

峨眉四照花茎尖组织培养技术

路承香^{1,2}, 李仲芳^{2*}, 王有科¹, 孙飞达³

(1. 甘肃农业大学林学院, 甘肃兰州 730070; 2. 乐山师范学院化学与生命科学系, 四川乐山 614004; 3. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃兰州 730070)

摘要 [目的]探讨峨眉四照花茎尖组织的最佳培养条件。[方法]采取峨眉山4~5年生四照花树体枝条的幼嫩茎尖作为外植体, 研究不同生长激素对外植体诱导发育出丛生芽的影响。[结果]结果表明: 培养基MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L和MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L组合对不定芽诱导效果较好。培养基MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L组合诱导茎尖产生大量愈伤组织。[结论]该研究为峨眉四照花的快速繁育、种质资源保存提供了技术依据和参考。

关键词 峨眉四照花; 组织培养; 茎尖; 愈伤组织

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** B **文章编号** 0517-6611(2008)04-01416-03

Preliminary Discussion on Tissue Culture Technology for the Stem-tip in the Rare and Protected Plant *Dendrobenthamia japonica* var. *emeinsis*
LU Cheng-xiang et al (College of Forestry, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] The aim of the research was to discuss the optimum culture conditions for the stem-tip tissue in *Dendrobenthamia japonica* var. *emeinsis*. [Method] The tender stem-tips on the branches of *D. japonica* with 4~5 years old were taken as explants to study the effects of different growth hormone on the induction and development of the clustered buds from explants. [Result] The medium combinations of MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA and MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IBA had better induction effects on the adventitious buds. A great deal of calli were produced by inducing stem-tips in the medium combination of MS+0.5 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA. [Conclusion] The research provided technical basis and references for the rapid propagation and germplasm resource conservation of *D. japonica*.

Key words *Dendrobenthamia japonica* var. *emeinsis*.; Tissue culture, Stem-tip; Callus

峨眉四照花(*Dendrobenthamia capitata* var. *emeinsis* Fang et Hu.)隶属于山茱萸科, 四照花属, 别名石枣、山荔枝, 落叶小乔木或灌木, 高可达9 m, 产于长江流域诸省, 多生长于海拔600~2 000 m的河谷、溪边及杂木林中, 喜温暖湿润气候, 有一定耐寒力, 本种树形整齐, 枝条疏散, 树姿秀丽, 夏赏玉花, 秋观红果、红叶, 是一种稀有的庭园观赏树种, 也是一种珍稀保护植物。果实营养丰富, 可鲜食, 也可酿酒、制醋和入药, 用途十分广泛^[1]。目前对于四照花的研究主要集中在种质资源调查、常规栽培和繁育技术的研究上。吕寻等研究了四照花的栽培与管理技术^[2]。韩维栋等对四照花鲜果的营养成分及其类群种质资源的开发利用作过调查^[3]。易咏梅等进行了四照花种子萌发等方面的研究^[4]。而有关峨眉四照花组织培养的研究未见报道。为此, 笔者以峨眉四照花的茎尖作为外植体, 探讨四照花有效的繁殖方法, 试图为峨眉四照花的快速繁育、种质资源保存提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料来源于四川省自然资源研究所峨眉山生物站(海拔990 m, 年平均气温22℃)。采4~5年生树体枝条的幼嫩茎尖, 装入保鲜袋备用。采集时间分别为3月中旬, 4、5月的上旬和下旬。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基。诱导愈伤组织及芽分化均选用MS培养基为基本培养基。在愈伤组织诱导培养基中附加不同浓度的6-BA及NAA进行对比试验; 而在诱导芽分化的培养基中附加不同浓度的6-BA、NAA及IBA, 设MS+6-BA+NAA和MS+6-BA+IBA 2种处理。每个处理中加蔗糖30 g/L、琼脂7 g/L, 培养基pH值调至5.8左右。

1.2.2 外植体消毒与接种。将采集的材料先用自来水冲洗

干净, 在超净工作台上用70%酒精消毒20 s, 再用0.1%升汞消毒5~8 min, 最后用无菌水清洗5遍。将灭菌后的外植体用无菌滤纸吸干水分, 切除茎尖以下较大叶片, 切取茎尖接种于愈伤组织诱导培养基上。

1.2.3 培养条件。白天温度(24±1)℃, 夜晚温度(21±1)℃, 光照时数12 h/d。采用的培养环境为GXZ智能型光照培养箱。

1.3 测定项目 外植体接种后每日观察, 发现有污染、褐变的植株后详细记录并及时转接或清除, 20 d后开始观察外植体的生长状况。

2 结果与分析

2.1 采集时间对峨眉四照花茎尖组织培养的影响 从表1可以看出, 外植体的采集时间对其成活具有很大的影响。3、4月为取材和接种的最佳时间, 而5月采集的材料接种后几乎全部褐化。3、4月采集的茎尖颜色为嫩绿色, 接种后发生轻微褐变, 不影响植株的正常生长, 随着培养时间的延长, 褐变逐渐消失; 而5月采集的幼嫩茎尖为浅红色或红色, 到5月下旬有的已变为褐红色。5月上旬所采材料在接种后第2天就发生较严重褐变, 此时及时转接并将基部切除, 观察发现褐变减轻甚至无褐变现象发生。5月下旬所采材料在接种后2 h基部已发红, 随着时间延长, 颜色越深, 到第2天全部发生严重褐变。这说明随着气候的变化, 气温的升高, 四照花茎尖所分化的酚类物质可能增加, 褐变率也随之增高^[5]。

2.2 愈伤组织的诱导 从表2可以看出, 不同培养基对愈伤组织的诱导效果有明显差异。方差分析表明, MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基的诱导效果与其他处理差异在0.05水平显著, 对愈伤组织的诱导效果最好, 外植体生长快, 所形成的愈伤组织细密, 数量大, 愈伤组织数达到12个, 诱导率达80.0%(图1); MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基对愈伤组织诱导效果最差, 形成的愈伤组织松散, 数量少, 愈伤组织数仅为4个, 诱导率仅为26.7%。同时, 在峨眉四照花愈伤组织的诱导中, 相同的6-BA浓度下,

基金项目 四川省教育厅重点项目(2006A128)。

作者简介 路承香(1981-), 女, 甘肃靖远人, 硕士研究生, 研究方向: 园林花卉。*通讯作者。

收稿日期 2007-10-11

NAA 浓度高有利于愈伤组织的形成;而相同的 NAA 浓度下, 6-BA 浓度高低对愈伤组织的形成没有直接关系。

表 1 采集时间对峨嵋四照花茎尖组织培养的影响

Table 1 Effects of different sampling time on culture of explants

采集时间	接种数	褐化状况	生长状况	污染率	愈伤组织数
Sampling time	No. of inoculated	Browning situation	Growth status	Contamination rate	No. of callus
月 - 日	个			%	个
03-16	46	几乎无褐化 Almost no browning	生长良好 Growth all right	34.8	33
04-10	50	少量有轻微褐化 A few of explants browning slightly	生长良好 Growth all right	32.0	32
04-22	60	有轻微褐化 Browning slightly	生长良好 Growth all right	36.7	35
05-09	72	褐化严重,仅有几株轻微褐化 Browning severely, just several assumed browning slightly	几乎无生长 Almost no growth	40.3	6
05-21	75	全部褐化死亡 All the explants browning and death	无生长 No growth	0	0

表 2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different culture medium on callus induction

基本培养基	6-BA//mg/L	NAA//mg/L	接种数	愈伤组织数	诱导率
Basic medium			No. of inoculated//个	No. of callus//个	Induction rate//%
MS	2.0	0.5	15	12	80.0 a
MS	1.0	0.5	18	13	72.2 b
MS	0.5	0.5	22	15	68.2 b
MS	0.5	0.2	19	9	47.4 c
MS	3.0	0.5	16	7	43.8 c
MS	2.0	0.2	15	6	40.0 c
MS	3.0	0.2	17	5	29.4 d
MS	1.0	0.2	15	4	26.7 d

注:表中数值均为平均值。采用 LSD 法进行方差检验,不同字母表示差异在 0.05 水平显著。下同。
Note: Values in above table are mean, followed by a different letter indicate significantly different at 0.05 probability level according to LSD method. The same as below.

2.3 芽的分化 从表 3 可以看出,2 种培养基配比所形成的芽增殖系数没有很大的变幅。方差分析表明,MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L 和 MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L 处理之间差异不显著,而与其他处理差异在 0.05 水平显著,增殖系数分别达到 3.35 和 3.41。由此得出,附加了 IBA 的 6-BA 2.0 mg/L 培养基中芽的分化较多,不定芽形成率较高,其中以 MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L 培养基对四照花芽分化诱导效果最好(图 2);而在附加生长素 NAA 的处理中,芽的分化率不高,MS + 6-BA 2.0



图 1 愈伤组织诱导
Fig.1 Induction for callus

mg/L + NAA 0.5 mg/L 培养基的增殖系数最大,仅为 1.53。可见,在峨嵋四照花的芽诱导分化中,IBA 比 NAA 效果好。



图 2 有效芽分化
Fig.2 Differentiation of available bud

表 3 不同培养基对芽分化的影响

Table 3 Effects of different culture medium on buds differentiation

基本培养基	6-BA//mg/L	NAA//mg/L	IBA//mg/L	接种数	分化芽数	增殖系数
Basic medium				No. of inoculated//个	No. of buds differentiation//个	Proliferation coefficient
MS	2.0	0	1.0	22	75	3.41 a
MS	2.0	0	0.5	20	67	3.35 a
MS	1.0	0	1.0	18	35	1.94 b
MS	1.0	0	0.5	21	32	1.52 c
MS	1.0	0.5	0	17	23	1.35 c
MS	2.0	0.2	0	20	29	1.45 c
MS	2.0	0.5	0	15	23	1.53 c
MS	1.0	0.2	0	19	21	1.11 d

注:增殖系数 = 分化芽数/接种数。Proliferation coefficient = No. of buds differentiation/No. of inoculated.

3 小结与讨论

峨眉四照花愈伤组织诱导培养基以 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 最好,诱导率达 80.0%;芽分化培养基以 MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L 最好,且 IBA 比 NAA 效果好;最佳接种时间为树体萌芽后的最初 1~2 个月,即 3~4 月。

在木本植物的组织培养中,褐变是普遍存在的一种现象。褐化是由于植物受伤后体内多酚氧化酶被激活,酚类物质氧化产生醌类物质而造成的。它们会逐渐扩散到培养基中,抑制其他酶活性,毒害整个外植体组织^[6]。研究表明,随着峨眉四照花的生长,萌芽后时间越长,组织培养中的褐化率越高,发生褐变的时间越短。

试验表明,峨眉四照花丛生芽易诱导产生,但生长缓慢,易褐变及污染;愈伤组织易产生,但不易分化出不定芽,主要是由于供试材料为野外采集的材料,不易消毒。对于四照花

的组织培养及培养基配方还处于摸索阶段,目前只能参考木本植物的组织培养^[3]。就组织培养而言,四照花最适生根培养基的确定、组培苗移栽时间长短的确定、组培苗化学成分的测定及其次生代谢产物的成分测定等都是当前工作的重点。

参考文献

- [1] 蔡天军.色艳果佳的四照花[J].花卉,2007(9):11.
- [2] 吕寻,赵精英.四照花的栽培与管理技术[J].特种经济动植物,2006,9(6):38.
- [3] 韩维栋.四照花类群种质资源及其开发利用[J].中国野生植物资源,1993(1):37-40.
- [4] 易咏梅,郑洪,周建华.四照花和狭叶四照花种子的萌发试验[J].西部林业科学,2004,33(4):17-19.
- [5] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986.
- [6] 周俊辉,周家容,曾浩森,等.园艺植物组织培养中褐变现象及抗褐研究进展[J].园艺学报,2000,27(S):481-486.

(上接第 1324 页)

2 结果与分析

术后,所有施术牦牛精神状态、体温及食欲等皆正常。7 d 后检查,全部施术牦牛的瘤胃壁都与腹膜、腹肌及皮肤愈合在一起,形成自然瘘管,没有出现腹腔感染的征象。全部施术牦牛的瘤胃试验瘘管都保持到 1.5 年以上。

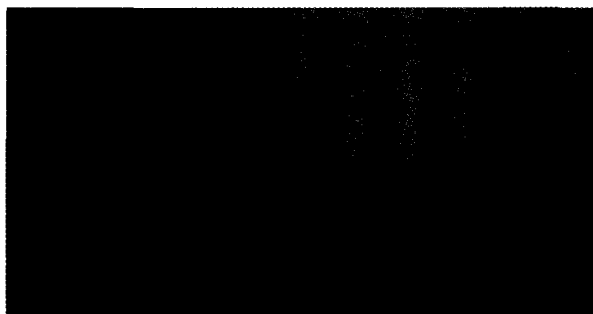


图 2 装置完毕后的外观示意图

Fig.2 The appearance sketch after devices fixed

3 小结与讨论

牦牛体型小,手术操作简便。术后恢复快,护理简单,瘘管安装后 1 周即可进行试验。因瘘管部位的腹部肌肉张力较大,对于常规手术安置方法,若缝合不牢固,容易导致瘘管脱落,引起胃液外流,造成瘘管周围组织溃烂和长期化脓,进而会导致瘘管松动滑脱难以固定,从而改变试验牦牛的瘤胃内环境,影响试验结果。该方法无须缝合固定瘤胃及其创口,也无须荷包缝合安置好的瘘管,只需常规闭合手

术通路,故安装的瘘管结合牢固、不易滑脱、密闭性好,具有创口恢复快、无感染、简洁、实用、可靠等特点,明显优于传统的常规手术安置方法。

安放瘤胃试验瘘管时,皮肤及瘤胃切口一定要尽可能小,使皮肤和瘤胃紧紧箍于瘤胃试验瘘管上,这有助于防止瘤胃液外溢。皮肤切口宜靠近背部,尽量使瘤胃瘘管处于瘤胃的背囊顶部,以避免瘤胃内容物长时间浸泡切口和瘘管,减少瘤胃及腹壁切口术后感染的机会,以促进瘤胃壁、腹膜以及腹肌的愈合。

除个别性烈牦牛补注了全身麻醉药物外,其余皆采用局部麻醉方法,有效降低了手术的危险性,保证了施术动物的安全。

参考文献

- [1] 候振中,徐永发.绵羊人造瘤胃瘘管的手术体会[J].黑龙江畜牧兽医,2001(9):24.
- [2] 曹杰,王春嫩.大口径牛瘤胃瘘管手术新方法[J].畜牧与兽医,2006,38(3):47-48.
- [3] 刘焕奇,闵令江,王光,等.奶牛试验用瘤胃瘘管手术的尝试[J].现代畜牧兽医,2006(7):62.
- [4] 王玲,赵胜军,苏鹏程,等.羊消化道永久性瘘管手术方法的改进[J].宁夏农学院学报,2004,25(3):36-37.
- [5] 赵艳兵,黄海龙,白景煌,等.用双切口法造牛瘤胃永久性实验瘘管[J].中国兽医科技,1999,29(3):31.
- [6] 刘焕奇,邵春兰,刘东明,等.山羊人造瘤胃瘘管术改进的几点体会[J].畜牧与兽医,2005,37(1):43.
- [7] 陈金山,宋百军.狗实验性瘤胃瘘管手术[J].中国兽医杂志,2005,41(5):13-14.
- [8] 王星凌,李兴光,宋恩亮.大口径牛瘤胃瘘管的安装与应用[J].山东农业科学,1999(1):48-49.