

珙桐芽体组织培养研究

张水成, 白振海, 张世卿 (黄淮学院农林科学系, 河南驻马店 463000)

摘要 采用基本培养基、附加 BA、附加 IBA 三因素三种浓度正交设计实验, 研究了以珙桐芽作为外植体诱导其顶芽发育的过程和初代培养中愈伤组织及变异的表现。结果显示, 3 个因素处理下珙桐顶芽的启动率分别为 14.3%、38.1%、52.4%。培养基 1/2MS + BA 1.5 mg/L + IBA 1 mg/L 的组合效果最好, 可显著提高芽的再生率。诱导出的愈伤组织种类较多, 对上部芽的生长影响不同, 表明新生出叶片变异程度与激素浓度相关。

关键词 珙桐; 芽体; 愈伤组织; 变异

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)13-03850-02

Research on Tissue Culture of *Davidia involucrate* Baill Bud

ZHANG Shui-cheng et al (Department of Agriculture and Forestry Science, Huanghuai College, Zhumadian, Henan 463000)

Abstract In tissue culture with *Davidia involucrate* Baill bud as explant, the design experiments with 3 levels and 3 factors of basic medium, adding BA and IBA were used to study the development process of top buds induced by explant and callus and variation representation in first generation culture. Results indicated that the medium of 1/2 MS + BA 1.5 mg/L + IBA 1 mg/L got best effect in notably increasing the regeneration rate of bud. It could induce more kinds of callus and had different effect on the growth of upper buds, suggesting that the variation degree of new leaf had a relation to hormone concentration.

Key words *Davidia involucrate* Baill; Bud; Callus; Variation

珙桐(*Davidia involucrate* Baill), 为珙桐科(蓝果树科), 珙桐属落叶乔木, 是我国特有的珍稀、濒危树种, 属国家一级保护植物。珙桐起源古老, 是第三纪古热带植物的孑遗种^[1], 在生态学、地质学和植物资源学方面都有重要价值。同时, 由于珙桐棕红色头状花序下具有 2 枚大型白色苞片, 形似白鸽, 开花时犹如满树群鸽栖息, 故有“中国鸽子树”之称^[2], 是世界上著名的观赏树种。但由于珙桐繁殖和引种困难, 所以至今未成为广泛应用的园林绿化树种。自 20 世纪 80 年代以来, 国内外学者对珙桐的组织培养技术进行了初步研究^[3-5]。为此, 笔者开展了珙桐芽体组织培养方面的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试珙桐芽体采自河南省驻马店市林业科学研究所苗圃园, 树龄 24 年。

1.2 培养条件的筛选 培养条件设计见表 1。

表 1 培养条件的设计

编号	白天		黑夜	
	时间/h	温度/℃	时间/h	温度/℃
1	12	22	12	20
2	13	24	11	22
3	14	26	10	24

注: 相对湿度为 65%~75%; 光照强度为 1 500~2 000 lx。

1.3 培养基 采用 3 因素 3 水平正交设计, 基本培养基 3 个水平分别为 1/2MS、1/4MS、H; 附加细胞分裂素 BA 3 个水平分别为 0.5、1.5、2.5 mg/L; 生长素 IBA 3 个水平分别为 1、2、3 mg/L。其中, 含蔗糖 2.5%, 琼脂 0.8%, pH 值 6.0~6.4, 以试管或 100 ml 三角瓶为培养容器, 121~123℃高压灭菌 20~25 min。

1.4 外植体的制备 珙桐芽体用毛笔沾肥皂水刷洗干净, 用洗衣粉浸泡 2 min, 再在流水下冲洗 1 h 后晾干置取超净工作台。用 70% 酒精消毒 7~8 s, 无菌水冲洗 2 次, 再在 0.01% 升汞中浸泡 5~6 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 小心剥去鳞片,

留 2~3 片绒状未展开叶, 去除与茎连接处的木质部, 接入培养基。

2 结果与分析

2.1 珙桐启动培养

2.1.1 珙桐启动培养中培养条件的筛选。 珙桐芽接种后 20 d 左右, 可观察到叶片展开, 但顶芽并未发育, 茎也未伸长, 只是顶芽中原来未发育成熟的叶片遇适宜的条件吸收营养后单纯的生长。若条件不适宜顶芽的萌发, 待叶片长到一定的程度便停止生长, 甚至顶芽坏死。所以, 叶片的展开并不意味着珙桐芽的启动。只有顶芽发育, 长出新叶, 才是珙桐芽启动的标志。珙桐芽接种 1 个月后, 3 个培养条件下珙桐顶芽的启动率分别为 14.3%、38.1%、52.4%, 说明 3 号培养条件下珙桐叶片展开最早、芽萌发最快。这说明 3 号培养条件较其他 2 种培养条件明显适于珙桐的启动培养, 故应以培养条件 3 进行启动培养。

2.1.2 珙桐启动培养中培养基的筛选。 将初代培养的启动率进行反正弦转换得到相应的数据, 并对此进行方差分析。表 2 表明, 各重复间不存在差异, 说明该试验结果具有较好的重现性。其中, 基本培养基差异在 0.01 水平显著, 细胞分裂素 BA 差异在 0.05 水平显著, 生长素 IBA 不存在差异。这说明基本培养基对珙桐初代培养的启动率有较大的影响。多重比较结果表明, 基本培养基水平间, H 与 1/4MS 不存在差异, 1/2MS 与 1/4MS、H 差异在 0.01 水平显著; 细胞分裂素 BA 水平间, 0.5 与 2.5 mg/L 浓度间不存在差异, 1.5 与 2.5、0.5 mg/L 浓度间差异在 0.05 水平显著; 生长素 IBA 各水平之间均不存在差异。所以, 基本培养基对珙桐初代培养的芽的诱导率影响极大, 细胞分裂素 BA 对珙桐初代培养中芽的诱导影响也较大, 生长素 IBA 对其影响较小。

表 2 表明, 处理②的效果在 0.05 水平显著优于其他处理, 在 0.01 水平显著优于处理④~⑨; 处理①、③之间不存在差异; 处理④、⑤、⑦、⑧、⑨之间不存在差异; 处理①、③效果在 0.05 水平显著优于处理④~⑨; 处理④、⑤、⑦、⑧、⑨效果在 0.05 水平显著优于处理⑥。研究表明, 1/2MS + BA 1.5

基金项目 河南省教育厅自然科学研究项目(2003220095)。

作者简介 张水成(1965-), 男, 河南上蔡人, 硕士, 副教授, 从事植物生理学方面的教学与科研工作。

收稿日期 2007-02-02

mg/L + IBA 2 mg/L 处理的效果最好,芽的诱导率高达 95.2%。由于基本培养基对结果影响极大,所以 1/2MS + BA 0.5 mg/L + IBA 1 mg/L 和 1/2MS + BA 2.5 mg/L + IBA 3 mg/L 的效果也较好,芽的诱导率均达到 75% 以上。

2.2 初代培养中愈伤组织的发生及形态 珙桐芽接种在初代培养基上约 20 d 后,随着叶片的展开,芽切口与培养基接触的部位普遍发生愈伤组织。愈伤组织主要是由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及未剥净的芽苞片。发生愈伤组织的颜色及形态结构因初代培养基的不同而有明显的差别。表 2 表明,颜色浅的愈伤组织质地较松软,突起较明显,其中褐色愈伤组织的质地最为松软,增长速度也较快,其上部芽生长也较快。在生长约 10 d 后,愈伤组织常呈近似球形,只有底部接触培养基,质地变硬,使上部芽吸收营养的难度加大,生长速度下降。乳白色愈伤组织生长速度较慢,同时其上部的芽长势也较慢,硬度

介于其他 2 种愈伤组织之间。黑色愈伤组织质地最为致密,生长最慢。褐色和黑色的愈伤组织生长 20 d 左右,其直径近 10 mm,此时,愈伤组织表面分泌出白色点状物质,与培养基接触的一端逐渐形成一层白色黏液状物质,愈伤组织呈瘤状,生活力下降,在转入新培养基后极易褐化死亡。

2.3 珙桐启动后的变异表现 在珙桐的初代培养中,变异表现主要体现在新发出叶片的形状、颜色、绒毛的有无、叶片厚度、叶柄长度等方面。在珙桐芽接入启动培养基后的 20 d 内,主要是原芽内未发育成熟的小叶充分生长。该类型的叶片保持了珙桐叶的特性,绿色,广卵圆形,基部心形,叶背面具绒毛。20 d 后随着顶芽的启动,不同启动培养基上新发出叶片差异明显,颜色从红色到深绿色,叶形从披针形、长卵圆形到广卵圆形不等,叶缘锯齿大小不等,有的甚至深裂。在相同培养基中的继代过程中,其变异特征基本不变。这说明其变异性状基本稳定,且受培养基成分的影响。

表 2 珙桐初代培养启动率、愈伤组织及新生叶片的表现								
处理	基本培养基	激素//mg/L		珙桐芽启动率//%	显著性检验		基部愈伤组织颜色及形态	新生叶片的形状及颜色
		BA	IBA		0.05	0.01		
①	1/2MS	0.5	1	76.2	b	AB	乳白到褐色,松软,突起不明显	广卵形,绿色,小且具绒毛
②	1/2MS	1.5	2	95.2	a	A	褐色,松软,表面有突起	长卵圆形,叶缘红色,无绒毛
③	1/2MS	2.5	3	81.0	b	AB	黑色,致密,表面无突起	披针形叶缘深裂,红色,无绒毛
④	1/4MS	0.5	2	33.3	c	B	褐色到黑色,松软,突起不明显	长卵圆形,叶缘红色,无绒毛
⑤	1/4MS	1.5	3	42.9	c	B	褐色,松软,表面有突起	长卵圆形,红色,无绒毛
⑥	1/4MS	2.5	1	19.0	d	B	黑色,致密,表面无突起	卵圆形,绿色,具绒毛
⑦	H	0.5	3	42.9	c	B	黑色,致密,表面无突起	披针形,红色,无绒毛
⑧	H	1.5	1	47.6	c	B	乳白,松软,表面瘤状小突起	长卵圆形,绿色,无绒毛
⑨	H	2.5	2	33.3	c	B	黑色,致密,表面突起不明显	长卵圆形,叶缘深裂红色,无绒毛

试验表明,叶片变异的方向具有一定的规律性。随着叶形逐渐变得狭长,叶缘锯齿逐渐增大,叶色由绿色向红色转变,叶柄增长,叶背面绒毛逐渐消失,同时叶片变薄。当变异的叶片薄如纸质时,往往不能完成正常叶片进行光合作用的功能,接触培养基表面后从叶梢逐渐变黑坏死,一直到叶柄基部。

表 2 表明,随着培养基中生长素 IBA 含量的升高,叶形逐渐变得狭长,由广卵圆形向长卵圆形、披针形变化,叶片其他变异特征也随之变化,其中处理③、⑤、⑦、⑨的变异程度较大。其共同特点是 IBA 浓度较高,同时其激素总含量也较高。而变异的程度受基本培养基的影响似乎不大,这恰与芽启动率的影响因素相反。

3 讨论

有学者曾以 N_6 作为基本培养基进行珙桐的初代培养^[3]。该试验采用了常用的 MS 培养基,并减少其无机盐浓度,也达到了较好的效果。这符合多数木本植物在诱导阶段中采用较低无机盐,而在继代增殖阶段采用较高无机盐浓度的一般规律。在植物组织培养中,常用细胞分裂素促进植物的再生。该试验采用 BA、IBA 作为诱导珙桐芽再生的激素,并证明 BA 对其诱导起到重要作用。这与大多数组织培养的试验结果吻合。

试验发现,在芽再生的同时,其外植体的下部诱导出不同的愈伤组织,它们的颜色、质地各不相同。这与启动培养基的成分有很大关系,同时受到培养环境条件、上部外植体长势等多方面因素的影响,反过来也影响上部芽的生长。一

般认为,质地松软的愈伤组织分化率高。该试验还表明,这种愈伤组织上部的芽长势也较好。颜色浅的愈伤组织一般易于增殖,但提高愈伤组织的胚性和分化能力的措施还有待进一步研究。

变异问题在快速繁殖中普遍存在,有的变异率达到 40%~60%。有些变异是遗传的,而有些变异是表型的、可逆的。对组培快繁中遗传变异的控制是提高试管苗质量的关键^[6]。利用细胞和组织培养中常发生变异的原理,可以进行突变的诱发和离体选择。大量试验表明,从细胞培养获得的遗传变异已成为选择有用变异的一个新的重要来源。这些变异可以通过把某种选择因素结合到培养基或环境中进行筛选,分离一定的目标性状而进行专化性选择,提高突变体选择效率^[6]。有研究表明,含有多种激素时,诱变率要大于单一激素,而 2,4-D 的复合激素又大于单一激素。激素浓度过高也容易诱发变异,这可能与激素物质抑制过氧化氢酶、过氧化物酶的活性或抑制糖酵解过程有关^[7]。该试验中新诱导出的珙桐叶片发生了很大的变异。培养基中激素的浓度,特别是 IBA 的浓度对叶片的变异程度有重要影响。对于一种观赏树种来说,要有意识地保护和改进有用的变异,从而为育种工作提供依据。

参考文献

[1] 傅立国.中国植物红皮书(第一册)[M].北京:科学出版社,1991:474-475.
[2] 张家勋.中国的鸽子树——珙桐[J].植物杂志,1998:1:1-7.
[3] 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,

片整夜保持湿润,延长了病菌侵入叶片的时间,从而加重病害发生。

5 注意合理施肥

合理施肥是保证冷季型草坪草正常生长的先决条件。适当的磷、钾比与适宜的氮水平有利于提高冷季型草坪草的耐热性。在夏天炎热高温的环境下,冷季型草坪草生长缓慢,这时用肥切不可过高,尤其要少施氮肥。如果施氮过量,会使草坪草营养生长旺盛,生长速率加快,群体密度加大,导致植株体内发生一些不良生理变化,如细胞壁变薄、组织软而多汁、养分贮存减少,使草坪草的耐热性、耐旱性和抗病力下降,甚至会使草坪毁于一旦。在夏天,磷钾肥配施可以提高草坪的抗热性。据报道,施钾肥可以提高草地早熟禾“午夜”和“男爵”品种的抗热性能(使其半致死温度提高 6℃左右)^[5]。另外,应注意春秋两季施肥,使草坪在气候适宜生长时有充足的养分供应,并于夏季来临前已形成致密、健康的草坪,从而有利于提高冷季型草坪草的越冬能力。

6 施用植物生长调节剂

研究认为,施用植物生长调节剂可以抑制冷季型草坪草的生长,促进其地下生物量积累,提高草坪质量,增加叶片的叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白质含量,提高叶片的过氧化物酶活性,降低叶片的丙二醛含量,保持膜系统稳定,从而较为系统地提高冷季型草坪草的抗旱性和抗热性,使草坪安全越冬。如,施用多效唑、B9、CCC 等可有效减缓干旱和高温带来的危害^[6],施用 ABA 和 KT 对提高草坪抗热性也有明显效果^[7]。同时,许多植物生长抑制剂还能有效抑制草坪病虫害的发生。如,多效唑能降低匍匐剪股颖(*Agrostis stolonifera* L.)钱斑病的发生率,还能减少因施肥过多而产生的锈病、叶斑病等的发病率^[6];水杨酸可增强高羊茅对弯孢霉叶斑病的抗性^[8]。另外,叶面喷施 CaCl_2 能提高 CAT、GR 和 APX 活性,减轻膜脂过氧化程度,从而减轻热胁迫对高羊茅和草地早熟禾的伤害^[9]。

施用植物生长调节剂时要注意 2 点:①选择合适的药剂类型。不同类型的草坪草对植物生长调节剂有不同的反应;②控制好施用浓度。如,多效唑的叶面喷施浓度以 200 mg/kg 为宜,500 mg/kg 以上就会发生药害^[10]。

7 做好病虫害防治

冷季型草坪草的主要病害有锈病、腐霉枯萎病、褐斑病、弯孢霉叶枯病和纹枯病等。梅雨季节是冷季型草坪草病害的高发期。从 4 月份开始,就要认真做好真菌性病害的预防工作,每隔 7~10 d 喷施 1 次广谱杀菌剂,如用 50% 代森锰锌 500~800 倍液或 50% 多菌灵可湿性粉剂 1 000~1 500 倍液进行叶面喷施,或用 70% 甲基托布津 800~1 000 倍液叶面喷施,也可选用百菌清、代锌铵、福美双、甲霜灵、井冈霉素等进行防治。在夏季高温期,还要注意防治卷叶蛾、蝗虫、小地老虎等虫害,可用 80% 敌敌畏 1 500~2 000 倍液或 90% 敌百虫

1 500 倍液、敌杀死 5 000 倍液进行喷杀。在进行药物防治的同时,还须及时刈割草坪、清除枯草层,改善草坪透气性,阻止病原菌的发生和扩展,减少病害发生机会。

8 合理修剪

适当的刈割可提高冷季型草坪草的耐热性^[11]。修剪时间应根据天气、病虫害发生情况等确定,一般以晴天、病虫害未发生或虽发生但已用药时修剪为佳。夏剪时间越早越好,避免修剪后马上出现高温高湿天气。修剪时,保证剪草机刀片锋利,以免叶片受伤失水枯黄或遭病菌侵袭。不同的修剪高度与修剪频率对草坪生长状况与草坪质量有直接影响。高频率修剪会使草坪草的生长态势被频繁打破,其光合面积和光合产物积累减少,从而导致其对环境胁迫的抗性下降。因此,适当延长修剪间隔,可使草坪草有较充分的生长时间,以增加草坪草的物质积累,增强其抗逆性。在修剪频率较低时,适当增加修剪高度可以减轻修剪对草坪草的伤害。夏季对冷季型草坪的修剪宜次数少、留茬高度高,如高羊茅草坪的夏季修剪留茬高度可适当提高到 9 cm 左右,以保持一定的坪内湿度和土壤水分,提高草坪的抗热性^[12]。

9 改善小气候环境

如果在空旷的草坪上忽视对其他植物类群的合理搭配,甚至不栽种任何乔木和灌木,则一旦到了夏天,草坪就易遭受直射光的强烈照射,使其蒸腾作用增强,土壤温度升高,从而使草坪根系受到伤害,致使草坪枯黄。因此,应在草坪周围及草坪区的适当位置配置一些具有观赏价值的乔木和灌木,这样既不影响草坪的景观效应和实用功能,又可起到为草坪遮荫和降低草坪温度的作用,给草坪创造了一个良好的生境,有利于冷季型草坪越冬。

参考文献

- [1] Liu X Z, Huang B R. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass[J]. Crop Sci, 2000, 40: 503-510.
- [2] 黄承前, 胡果生, 彭信海, 等. 冷季型草坪草耐干热性能研究[J]. 湖南农业大学学报, 1998, 24(2): 113-118.
- [3] 马进, 林夏珍, 王小德, 等. 浙江绿地草坪草种混播组合筛选研究[J]. 中国草地, 2003, 25(3): 53-58.
- [4] 周嘉友, 汤承, 卢建森, 等. 草坪过渡带优质草坪建植与管理综合技术研究——1 坪床配方[J]. 草业科学, 1998, 15(5): 44-48.
- [5] 祝美俊, 樊奋成, 王培. 钾肥对草地早熟禾抗热性的影响[J]. 草地学报, 2000, 8(3): 204-208.
- [6] 吴晓玲, 邵生荣, 姚爱兴, 等. 植物生长抑制剂在草坪上的应用研究进展[J]. 草业科学, 2000, 17(2): 34-38.
- [7] 应武, 陈锦新, 张国平. 植物生长调节剂对提高冷季型草坪草抗热性的研究[J]. 草业科学, 2002, 19(9): 55-57.
- [8] 古燕翔, 王代军. 外源诱导物水杨酸对草坪型高羊茅弯孢霉叶斑病抗性影响的研究[J]. 中国草地, 2003, 25(4): 56-60.
- [9] JIANG Y, HUANG B. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses [J]. J Exp Bot, 2001, 52: 341-349.
- [10] 申屠文月, 陈秉初, 张纯大, 等. 多效唑对高羊茅草坪草耐热性的影响[J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 172-174.
- [11] 甘肃草原生态研究所草坪课题组. 运动场草坪建植管理技术的研究与开发[J]. 草业科学, 1992, 9: 52-57.
- [12] 江海东, 曹卫星, 王举斌. 修剪对高羊茅生长及草坪质量的影响[J]. 草业科学, 1998, 15(1): 54-58.

(上接第 3851 页)

4: 43-44.

- [4] 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.
- [5] 周俊辉. 植物快速繁殖中存在的问题与对策[J]. 仲凯农业技术学院学

报, 1999, 12(4): 64-70.

- [6] 李海燕, 张丽娟, 田和平. 细胞和组织培养技术在植物育种中的应用[J]. 天津农林科技, 1999, 10(5): 15-16.
- [7] 曾少玲, 容世清, 梁庆华, 等. 香蕉组织培养中变异的发生与控制的途径[J]. 云南热作科技, 2001, 24(4): 36-37.