

人参果茎尖脱毒培养与快速繁殖

翟进升, 邹爱兰, 常兴亚

(阜阳师范学院生物系, 安徽 阜阳 236032)

摘要 对人参果(*Solanum muricatum* Ait)茎尖进行离体培养及快速繁殖。结果表明:适于外植体生长分化的培养基是不加任何激素或只加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基;用MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA培养基能促进组培苗茎尖快速伸长,有利于茎尖的剥离和脱毒培养;适于茎尖愈伤组织形成和分化的培养基为MS + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA;适于壮苗快繁的培养基为MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP₃₃₃。生物学和电镜检测结果表明,利用0.2~0.3 mm茎尖培养的人参果试管苗已脱除病毒。

关键词: 人参果; 茎尖培养; 脱毒; 快速繁殖

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2004)03-0041-03

Virus-free culture of shoot tips and rapid propagation of *Solanum muricatum* ZHAI Jin-sheng, ZOU Ai-lan, CHANG Xing-ya (Department of Biology, Fuyang Teachers College, Fuyang 236032, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(3): 41-43

Abstract: The culture and rapid propagation of shoot tips of *Solanum muricatum* Ait were investigated. The results showed that MS medium with both no phytohormone or $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was suitable to grow for explants. MS medium with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was suitable for rapidly lengthening of shoot tips and to isolate and culture of the shoot tips. The better medium for inducing and differentiating of callus was MS + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, and the suitable medium for growth and rapid propagation was MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP₃₃₃. The results of examination by the methods of biology and electron microscope showed that there were no viruses in the plantlets cultured from the shoot tips of 0.2-0.3 mm.

Key words: *Solanum muricatum* Ait; tissue culture of shoot tips; virus elimination; rapid propagation

人参果(*Solanum muricatum* Ait)是近年来国内引进和推广种植的新型果蔬作物,其营养保健价值高于一般果蔬^[1-3]。人参果主要通过扦插繁殖,体内病毒感染严重,并逐代积累,严重影响其生长发育以及产品的产量和质量。通过茎尖培养进行种苗脱毒和快速繁殖是生产无病毒种苗的有效途径^[4]。有关人参果组织培养方面的研究已有多篇报道^[5-9],但脱毒培养方面的研究较少^[10]。本研究采用不同的处理方法进行茎尖脱毒培养,以期为人参果脱毒苗的工厂化生产提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人参果品种为“紫燕”(S. *muricatum* cv. ZiYan),取材于阜阳师范学院应用生物技术研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 外植体处理和初代培养 从温室苗床上剪取1~1.5 cm人参果顶芽,流水冲洗2 h,70%乙醇浸洗1 min后,无菌水冲洗3次,再用0.1% HgCl₂处理10 min,无菌水冲洗5次,吸干表面水分。切取0.5 cm茎尖,接种在不含激素的MS培养基上,共接种30瓶。培养条件为:温度25℃,光照2 000 lx,光照时间12 h·d⁻¹。

1.2.2 生长分化培养基筛选 以MS培养基为基本培养基,分别加入 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA以及0、0.2、0.4、0.6、0.8和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA,以选出最适NAA浓度。之后以最适浓度NAA与0、1.0、2.0和3.0

收稿日期: 2004-02-20

基金项目: 安徽省教育厅重点资助项目(99JL180Z)

作者简介: 翟进升(1959-),男,安徽界首人,硕士,副教授,研究方向为园艺植物生理及栽培。

mg·L⁻¹ 6-BA 组合,筛选出人参果生长分化的最佳激素配比。

在 MS 培养基中,添加不同浓度 NAA,促使顶芽快速伸长,以利于茎尖的剥离和切取。NAA 实验浓度为 0、0.05、0.10、0.50、1.00 和 2.00 mg·L⁻¹。

1.2.3 茎尖剥离、接种和培养 取伸长最快的试管苗茎尖,在 XTX-2 型体视显微镜下切取 0.2 mm 茎尖,接种于下列培养基上,比较其生长分化质量。A₁: MS + 0.1 mg·L⁻¹ NAA + 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA; A₂: MS + 0.2 mg·L⁻¹ NAA + 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA; A₃: MS + 0.2 mg·L⁻¹ NAA + 4.0 mg·L⁻¹ 6-BA; A₄: MS + 0.4 mg·L⁻¹ NAA + 4.0 mg·L⁻¹ 6-BA。

1.2.4 壮苗快繁培养基筛选 在上述实验基础上,选用 MS + 0.5 mg·L⁻¹ NAA 培养基,分别加入 0、0.01、0.05、0.10、0.20 和 0.30 mg·L⁻¹ PP₃₃₃,筛选有利于壮苗快繁的最佳培养基。

1.2.5 病毒检测 在继代培养的试管苗中随机抽取 5 瓶,利用生物学和电子显微镜方法观察脱毒状况。生物学测定方法:将人参果组培苗取出冲洗干净后,研成汁液,分别接种,鉴别寄主 10 种,置隔离温室中观察症状反应。电子显微镜观察是将铺有福尔马膜的铜网,用直粘法制片,观察病毒的粒体形态。同时取未脱毒培养的植株做同样检测。实验由国家出入境检验检疫局动植物检疫实验所进行。

2 结果和分析

2.1 不同浓度激素对人参果生长分化的影响

人参果植株营养生长较旺盛,产生不定芽和不定根的能力很强,因此在外植体初代培养时选用不添加任何激素的 MS 培养基。结果表明,顶芽接种 5~7 d 后,基部产生不定根,然后茎尖和叶原基开始生长和分化。1 个月可长成 3 cm 左右的植株,2 个月长至瓶口,并具 8~10 个叶片。外植体接种 30 瓶,成活 21 瓶。

以初代培养的瓶苗为材料,剪取单叶茎段接种培养,筛选最适生长分化培养基。结果表明,当 6-BA 浓度为 1 mg·L⁻¹ 时,较适的 NAA 浓度为 0 或 0.2 mg·L⁻¹; 以上述 NAA 浓度进一步筛选,得最佳激素组合为 0.2 mg·L⁻¹ NAA + 0 mg·L⁻¹ 6-BA 或不添加任何激素,在这 2 种培养基上芽和根的发生速度、长度和发生率均优于其他组合。

2.2 茎尖大小对存活率和分化的影响

植物脱毒苗组织培养的关键是茎尖的切取,只有顶端分生组织及其下部尚未分化维管组织的芽尖未受病毒感染,因此,芽尖切取应不超过 0.2~0.3 mm。茎尖愈大,愈易成活,但去病毒的概率降低;茎尖太小不易成活,或只有愈伤组织的增殖,不易分化^[11]。本研究共接种 48 个茎尖,存活 28 个,成活率 58%。其中有 4 瓶生长较慢,只有愈伤组织的增殖,无芽的分化;另有 3 瓶茎尖切取过大(0.4 mm),很快直接发芽、生根,并长成完整植株。

2.3 NAA 对人参果茎尖伸长的作用

植物的茎尖被叶原基所包被,不易切取,因此,在取材之前通常用 35℃ 的温度促使芽茎尖迅速伸长,然后再切取茎尖^[11]。本实验则根据适宜浓度的生长素类物质可促进细胞纵向快速伸长的理论,通过调节培养基中 NAA 浓度来选取有利于人参果茎尖快速伸长和剥离的培养基。实验结果见表 1。

表 1 培养基中不同浓度 NAA 对人参果茎尖生长状况的影响¹⁾

Table 1 Effects of different concentration of NAA in media on shoot tip growth of *Solanum muricatum* Ait¹⁾

NAA 浓度/mg·L ⁻¹ Conc. of NAA	株高/cm Plant height	节间长/cm Internode length	每株根数 Root numbers
0	3.5	0.42	4.0
0.01	5.0	0.60	5.5
0.05	4.6	0.52	9.5
0.10	3.5	0.48	5.0
0.50	6.2	0.80	18.0
1.00	5.1	0.51	18.0
2.00	3.6	0.26	14.0
3.00	2.3	0.22	6.50

1) 接种单芽茎段并培养 21 d Innoculating single node and culturing 21 d.

适宜浓度的 NAA 有利于茎尖的生长和不定根的产生,其中 0.5 mg·L⁻¹ NAA 既促进茎的快速伸长,又利于根的发生。浓度过高,对伸长生长有抑制作用,并易使茎段基部脱分化形成灰色愈伤组织,甚至使某些茎段的腋芽不能萌发并发生褐化而死亡。用 MS + NAA 0.5 mg·L⁻¹ 培养的茎尖,与在 35~38℃ 条件下不加任何生长调节剂的 MS 培养基上培养的组培苗作比较,其茎尖形态特征相似,均较易剥离、切取和培养,但前者操作简便易行。

2.4 6-BA 和 NAA 对茎尖形成愈伤组织及其分化的影响

培养基中 6-BA 和 NAA 的相对含量和绝对含量

直接影响着茎尖愈伤组织的形成和分化。由表2结果可以看出,当培养基中6-BA浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA浓度为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织的增殖速度较快,组织块紧密,分化特征及组织块生长状况良好,在培养过程中有绿色芽点出现。当6-BA和NAA浓

度均为 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,分化程度相对较差,说明6-BA在组织细胞增殖过程中具有明显的促进效应,但浓度高不利于人参果愈伤组织的进一步分化。说明适宜浓度的6-BA和NAA不仅有利于愈伤组织的增殖,而且对愈伤组织的分化起重要的作用。

表2 不同浓度6-BA和NAA对人参果茎尖愈伤组织形成与分化的影响

Table 2 Effects of different concentration of 6-BA and NAA on formation and differentiation of shoot tip callus from *Solanum muricatum* Ait

激素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration		愈伤组织直径/mm Callus diameter	形态特征 Formation characteristics	分化程度 ¹⁾ Differentiation degree ¹⁾
NAA	6-BA			
0.1	2.0	4.00	表面有明显颗粒状结构 Granular structure in the surface	++++
0.2	2.0	5.75	表面不规则,少数颗粒 Irregular structure in the surface	++++
0.2	4.0	3.25	结构不紧密,水浸状 Loose structure, like water-saturated	++
0.4	4.0	3.50	粥状弥散 Congee-like structure	+

¹⁾ + : 分化程度 The marks of different "+" mean different degree of differentiation

2.5 PP₃₃₃对人参果组培苗生长的影响

在MS + NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基中,添加不同浓度PP₃₃₃,对人参果增殖苗继代培养,生长21 d后的结果如表3所示。当培养基中PP₃₃₃的浓度低于 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,人参果试管苗发根早而快,叶无黄化及早衰现象,叶色较深。生根数随着PP₃₃₃浓度的增加而增加,而根的长度则随浓度增加而减小,但根粗度增加;当浓度大于 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,根生长过慢,增粗明显并出现褐化,表明根老化较快;植株的高度和节间长度随PP₃₃₃浓度的升高有明显下降的趋势,表明PP₃₃₃对株高有明显的抑制作用,苗生长过慢,植株较矮,对营养生长不利,而且叶面积变小且有皱缩现象。总之,适宜浓度的PP₃₃₃对提高人参果苗的质量有一定的促进作用,组培苗茎粗叶茂,根系发达,生长健壮。对后期的炼苗也有利,移栽成活率明显提高。

表3 培养基中不同浓度PP₃₃₃对人参果试管苗生长的影响

Table 3 Effects of different concentration of PP₃₃₃ in media on growth of plantlets of *Solanum muricatum* Ait

浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration	每株根数 Root number per plantlet	苗高/cm Plant height	节间长/cm Internode length
0.00	16	5.0	0.51
0.01	15	3.5	0.40
0.05	16	3.0	0.35
0.10	17	2.5	0.28
0.20	20	2.0	0.20
0.30	21	1.0	0.10

2.6 脱毒苗病毒检测结果

利用生物学方法和电子显微镜观察,对随机取样的试管苗进行病毒检测,均未发现病毒症状和病毒粒体,表明利用上述方法培养的人参果试管苗已脱去病毒,而送检的对照植株则有病毒症状反应和病毒粒体。

参考文献:

- [1] 赵声兰,魏大巧,李涛,等. 人参果的营养成分分析研究[J]. 食品科学,2000,21(12):137-138.
- [2] 赵鹤云,殷国健,张琼芬,等. 云南人参果中微量营养成分的研究[J]. 食品科技,2001(2):68-69.
- [3] 田备. 营养保健型果蔬——人参果[J]. 上海蔬菜,1998(3):32.
- [4] 马占元. 日光温室实用技术大全[M]. 河北:科学技术出版社,1999. 618-628.
- [5] 傅玉兰,李春生,许青松. 人参果的组培快繁[J]. 安徽农业大学学报,2002,24(2):132-136.
- [6] 丁兰,杨红,刘国安,等. 人参果离体微型扦插[J]. 西北师范大学学报(自然科学版),2001,37(4):86-88.
- [7] 张云开,朱西儒,张海保,等. 南美香瓜梨离体培养快速复壮繁殖的研究[J]. 广西植物,1996,16(1):69-72.
- [8] 蔡润,沈国龙,陶艳,等. 人参果茎尖培养[J]. 上海农学院学报,1999,17(3):233-236.
- [9] 张俊伟,郭盘江,陈冠吉. 人参果组织培养技术研究[J]. 西南林学院学报,2003,23(2):21-22.
- [10] 陆瑞菊,王亦菲,周润梅,等. 人参果的脱毒与快速繁殖[J]. 中国农学通报,2001,17(2):4-7.
- [11] 李宝平,茹文明. 植物组织培养技术[M]. 北京:中国农业科学出版社,2000.