

新疆树上干杏不定芽再生影响因子的研究

周 黎¹, 王晓军¹, 刘 敏¹, 刘 峰¹, 郝秀英²

(1. 中国科学院 新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆农业科学院 微生物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘 要:以新疆树上干杏茎段为材料, 研究了外植体消毒、植物激素的种类及其浓度和取材时间等因素对茎段不定芽再生的影响。结果表明:75%酒精 30 s+0.1% HgCl₂ 5 min+15% H₂O₂ 20 min 具有较好的灭菌效果, 且不会较大影响茎段不定芽的再生; 最适诱导不定芽再生的培养基为改良 MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 培养 15 d 后出芽率可达到 90.8%; 分裂素 TDZ 促进不定芽再生的效果优于 6-BA; 春季取材效果明显优于夏季取材。

关键词:杏; 不定芽; 再生

中图分类号: S 662.2(245) 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)24-0073-03

新疆树上干杏, 又名吊树干, 因其果实成熟后可一直在树上脱水风干不落果而得名。该杏原为山上野杏, 被果农发现后经栽培嫁接被广泛种植^[1], 现为新疆兵团农四师六十一团独特的优良品种。树上干杏无论是干果还是鲜果品味都极好, 其核壳极薄, 轻磕即破, 果仁香甜可口, 实为风沙地区的无价之宝^[2]。自 RACHE^[3]报道杏离体叶片经胚状体培养获得再生植株以来, Tornero^[4-5]、马峰旺^[6]、石荫坪^[7]等对杏的离体再生系统

的建立做了详细的研究。由于杏的再生体系的建立受基因型、组织来源、生理状态等多种因素的影响, 每一种杏再生体系的建立所需的条件都不相同。到目前为止只有特早熟杏、大扁杏^[8]、山杏等某些品种上初步建立了离体器官再生体系, 而树上干杏至今尚未建立完善的再生体系。试验对树上干杏不定芽再生的有关因素进行了研究, 以期建立完善的再生体系, 为进一步开展树上干杏的遗传育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以新疆伊犁清水县六十一团果园内树上干杏的当年新生杏枝为试材。

1.2 试验方法

试验均采用改良 MS 为基本培养基, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L, pH 5.8。培养温度为 20℃, 光照强度为 2 000 lx, 光周期(昼/夜)为 15 h/9 h。

第一作者简介:周黎(1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物生理生化。E-mail: 1483548161@qq.com。
通讯作者:王晓军(1962-), 男, 硕士, 研究员, 现从事植物资源利用研究工作。E-mail: wangxj@ms.xjb.ac.cn。
基金项目:中科院“西部行动计划高新技术”资助项目(KGCXZ-YW-509)。
收稿日期:2010-10-25

Study on Extraction and Antioxidant Activity of Water-soluble Coarse Polysaccharides from Camphor Tree

WANG Na WANG Kai-xuan, LI Jing, SU Li-yi

(College of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018)

Abstract: Taking leaves of camphor tree as test material, through L₉(3⁴)orthogonal experiment, the extraction method of the water-soluble polysaccharides and antioxidation activity were studied. The results showed that the ratio of sample to water was 1 : 110, the temperature of extraction was 80℃, the time of extraction was 2 hours and extracting two times. The contents of polysaccharides in leaves of four seasons were respectively 93.8, 77.00, 83.35 and 116.55 mg/g. The water-soluble coarse polysaccharides had higer scavenging ability to H₂O₂, but lower to hydroxyl radical, DPPH free radica and restoring ability in a certain range of concentration. The antioxidant activity was not as good as VC.

Key words: camphor tree; polysaccharides; extraction; antioxidant activity

1.2.1 外植体灭菌条件对不定芽再生的影响 以5月采取的枝条为试材,去叶后用洗洁精清洗,剪成1.5~2.0 cm带1个腋芽的茎段,用自来水冲洗30 min。在无菌间操作台上用75%酒精表面消毒30 s后,转入0.1% HgCl₂溶液分别浸泡2、5、7 min;转入15% H₂O₂溶液中浸泡20 min。灭菌处理后用无菌水冲洗5遍,用灭菌滤纸吸干水分,将茎段竖直插入培养基(改良MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L)中培养,每瓶3个,每组试验30个外植体,3次重复,10 d后统计污染率、出芽率。污染率(%)=污染外植体数/总外植体数×100%;出芽率(%)=出芽外植体数/总外植体数×100%;有效出芽率(%)=未污染的出芽外植体数/总外植体数×100%。

1.2.2 激素对不定芽再生的影响 不定芽再生培养基以改良MS培养基为基本培养基,添加不同浓度的TDZ、6-BA和NAA。TDZ和6-BA浓度分别为1.0、2.0 mg/L;NAA浓度分别为0.1、0.2 mg/L。茎段接入培养基培养15 d后,统计出芽率。每组试验30个外植体,3次重复。

1.2.3 取材时间对不定芽再生的影响 取材时间分为2次,分别为5月10日和7月15日。2次取回的枝条分别经过相同的灭菌处理后接入培养基(改良MS+

1.0 mg/LTDZ+0.1 mg/L NAA)中,培养15 d后统计存活率和出芽率。

1.3 数据分析

试验数据采用Spss 13.0统计软件进行分析,用LSD法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌条件对不定芽再生的影响

升汞是一种剧毒的重金属盐杀菌剂,其杀菌的原理是Hg²⁺可与带负电荷的蛋白质结合,使细菌蛋白变性,酶失活,可以有效地杀死附着在外植体表面的细菌及真菌芽孢。虽然升汞的灭菌效果较好,但是其残毒难以除去,会对外植体具有毒害作用。试验中它作用时间的长短,会对外植体出芽的时间造成影响,处理时间越短,出芽所需要的时间也越短,反之就越长,严重会导致外植体不出芽或褐化死亡。由表1可知,随着外植体在0.1% HgCl₂溶液中浸泡的时间越长,虽然外植体的污染率明显降低,但是出芽率反而降低了。因此,在灭菌时选择合适的处理时间是很必要的。试验结果表明,用升汞处理5 min能有效灭菌且不会严重影响树上干杏的不定芽再生,是比较适当的选择。

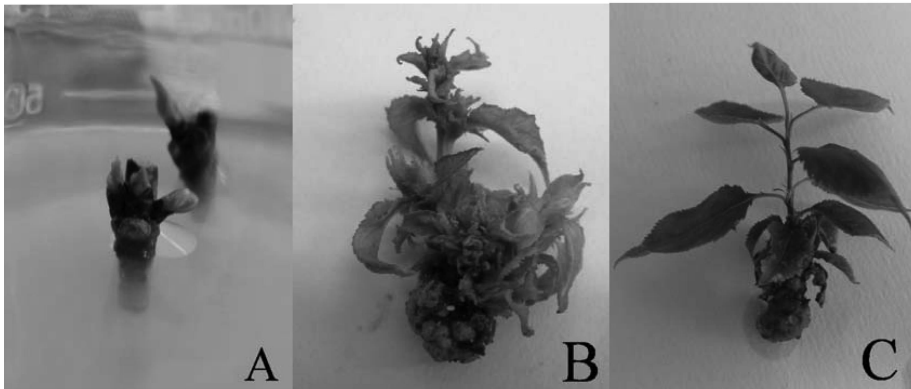


图1 激素对不定芽再生的影响
注: A为茎段在诱导培养基中发芽; B为玻璃化苗; C为玻璃化恢复的苗。

| 升汞处理 | 污染率 | 出芽率 | 有效出 | 芽启动 |
|--------|------------|------------|------------|-------|
| 时间/min | / % | / % | 芽率/ % | 时间/ d |
| 2 | 46.5±3.40a | 95.6±0.32a | 51.1±1.11a | 4 |
| 5 | 8.9±0.84b | 89.6±0.65b | 81.6±0.35b | 5 |
| 7 | 3.4±0.23b | 70.4±1.50c | 68.0±0.79c | 15 |

注: 不同小写字母表示0.05水平上差异显著。下同。

2.2 激素对不定芽再生的影响

茎段在插入诱导出芽的培养基后,培养4~5 d后,叶柄就会被新生的小芽顶掉。加有TDZ的培养基中的茎段会底端膨大长出愈伤组织(图1-A),TDZ浓度越大该现象越明显,而加有6-BA的培养基中没有这种现象。

由表2可看出,在诱导出芽率方面,TDZ与6-BA的差异并不是很大,NAA浓度相同时,TDZ要比6-BA的诱导率略高一些。从诱导的组培苗生长状况来看,高浓度的TDZ和6-BA都会引起组培苗的玻璃化,而6-BA更易引起组培苗的叶面卷曲、畸形(图1-B~C)。综合来看,TDZ对树上干杏茎段诱导不定芽的效果更好。在6组配比当中,可发现细胞分裂素与生长素的配比也会影响不定芽再生,细胞分裂素:生长素=10:1的出芽率高于20:1的出芽率。因此,在改良MS培养基中加入添加1.0 mg/L的TDZ与0.1 mg/L的NAA对诱导产生

表 2 激素对不定芽再生的影响

| 激素浓度/ mg · L ⁻¹ | | | 出芽率/ % | 组培苗生长状况 |
|----------------------------|------|-----|-------------|------------------|
| TDZ | 6-BA | NAA | | |
| 2.0 | 0 | 0.2 | 89.4±1.91a | 节间短, 叶卷曲 |
| 2.0 | 0 | 0.1 | 76.7±3.25b | 节间极短, 叶黄不伸展, 玻璃化 |
| 1.0 | 0 | 0.1 | 90.8±0.76c | 节间短, 叶伸展 |
| 0 | 2.0 | 0.2 | 88.9±1.66cd | 节间短, 叶黄不伸展 玻璃化 |
| 0 | 2.0 | 0.1 | 83.3±2.48d | 无茎的分化 生长缓慢, 叶片重叠 |
| 0 | 1.0 | 0.1 | 87.5±2.05cd | 节间短, 叶黄不伸展 |

芽苗较为有利。

2.3 取材时间对不定芽再生的影响

由表 3 可看出, 5 月取材的污染率明显低于 7 月取材的污染率, 出芽率明显高于 7 月取材的出芽率, 芽启动时间也早于 7 月取材的污染率。由此可见, 取材的时间对树上干杏茎段不定芽再生的影响较大。春季取材, 外植体处于生长旺盛的阶段, 易于出芽, 新生的嫩芽表面细菌真菌较少, 易于去除; 夏季取材, 外植体处于生长稳定期, 准备迎接秋季即将来临的休眠, 细胞不活跃, 不易出芽, 枝条表面细菌真菌复杂, 难于去除, 为诱导出芽带来困难。

表 3 取材时间对不定芽再生的影响

| 取材时间/ 月·日 | 污染率/ % | 出芽率/ % | 芽启动时间/ d |
|-----------|------------|------------|----------|
| 5-10 | 8.9±0.84a | 89.6±0.66a | 5 |
| 7-15 | 25.6±1.04b | 38.0±3.73b | 10 |

3 结论

在杏的组培报导中, HgCl₂ 处理时间一般为 7 min, 树上干杏对 HgCl₂ 处理时间较为敏感, 7 min 的处理时间会影响茎段不定芽的出芽率, 75%酒精 30 s+0.1% HgCl₂ 5 min+15% H₂O₂ 20 min 具有较好的灭菌效果, 且不会较大影响茎段不定芽再生。春季取材效果明显优于夏季取材, 夏季取材可用无菌苗作为外植体。

Factors Affecting Shoot Regeneration of Apricot Cultivar “SHU shang-gan”

ZHOU Li¹, WANG Xiao-jun¹, LIU Min¹, LIU Feng¹, HAO Xi-ying²

(1. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011; 2 Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi, Xinjiang 830091)

Abstract: Factors affecting successful and rapid shoot regeneration of apricot cultivar “SHU shanggan” was studied. Ethanol, HgCl₂ and H₂O₂ were applied in several combinations for disinfection; time of disinfection, plant growth regulators TDZ, 6-BA and NAA, season of obtain the explants were evaluated for the optimization of shoot regeneration. The results showed that 30 s 75% Ethanol+5 min 0.1% HgCl₂+20 min 15% H₂O₂ was the best combinations for disinfection, The highest number of new microshoots was obtained in the culture medium, modified MS+1.0 mg/ L TDZ+0.1 mg/ L NAA, with 90.8% shoot regeneration rate. We found that TDZ was better than 6-BA in adventitious shoot regeneration and we’d better take the explants in spring.

Key words: apricot; shoot; regeneration

综合 DZ 和 6-BA 对茎段出芽率及组培苗的生长状况的影响, TDZ 比 6-BA 的效果好, 这与其它杏组培研究者得出的结论是一致的。从激素配比对出芽率的影响来看, 细胞分裂素 : 生长素 = 10 : 1 的浓度比出芽率高于 20 : 1 的, 在改良 MS+TDZ 1.0 mg/ L+NAA 0.1 mg/ L 培养 15 d, 出芽率可达到最好的结果 90.8%。玻璃化的现象在树上干杏的组培苗中容易发生, 比较有效的方法是把玻璃化的苗转入改良 MS+0.2 GA₃ 的培养基中, 转入后有明显的生长, 新生叶片也不再卷曲, 节间也会生长开来, 继代 2 次即可基本恢复正常。Tomero^[9] 文中报导的使用底部冷控系统可有效改善组培苗的玻璃化, 由于需要特殊的设施, 试验中并未尝试。

参考文献

[1] 陆承志. 新疆杏树优良品种介绍[J]. 山西果树, 2004(6): 26-27.
[2] 杨超, 李俊英. “树上干”杏栽培管理技术[J]. 新疆林业 2008(2): 30.
[3] Rachel E. Pieterse. Regeneration of plants from callus and embryos of ‘Royal’ apricot [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989, 19: 175-179.
[4] Perez-Tornero O, Bugos L, Egea J. Introduction and establishment of apricot in vitro through the regeneration of shoots from meristem tips [J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 1999, 35: 249-253.
[5] Perez-Tornero O, Bugos L. Different media requirements for micro-propagation of apricot cultivars [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 63: 133-141.
[6] 王鸿, 马峰旺, 郝燕. 山杏下胚轴再生植株的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(5): 127-128.
[7] 石荫坪, 王强生, 陈学森 等. 杏特早熟品种胚培的研究[J]. 落叶果树, 1997(1): 3-5.
[8] 齐高强, 赵忠, 张存旭 等. 大扁杏组培基本培养基与培养条件的优化研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(3): 115-118.
[9] Mohan J S, Haggman H. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits[M]. Springer: 2007.