响[J]. 种子,2009,28(7):101-104.

[10] 严姜黎,张翼,邢梅. 红肉猕猴桃离体快速繁殖技术研究[J]. 华中农业大学学报,2008,27(1):101-104.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

四川天彭牡丹遗传多样性研究

甘　娜[1,2]，陈其兵[2]，罗承德[3]

(1.四川师范大学 地理与资源科学学院，四川 成都 610066；2.四川农业大学 风景园林学院，四川 雅安 625014；
3.四川农业大学 林学院，四川 雅安 625014)

摘　要：以20个天彭牡丹品种为试材，通过野外调查与ISSR分子标记试验，研究了其遗传多样性。结果表明：天彭牡丹组内不同品种的表型变异较大，按照花色、花期、花型均可划分出不同的分类结果。20个牡丹群体遗传多样性水平较高，平均Nei's基因多样性指数(He)为0.3657，平均Shannon信息指数(I)为0.4901，20份材料的遗传相似系数为0.44～0.94，平均遗传相似系数为0.69，其中'醉西施'与'血丝红'最近，GS为0.94，'红腰楼'的相似系数次之。聚类分析结果表明，聚类结果与花色相关性最大。可见，根据花色对天彭牡丹进行类别划分具有重要的实践和理论意义。

关键词：天彭牡丹；表型变异；分子标记；遗传多样性

中图分类号：S 685.11　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1001－0009(2014)09－0112－05

四川彭州市古称天彭，唐代已有牡丹栽培，南宋时栽培最盛，成为西南地区的栽培中心，是我国现代三大牡丹聚集区之一，也是我国牡丹西南品种群的分布中心。陆游所作《天彭牡丹谱》中记载的5种紫花牡丹，极有可能来源四川牡丹(*P. szechuanica*)或四川牡丹和原有品种杂交而来，至于4种黄花类型也可能来源于四川道孚的野生牡丹类群。尽管如此，天彭牡丹的起源尚不清楚。目前，从彭州的地理位置上看离现在仍有野生牡丹分布的茂县和汶川很近，这有可能是天彭牡丹的来源[1]，但这还缺乏足够的理论依据。天彭牡丹是中国牡丹西南牡丹品种群的重要组成部分，以其植株高大、园艺化程度高、耐湿热等特点，成为普遍受关注的地域性牡丹品种。就天彭牡丹的分类而言，大多根据其花色、

第一作者简介：甘娜(1981-)，女，四川富顺人，博士研究生，讲师，研究方向为城市规划与观赏园艺。E-mail:gan_na1981@126.com.
责任作者：陈其兵(1963-)，男，四川万源人，教授，博士生导师，研究方向为园林植物与观赏园艺。
基金项目：国家科技支撑计划资助项目(2008NZ0045)；四川省科技厅重点资助项目(2009FZ0028)。
收稿日期：2013－12－12

Study on Effect of Different Growth-regulators on Callus Induction of Cotyledon Explants About *Critus rutaceae*

HU Xuan-ping[1,2]

(1. School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Shaanxi Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong, Shaanxi 723000)

Abstract: Taking *Citrus rutaceae* leaves as materials, the effect of 2,4-D, NAA, 6-BA, KT on the callus induction was researched. The results showed that, NAA, 2,4-D, 6-BA and KT had significant influence on callus induction from cotyledon explants and they contributed to callus induction for each dependent variable were 86.4%, 93.9%, 93.9% and 94.5%. The sequences that four growth-regulators exerted effect on expanding rate, expanding velocity, callus inducing rate and callus accumulating velocity were 2,4-D＞NAA＞6-BA＞KT, KT＞2,4-D＞NAA＞6-BA, 2,4-D＞NAA＞6-BA＞KT, 2,4-D＞KT＞NAA＞6-BA. Taking the comprehensive effect of various measurement variables into consideration, the appropriate culture condition about four growth-regulators combining for cotyledon explants of *Citrus rutaceae* was 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L.

Key words: *Citrus rutaceae*; cotyledon; growth-regulators; callus

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn