

龙眼的茎尖培养

陈菁瑛 陈景耀 陈 熹

(福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013)

摘要 以网室内6年生的龙眼实生苗、嫁接苗的顶芽和侧芽为外植体, 采用两步法, 排除了污染与褐变。第一步建立了无菌培养物, 经30 d培养诱导出腋芽。第二步是从腋芽上取2 mm长茎尖进行培养, 试验采用对茎尖死亡率、萌芽率、展叶数和培养净重四个衡量指标因素进行综合评判。筛选出茎尖培养效果最好的是以MS附加0.3 mg L⁻¹ 6-BA、0.1 mg L⁻¹ IAA和3%蔗糖的培养基; 茎尖增殖最适宜的激素及其浓度是0.1-0.2 mg L⁻¹ 6-BA, 0.1-0.5 mg L⁻¹ KT及0-0.3 mg L⁻¹ IAA, 其增殖倍数达3.05倍。在生根培养中, IBA优于NAA, 液体优于固体, 生根效果最好的培养基是用0.01 mg L⁻¹ 6-BA+1.0 mg L⁻¹ IBA, 生根率达34.1%。

关键词 龙眼; 茎尖培养; 增殖

中图分类号 Q944.6

SHOOT APEX CULTURE OF LONGAN (*DIMOCARPUS LONGAN* LOUR.) TREES

Chen Jingying Chen Jingyao Chen Xi

(Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013)

Abstract Procedures were developed for the micropropagation of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) using lateral and terminal shoots from seedlings and graftings of 6-year-old trees grown in reticular plot. Shoot apex culture was established in two steps: sterilized explants were first cultured for 30 days, then the 2 mm long segments of shoot apices from axillary buds were taken and cultured on induction and multiplication media. Four indexes were used to evaluate the growth of cultures, i.e. the death rate, induction rate, leaf number, and the fresh weight. Of the media and explants examined, the best culture establishment was obtained with shoot apices cultured on MS medium supplemented with 0.3 mg L⁻¹ 6-BA, 0.1 mg L⁻¹ IAA and 3% sugar. Optimum hormones for shoot apex multiplication were 0.1-0.2 mg L⁻¹ 6-BA, 0.1-0.5 mg L⁻¹ KT and 0-0.3 mg L⁻¹ IAA, the multiplication rate being 3.05 times. Treatment in liquid culture with 0.01 mg L⁻¹ 6-BA and 1.0 mg L⁻¹ IBA in combination was best for rooting, the rooting percentage reaching to 34.1%.

Key words Longan; Shoot-tip culture; Propagation

龙眼及其加工品是滋补强身的佳品,深受海内外欢迎。但龙眼果实品质差异极大,而良种的更新与推广,需要大量优质无毒苗木,期待快繁与脱毒技术的突破。香蕉、葡萄等^[1,2]果树,已成功地应用茎尖组培技术解决了良种脱毒与快繁问题。长期以来,龙眼茎尖培养技术未取得实质性进展。魏文雄等^[3,4]以龙眼幼嫩子叶、花药和幼胚为外植体,诱导出愈伤组织和胚状体,从而获得完整植株;周丽依等^[5]是以无菌实生苗刚抽出的3-5 cm长的嫩枝为材料,通过诱导愈伤组织来繁殖试管苗。据邓秀新等^[6]报道,柑桔通过愈伤组织培养途径较难保持品种稳定性,因而不能用于生产。本试验的目的在于应用组培技术,探索龙眼茎尖培养方法,不经愈伤组织阶段直接诱导腋芽萌动,培养成苗的条件,为进一步研究茎尖培养和快速繁殖龙眼的优、稀品种(系)提供依据。我们曾简要报道龙眼茎尖培养初步研究结果^[7,8],近年来,在此基础上进一步研究与茎尖培养增殖和生根有关的因素,本文是该项研究工作的总结。

1 材料和方法

材料 本所网室内6年生福眼实生苗及乌龙岭嫁接苗,于夏、秋季晴天取其嫩枝侧芽和顶芽茎段,去除大叶备用。

外植体的消毒 用自来水洗净外植体,修剪成约5 cm长,用0.1%金星消毒液浸泡20 min,再用0.1%高锰酸钾溶液处理5 min,然后进行外植体灭菌处理,其方法详见文献[8]。灭菌处理之后需冲洗3-5次以除去多余灭菌药剂,这个过程分二种处理比较:一是用无菌水冲洗3-5次;二是用无菌水+0.5 mg ml⁻¹羧苄青霉素冲洗。

二步法 第一步:外植体冲洗后,用无菌滤纸吸干表面水分,切割中段组织培养,置25-30℃,光照12 h,光强2000-3000 lx条件下培养。第二步:经30 d培养,中段组织腋芽萌发,在无菌操作条件下,将小芽切下,剥离2 mm左右带有3-5个叶原基的茎尖,接种到茎尖诱导与增殖培养基上。每处理接种60个茎尖以上,培养条件同上,培养30 d后观察统计。

培养基 供试的基本培养基有MS^[10]、Anderson^[11]、Tabachnik^[12]、AS^[13]、WPM^[14]、N₆^[15]、White^[16]、B₅^[17]、MS-R^[18]等。附加不同浓度的6-苄氨基嘌呤(6-BA)、激动素(KT)、吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA₃)、水解酪蛋白(casein hydrolysate,即CH)、生物素(biotin, vitamin H, V_H)等,单独或混合使用。蔗糖浓度0.3%-0.5%,琼脂为0.5%,pH值调整到5.8,除生根培养基用蛭石、珍珠岩作为基质外,其余固体培养基加5 g L⁻¹的琼脂。

统计与分析 记录所接种的外植体(茎尖)总数,成活茎尖数、茎尖成苗数。显著性测定采用反正弦转换后进行方差分析,经F检验差异显著后,再进行邓肯新复极差测验(SSR测验),以判定处理间差异显著性,并以字母a、b、c、d等表示,凡有一个相同字母的为相互间差异不显著,不同字母的表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒与褐变防止

外植体消毒分别采用三种处理方法进行比较, I. 灭菌处理→无菌水冲洗3-5次; II. 预处理→灭菌处理→无菌水冲洗3-5次; III. 预处理→灭菌处理→无菌水+0.5 mg ml⁻¹羧苄青霉

素冲洗。结果表明, 方法Ⅲ的成功率(69.3%)优于方法Ⅱ(51.9%), 方法Ⅰ(41.3%)最低。说明不经过预处理直接进行消毒灭菌, 则成功率受影响, 预处理对消毒效果有较明显的正效应; 预处理后进行多种药液交替浸泡的灭菌处理试验^[6]证明, 能有效控制外植体变褐; 灭菌处理后用添加青霉素的无菌水冲洗的消毒效果最好, 说明青霉素对难灭菌的木本外植体表面杂菌有一定的消除和抑制作用。

2.2 茎尖的培养与增殖

基本培养基对茎尖培养的效果 茎尖的成活与很多因素有关, 其中基本培养基的成分是影响茎尖成活和生长的重要因素之一。对茎尖死亡率、萌芽率、展叶率和培养后净重四个衡量指标因素采用 $D_i = (0.25, 0.30, 0.20, 0.25)$ 的权数分配进行综合评判。设有 $i = 1, 2, 3 \dots m$ 个基本培养基, 选取 $j = 1, 2, 3 \dots n$ 个评价指标, 则第 i 个基本培养基的第 j 个评价指标值为 X_{ij} , 并给予对应的权重系数 α_j , 则综评值 $B_i = \sum \alpha_j X_{ij}$, 为了消除各指标量纲的差异, 采取标准化处理, 即 $x'_{ij} = X_{ij} / m \max X_{ij}$, 程序(略)。

表1 基本培养基对茎尖培养效果的综合评价

Table 1 Comprehensive evaluation on apex culture with different basal media

培养基 Basal media	死亡率 Death rate (%)	萌芽率 Germination rate (%)	展叶数 No. of leaves	净重 Fresh weight (g)	综评值Bi Evaluation index	K
AS	17.8	66.4	4.9	9.5	0.6994	8
WPN	24.0	82.1	7.3	8.2	0.8175	4
MS-R	18.6	67.2	5.3	8.9	0.7019	7
N ₆	20.1	75.2	6.8	6.9	0.7229	6
White	30.2	88.1	8.0	6.5	0.8571	2
B ₅	27.1	82.4	6.5	7.6	0.8098	5
Anderson	29.1	87.2	7.7	6.5	0.8388	3
MS	33.2	93.1	9.0	6.3	0.9107	1
Tabacknick	15.9	64.3	4.3	9.8	0.6739	9

各培养基中均附加 6-BA 0.3 mg L⁻¹, IAA 0.1 mg L⁻¹, 蔗糖 3%。K 表示综评值的大小顺序。

All media were supplemented with 0.3 mg L⁻¹ 6-BA, 0.1 mg L⁻¹ IAA and 3% sugar.

K represents favourable remarks in descending order from 9 to 1.

由表中的综合评价值 B_i 可看出基本培养基对龙眼茎尖的培养效果基本上可分为强、中、弱三类。 $B_i > 0.85$ 为培养效果好, 如 MS 和 White; 0.75–0.85 之间为中等, 如 Anderson、WPM 与 B₅ 三种培养基; 0.75 以下表示对茎尖生长不适宜, 如 AS、MS-R、N₆ 和 Tabachnik 四种培养基。

茎尖的增殖 筛选出茎尖培养的基本培养基为 MS, 附加 6-BA、KT、IAA、水解酪蛋白(CH)、生物素(V_H)等各种不同成分, 观察茎尖增殖的效果, 培养 30 d 后统计茎尖成活率、增殖倍数, 并进行处理间显著性测验。表 2 表明, 6-BA 是茎尖增殖所必需的, IAA 浓度高时对茎尖增殖有抑制作用, 存活率低; GA₃ 可使茎尖萌动的时间缩短, 茎枝节间加长, 但浓度过高时, 易在叶柄处产生愈伤组织, 形成离层。可见龙眼茎尖增殖需用适当浓度的 6-BA、

KT、IAA 和 GA_3 ，不然易在切口处发生愈伤，并蔓延至整个茎尖而引起叶片脱落，腋芽不能萌发。经多次重复试验，筛选出 X、Y、Z 三种适宜培养基：X:MS+0.1–3.0 mg L^{-1} (单位下同) 6-BA+0.05–0.2 IAA+200 CH; Y:MS+0.1–2.0 6-BA+0.1–0.6KT+0.1–0.5 IAA+0.1–0.5 叶酸+0.1 GA_3 ; Z:MS+0.1–2.0 6-BA+0.1–0.5KT+0–0.3 IAA+0.1–0.5 叶酸+0.05–0.2 V_H 。X 培养基可使离体茎尖萌动，变绿；转入 Y 培养基中，茎尖继续发育，叶子展开，幼茎伸长，但长时间培养，出现部分落叶，逐渐发黄变褐，已长成的嫩枝转入 Z 培养基中，可长时间保持不落叶，在 20–40 d 内，每个试管枝可萌发 1–2 个腋芽，并正常生长。若茎尖分别在 X、Y、Z 三种培养基上长时间培养，则存活率、增殖率均明显不同，在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。

表 2 不同激素及其浓度对茎尖增殖的影响

Table 2 Effects of different hormones in MS medium on apex propagation

MS 里的附加成分 Hormones (mg L^{-1})						接种数 No. of inoculums	成活率 Survival rate (%)	增殖倍数 Multiplication (times)
6-BA	KT	IAA	V_H	GA_3	CH			
0	0	0.5	0	0	0	60		
1.0	0	0.5	0	0.3	0	60	16.5 d	
0.8	0	0.5	0.2	0.3	0	60	38.8 c	0.89 d
0.8	0	0.3	0.2	0.2	200	60	61.0 b	0.95 d
0.5	0	0.3	0.2	0.2	200	60	64.7 b	1.49 c
0.3	0.1	0.2	0.2	0.1	300	60	69.9 ab	1.57 c
0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	300	60	82.9 a	2.14 b
0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	300	60	84.4 a	3.05 a
0.1	0.5	0.05	0.1	0.1	400	60	70.1 ab	2.07 b

CH: Casein hydrolysate; V_H : Vitamin H

具有相同字母的为相互间差异不显著 ($<SSR 0.05$)，不同字母间表示差异显著。

Values followed by the same letter are not significantly different from each other.

2.3 试管枝的生根

待嫩枝长到 2 cm 以上，带有 3 片以上展开的正常叶片时，在无菌条件下取出嫩枝，去除枯叶及基部褐变的组织，转移到生根培养基上。

生长调节剂对生根的影响 从表 3 看出，不同生长素水平的生根效果有很大不同，在不含 6-BA 的情况下，高浓度的生长素对生根有抑制作用；当 6-BA 和 NAA、IBA 配合使用时，在同一生长素水平下，低浓度的 6-BA 对龙眼茎尖苗生根有促进作用；NAA 促进生根的作用低于 IBA。当 0.01 mg L^{-1} 6-BA 与 1.0 mg L^{-1} IBA 配合使用时，生根效果最好，生根率可达到 34%

表 3 不同生长素组合的生根率 (%)

Table 3 Effects of 6-BA in combination with NAA and IBA on rooting (%)

6-BA (mg L^{-1})	NAA (mg L^{-1})				IBA (mg L^{-1})			
	0.5	1.0	2.0	5.0	0.5	1.0	2.0	5.0
0	3	10.7	17	3	6.3	16	10.1	5.7
0.01	11.3	23.7	18	7	9.7	34	20	14
0.05	6	9	16	5.8	7.1	9	13	0

培养基状态对生根效果的影响 采用液体培养基、固体培养基和半固体培养基加 0.5% 活性炭进行生根试验。生根率分别是 34.1%、11.9% 和 24.4%。三者差异均达显著水平。液体培养基之所以有利于生根, 可能有以下几个原因: 一是试管枝外植体基部切面浸在滤纸桥上的一浅层培养液中, 通气条件较好; 二是嫩枝中酚类物质氧化后产生的有害物质容易扩散到培养液中, 减少了毒害作用; 三是液态培养过程中, 培养基中的养分易被吸收。至于活性炭促进生根的效果, 可能与它吸收培养过程中组织氧化而产生的有害物质有关。

不同固化物的生根效果 将蛭石和珍珠岩作为生根培养基的基质分装在试管中, 再加入培养液, 高压灭菌。将以上两种生根培养基与用 0.6% 琼脂做固化物的生根培养基(激素条件一致)进行生根率的比较, 结果是: 龙眼试管枝在蛭石与珍珠岩固化物的培养基中的生根率较为接近, 分别为 38.6% 和 37.5%, 处理间差异不显著, 而琼脂培养基生根率为 16.6%, 与以上两种固化物培养基处理差异极显著, 说明生根效果受培养基的通气条件的直接影响, 蛭石与珍珠岩不仅具有类似琼脂的固定培养物的支撑作用, 而且具有较好的通气条件, 蛭石与珍珠岩作为生根培养基的固化物代替琼脂不仅降低了培养成本, 同时还提高了生根率。

2.4 试管苗的移栽

将已生根的试管苗, 在自然散射光下放置 2-3 d, 再打开瓶盖炼苗 2-3 d, 移入泥炭土与蛭石等量混合的基质中, 要注意保湿。盆栽 2 年生长, 株高可达 70 cm 以上, 直径可达 1.0 cm, 表明试管苗能正常生长, 目前存在的问题是移栽成活率不高, 需进一步研究。

3 讨论

龙眼茎尖若直接采自田间或网室的露地苗, 则几乎完全失败, 其原因: 一是龙眼为特殊的裸芽, 休眠时具干硬的小叶, 表面灭菌很难彻底, 用它直接培养, 则会因污染而失败; 其次, 若采用生长状态的芽, 则茎尖富含酚类物质, 经表面灭菌、切割之后, 会使更多的酚类物质被氧化, 因组织褐变而失去成苗的能力。本试验采用两步法, 取得较好的效果。第一步应用预处理结合多种灭菌药品、抗氧化剂交替使用方法, 和使用较长龙眼茎段作外植体, 具有两方面的优点: 其一, 采用预处理, 较以前不经预处理^[9]的灭菌效果提高, 说明预处理能较好地湿润外植体, 并对其表面杂菌有一定的消除作用; 同样灭菌时间, 多种灭菌药品交替使用比单种使用, 其药品对外植体的伤害作用会降低; 本试验改进灭菌后的冲洗方法, 相应提高了灭菌成功率; 预处理、灭菌和冲洗三个步骤结合, 显示了这三种处理的综合效应, 效果较好。其二, 取较长外植体时, 它对药品的忍耐能力也相对提高, 且培养时体内营养物质也较多, 反而容易成活, 减少了污染、褐变的干扰, 培养出无菌龙眼试管苗。待生长一段时间后, 再进行第二步, 将试管苗取出, 切成 2 mm 长的茎尖进行培养, 无需再作灭菌处理, 减少培养物酚类物质的分泌与氧化的机会, 从而降低褐变, 大大地提高成活率。前人已有不少关于防止褐变的研究^[19,20], 而笔者认为本试验二次剥茎尖的方法不失为一种降低褐变、提高成活率的有效方法。鲁雪华^[21]也是应用了同样的两步法, 成功地去除甘薯丛枝病的支原体。我们以同样方法配合热处理、或添加病毒唑, 取得去除龙眼鬼帚病毒成功, 将另文发表。

组织培养中固体培养基所用琼脂的量多在 0.8% 以上, 而龙眼的茎尖培养所用的琼脂浓度为

0.5%，使培养基呈半固化状态。研究表明，在接入外植体时，琼脂以稍稀为宜。以外植体与培养基表面密切接触，但又不沉没为度。龙眼茎尖在其上能正常生长发育，这与韩碧文等^[22]在核桃组织培养中取得的结论相近，外植体只有在半固体培养基上低氧的条件下才能成活，在液体培养基中成活率不高，而在固体培养基中因氧化褐变而不易成功。说明半固体培养也是有效控制龙眼茎尖褐变的措施之一。Arnold^[23]在欧洲云杉(*Picea abies*)的组织培养中发现，当把琼脂浓度从0.7%降至0.3%时，可使芽分化的成功率提高。但有时在仅含琼脂0.3%的培养基中，培养物的发育突然中止。Arnold认为这是因基质过软，器官被淹没所致，提出以含0.5%琼脂的培养基为适宜。我们在研究中亦有同样的经验。文献报道，琼脂的费用占成本的80%，因而采用低浓度的琼脂，既能控制组织褐变，提高培养的成功率，又能降低培养成本。

参考文献

- 1 黄贞光, 谭素英等. 葡萄组织培养快速繁殖及微茎尖培养研究. 果树科学, 1990, 7(1):13-18
- 2 马雪筠, 周丽依, 陈俊秋. 香蕉组织培养快速繁殖技术的研究. 广东农业科学, 1989, (1):22-24
- 3 魏文雄. 龙眼的花药培养与胚培养. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986, 408-419
- 4 魏文雄, 杨永青. 龙眼子叶胚状体的诱导和试管苗的培育. 福建师范大学学报(自然科学版), 1981, (2):102-106
- 5 周丽依, 马雪筠, 陈俊秋. 龙眼的组织培养. 植物生理学通讯, 1986, (4):51-52
- 6 邓秀新等. 柑桔愈伤组织染色体变异研究. 中国柑桔, 1985, (3):4-6
- 7 陈菁瑛, 陈景耀. 龙眼茎尖培养研究初报. 福建果树, 1991, (1):4
- 8 陈菁瑛, 陈景耀. 龙眼茎尖离体培养及其脱毒效果. 植物生理学通讯, 1996, 32(2):126-127
- 9 陈菁瑛, 陈景耀等. 提高龙眼离体培养成活率的研究. 福建农业科学院学报, 1997, 12(1):32-35
- 10 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15:473
- 11 Anderson W C. Propagation of rhododendrons by tissue culture. Part I. Development of culture medium for multiplication of shoots. *Proc Int Plant Prop Soc*, 1975, 25:129-135
- 12 Tabachnik L, Kester D E. Shoot culture for almond and almondpeach hybrid clones *in vitro*. *HortScience*, 1977, 12:545-547
- 13 赵惠祥. 梨茎尖离体培养. 植物学报, 1982, 24(4):392-394
- 14 McCown B H, Lloyd G. Woody plant medium (WPM)-A mineral nutrient formulation for microculture of woodplant species. *HortScience*, 1981, 16:453
- 15 朱至清, 王敬驹, 孙敬三等. 通过碳源比较建立一种较好的花药培养基. 中国科学, 1975, (2):484-490
- 16 陈正华. 木本植物组织培养的一般技术. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986, 56
- 17 Gamborg O L et al. Nutrient requirements of suspension cultures of soy bean root cells. *Expt Cell Res*, 1968, 50:151
- 18 杨增海, 胡霓云, 路广明. 桃试管实生苗茎尖培养的研究. 园艺学报, 1984, 11(2):7-13
- 19 陈维伦, 杨善英等. 苹果成年树(金冠品种)的茎尖培养. 植物学报, 1980, 22(1):93-95
- 20 秦新民, 罗紫娟. 甘蔗组织培养中抗酚污培养基的筛选. 广西甘蔗, 1988, (1):18-19
- 21 鲁雪华, 陈扬春. 甘薯丛枝病去除病原技术的研究. 福建省农业科学院学报, 1986, 1(1):80-86
- 22 Von Arnold S. Induction and development of adventitious bud primordia on embryos, bud and needles of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] grown *in vitro*, Report of Institute of Physiological Botany, University of Uppsala, Sweden, 1979, 511:1-32
- 23 韩碧文, 刘淑兰. 核桃的组织培养. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986, 456-465