

‘富有’和‘次郎’甜柿叶片再生植株的研究

马俊莲¹ 刘 恺² 张子德¹

(¹河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001; ²保定师范专科学校化学系, 河北保定 071051)

摘 要: 比较了不同生长调节剂及其种类浓度和培养时间对‘富有’和‘次郎’两个甜柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 品种的叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响。TDZ诱导叶片愈伤组织和不定芽再生的能力很强, 在含 ZT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中, 愈伤组织的形成率达 96%, 愈伤组织不定芽分化率达 80%以上, 由 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ诱导形成的富有和次郎愈伤组织, 在含有 ZT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1/2DKW 培养基培养 30 d, 不定芽分化率均达 96%以上, 平均芽数分别为 7.8和 5.4, 所得再生苗的生根率近 75%。

关键词: 柿; TDZ; 叶片; 植株再生; 愈伤组织

中图分类号: S 665.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 05-1048-03

Shoot Regeneration from Leaves of ‘Fuyu’ and ‘Jiro’ Persimmon

Ma Junlian¹, Liu Kai², and Zhang Zide¹

(¹College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; ²Department of Chemistry, Baoding Teachers College, Baoding, Hebei 071051, China)

Abstract: Studies were carried out on high-frequency shoot regeneration from leaves of Fuyu and Jiro, two Japanese non-astringent persimmon. The effects of growth regulator and cultural time on the adventitious shoot regeneration from leaves were investigated. The results showed that TDZ was a strong and efficient hormone inducing adventitious shoot and calli formation. The best regeneration was achieved in 1/2DKW + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, in which callus percentage was 96% and shooting was near above 80%. After 30 day culture, the calli with small shooting were transferred to 1/2DKW medium supplemented with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA. Shooting regeneration rate were more than 96%, and average adventitious shoots per explant were 7.8 and 5.4 respectively for Fuyu and Jiro after 30 days culture. Rooting percentage from regenerated shoots was about 75%.

Key words: Persimmon; TDZ; Leaf; Plant regeneration; Callus

1 目的、材料与方法

近年来甜柿的组织培养技术取得一定进展^[1,2], 但再生效率较低^[3,4]。本研究旨在通过柿叶片的组织培养, 为其遗传转化提供参考。

供试甜柿品种为‘富有’和‘次郎’, 树龄约 8 年。以休眠芽为外植体, 建立了初代培养体系。在 MS (1/2N) + ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + PVP $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中离体繁殖 15 代后, 转入 DKW + ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + PVP $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中继代培养。

剪取组培苗幼叶, 去叶尖, 剪成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 小块, 接种于分化培养基上。分化基本培养基为 1/2DKW, 添加蔗糖 3%, PVP $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 0.6%, pH 为 5.8, 生长调节剂处理见表 1。每处理接种 30 个小块叶片。培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 将经过 20 ~ 40 d 初代诱导形成的愈伤组织切割成小块转移到不定芽伸长培养基。基本培养基为 1/2DKW, 添加 IAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养条件同上, 30 d 后统计两个品种的不定芽再生率和平均不定芽数。

收稿日期: 2006 - 05 - 10; 修回日期: 2006 - 08 - 16

基金项目: 河北省重点科技攻关项目 (04395501D-3)

剪取继代 2 代 (1.5 cm 高) 的不定芽转移至生根培养基中。基本培养基为 1/2MS, 含蔗糖 3%, PVP 500 mg · L⁻¹, 琼脂 0.6%, pH 5.8, BA 1.0 mg · L⁻¹ 或 IAA 1.0 mg · L⁻¹。培养条件同上。所有试验均重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 TDZ (噻苯隆) 对愈伤组织和不定芽的诱导效果

柿叶片在添加了 TDZ 的培养基中培养 10 d 后开始长大, 20 d 后陆续长出嫩绿色的愈伤组织, 数天后愈伤组织迅速膨大。

TDZ 浓度在 0.5 mg · L⁻¹ 以上时, 愈伤组织形成率达 95% 以上, 愈伤组织比较疏松。培养 30 d 后不定芽分化率达到 80% 以上, 但不定芽点很小, 生长缓慢, 节间距很短。培养时间超过 40 d 时会对叶片产生毒害作用, 愈伤组织容易褐化死亡。而在含 NAA 的培养基中, 愈伤组织诱导率达 100%, 愈伤组织较大, 颜色较深, 但没有不定芽再生。

2.2 带芽愈伤组织的继代分化培养

2.2.1 初代生长调节剂处理对继代不定芽分化效果的影响 由表 1 可见, 在仅添加 1.0 mg · L⁻¹ ZT 培养基中诱导形成的愈伤组织, 在不含 TDZ 的继代培养中分化率为 0。由 TDZ 初代诱导形成的愈伤组织, 在继代培养中, 其分化率和平均不定芽数与初代培养基中 TDZ 浓度成正相关。由 0.5 mg · L⁻¹ TDZ 诱导形成的富有、次郎愈伤组织不定芽分化率均达到 96% 以上, 平均芽数分别为 7.8 和 5.4 (图版, 1、2)。由 1.0 mg · L⁻¹ TDZ 诱导的愈伤组织平均不定芽数明显高于其它处理, 但形成的不定芽较小, 节间短, 部分芽表现为丛状苗, 不利于再生苗的快速生长。因此, 比较适宜的 TDA 诱导浓度为 0.5 mg · L⁻¹。

在含 NAA 的培养基中, 愈伤组织诱导率达 100%, 但在继代分化生长中愈伤组织不定芽的分化率和平均不定芽数都很低, 当 NAA 浓度达到 0.2 mg · L⁻¹ 时两品种的分化率为 0, 表明 NAA 对柿叶片不定芽的分化有较强的抑制作用。

表 1 初代生长调节剂处理对继代不定芽分化效果的影响

Table 1 Effects of growth regulator used in the first culture on the shoot regeneration in the successive culture

生长调节剂 Growth regulator(mg · L ⁻¹)			不定芽分化率 Shooting percentage (%)		平均不定芽数 Adventitious shoots per explants	
ZT	TDZ	NAA	富有 Fuyu	次郎 Jiro	富有 Fuyu	次郎 Jiro
1.0	0	0	0e	0e	0d	0d
1.0	0.1	0	63.1b	55.9c	2.0c	1.7c
1.0	0.2	0	89.7a	82.1b	5.3b	4.5b
1.0	0.5	0	96.8a	97.5a	7.8ab	5.4b
1.0	1.0	0	96.8a	96.8a	9.1a	8.5a
1.0	0.2	0.1	29.1c	16.2d	2.2c	1.8c
1.0	0.2	0.2	16.2d	0e	1.5cd	0d

2.2.2 TDZ 处理时间对继代不定芽再生的影响 将叶片放在含有 TDZ 的 1/2DKW 培养基上培养 20 ~ 40 d 后, 将形成的愈伤组织接种到不含 TDZ 的培养基中, 30 d 后观察不定芽的再生效果 (表 2)。在含有 TDZ 2.0 mg · L⁻¹ 培养基中培养 20 d 时, 愈伤组织的分化率较低, 转移至继代培养基后不定芽的分化率低。随着初代 TDZ 处理时间的延长, 继代培养后的不定芽分化率升高。

富有柿叶片对 TDZ 较为敏感, 在 TDZ 0.5 mg · L⁻¹ 诱导的愈伤组织培养 30 d 以上时, 少数苗开始出现丛生矮化现象, 平均有效新梢率较低。

次郎柿对 TDZ 的耐受性较高, 在 TDZ 0.5 mg · L⁻¹ 的培养基中培养 40 d 才会产生少量丛状苗。

一直以来, ZT 被认为是诱导柿不定芽再生的最有效的激素^[5], 而 TDZ 在柿的组织培养中研究极少。本研究表明, TDZ 有很强的诱导愈伤组织和不定芽形成的能力, 对叶片不定芽的诱导效果远远好

于 ZT。综合考虑, 富有柿适宜的 TDZ 处理时间应在 30 d, 而次郎可以延长至 35 d。

表 2 TDZ 处理时间对继代培养中叶片不定芽再生的效果

Table 2 Effects of cultural time in the TDZ medium on the shoot regeneration in the successive culture

培养天数 Cultural time (d)	TDZ (mg · L ⁻¹)	不定芽再生率 Regeneration rate (%)		平均不定芽数 Adventitious shoots per explants	
		富有 Fuyu	次郎 Jiro	富有 Fuyu	次郎 Jiro
20	0.2	76.7c	37.9d	2.1c	2.1d
	0.5	80.6bc	87.1ab	3.3c	3.1d
25	0.2	83.3bc	67.7c	3.1c	2.3d
	0.5	96.3a	90.0ab	7.4a	5.3bc
30	0.2	89.7ab	82.1b	5.3b	4.5c
	0.5	96.8a	97.5a	7.8a	5.4bc
40	0.2	96.7a	96.8a	6.1b	5.6ab
	0.5	96.8a	96.7a	7.9a	6.6a

2.3 生根

不定芽在生根培养基上培养 20 d 左右开始形成不定根, 40 d 后形成较发达的根系。BA 的效果好于 IA。在 1/2MS + BA 1.0 mg · L⁻¹ 培养基上两个甜柿品种的生根率近 75%, 平均不定根数达到 3 条以上。

参考文献:

- 孔祥生, 张妙霞, 张益民, 王振镒. 柿离体繁殖技术. 果树科学, 1998, 15 (3): 232 ~ 238
Kong X S, Zhang M X, Zhang Y M, Wang Z Y. In vitro propagation of persimmon (*Diospyros kaki* Linn). Journal of Fruit Science, 1998, 15 (3): 232 ~ 238 (in Chinese)
- 刘晓娜, 马俊莲, 张子德, 宋春丽. 上西早生甜柿离体快繁技术研究. 河北农业大学学报, 2004 (1): 61 ~ 63
Liu X N, Ma J L, Zhang Z D, Song C L. Micropropagation in vitro of Uenishiwase persimmon. Journal of Agricultural University of Hebei, 2004 (1): 61 ~ 63 (in Chinese)
- Ma J L, Liu X N, Zhang Z D. Adventitious shoot regeneration from leaf of Uenishiwase persimmon. Agricultural Sciences in China, 2004, 3 (1): 71 ~ 74
- Tetsumura T, Yukinaga H. High-frequency shoot regeneration from root of Japanese persimmon. HortScience, 1996, 31 (3): 463 ~ 464
- Tao R, Murayama H, Moriguchi K, Sugiura A. Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. HortScience, 1998, 23: 1055 ~ 1056



图版说明: 0.5 mg · L⁻¹ TDZ 初代诱导的再生效果。

Explanation of plates: Shooting regeneration effect of primary culture with 0.5 mg · L⁻¹ TDZ