

文章编号:1003-8701(2013)01-0065-02

铜离子对猕猴桃愈伤组织再分化培养的研究

袁云香^{1,2}

(1. 渭南师范学院化学与生命科学学院, 陕西 渭南 714000;
2. 陕西省多河流湿地生态环境重点实验室, 陕西 渭南 714099)

摘要:以秦美猕猴桃茎段为外植体,诱导愈伤组织并进行猕猴桃再分化及生根试验。在分化培养基中分别添加不同浓度的铜离子进行筛选,以确定适于猕猴桃愈伤组织分化的最佳铜离子浓度。结果表明:再分化培养基中添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铜离子时,可明显提高猕猴桃愈伤组织绿苗再分化率及生根率。但当铜离子浓度超过 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,猕猴桃愈伤组织绿苗再分化率显著降低。

关键词:猕猴桃;铜离子;愈伤组织;再生植株

中图分类号: S663.4

文献标识码: A

Effects of Different Concentrations of Copper on Regeneration of Kiwifruit Callus

YUAN Yun-Xiang

(1. College of Chemistry and Life Science, Weinan Normal University, Weinan 714000; 2. Key Lab of Wet Land Ecology and Environment of Duoheliu of Shanxxi Province, Weinan 714099, China)

Abstract: The stems of Actinidia chinensis were taken as explants and induced callus formation, and then the calli were placed on different combinations regeneration medium. The different concentrations of Cu^{2+} were added into the media to screen optimal concentrations of Cu^{2+} on regeneration and rooting of Kiwifruit callus. The results showed that the regeneration and rooting rate of Kiwifruit callus can be increased distinctly on the medium with Cu^{2+} content of $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. But the effects were decreased significantly on the medium with more than Cu^{2+} content of $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Keywords: Kiwifruit; Copper; Callus; Plantlet regeneration

猕猴桃属猕猴桃科猕猴桃属植物,具有丰富的营养价值和良好的药用价值,果实中含有大量的糖、蛋白质、氨基酸以及多种矿物质及维生素;尤其以维生素C的含量最高,故有“水果之王”、“Vc之王”之美誉。猕猴桃是雌雄异株,利用常规育种手段进行猕猴桃的品种改良,周期长、工作量大、效率低,且长期进行常规繁殖容易造成品种退化。为了进行品质改良及促进优良品种的推广与应用,对猕猴桃进行离体培养是一种有效的途径^[1-2]。

本研究通过对猕猴桃愈伤组织进行再分化培养,在分化培养基中添加了不同浓度的铜离子进行筛选试验,以确定最适于猕猴桃愈伤组织分化的铜离子浓度,为建立高效的猕猴桃愈伤组织再生体系提供理论依据,为其良种克隆育苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以西安市长安区优质栽培秦美猕猴桃一年生带腋芽嫩枝条为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 猕猴桃愈伤组织的诱导

剪取秦美猕猴桃一年生带腋芽枝条的新嫩枝,放入烧杯中,加入适量洗衣粉,在自来水下冲

收稿日期:2012-09-16

基金项目:陕西省教育厅项目(12JK0832);陕西省教育厅项目(09JK434);国家自然科学基金项目(31000410)

作者简介:袁云香(1980-),女,讲师,硕士,从事植物分子遗传学研究。

洗 2 h 左右,再用蒸馏水冲洗 5 min,于超净工作台内,先用 75%酒精处理 30 s,再用 0.1%升汞处理 12 min,然后用无菌水冲洗 5~6 次,将幼嫩茎段切成约 1~1.5 cm 长作为外植体,接种于诱导培养基($MS+1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + 0.7%琼脂 + 3%蔗糖 + 脯氨酸 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 水解酪蛋白 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)上,在 $24\sim 26^{\circ}\text{C}$ 条件下暗培养,诱导愈伤组织形成,3 周后统计诱导率,并观察愈伤组织生长状态。

1.2.2 猕猴桃愈伤组织的增殖

茎段在培养基上诱导 21 d 后,将愈伤组织小心切下,继代于增殖培养基($MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + 0.7%琼脂 + 3%蔗糖 + 脯氨酸 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 水解酪蛋白 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)上,每瓶接种 5 块愈伤组织, $(22\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 条件下暗培养,14 d 后统计愈伤组织生长情况。愈伤组织增殖每 2 周继代一次。

1.2.3 猕猴桃愈伤组织的再分化

猕猴桃愈伤组织增殖培养 3 代后,将结构致密、淡黄绿色愈伤组织小心切开,分别接种于再分化培养基 ($MS+3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + 0.7%琼脂 + 3%蔗糖 + 脯氨酸 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 水解酪蛋白 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 上,培养基中分别添加 Cu^{2+} 浓度范围为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每瓶接种 5 块愈伤组织,培养温度 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、光照强度为 $1\ 500\sim 2\ 000\text{ lx}$ 、每天光照时间 13 h。接种 35 d 后统计再分化率。每个试验重复 3 次。

1.2.4 再生植株的生根培养及炼苗

待猕猴桃再生植株叶片长至 2~4 cm 时,转移至生根培养基中 ($1/2\ MS+NAA1.0+3\%$ 蔗糖 + 0.7%琼脂)生根。培养基中添加 Cu^{2+} 的浓度范围为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养一周左右,小苗开始生根,分别于 10 d、15 d、20 d 时统计生根情况。20 d 后取一部分再生植株打开瓶盖,炼苗 1 周后进行盆栽培养,2 周左右进行移栽。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃愈伤组织诱导及增殖

诱导培养 1 周左右,在猕猴桃茎的两端开始出现愈伤组织,而且茎开始膨大。培养至 14 d 时愈伤组织分化。将结构致密、颜色淡黄绿色生长旺盛的愈伤组织进行增殖培养。

2.2 再分化培养基中 Cu^{2+} 浓度的筛选

将继代培养第 3 次、生长旺盛的愈伤组织分别接种到不同的再分化培养基中,对其进行再分化培养。结果表明,培养基中添加 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cu}^{2+}$ 时,再分化培养第 5 d,一些愈伤组织表面发现有绿点,1 周左右绿芽不断增多,2 周左右绿芽长出了完整的再生植株。在 Cu^{2+} 浓度为 $0.1\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时(表 1),猕猴桃愈伤组织分化率逐渐升高,以 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,再分化率最高,达 82.60%。而对照组培养 2 周时也未见绿芽形成,少数在 20 d 左右才有绿芽形成。当 Cu^{2+} 浓度在 $1.5\sim 3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,却影响了猕猴桃愈伤组织分化,分化率呈下降趋势。

表 1 不同 Cu^{2+} 浓度对猕猴桃愈伤组织再分化率的影响

Cu^{2+} 浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种 愈伤组织块数	分化小苗 愈伤组织块数	愈伤组织 再分化率(%)
0	50	21	42.0 $\pm$ 1.14a
0.1	51	24	47.05 $\pm$ 2.39a
0.3	46	25	54.34 $\pm$ 2.07 b
0.5	48	33	68.75 $\pm$ 3.36 c
0.7	50	36	72.0 $\pm$ 3.21 d
1.0	46	38	82.60 $\pm$ 1.81 e
1.5	51	38	74.50 $\pm$ 2.59 d
2.0	50	32	64.0 $\pm$ 2.97 c
2.5	50	23	46.0 $\pm$ 3.51 b
3.0	47	19	40.43 $\pm$ 0.83 a

注:再分化率 = (分化小苗愈伤组织块数 / 接种愈伤组织块数) $\times$ 100%;显著性检验采用 LSD 法,同列不相同字母标注的数值表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著。

2.3 不同浓度 Cu^{2+} 对猕猴桃再生植株生根的影响

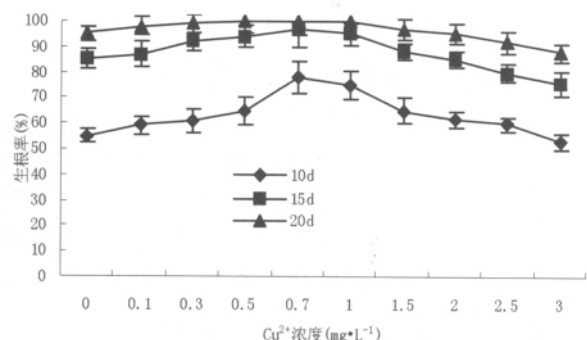


图 1 不同浓度 Cu^{2+} 对再生植株不同时间生根率

在已经筛选出的最适生根培养基中,附加不同浓度的 Cu^{2+} 进行生根培养试验,如图 1 所示,猕猴桃愈伤组织再生植株 10 d 生根率,在 Cu^{2+} 浓度为 $0.1\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时呈增高趋势,但当 Cu^{2+} 浓度在 $1.0\sim 3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,猕猴桃愈伤(下转第 79 页)

表明,番木瓜乙醇提取液对 DPPH·清除作用是所有存在于番木瓜提取液中的抗氧化活性物质综合作用效果,总多糖、总黄酮、总多酚对 DPPH·清除作用都不是主导作用的组分。

3 结 论

对以无水乙醇为溶剂番木瓜提取液,通过单因素试验和正交试验优化,得到以 DPPH·清除率最大为抗氧化活性衡量标准超声辅助提取最佳工艺条件为:提取时间 30 min,提取温度 40℃,超声功率为 600W;3 个因素对番木瓜乙醇提取液 DPPH·清除率影响程度为:提取时间 > 提取温度 > 超声功率。

番木瓜乙醇提取液的总多糖、总黄酮和总多酚含量与 DPPH·清除率无可循相关性,番木瓜乙醇提取液对 DPPH·清除作用是番木瓜提取液中的所有抗氧化活性物质综合作用效果。

参考文献:

- [1] 李向宏,何凡,华敏.海南番木瓜产业优势及发展对策[J].中国果业信息,2004,20(3):1-2.
- [2] 张文学,胡承,李仕强.番木瓜资源的应用状况[J].四川食品与发酵,2000(1):26-34.
- [3] Karina Almora, Jorge A Pino, Mercedes Hernandez. Evaluation of volatiles from ripening papaya (*Carica papaya* L., var. Maradol roja)[J]. Food Chemistry, 2004(86): 127-130.
- [4] Jorge A Pino, Karina Almora, Rolando Marbot. Volatile components of papaya(*Carica papaya* L. Maradol variety)fruit

[J]. Flavour Fragr, 2003(18): 492-496.

- [5] Marisa M Wal1. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana(*Musa* sp.) and papaya(*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006(19): 434-445.
- [6] Kondo S, Kittikorn M, Kanlayanarat S. Preharvest Antioxidant Activities of Tropical Fruit and the Effect of Low Temperature Storage on Antioxidants and Jasmonates [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 36(3): 309-318.
- [7] 张婷,糜漫天,唐勇,等.光皮木瓜多酚类的提取和清除 DPPH 的抗氧化活性[J].营养学报,2007,29(5):485-489.
- [8] 胡华平,韩雅莉,张峰.木瓜提取物抗氧化性质的初步研究[J].食品科学,2008,29(6):645-648.
- [9] 刘朝霞,胡士德,邹坤,等.资木瓜乙醇提取物的体外抗氧化活性研究[J].三峡大学学报,2008,30(4):72-75.
- [10] 黄海兰,王海媛,高昭,等.崂山光皮木瓜提取物抗氧化活性研究[J].食品科学,2009,30(17):45-47.
- [11] 张淑娟,徐怀德,米林峰,等.光皮木瓜汁体外抗氧化活性研究[J].食品科学,2011,32(21):56-61.
- [12] 许宗运,马少宾,张秀萍,等.DPPH·法评价 37 种植物抗氧化活性[J].塔里木农垦大学学报,2004,16(3):1-4.
- [13] 刘朝霞,杨兴海,邹坤.大孔吸附树脂分离纯化资木瓜黄酮的研究[J].中国中药杂志,2008,33(2):139-142.
- [14] 邹瑶,齐桂年,王绍梅.茉莉花渣多糖含量测定方法的建立及抗氧化作用研究[J].氨基酸和生物资源,2010,32(2):76-79.
- [15] 吴晓青,陈丹,邱红鑫,等.芙蓉李中总多酚含量测定方法的优选[J].中国中医药科技,2011,18(2):131-133.
- [16] 吴显荣.番木瓜的生物化学[J].热带作物科技,1992(1):5-11.

(上接第 66 页) 组织再生植株生根率不断下降。20 d 后猕猴桃愈伤组织再生植株生根率在不同 Cu^{2+} 浓度之间相差不明显,可能由于生根时间长的原因。

3 讨 论

铜是植物正常生命活动所必需的微量矿质元素,为多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶的成分,在呼吸的氧化还原过程中起重要作用。同时也存在于叶绿体的质体蓝素中,参与光合作用的电子传递,并有稳定叶绿素的功能^[3-4]。关于铜离子对植物器官再分化的促进作用的影响研究在水稻等植物中已有报道^[5-6]。本试验借鉴前人的研究,在猕猴桃愈伤组织再分化培养时增添了不同浓度的铜离子。研究发现,在培养基中适度增加铜离子,能够有效地改善愈伤组织质量,提高其胚性状态,并且猕猴桃愈伤组织转绿天数变短,绿芽分化率提高,但浓度过大则不利于再分化。这可能是由于铜离子处理激发了愈伤组织 POX 的活性,进而影响了愈伤组织生长发育的进程,提高了绿苗的分化率。

同时,也可能由于铜离子与培养基中激素和培养基中的营养元素相互作用,通过与外植体内源激素的相互作用而提高愈伤组织再生频率^[7-8]。关于此问题的具体机制,还有待于进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] 陈东虹.猕猴桃的药理活性研究进展[J].广东药学院学报,2002,18(3):231-234.
- [2] 文国琴,何震.红阳猕猴桃茎段愈伤组织诱导成苗技术[J].福建林业科技,2004,31(4):78-79.
- [3] 宋凤鸣,郑重,葛秀春.活性氧及膜脂过氧化在植物-病原物相互作用中的作用[J].植物生理学通讯,1996,32(5):377-385.
- [4] 邱金龙,金巧玲,王钧.活性氧与植物抗病反应[J].植物生理学通讯,1998,34(1):56-63.
- [5] 马静,安永平,孙建昌,等.微量元素对宁夏粳稻愈伤组织绿苗分化的影响[J].西北农业学报,2009,18(5):213-216.
- [6] 杨跃进,简玉瑜,郑迎冬.铜在水稻愈伤组织培养再生植株的促进作用[J].中国水稻科学,1999,13(2):95-98.
- [7] 刘元凤,刘彦卓,贺红,等.几种影响籼稻成熟胚愈伤组织诱导及再生的因素[J].植物生理学通讯,2004,40(3):319-322.
- [8] 徐吉臣, Yohan M. W., Jeffery L. B. 高粱(*Sorghum bicolor*)分子图的构建及寄生草(*Striga asiatica*)萌发诱导物基因的定位[J].遗传学报,2001,28(9):870-876.