

# 百香果组织培养及植株再生

杨冬业<sup>1</sup>, 张丽珍<sup>2</sup>, 徐淑庆<sup>3</sup>

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541001; 2. 桂林师范高等专科学校, 广西 桂林 541001; 3. 钦州学院生化系, 广西 钦州 535000)

**摘要:**以 MS 为基本培养基, 百香果茎段为外植体, 进行百香果组织培养及植株再生的研究。结果表明: MS+6-BA 2.0 mg/L 适合丛生芽诱导, 诱导率达 100%; MS+6-BA 1~1.5 mg/L+IBA 0.1~0.2 mg/L 适合继代增殖培养; 1/2MS+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 适合生根诱导, 诱导率达 100%。

**关键词:**百香果; 植株再生; 组织培养

**中图分类号:**S 667.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0125-03

百香果又称鸡蛋果, 学名西番莲, 营养丰富, 有“果汁之王”的美称, 属多年生热带藤本植物, 其果汁可散发出番石榴、菠萝、香蕉等 10 多种水果的浓郁香味。据科学预测, 其果实含有人体所需的 17 种氨基酸、多种维生素和类胡萝卜素以及微量元素。可溶性固形物占 5%~16%, 总酸量为 3.8%~4%, 甜酸适中; 营养价值很高。用它为原料, 加工制成果汁、果露、果酱、果冻, 风味独特。果皮可作饲料和提取果胶, 根、茎、叶均可入药, 有消炎止痛、活血强身、滋阴补肾、降脂降压等疗效。近年来, 国际市场对西番莲果汁的需求以每年 15%~20% 的速度增长, 大有供不应求之势<sup>[1]</sup>。百香果的繁殖方法主要有 2 种, 一是用种子直接播种繁殖, 二是用蔓条扦插繁殖。由于不加选择地随意压藤繁殖, 加快了品种的退化, 病害增加, 特别容易感染茎腐病, 产量大大降低<sup>[2]</sup>。该研究通过对百香果组织培养的研究, 旨在为百香果的产业发展开辟一条新的捷径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

紫果西番莲(*P. edulis*)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 培养基的配制** 用 MS 培养基为基本培养基, 加 3% 的蔗糖和 0.7% 的琼脂, 调 pH 至 5.8~6.0, 在不同的培养阶段再加入不同的植物生长调节剂。培养基分装到 200 mL 的培养瓶中, 在 121℃、0.1~0.15 MPa 压力下灭菌 20 min。

**1.2.2 外植体的消毒** 晴好天气的中午或下午在健壮无病害的植株上剪取外植体, 将材料祛除不要的部分,

在搅匀的已经加入适量洗衣粉的水中浸泡 3~5 min, 再用自来水流水冲洗 1 h, 再使用 0.1% 的升汞溶液灭菌 10~12 min, 用无菌水冲洗 3~5 次, 备用。

**1.2.3 丛生芽诱导培养** 在超净工作台上将准备好的材料接种到诱导分化培养基中, 每瓶接种 2~3 个外植体, 注意不要插入培养基太深。将接种好的培养瓶放在光照 2 000 lx、温度 25℃ 的培养室中培养。

**1.2.4 继代增殖培养** 把初代培养形成的丛生芽从基部切下, 转接入继代增殖培养基中进行增殖培养, 第 25 天统计结果。

**1.2.5 生根诱导培养** 待不定芽长至 2~3 cm 高时, 将其从基部切下, 接种到生根培养基中进行生根诱导。第 25 天统计结果。

**1.2.6 再生植株的移栽** 当植株根长至 2~3 cm 时, 进行驯化移栽。首先将瓶口打开, 锻炼 2~3 d, 然后取出植株, 小心洗净根部培养基, 移栽于营养钵中。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同部位外植体对诱导丛生芽的影响

通过采用不同的百香果部位, 在培养基营养成分相同的情况下, 附加 2.5 mg/L 的 6-BA, 温度和光照条件均相同的条件下培养, 观察其出芽率, 结果表明, 叶片较难诱导出芽, 茎段的出芽诱导率为 100% (表 1)。

表 1 不同部位外植体对诱导丛生芽的影响

| 外植体   | 叶  | 茎   |
|-------|----|-----|
| 接种数/块 | 30 | 30  |
| 出芽率/块 | 5  | 30  |
| 出芽率/% | 17 | 100 |

### 2.2 不同消毒时间对百香果组织培养的影响

由表 2 可看出, 先用酒精消毒 30 s 后, 再用 0.1% 升汞消毒 10 min 时, 效果最好, 出芽率最高。随着消毒时间的增加, 对细胞的穿透力增强, 所以杀伤增高, 使细胞坏死变黄。而消毒时间太短则会引起消毒不完全, 细菌滋生, 使外植体变黄坏死。

**第一作者简介:**杨冬业(1976-), 男, 广西昭平人, 硕士, 讲师, 现主要从事细胞工程研究工作。E-mail: gysxk@126.com。

**收稿日期:**2010-10-22

表2 不同消毒时间对百香果组织培养的影响

| 升汞消毒<br>时间/min | 升汞(0.1%) |      |      |      |      | 酒精(70%) + 升汞<br>(先用酒精消毒 30 s 后再用升汞消毒) |      |       |      |      |
|----------------|----------|------|------|------|------|---------------------------------------|------|-------|------|------|
|                | 6        | 8    | 10   | 12   | 16   | 6                                     | 8    | 10    | 12   | 16   |
| 接种数/块          | 30       | 30   | 30   | 30   | 30   | 30                                    | 30   | 30    | 30   | 30   |
| 出芽率/块          | 12       | 25   | 29   | 26   | 5    | 15                                    | 28   | 30    | 22   | 4    |
| 出芽率/%          | 40.0     | 83.3 | 96.7 | 86.7 | 16.7 | 50.0                                  | 93.3 | 100.0 | 73.3 | 13.3 |

## 2.3 植物激素对百香果丛生芽诱导的影响

为了筛选合适的细胞分裂素,设计表3试验,30 d后观察。由表3可知,6-BA 更适合用于丛生芽的诱导。为了确定适合的 6-BA 浓度,进一步作诱导试验,接种 30 d后观察,结果见表4。接入 5 种不同浓度 6-BA 的茎段,在其它条件不变的情况下出芽率的高低取决于 6-BA 的绝对量。浓度较低时,出芽率较低且趋于平缓,随着浓度的增大,出芽率也增高,在 6-BA 2.0 mg/L 时最高,随着浓度的增大,出芽率会下降,因为浓度升高,愈伤组织就不能分化出苗,变黄坏死。

表3 不同细胞分裂素对百香果丛生芽诱导的影响

| 细胞分裂素种类 | 浓度<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 诱导出芽率/% | 平均出芽个数/棵 | 芽的特征                      |
|---------|-----------------------------|---------|----------|---------------------------|
| 6-BA    | 2.0                         | 92.7    | 5.2      | 芽颜色嫩黄或淡绿,健壮,同一外植体所出的芽大小相似 |
| KT      | 2.0                         | 37.3    | 1.4      | 芽淡黄偏白,瘦小,同一外植体所长芽大小不均     |
| ZT      | 2.0                         | 56.3    | 2.5      | 黄色,细小,嫩弱所长的芽大小不均          |
| 不加激素    | —                           | 未发现出芽   | —        | —                         |

注:接种数均为 30。

表4 不同浓度 6-BA 对百香果丛生芽诱导的影响

| 6-BA 浓度/mg · L <sup>-1</sup> | 0.5  | 1.0  | 1.5  | 2.0 | 2.5  |
|------------------------------|------|------|------|-----|------|
| 接种数/块                        | 30   | 30   | 30   | 30  | 30   |
| 出芽率/块                        | 7    | 15   | 24   | 30  | 25   |
| 出芽率/%                        | 23.3 | 50.0 | 80.0 | 100 | 83.3 |

## 2.4 继代增殖培养

将诱导获得的丛生芽从其基部切下,接种在下列培养基中,通过芽生途径进行增殖,接种后 5~7 d,基部膨大,15 d 长出一些细小的丛生芽,25 d 左右小芽长大,变成一簇丛生芽。由表5可知,进行继代培养时,遵循激素浓度递减原则进行<sup>[5]</sup>,这样既可获得较高的增殖系数,同时获得的苗也比较健壮。其中附加 6-BA 1~1.5 mg/L 与 IBA 0.1~0.2 mg/L 配合使用比较利于壮苗。

表5 不同激素浓度组合下无根苗生长情况

| 6-BA<br>/mg · L <sup>-1</sup> | IBA/mg · L <sup>-1</sup> |         |          |                  |
|-------------------------------|--------------------------|---------|----------|------------------|
|                               | 0.05                     | 0.1     | 0.2      | 0.5              |
| 1.0                           | 苗嫩绿色,大小均匀                | 苗绿色,较粗壮 | 苗绿色,粗长   | 苗深绿色,较高          |
| 1.5                           | 苗嫩绿色,长得均匀                | 苗绿色,健壮  | 苗嫩绿色,健壮  | 苗绿色,比较高大         |
| 2.0                           | 苗小而均匀,淡黄色或嫩绿色            | 苗小,淡黄色  | 苗绿色,大小不一 | 苗深绿色,比较高,出现愈伤组织  |
| 2.5                           | 苗、很幼小,淡黄色                | 苗幼小,淡黄色 | 苗小,淡黄色   | 苗小黄色,基部有较明显的愈伤组织 |

## 2.5 生根培养

生根培养是组织培养快速繁殖的重要环节,是快速繁殖种苗的有力保证。把丛生状的幼苗切割成单株小苗,接入不同生根培养基,25 d 后观察,由表6可知,生根培养基最好为 1/2MS 附加 0.1 mg/L 的 NAA 和 IBA。在此培养基上诱导的根粗壮,数目多,生长良好。

表6 不同无机盐以及不同激素组合对百香果生根的影响

| 培养基   | NAA 0.2 mg/L          | IBA 0.2 mg/L            | NAA 0.1 mg/L + IBA 0.1 mg/L    |
|-------|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 1/4MS | 平均根数为 1~2 根,细弱,叶色发黄老化 | 平均根数为 3 根,粗大,叶色稍老化,变黄   | 根数约为 3~5 根,平均长度 2~3 cm 根部有愈伤组织 |
| 1/2MS | 平均根数为 3~4 根,细长        | 根数平均为 4~5 根,2~3 cm 长,粗大 | 根数约为 5~8 根,平均长度 3~4 cm,较粗大     |
| MS    | 根少,为 1~2 根,较细长        | 根数为 3~4 根,粗大,2~3 cm 长   | 根数约为 3 根,有 1~2 根较粗,平均长度为 2 cm  |

## 2.6 移栽

待根长到 2~3 cm 时,将培养瓶从培养室移入温室,打开盖子,在自然光下锻炼 2~3 d。锻炼过程中注意瓶温,避免过强阳光灼伤幼苗。经过锻炼的幼苗用镊子轻轻地取出,放入清水中洗去附着于根部的培养基,栽入带营养土的营养杯中。栽植好后,浇足定根水,放置于带有遮阳网的塑料大棚内,注意遮荫、保湿、通气。移栽后 10~15 d 就可长出新根与新叶,移栽成活率可达 95% 以上。

## 3 讨论

从理论上讲,生物体的每一个细胞都包含有该物种所特有的全套遗传物质,即该物种的全套遗传信息<sup>[3]</sup>。处于离体状态的植物细胞、组织、器官在一定的营养物质、激素和其它外界条件下,表现出其全能性,发育成完整的植株,在人工条件下实现这一过程就是植物的组织培养<sup>[6]</sup>。6-BA、KT 等细胞分裂素类物质对诱导出芽一般具有重要作用<sup>[4]</sup>。根据试验观察,百香果茎段丛生芽诱导培养并不难,但试验中容易出现污染,成为百香果组培失败的主要因素。造成污染的因素有很多,包括前期的清洗不干净,培养基的分装、灭菌过程中造成污染,取材过程的疏忽,净台操作过程中的人为因素造成污染和培养过程中出现内生菌等。采取流水冲洗 1 h 后,先用酒精消毒 30 s 后,再用 0.1% 升汞消毒 10 min 时效果最好,出芽率最高。

在外植体的选择上,以叶为外植体重复 Otahola V 等<sup>[7]</sup>的试验,但效果都不佳。以芽生芽的方式建立再生体系是最快捷的途径,以百香果茎段为外植体诱导丛生芽,诱导率为 100%,增殖系数为 5~6/月,移栽成活率在 95% 以上。百香果试管苗培养的成功,将为百香果试管苗工厂化生产扫清了障碍,并有助于百香果产业的发展。

# 菌液浓度对 PCR 扩增的影响

郝爱平, 魏继承, 国会艳

(牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157012)

**摘要:**以大肠杆菌和农杆菌(含有多丁质酶基因)为试材,研究了菌液浓度对 PCR 扩增的影响。结果表明:当菌液 OD 值达到 0.006 后作为模板进行 PCR 扩增,经电泳检测即可出现条带,随着 OD 值的增加电泳条带逐渐变亮;OD 值在 0.200~0.700 的电泳条带比较清晰;LB 液体培养基中的成分对 DNA 模板没有影响,菌液 DNA 能正常扩增。

**关键词:**菌液浓度;模板;PCR

**中图分类号:**Q 949.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0127-03

利用 PCR 技术进行重组体的筛选是分子克隆实验中常用的方法之一。但常规的 PCR 过程需要进行细菌培养、质粒制备等多步操作后才能进行基因扩增,操作繁琐,耗时较长,同时在反复的操作中 DNA 量损失也较大,产率较低<sup>[1]</sup>。菌液作为模板进行 PCR 反应则大大节约了时间和成本,是一种经济、快速、准确的好方法。该实验探讨了能够进行 PCR 扩增的菌液浓度范围,并讨论

不同细菌菌液浓度与 PCR 扩增的关系,为今后的分子生物学实验提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株 中间表达载体为大肠杆菌和农杆菌(含有多丁质酶基因)。

1.1.2 主要试剂和酶 rTaq 酶、dNTPMixture、DL2000DNAMarker、10×PCRbuffer、Goldview,购于大连宝生物公司。PCR 引物合成于大连宝生物公司。CH-1: 5'-AGCATCTAGAATCAACCATGGCTCTCAAC-3'; CH-2: 5'-CGACGAGCTCATATAAATTAGCAAGAGAGG-3'。

1.1.3 仪器 T6 型紫外分光光度计,电子恒温水浴锅,

**第一作者简介:**郝爱平(1979-),女,硕士,讲师,现从事植物分子生物学的教学与科研工作。E-mail:swxhap@126.com。

**基金项目:**牡丹江师范学院青年专项基金资助项目(QF200902)。

**收稿日期:**2011-11-24

## 参考文献

- [1] 章宁,林清洪,曾新萍,等.西番莲生物技术研究进展[J].亚热带植物科学,2003,32(4):77-80.
- [2] 张兴旺.“百香果”与西番莲[J].柑桔与亚热带果树信息,2004,20(5):11.
- [3] 吴庆余.基础生命科学[M].北京:高等教育出版社,2006:56-84.
- [4] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版

社,1991:4-6.

- [5] 张丽珍,徐淑庆,杨冬业,等.青蒿组织培养及其快速繁殖研究[J].生物学通报,2010,45(3):48-50.
- [6] 张淑红.植物组织培养及其发展方向[J].垦殖与稻作,2003(6):44-46.
- [7] Otahola V. Plant regeneration of passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) through leaf disc *in vitro* culture[J]. Bioagri., 2000,12(3):71-74.

## Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *P. edulis*

YANG Dong-ye<sup>1</sup>, ZHANG Li-zhen<sup>2</sup>, XU Shu-qing<sup>3</sup>

(1. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004; 2. Guilin Normal College, Guilin, Guangxi 541004; 3. Qinzhou University, Qinzhou, Guangxi 535000)

**Abstract:** Taking stems with buds of passionfruit as explants, MS as basal medium, passionfruit tissue culture and plantlet regeneration of passionfruit were studied. The results showed that MS + 6-BA 2.0 mg/L was suitable for inducing adventitious buds, the induced rate reaches to 100%. The perfect medium for adventitious shoot proliferation was MS + 6-BA 1~1.5 mg/L + IBA 0.1~0.2 mg/L, 1/2MS + IBA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L was the best suitable medium for inducing roots and the induced rate reached to 100%.

**Key words:** passionfruit; tissue culture; regeneration