维普资讯 http://www.cqvip.com

第22卷 第12期
2007年12月

乐山师范学院学报
Journal of Leshan Teachers College

Vol.22,No.12
Dec.2007

国家一级保护植物珙桐的愈伤组织培养*

李仲芳[1] 李 卉[2] 刘 芳[1] 汤 莉[1] 谭小莉[1]
(1.乐山师范学院,化学与生命科学学院,四川 乐山 614004;
2.甘肃农业大学生命科学学院,甘肃 兰州 731000)

摘 要:研究了以珙桐芽作为外植体诱导愈伤组织形成的过程。探索了不同植物生长调节剂与培养基配方对诱导珙桐愈伤组织形成的影响。结果表明,培养基1/2MS+BA(1.5mg/l)+NAA(1mg/l)组合较好,用该组合培养珙桐芽外植体易形成较多的愈伤组织。

关键词:珙桐;组织培养;愈伤组织
中图分类号:Q945.5 文献标识码:A 文章编号:1009-8666(2007)12-0052-02

珙桐(*Davidia involucrata* Baill.)是国家一级保护植物[1],为珙桐科珙桐属落叶乔木。起源古老,是第三纪古热带植物区系的残遗种,有"活化石"之称。珙桐是我国特有的单种科珍稀植物,在生态学和植物资源学上都有重要价值[2]。开花时节,珙桐头状花序基部的两枚白色大苞片,如白鸽展翅,故又称为中国鸽子树(Dovetree),观赏价值极高。由于珙桐对生长环境要求苛刻,现仅存于我国西南少数几个省的局部地区。其分布区冬冷夏凉,常年多雾多雨,空气湿度大的山地环境,大多只占据沟谷两侧山坡中、下部的小生境[3]。由于自然和人为的原因,适合珙桐的生存环境不断减少,珙桐面临灭绝的危险[4]。珙桐结实年龄大,种子败育现象严重,有"千花一果"的特性[5]。种子繁殖,扦插压条或嫁接都不易成功,使珙桐难于批量育苗造林[7],这是珙桐仍处于濒危状态的另一个原因。

试验探讨了以珙桐芽作为外植体诱导愈伤组织发育的过程,以及如何有效地利用植物生长调节剂来加速珙桐愈伤组织的形成,以期筛选出一种较适宜诱导珙桐愈伤组织的培养基,为加速珙桐的繁殖扩增提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的珙桐芽于2005年9月采自四川峨眉山,地理位置为29°34′025″~29°34′212″N,103°17′905″~103°17′704″E,海拔在1568~1624m范围内。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基

本试验设置两个因素,植物生长调节剂2水平,为I-AA(萘乙酸)1mg/L、NAA(吲哚乙酸)1mg/L;基本培养基3水平,为MS、1/2MS、1/4MS,配比成六个组合,每个组合都加入6-BA(苄基腺嘌呤)1.5mg/L(参照夏晗等试验结果[8])。pH值5.8-6.0,以100ml的锥形瓶为培养容器,121℃-123℃高压灭菌20min。

1.2.2 取材、消毒、接种

由于珙桐在生长期间是暴露在野外的,为了减少污染,进行表面消毒前采取了以下措施。(1)从植株上取无伤口无病虫的材料。(2)在晴天中午取材料。(3)在室内进行预培养。取珙桐嫩梢,剪去叶片,在自来水下用刷子清洗干净,剪成2-3cm带1-2个侧芽的茎段,流水冲洗4-6h,切成适当大小置超净工作台上进行消毒。用70%的酒精表面消毒30s,无菌水冲洗2次,再用0.1%的升汞消毒8min,无菌水冲洗5次,逐渐剥去外面的包片,待剥去3-5层包衣露出有绒毛的小芽时,即可接入培养基中。

收稿日期:2007-05-08
*本研究得到四川省教育厅和乐山师范学院项目经费资助。
作者简介:李仲芳,乐山师范学院化学与生命科学学院教授,甘肃农业大学硕士生导师,主要从事园林花卉组培方面的研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.3 培养条件

每个组合各接种 10 瓶，每瓶接种 3 个芽体，即每种组合共接种 30 个芽体，接种后置于光照培养箱内培养，培养温度 22℃，光照 13h。接种后观察，如发现有污染，详细记录并及时转接或清除。25d 后开始形成愈伤组织，附图 1、图 2。

图 1

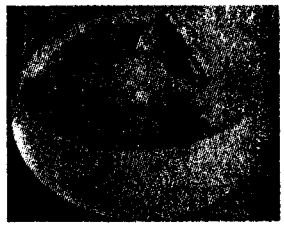

图 2

2 结果及分析

2.1 珙桐愈伤组织培养基的筛选

由表 1 可知，4 号组合（1/2MS+6-BA+NAA）效果最好，诱导愈伤组织的百分率高达 80.5%，处理效果显著的优于其他处理组合。符合多数木本植物在诱导阶段采用较低无机盐浓度的结论。与夏晗等试验结果相一致[8]。同时我们从表 1 可看出，在本试验所设的两个因素中，植物生长调节剂对诱导珙桐愈伤组织形成的影响要大于基本培养基对其的影响。这与夏晗等试验结果不大一致[8]，夏晗等认为基本培养基对珙桐初代培养的芽的诱导率影响极大。这可能是选用不同的植物生长调节剂所引起的。

2.2 珙桐组织培养中植物生长调节剂的筛选

在各种植物生长调节剂中，选择了常用的两种进行对比实验。生长素主要用于诱导细胞的愈伤组织的产生，促进细胞的脱分化。试验中采用的生长素是 NAA 和 IAA。在培养基中加入细胞分裂素 6-BA 的目的是为促进细胞分裂和扩大，加速愈伤组织的形成。从表 1 中可看出，珙桐芽接种后，在相同的培养基的情况下，使用 NAA 处理的 2,4,6 号组合中诱导形成愈伤组织的百分率明显的高于使用 IAA 处理的 1,3,5 号组合，并分别高 22.7%、59.4% 和 18.5%。因此，表明在诱导珙桐愈伤组织形成时，植物生长调节剂 NAA 的效果优于 IAA 的。

2.3 愈伤组织的形成

珙桐芽接种后，芽中原来未发育成熟的叶片吸收营养，15d 左右便可观察到叶片展开。珙桐芽接种约 25d 后，随着叶片的展开，芽切口（或叶片）与培养基接触的部位普遍形成愈伤组织，其主要是切口处分裂能力强的细胞脱分化而来，有的来源于发育中的叶柄。表 1 分别记录了 6 个不同配比组合中，愈伤组织的颜色、形态。从表 1 可见，颜色浅的愈伤组织质地较松软、突起较明显，特别是褐色愈伤组织的质地最为松软，这与大多数组织培养的试验结果吻合[8]。3、4、5 号培养结果表明，低浓度无机盐培养基诱导的愈伤组织致密，较硬。生长旺盛的愈伤组织一般呈淡黄色、白色也有浅绿色或绿色，而老化的愈伤组织多转变为深黄甚至褐色[10]。4 号培养基中的愈伤组织出现了多种颜色、状态，说明愈伤组织出现较早，愈伤组织生长时间长。进一步证实了 4 号培养基较适宜珙桐愈伤组织的诱导。

表 1 珙桐愈伤组织的诱导率及形态特征

组合	基本培养基	愈伤组织诱导率	愈伤组织形态特征
1	MS+ BA+ IAA	18.6%	淡黄到褐色，松软，突起不明显
2	MS+ BA+ NAA	41.3%	淡黄色，松软，表面突起不明显
3	1/2MS+BA+IAA	21.1%	淡黄色，致密，表面无突起 黄色，致密，表面突起不明显
4	1/2MS+BA+NAA	80.5%	淡黄到褐色，致密，突起不明显 淡黄到褐色，致密，突起不明显 黑色，致密，表面突起不明显 淡黄，松软，表面瘤状突起明显
5	1/4MS+BA+IAA	11.8%	淡黄色，致密，表面无突起
6	1/4MS+BA+NAA	30.3%	淡黄色，松软，表面瘤状突起明显或较明显 淡黄色，松软，表面突起不明显

2.4 珙桐组织培养中的褐变及防治措施

珙桐芽在培养过程中体内的多酚氧化酶被激活，细胞内的酚类物质被氧化成醌类物质，致使芽体表面或芽体与培养基接触部分变褐，同时还会抑制其他酶的活性，最后导致芽体死亡。试验中主要采用连续转接来减轻醌类物质对培养物的毒害作用。试验证明，转接五天后，褐变程度明显降低。

3 讨论与结论

植物愈伤组织培养是植物种质保存及快速繁殖的重要方法。是保护濒临灭绝的珙桐的一种理想手段。本试验筛选出适合进行珙桐愈伤组织诱导培养的培养基——1/2MS+6-BA(1.5mg/l)+NAA(1mg/l)，该培养基愈伤组织诱导率较高，处理效果显著的优于其他处理组合。加入同浓度(1mg/l)NAA 的培养基中其愈伤组织的形成优于加入 IAA 的。但对于不同浓度 NAA、IAA 培养基诱导珙桐愈伤组织的效果还须进一步试验。

参考文献：

[1]傅立国，金鉴明. 中国植物红皮书——稀有濒危植物（第 1 册）[M]. 北京：科学出版社，1992. 474-475.

[2]陈坤荣，李桐森，田广红等. 珙桐繁殖的生物学特征[J]. 西南林学院学报，1998，18(2).

[3] 张征云，苏智先，申爱英. 中国特有植物珙桐的生物学特性、濒危原因及保护[J]. 淮阴师范学院学报，2003，2(1).

[4] 张家勋，李俊清，周宝顺. 珙桐的天然分布和人工引种分析[J]. 北京林业大学学报，1995，17(1):25-30.

[5] 张清华，宋朝枢. 珙桐天然分布的调查研究主要珍稀濒危树种繁殖技术[M]. 北京：中国林业出版社，1992.

[6]李贤伟. 珙桐的研究现状及展望[J]. 林业科技，2004，29(6).

[7]陈坤荣. 珙桐种子休眠原因研究初报[J]. 植物生理学通讯，1988，(3):24-28.

[8]夏晗，张健，尚旭岚，李贤伟. 珙桐初代培养研究[J]. 四川农业大学学报，2003，21(4).

[9]胡进耀，苏智先，黎云祥. 珙桐生物学进展[J]. 中国野生植物资源，2003，22(4)15-19.

[10]王清连. 植物组织培养[M]. 北京：中国农业出版社，2002. 34.