

不同牡丹外植体诱导愈伤组织的研究

高昌勇 (菏泽学院生命科学系, 山东菏泽 274015)

摘要 用牡丹的土芽、叶柄、叶片、幼芽等外植体进行愈伤组织的诱导。结果表明, 配方 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L 的培养效果最为理想。不同外植体中, 幼芽和土芽诱导率最高, 叶柄和叶片次之, 其诱导率分别为 100.0%、60.0%、26.6%。

关键词 牡丹; 组织培养; 愈伤组织

中图分类号 S685.11 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)34-11036-01

Research of Inducing Callus with Different Peony Explants

GAO Chang-yong (Department of Life Sciences, Heze University, Heze, Shandong 274015)

Abstract The callus were induced with explants of peony such as petiole, blade and tender bud. The results showed that the culture effect of formula MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L was most perfect. Among different explants, the induction rates of tender bud were highest and that of petiole and blade were secondary, and their induction rates were 100.0%, 60.0% and 26.6% resp.

Key words Peony; Tissue culture; Callus

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)是著名的花卉, 花姿优美, 有“国色天香”、“花中之王”的美誉。长期以来, 我国一直把牡丹作为幸福美好、繁荣昌盛的象征, 深受人们的喜爱^[1]。牡丹也是一种重要的药用植物。其根皮中含有丹皮酚等多种生物活性物质, 有清热凉血、活血化瘀之功效^[2]。采用播种、嫁接和分株等牡丹传统的繁殖方法, 不仅成苗周期长, 而且出苗量少, 质量参差不齐, 难以满足生产需求。所以, 尽快解决牡丹的快繁问题, 显得尤为重要。以菏泽牡丹的不同器官作为外植体, 进行了愈伤组织诱导试验。

1 材料与方法

1.1 材料 顶芽、叶柄、叶片和土芽等牡丹营养器官, 均采自菏泽学院校园内栽培的牡丹。

1.2 方法

(1) 将牡丹的顶芽经流水冲洗以及酒精、升汞灭菌后, 接种于添加不同浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基, 进行愈伤组织的诱导, 观察愈伤组织的形成和分化情况, 统计出愈伤组织的诱导率, 筛选出牡丹愈伤组织形成的最佳培养基配方。

(2) 分别将牡丹的顶芽、叶柄、叶片和土芽经流水冲洗以及酒精、升汞灭菌后, 接种于所筛选出的培养基上, 进行愈伤组织的诱导, 统计出愈伤组织的诱导率, 比较不同器官愈伤组织的诱导效果, 筛选出易诱导出愈伤组织的器官。

(3) 接种后 25℃ 下暗培养 1 周后, 于光照强度 2 000 lx、光照时间 10 h、25℃ 条件下培养。

1.3 培养基配方 基本培养基为 3% 蔗糖和 0.7% 琼脂, pH 值为 5.8~6.0。在 MS 培养基中添加不同浓度 6-BA 和 NAA (表 1)。

2 结果与分析

顶芽接种于上述 9 种培养基, 其接种数量、诱导出愈伤组织的数量以及愈伤组织的诱导率见表 2。以牡丹的营养器官为外植体诱导愈伤组织时, 不同浓度的 6-BA 和 NAA 必须配合。当 6-BA 浓度大于 NAA 浓度时, 也能诱导出愈伤组织, 但随着其比例的加大, 愈伤组织的诱导率下降, 当加大到一定程度就不能形成愈伤组织。这说明在诱导愈伤组织时, 组

织脱分化对 NAA 的浓度变化比 6-BA 的浓度变化敏感。在诱导愈伤组织的试验中, NAA 浓度稍高于 6-BA 浓度是比较理想的。研究表明, 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 1.5 mg/L 是理想的配方组合。

表 1 添加不同浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基 mg/L

编号	6-BA	NAA
1	0.5	0.1
2	1.0	0.1
3	2.0	0.1
4	0.5	1.5
5	1.0	1.5
6	2.0	1.5
7	0.5	2.5
8	1.0	2.5
9	2.0	2.5

表 2 试管苗顶芽在 9 种培养基上愈伤组织的形成状况

编号	接种总数	诱导出愈伤组织	愈伤组织诱导率
	个	总数//块	%
1	15	4	26.6
2	15	1	6.0
3	15	0	0
4	15	12	80.0
5	15	14	93.3
6	15	5	33.3
7	15	7	46.6
8	15	12	80.0
9	15	6	40.0

注: 诱导率 = 诱导出愈伤组织总数 / 接种总数。

顶芽、叶柄、叶片和土芽等作外植体时, 在培养基 5 上愈伤组织的形成状况见表 3。由表 3 可知, 土芽和顶芽诱导愈伤组织诱导率为 100%, 顶芽的愈伤组织开始形成时间需 15 d, 土芽开始出现愈伤组织时间为 11 d; 叶柄的诱导率为 60.0%, 愈伤组织开始出现需要 13 d; 叶片的诱导率为 26.6%, 且愈伤组织出现时间最长, 需要 17 d。这表明叶片组织的分化程度较高, 叶柄和顶芽组织分化程度较低, 而土芽的组织分化程度最低, 最容易脱分化, 产生愈伤组织。在诱导愈伤组织的试验中, 顶芽和叶柄是较为理想的材料, 而土芽

(下转第 11111 页)

基金项目 菏泽学院科学研究基金(XY07SW01)。

作者简介 高昌勇(1976-), 男, 山西汾阳人, 硕士, 讲师, 从事生物技术的研究与应用。

收稿日期 2007-07-08

采取养牛场公有、职工分散饲养方式,建立 200 头规模的南阳黄牛保种群,实行统一配种,统一防疫,统一登记,统一饲养技术指导。鉴于南阳黄牛生长速度较慢的特点,可以按市场价格给予相应补贴以提高职工养牛积极性。

2.2 建立南阳黄牛保护区 在南阳市宛城区的新店、瓦店等地、卧龙区的青华、陆营等地、邓州市都司镇等地、方城、社旗建立保护区,以自然村为保种单位,对黄牛种后代的繁殖进行生产性能的选择,可采取由技术人员指导进行黄牛家系等量留种轮式交配的方式,后代仍采取等量留种,同时自然村之间进行有计划定期交换公牛,确保随机交配,防止因近亲交配造成基因丢失,以保持群体基因频率长期稳定。保护区内禁止开展任何形式的经济杂交,以保证种群的数量和质量,但可以在保护区之外利用具有优良肉用性状的外来品种进行大面积的杂交改良和经济利用。

2.3 建立南阳黄牛冻精冻胚保种基因库 在南阳黄牛育种中心及保种站核心群体中,选择健康的、生产力正常、3~6 岁符合南阳黄牛国际标准特级的种公牛、种母牛。种公牛按照《牛冷冻精液制作程序》,采制冻精颗粒 3000 份以上,冻精颗粒质量技术标准符合《牛冷冻精液国家标准》。种母牛依照同期发情、超数排卵、人工授精、冲胚采集、检胚分级、冷冻保存等程序,采制冻胚,全部达到 I 级可用胚,建立南阳黄牛地方基因库。对基因库实行严格的管理,对于获取和利用基因资源的任何单位和个人进行严格审批。

2.4 建立专门的社区信托基金 南阳黄牛保护区设立社区信托基金,由政府负责监督、管理。社区信托基金主要由国家拨款、社会各界的捐赠以及南阳黄牛遗传资源的货币惠益等组成,用于南阳黄牛保种群、南阳黄牛保护区、南阳黄牛冻精冻胚保种基因库的建设以及南阳黄牛遗传资源的其他保护,实行专款专用。

2.5 管制获取南阳黄牛遗传资源的活动 遗传资源的获取主要指为了研究、生物开发与保护、工业应用或商业等目的而取得并利用移地和就地条件下保护的遗传资源及其衍生物或其无形成分。对于获取活动必须贯彻事先知情同意制度,事先即在生物开发活动开始之前的合理期限内寻求知情同意,事先获取申请者寻求相关主体知情同意的时间要求。南阳黄牛保护区作为遗传资源的实际提供者,提供遗传资源,

其他任何单位和个人,未经保护区同意不得私自提供南阳黄牛的遗传资源。另外,对于国内单位和个人的获取活动必须经省级农业部门批准,对于国外单位和个人的获取活动必须经国家农业部门的批准。

2.6 按共同商定条件分享南阳黄牛遗传资源惠益 共同商定条件是指遗传资源的提供国通过获取与惠益分享管制立法而确定的,相关主体与遗传资源获取者达成获取与惠益分享协定时必须遵守的最低条款和条件。它是任何一项获取与惠益分享安排的核心。合理确定共同商定条件的最低标准,是确保共同商定条件有效实施的前提之一。从遗传资源提供国的角度看共同商定条件的主体主要包括国家和其他实际提供遗传资源的主体。在遗传资源获取与惠益分享方面,我国以直接的方式参与共同商定条件,即国家主管部门代表国家作为一方主体与遗传资源获取申请者就获取与惠益分享的条款和条件达成协议。而遗传资源的实际提供者不是作为独立主体,是作为附加主体参与到国家与遗传资源获取申请者之间的获取与惠益分享协定之中。所以,国家农业部门代表国家对外签订协定,而南阳黄牛保护区作为遗传资源的实际提供者,是以附加主体参加到协定中。同时,遗传资源的实际提供者也是惠益分享的主体,将货币惠益按照一定的比例分别纳入国家信托基金和社区信托基金,非货币惠益由南阳黄牛保护区负责管理,用于南阳黄牛遗传资源的保护。

参考文献

- [1] 朱雪忠,杨远斌.基于遗传资源所产生的知识产权利益分享机制与中国的选择[J].科技与法律,2003(3):54.
- [2] 徐海根.《生物多样性公约》热点研究[M].北京:科学出版社,2004.
- [3] 陆文聪,倪琪.植物遗传资源保护与利用的市场机制和国际机制[J].自然资源学报,2000,15(3):285-290.
- [4] 王健民,王如松.中国生态资产概论[M].南京:江苏科学技术出版社,2001.
- [5] 李峰,王凤莲.南阳黄牛的生态地理分布与开发利用[J].家畜生态,2000,21(1):27-29.
- [6] 南阳地区农业局.南阳畜牧志[Z].南阳,1992.
- [7] 许尚忠,高雪,任红艳,等.中国黄牛遗传资源的保护与开发利用[J].中国畜牧业通讯,2005(13):16-18.
- [8] 马月辉,曹红鹤,陈幼春,等.部分黄牛品种(群体)遗传多样性分析[J].中国农业科学,2003,36(6):696-699.
- [9] 秦天宝.遗传资源获取与惠益分享的法律问题研究[M].武汉:武汉大学出版社,2006.
- [10] 鲁云凤.南阳黄牛种质资源遗传分析与保护策略[D].郑州:河南农业大学,2005.

(上接第 11036 页)

是最理想的材料。把愈伤组织继代在培养基 5 上,继代培养中愈伤组织的生长状况是 10 d 后组织开始膨大;13~15 d 后愈伤组织生长明显减慢并开始逐渐变绿,说明愈伤组织细胞在 15 d 后开始进入分化阶段;25~28 d 愈伤组织块变为深绿色;此后,组织块开始逐渐坏死,少量组织块也从边缘生长出新的组织。继代培养中愈伤组织常褐化。这主要与愈伤组织中的次生代谢产物代谢有关。次生产物中酚类物质在接触空气中氧气时,会自动氧化或由于机械损伤使酚氧化酶和底物接触,从而使酚类物质被氧化后产生醌类物质(这类物质为棕褐色),从而毒害自身的现象^[3]。所以,要通过继代培养以扩大繁育系数,继代培养以 13~15 d 最为合适,同时在操作过程中应尽量减少机械创伤,以防止

褐化。

表 3 不同器官的外植体在培养基 5 上愈伤组织形成状况

外植体	接种总数	诱导出愈伤组织	出现愈伤组	诱导率
	个	总数//块	织的时间//d	%
土芽	15	15	11	100.0
顶芽	15	15	15	100.0
叶柄	15	9	13	60.0
叶片	15	4	17	26.6

参考文献

- [1] 陈俊愉,程绪珂.中国花经[M].上海:上海文化出版社,1994.
- [2] 徐国均.生药学[M].北京:人民卫生出版社,1995.
- [3] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1999.