

文章编号: 1001-9499 (2006) 04-0004-03

珙桐组织培养研究

罗世家^{1,2}

(1. 华中农业大学园林艺术学院, 湖北 武汉 430070; 2. 湖北民族学院生物科学与技术学院 恩施 445000)

摘要: 分别以 MS、N₆ 和 B₅ 为基本培养基, 添加 NAA 与 6-BA 不同浓度组合于培养基中, 以珙桐的叶片、茎、芽为外植体, 诱导愈伤组织。结果表明: N₆ 培养基的诱导愈伤效果略好于 MS 培养基和 B₅ 培养基, 但效果不显著。同时使用 NAA 和 6-BA 时, 以 NAA 2.0 mg/L 加 6-BA 1.0 mg/L 时效果较好。叶片、茎、芽 3 种外植体以芽诱导愈伤组织效果最明显。

关键词: 珙桐; 外植体; 愈伤组织; 组织培养

中图分类号: S 722.3⁺7, S 792.99

文献标识码: A

珙桐 (*Davidia involucrata*) 又名“水梨子”^[1], 稀有种, 为我国特有的单型属植物。珙桐起源古老, 系第三纪古热带植物区系的孑遗种^[2], 对于研究古植物区系和系统发育具有重要的科学价值。

珙桐叶互生, 集于枝顶, 纸质, 宽卵形, 长 9~15 cm, 宽 7~12 cm, 两面被毛, 叶缘粗锯齿, 边缘有尖锯齿。花杂性, 雄花有雄蕊 1~7 枚, 雌花和两性花有退化花瓣 6~10 片, 子房下位, 6~10 室, 花柱粗壮, 分 6~10 枚, 柱头向外平展。花期 4~5 月。花形似鸽子展翅, 白色的大苞片似鸽子的翅膀, 暗红色的头状花序如鸽子的头部, 绿黄色的柱头像鸽子的喙, 盛花时犹如满树群鸽栖息, 被誉为“中国鸽子树”^[3]。核果肉质, 椭圆形或矩状卵形, 呈紫色, 有黄褐色小斑点。果期 9~10 月。珙桐木材坚硬, 材质好, 可用于雕刻、玩具及美工艺术品^[4]。

珙桐一般生长在海拔 1 250~2 200 m 的湿润、多雾的常绿阔叶混交林中, 喜凉润气候及疏松肥沃的土壤, 在陕西、湖北、湖南、四川、贵州、云南等地有少量分布。

由于森林被砍伐破坏及挖掘野生苗栽植, 珙桐的分布正日益缩小, 濒临灭绝。目前, 生产上主要是利用珙桐的种子进行繁殖, 但由于珙桐种子表皮坚硬, 果皮和种子子叶中都含有抑制物质^[5], 且后熟期长, 有隔年发芽特性, 甚至 3 至 4 年才发芽, 故大部分种子未到发芽时间已腐烂,

发芽率极低, 甚至基本不发芽, 为播种繁殖带来极大困难。采用组培技术进行繁殖很有现实意义^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料

材料取自湖北民族学院生物科学与技术学院苗圃和恩施市百户湾林场。剪取侧芽尚未萌发的枝条和具有较多嫩叶的枝条, 经清洗、修剪后, 插入水瓶中, 在室温条件下水培。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制

实验选取的培养基是以 MS、N₆、B₅ 为基本培养基, 附加生长素 (NAA) 和细胞分裂素 (6-BA), 以叶片、茎、芽为外植体, 采用三因素三水平正交设计, 6-BA (因素 I) 三水平分别为 0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L; 选用的材料 (因素 II) 三水平分别为: 叶片、茎、芽; 所用培养基 (因素 III) 三水平分别为: MS 培养基、N₆ 培养基、B₅ 培养基。培养基中含 NAA 2.0 mg/L^[11], 蔗糖 3%, 琼脂 0.8%, pH 值调节到 5.6~5.8 之间, 配比成 9 个不同组合, 以 100 ml 三角瓶为培养容器, 121~126℃ 热压灭菌 20~25 min。

1.2.2 外植体的灭菌和接种

将叶片、茎、芽用 75% 的酒精浸泡消毒 30 s, 用无菌水冲洗干净, 取 10% 的 84 消毒液对外植

体消毒 15 min; 然后用无菌水冲洗 4~5 遍。将消毒后的叶片切成小块, 每瓶接种 3 块; 同样, 将消毒后的茎切成小段, 每瓶接种 3 段; 将消毒后的芽去除芽鳞, 每瓶接种 1 个。每种材料接种 60 瓶。

1.2.3 培养条件

将接种后的材料置于培养室内培养, 温度控制在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 每日光照 12h, 每 3 天观察 1 次, 如发现感染, 及时清除或转接。半月后, 开始形成愈伤组织, 1 个月后进行统计。

2 结果与分析

培养 7 天后, 对每种材料的成活效果进行统计分析 (表 1)。

表 1 3 种外植体成活效果比较

材料	接种数 (个)	死亡率 (%)	成活率 (%)
叶片	140	87.3	12.7
芽	140	25	75
茎	140	52.2	47.8

由表 1 可知, 采用相同的消毒方法和相同的生长素含量, 叶片、茎、芽的生长情况存在明显的差异: 芽的存活率最高, 可达 75%; 叶片的最低, 仅有 12.7%, 死亡率高达 87.3%; 茎的生长优于叶片, 但较芽为差。这可能与实验所用的消毒方法有关 (表 2)。

表 2 三种培养基对外植体成活率的影响

培养基种类	接种数 (块)	死亡率 (%)	成活率 (%)
MS	140	64.3	35.7
N_6	140	58.5	42.5
B_5	140	67.9	32.1

表 2 显示, 三种培养基相比, N_6 培养基略好于 MS 培养基和 B_5 培养基, 但差异性不明显。

本次实验是将各种组合的外植体的愈伤组织形成率加以统计分析, 得出愈伤形成百分率, 然后再对结果进行不考虑交互作用的方差分析和比较, 从中选出最佳组合; 在 $\alpha = 0.01$ 与 $\alpha = 0.05$ 显著水平上进行 F 检验, 求出各个组合之间的差异显著性。

愈伤形成率 = (愈伤组织形成块数/原培养外植体数) $\times 100\%$

实验统计结果如表 3。

表 3 正交实验结果

编号	6-BA (mg/L)	材料	培养基	愈伤组织形成率 (%)	反正弦变换
1	0.5	叶	MS	15.00	22.79
2	0.5	茎	N_6	48.33	44.04
3	0.5	芽	B_5	65.00	53.73
4	1.0	叶	N_6	10.00	18.34
5	1.0	茎	B_5	40.00	39.23
6	1.0	芽	MS	85.00	67.21
7	1.5	叶	B_5	13.34	21.42
8	1.5	茎	MS	55.00	47.87
9	1.5	芽	N_6	75.00	60.00

$$T_0 = 120.56 T_{\text{叶}} = 62.55 T_{\text{MS}} = 137.87 T_1 = 122.02$$

$$T_1 = 124.78 T_{\text{茎}} = 131.14 T_{\text{N}_6} = 122.38 T_2 = 132.67$$

$$T_2 = 129.29 T_{\text{芽}} = 180.94 T_{\text{B}_5} = 114.38 T_3 = 119.94$$

$$\sum_{i=1}^9 x_i = 374.63$$

$$C = (\sum x_i)^2 = 15573.38$$

注: T_0 、 T_1 、 T_2 、 $T_{\text{叶}}$ 、 $T_{\text{茎}}$ 、 $T_{\text{芽}}$ 、 T_{MS} 、 T_{N_6} 、 T_{B_5} 分别为同一因素相同浓度或相同材料的反正弦变换值之和, T_1 、 T_2 、 T_3 表示相同随机误差的反正弦变换值之和

表 4 方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	均方比	临界值
6-BA	2	33.51	16.76	0.61	$F_{0.01}(2, 2) = 99$
材料	2	2376.45	1188.23	43.29*	
培养基	2	115.89	57.95	2.11	$F_{0.05}(2, 2) = 19$
随机误差	2	51.89	27.45		

愈伤组织培养采用正交实验设计三因素三水平方案, 将愈伤组织形成率进行反正弦转换得到相对应的数据, 并对此进行方差分析。其中因素 I (6-BA) 与因素 III 培养基 (MS、 N_6 、 B_5) 差异都不显著, 因素 II 材料 (叶片、茎、芽) 呈显著性差异。这说明, 不同的材料对诱导愈伤组织的形成有较大的影响。由于因素 II 具有显著性差异, 故有必要对三因素各个水平间进行多重比较。多重比较均采用 q 检验: 当 $r = 3$ 时, $|T_{\text{芽}} - T_{\text{叶}}| > W_r$, 其中 $|T_{\text{芽}} - T_{\text{叶}}|$ 为芽与叶片 3 次重复的平均差的绝对值, 而 W_r 可以由公式 $W_r = q(r, f_2)(MS_2/m)^{1/2}$ 求得, r 表示各个样本均值按从小到大排列后, 所欲比较两个组相隔的距离。q (r, f_2) 值为显著水平 $\alpha = 0.05$ 时所查 q 表所得。多重比较结果表明, 因素 II (材料) 之间, 芽与叶片的差异性显著, 茎与叶片和芽之间

的差异性不显著; 6-BA 和培养基各水平之间差异性均不显著 (表 4)。

综上所述, 因素 I 即 6-BA 浓度的大小对珙桐诱导愈伤组织的影响小; 因素 III 培养基 (MS、N₆、B₅), 对珙桐愈伤组织的诱导率影响较小, 因素 II 材料 (叶片、茎、芽) 对其影响较大。从实验观察所得的数据看, 6-BA 1 mg/L + N₆ 培养基 + 芽组合为本次实验所用的 9 组组合中的最佳组合, 愈伤诱导率达到了 85%。由于材料对结果影响较大, 故 6-BA 1 mg/L + MS 培养基 + 芽和 6-BA 1 mg/L + B₅ 培养基的诱导效果也较好, 愈伤组织的形成率都达到了 60% 以上。各处理的多重比较也证实了这个结论。

参 考 文 献

- [1] 武汉市园林技工学校. 树木学 [M]. 北京: 科技出版社, 2001
- [2] 傅立国. 中国植物红皮书 (第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 1991
- [3] 张家勋. 中国的鸽子树——珙桐 [J]. 植物杂志, 1998, 1: 1~7
- [4] 祁承经、朱政德、李秉滔. 树木学 (南方本) [M]. 北京: 中国林业出版社, 1994
- [5] 潘瑞炽. 植物生理学 (第四版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001
- [6] 李浚明. 植物组织培养教程 (第二版) [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001
- [7] 毕世荣, 何立明, 孔凡伦等. 珙桐组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1983, 4: 43~44
- [8] 谈锋, 刘玉成. 缙云山五种珍稀濒危植物的组织培养 [J]. 重庆林业科技, 1993, 36: 11~15
- [9] 罗世家, 周光来, 王建明等. 珙桐芽体组织培养研究 [J]. 湖北民族学院学报, 2003, 21 (4): 11~13
- [10] 夏哈, 张健, 尚旭岚等. 珙桐初代培养研究 [J]. 四川农业大学, 2003, 21 (4): 356~358
- [11] 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, 1998
- [12] 赵选民, 徐伟, 师义民等. 数理统计 (第 2 版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [13] 盖钧镒. 试验设计方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997

第 1 作者简介: 罗世家 (1966-), 男, 副教授, 主要研究方向为植物资源。发表论文 20 余篇。

收稿日期: 2006-03-07

Study on Tissue Culture of *Davialia involucrata*

LUO Shijia

(Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000)

Abstract Regarded MS medium, N₆ medium and B₅ medium as the basic mediums. The blade, stem, bud of the dove tree were used as explant. the material was disinfected with 0.1% HgCl₂, add different density of 6-BA at the nine mediums. The result shows that the bud is the best explant in three of bud, stem and blade. N₆ medium is little better than B₅ and M₅ medium in induce callus, but the result is not remarkable. The best combination of culture medium to inducement callus in 6-BA 1 mg/L + N₆ medium + bud.

Key words *Davidis involucrata*; Explant; Callus; Tissue culture