

文章编号:1674-7054(2011)01-0042-04

化州橘红成年态茎段离体培养的改良

李 凯^{1,2}, 陈雄庭¹, 洪 磊^{1,2}, 甘 露^{1,2}

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海南 海口 571101;
2. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘 要: 比较了不同大量元素以及不同的激素组合对化州橘红离体培养的影响, 试验结果表明, 用 3/4MS 培养基, 其中 6-BA 质量浓度为 0.6~0.8 mg·L⁻¹ 和 NAA 质量浓度为 0.8~1.2 mg·L⁻¹ 的组合, 芽的增殖率较高。当培养基中 6-BA, NAA, GA₃ 的质量浓度分别为 0.3, 0.6, 0.3 mg·L⁻¹ 时可以使丛生芽继代培养。

关键词: 化州橘红; 离体培养; 改良

中图分类号: S 666.2

文献标志码: A

化州橘红是珍稀的中药材, 素有“南方人参”的美誉, 能化痰止咳, 治疗风寒哮喘、胃病、消化不良、肺气肿、胸闷等。化州橘红 *Exocarpium citri Grandis*, 为芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥果及外层果皮。化州橘红一般分为毛橘红(正毛、副毛)和光橘红 2 种, 其中毛橘红里的正毛化州橘红药效最佳。化州橘红主要药用成分柚皮苷(Naringin, 化学式: C₂₇H₃₂O₁₄) 高达 15%, “类素互呋”含量达 1.7%^[1]。这些药用成分得到了古代和现代医学的认定。目前, 化州橘红通过 3 种育苗方式(实生苗、嫁接苗和圈枝苗)^[2]繁殖, 但后代种苗都有一定的变异, 不能很好地保留母树的优良性状, 圈枝苗的变异相对较小, 可是效率低。目前, 化州橘红的报道主要在有效成分的含量测定及品种鉴定等方面, 而药理及产品应用开发、现代栽培技术尤其是应用生物技术进行组织培养或细胞工程研究方面报道很少^[3]。因此笔者希望通过研究完善化州橘红的茎段离体培养体系, 提高其增殖效率, 减少变异, 促进这一名贵中药材产业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料 2007 年 9 月从广东省化州市平定镇引种正毛化州橘红圈枝苗移栽于中国热带农业科学院热带生物技术研究所苗圃, 取其成年态半木质化新梢茎段作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒 消毒步骤: 天气连续晴朗 2 d 后于上午 10:00 或下午 17:00 左右采摘材料, 将其叶片剪去, 用 $\varphi=75\%$ 的酒精喷湿, 再用由 $\varphi=75\%$ 的酒精浸湿的脱脂棉仔细擦拭, 晾置 1 min 后放入自来水下缓慢冲洗 2 h, 然后在无菌环境下用 $w=0.2\%$ 的升汞浸泡消毒 8 min, 再用含活性氯的 $w=2.5\%$ 的次氯酸钠浸泡消毒 15~20 min, 最后用无菌水冲洗 4~5 次^[4]。

1.2.2 出芽诱导培养基改良 本实验室已成功获得在 MT 基本培养基中添加 6-BA 1.0 mg·L⁻¹, NAA 0.3 mg·L⁻¹ 的出芽诱导培养基, 能够诱导化州橘红成年态半木质化茎段腋芽的萌发和生长^[4]。在此基础上, 笔者继续对诱导出芽培养基进行改良, 并将 MT 培养基改为 1/2 MS、3/4 MS 和全量的 MS 培养基进行比较试验, 以及进行 MS 培养基和 MT 的生长物质相结合的摸索。

1.2.3 增殖培养 对比出芽后更换新培养基的不同时间对丛生芽增殖的影响, 以及培养基中 6-BA 和

收稿日期: 2011-01-05

作者简介: 李凯(1983-), 男, 湖南娄底人, 海南大学农学院 2007 级硕士研究生。

通信作者: 陈雄庭(1957-), 男, 广东高州人, 博士, 研究员, 博士生导师. E-mail: cxt66988063@163.com

NAA 的不同质量浓度对丛生芽增殖的影响。

1.2.4 壮芽培养 比较了培养基中 BA、NAA 和 GA₃ 的质量浓度对丛生芽的影响。

1.2.5 继代培养 对 MT 培养基中添加激素 NAA 1.0 mg · L⁻¹, 6 - BA 0.2 mg · L⁻¹, GA₃ 0.3 mg · L⁻¹ 的继代培养基^[4]进行较大的改良,包括: MT 和 MS 培养基的转换;一些大量元素(尤其是 Ca, P, N)的增减;对 6 - BA 和 NAA 的质量浓度组合调整;个别生长物质的增加以及培养容器的更换。

1.2.6 其他培养条件 每天光照 14 h,培养温度为(26 ± 1) °C。

1.2.7 统计方法 污染率 = 污染数/接种外植体数 × 100%;死亡率 = 非污染死亡数/(接种外植体数 - 污染数) × 100%;外植体萌芽率 = 芽萌发外植体数/总接种外植体数 × 100%;增殖倍数 = 增殖的总芽数/萌发芽的外植体数。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒 通过上述消毒过程,能将污染率控制在 5% ~ 20% 内。

2.2 出芽诱导培养基的改良 本实验此阶段研究是将 MT 培养基转换为用 1/2 MS、3/4 MS 和全量 MS 培养基来培养(其中生长物质使用的是 MT 的生长物质)。结果是在 3/4 MS 培养基上出芽率有所提高,能保持在 55% ~ 75% 之间,而且在后续试验中表明其继代活力也有所提高。这是由于 MT 培养基的大量元素中没有硫酸锌,而在很多对柑橘元素的研究中锌的含量较高,因此,改用 3/4 MS 培养基后对出芽率有所提高,而用 1/2 MS 则表现为营养不足,用全量 MS 则表现为大量过量,用 3/4 MS 大量元素出芽率较高(见表 2,此方面共做了 3 次实验,分别表示为 A, B, C,每次每种培养基为 20 管)。

表 1 不同培养基对出芽率的影响 %

实验	MT	1/2 MS	3/4 MS	MS
A	30	30	55	55
B	40	30	70	50
C	35	35	75	55

其后在 3/4 MS 培养基中使用 MT 培养基的生长物质,另添加了生物素,并将椰水由原来的 φ = 5% 增加到 φ = 10%,通过以上改进,使得出芽率相对于以前有所增加,而且芽更加健壮(见图 1)。这主要是针对芸香科植物有机物质的需求量相对较大,而在培养基中增加有机营养的供给^[5-6],对出芽率的提高取得了较好的效果。

2.3 增殖培养 在以前研究(1 个外植体能萌发出 1 个主芽和 2 ~ 5 个次芽,但主芽严重抑制次芽的生长,分开培养次芽,其活力也较弱)的基础上,笔者进行了 KT, 6 - BA 和 NAA, IAA, IBA 的不同质量浓度组合试验,但除 6 - BA 和 NAA 组合较好外,其他的组合都不理想,芽叶易黄,然后落叶死亡,所以,在后期主要针对 BA 和 NAA 的质量浓度和比例做了正交设计试验(每个组合为已经长腋芽的试管芽 10 管,如图 1 所示),结果显示(见表 2),在 6 - BA 为 0.6 ~ 0.8 mg · L⁻¹和 NAA 为 0.8 ~ 1.2 mg · L⁻¹组合的范围内增殖率较高,1 个腋芽能增殖至 4 个丛生芽以上(如图 2),这一步骤需要注意转至该培养基的时间,即主芽为 1 cm 时就要及时转换培养基,否则主芽会抑制次芽的生长。

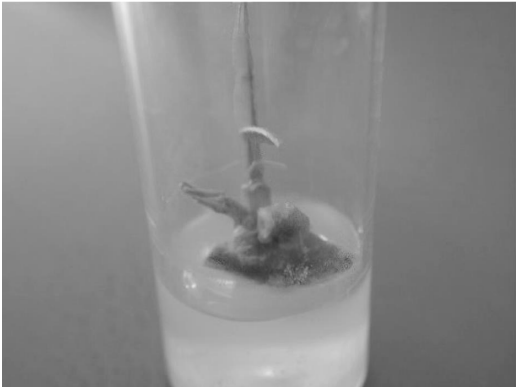


图 1 萌发中的腋芽



图 2 丛生芽

试验中,在 6-BA 高于 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后增殖率急剧下降,芽在实验中出现黄叶,在叶的基部有愈伤组织出现,而且次芽长大的过程中叶片卷曲不能展开,说明激素浓度过高(在诱导出芽时 6-BA 为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, BA 已经在芽体内有积累),在这一步需要相对的降低。而其对 NAA 的有效浓度的范围相对较宽。

表 2 6-BA 和 NAA 的不同质量浓度对芽增殖的影响

6-BA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + NAA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			增殖倍数	6-BA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + NAA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			增殖倍数
0.2	0.2	3.0		0.8	1.0	4.4	
0.4	0.2	3.2		1.0	1.0	3.2	
0.6	0.2	3.3		1.2	1.0	2.6	
0.8	0.2	3.5		0.2	1.2	3.5	
1.0	0.2	3.1		0.4	1.2	3.4	
1.2	0.2	2.5		0.6	1.2	4.0	
0.2	0.5	3.6		0.8	1.2	4.2	
0.4	0.5	3.7		1.0	1.2	3.1	
0.6	0.5	4.0		1.2	1.2	2.0	
0.8	0.5	4.3		0.2	1.4	2.8	
1.0	0.5	3.0		0.4	1.4	3.3	
1.2	0.5	2.5		0.6	1.4	4.0	
0.2	0.8	3.8		0.8	1.4	4.2	
0.4	0.8	3.9		1.0	1.4	2.0	
0.6	0.8	4.4		1.2	1.4	1.5	
0.8	0.8	4.5		0.2	1.6	1.0	
1.0	0.8	3.3		0.4	1.6	2.7	
1.2	0.8	2.6		0.6	1.6	3.5	
0.2	1.0	3.9		0.8	1.6	3.5	
0.4	1.0	4.0		1.0	1.6	1.7	
0.6	1.0	4.4		1.2	1.6	1.2	

2.4 壮芽培养 当丛生芽增殖培养至 1~1.5 cm 后,继续长高缓慢,须将其转到壮苗培养基(6-BA 为 $0.4\sim0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA 为 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 附加 GA_3 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 笔者对比试验得出 GA_3 对芽生长有促进作用),经 3 周培养,丛生芽能长至 3~4 cm 的高度(见图 3),增殖培养到壮芽培养这一过程的时间很关键,转接过晚则表现为叶不能很好的展开。壮苗培养基为 4/5 MS 大量元素加 MT 生长物质,另外根据对柑橘的大量元素的需求^[5-6],添加了 1/4 倍的氯化钙和磷酸二氢钾,可以很好地解决老叶易黄的问题。

2.5 继代培养 壮芽培养后,将丛生芽分开,转接到继代培养基中(6-BA 为 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA 为 $0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 其他条件与壮苗培养基相同),在长期继代培养基中芽能继续长高、长壮(由于芽整体长大,这一步将芽转移到广口瓶中,有利于其进一步生长),见图 4。目前,本实验丛生芽在这一培养基中最长的继代时间已经有 6 个月,芽生长状况依然良好。



图 3 壮芽培养

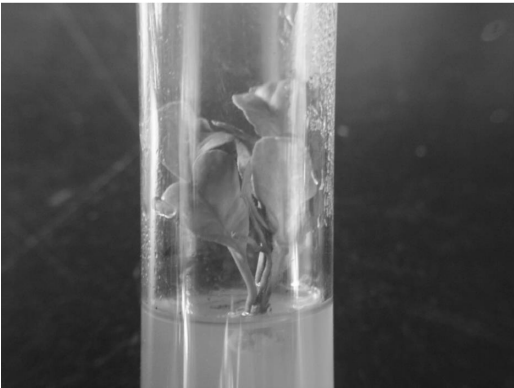


图 4 继代培养

3 讨 论

目前,柑橘类植物的组织培养研究主要包括花药培养、原生质体培养、胚乳培养、胚培养、茎段培养等^[7],利用组织培养进行快速繁殖可节约时间,我国在此项研究中已经有广泛的研究^[8],如酸橙、甜橙^[9]、柠檬、金桔^[10-11]、四季桔等均建立了组织培养的再生体系。6-BA 是组织培养研究中促进不定芽萌发时最常用的激素,不同柑橘外植体对 6-BA 的敏感性不同。甜橙类品种再生需要 6-BA 的质量浓度一般为 $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[12-13]。附加一定浓度的 NAA,对丛生芽的发生有一定的促进作用。在此基础上,本研究对化州橘红成年茎段离体培养进行了改良,为化州橘红的快速高效地扩繁打下了良好的基础。由于柑橘类不定芽生根困难,笔者仅做了初步的研究工作(NAA 和其他激素组合)^[14],目前尚未得到理想的效果,后续工作正在进行当中。

参考文献:

- [1] 葛发欢,元四辉. 化州橘红柚皮甙的分离鉴定[J]. 中药材,1989,12(9):35.
- [2] 广东省农业厅. 广东省农业地方标准:DNB440900/T8-2005[S]. 化州橘红栽培技术规程[M]. 广州:广东农业出版社,2005.
- [3] 莫小路,蔡岳文,曾庆钱. 中药化橘红的研究进展[J]. 食品与药品,2007,9(6):39-49.
- [4] 洪磊,李凯,陈亚鸿,等. 化州橘红成年态茎段再生体系研究初报[J]. 广东农业科学,2009(9):40-43.
- [5] 申红涛. 果树所需的大量元素与微量元素[J]. 北京农业,1996(12):14.
- [6] 石健泉. 柑橘营养元素的缺乏与矫治[J]. 果农之友,2007(9):27.
- [7] 陈霞,谢永红,魏召新. 柑橘组织培养研究进展[J]. 南方农业,2007(1):46-48.
- [8] 张进仁,高峰. 我国柑桔离体培养研究的进展[J]. 中国柑桔,1988,18(3):16-17.
- [9] 李耿光,胡兰娟等. 柑桔茎尖培养的初步研究[J]. 植物生理学报,1978,4(2):189-196.
- [10] 杨乃博. 柑桔与金桔的器官发生研究[J]. 植物生理学通讯,1983(6):33-37.
- [11] 林荣,王秀琴,王润珍. 金桔组织培养的初步研究. 广西植物,1982,2(1):11-13.
- [12] 敖小平,胡新喜,郭琛,等. 用 rolB 基因转化大红甜橙的初步研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2005,31(6):623-626.
- [13] 谢玉明,邓子牛,郭琛,等. 农杆菌介导甜橙遗传转化的初步研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2005,31(6):627-630.
- [14] 宁正祥. 柑桔组织培养述评[J]. 植物生理学通讯,1987(3):12-17.

Improving on Mature-type *Citrus grandis* Stem Cultured *in vitro*

LI kai^{1,2}, CHEN Xiong-ti ng¹, HONG Le^{1,2}, GAN lu^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;

2. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The effects of different concentrations of macro-element and combination of plant growth regulator on the mature-type *Citrus grandis* stem cultured *in vitro* were compared. The results showed when 3/4MS mediums, in which the 6-BA concentrations were $0.6\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ - $0.8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA concentrations were $0.8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ - $1.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, were used, high proliferation rate were obtained; when the concentrations of 6-BA, NAA and GA3 were $0.3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.6\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, multiple shoots' long-time subculture were feasible.

Key words: *Citrus grandis*; cultured *in vitro*; improvement