

金边瑞香茎段外植体快繁技术研究

李先良

(荆楚理工学院 生物工程学院, 湖北 荆门 448000)

[摘要] 以金边瑞香茎段为外植体,探讨了不同培养基对愈伤组织诱导、愈伤组织分化的影响。结果表明:1)金边瑞香茎段愈伤组织诱导以培养基 MS+2,4-D $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 效果最佳;2)愈伤组织增殖宜采用培养基 MS+2,4-D $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,并且增殖培养不宜超过1代;3)愈伤组织分化成苗宜采用培养基 1/2MS+6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对愈伤组织进行脱水处理能提高分化率。

[关键词] 金边瑞香;茎段;愈伤组织;成苗

[中图分类号] Q945.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-4657(2008)03-0022-05

金边瑞香(*Daphne odora* var. *marginata*)属瑞香科金边瑞香属植物,其叶缘金黄色,花紫白色,香味浓郁,春节前后开放,花期可达3个月,具有较高的观赏价值。此外,金边瑞香的根、茎、叶和花可入药,具有清热解毒、消炎止痛及祛瘀散结之功效。从其花和叶可提炼的瑞香甙、瑞香油是美容化妆品的理想原料^[1]。目前生产上通常采用扦插的方法繁殖金边瑞香,但这种方法成活率不高,据笔者在江西和湖北等地的调查,扦插的成活率还不到20%。通过组织培养的方法,可大幅度提高繁殖系数,降低成本,实现金边瑞香的大规模快繁,满足市场需求。

对金边瑞香快繁的研究主要基于这样一条途径:茎段通过诱导形成芽,然后通过适当的培养形成小植株^[2,3]。本研究希望通过从茎段到愈伤再到小苗这样一条途径,提高金边瑞香的快繁效率。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

供试材料由荆门市金桂园苗木公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选取和接种

取材时间宜在每年5月或10月。取材时,从植株上取下1~2 cm的新发嫩梢,去掉叶片,然后用洗衣粉水浸泡2 min,再用流水冲洗约20 min,然后置于超净工作台准备外植体灭菌,方法如下:75%酒精浸泡约30 s——无菌水冲洗1次——0.1%升汞浸泡10 min——无菌水冲洗5次。外植体灭菌后,取出放入经高压灭菌的带有滤纸的培养皿中晾干,然后将茎段的下端朝下斜插入培养基中,每瓶培养基接3个。

1.2.2 培养程序

1)愈伤组织诱导培养:以金边瑞香茎段为外植体,愈伤组织的诱导采用以下培养基:MS+2,4-D(1.0,2.0,4.0) $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA(0,0.2,0.4) $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;B5+2,4-D(1.0,2.0,4.0) $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA(0,0.2,0.4) $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;各种浓度两两组合成18种培养基,每种培养基接5瓶。所有培养基均加琼脂0.7%,蔗糖3%,维生素C $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值调到5.8。

[收稿日期] 2007-11-04

[项目来源] 荆楚理工学院科学研究计划项目(项目编号:2005XYZ05)。

[作者简介] 李先良(1976-),男,湖北武汉人,荆楚理工学院讲师,硕士。研究方向:植物细胞工程。E-mail:libusher@sina.com。

2)愈伤组织增殖培养:愈伤组织诱导出来后,将其中一部分直接接入分化培养基上,将另一部分接入三种培养基 MS + 2,4 - D(1.0,2.0 ,4.0) mg · L⁻¹,经 30 d 增殖培养后,比较增殖愈伤的量,并将一部分愈伤接入分化培养基。将另一部分愈伤组织再次接到培养基 MS + 2,4 - D2.0 mg · L⁻¹上培养,增殖后接入分化培养基,以观察第二次增殖培养是否造成愈伤组织质量下降。

3)愈伤组织成苗培养:将增殖后的愈伤一半直接接入 1/2MS + 6 - BA(1.0,2.0,4.0) mg · L⁻¹ + NAA(0.1,0.2,0.4) mg · L⁻¹ 9 种培养基组合上,另一半放入无菌三角瓶内,然后将三角瓶置于干燥皿中,放置 24 h 后接入以上 9 种培养基中。

4)小苗生根培养:分化成苗后,小苗接入培养基 1/2B5 + NAA50 mg · L⁻¹中培养 10 d,然后接入 1/2B5 培养基中,使之生根。

1.2.3 培养条件

所有培养的温度均控制在 25 ℃,愈伤组织的诱导和增殖培养采用暗培养,分化培养和生根培养均采用每天 12 h 的光照。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

不同培养基对愈伤组织诱导影响的结果见表 1。

表 1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

培养基 编号	基本 培养基	激素浓度(mg · L ⁻¹)		外植体数	形成愈伤的 外植体数	诱导率(%)
		2,4 - D	6 - BA			
1	MS	1.0	0	15	1	6.67
2	MS	1.0	0.2	12	0	0
3	MS	1.0	0.4	15	2	13.3
4	MS	2.0	0	15	6	40.0
5	MS	2.0	0.2	15	13	86.7
6	MS	2.0	0.4	12	9	75.0
7	MS	4.0	0	12	6	50.0
8	MS	4.0	0.2	15	6	40.0
9	MS	4.0	0.415	8	53.3	
10	B5	1.0	0	15	0	0
11	B5	1.0	0.2	15	0	0
12	B5	1.0	0.4	15	1	6.67
13	B5	2.0	0	12	8	66.7
14	B5	2.0	0.2	15	12	80.0
15	B5	2.0	0.415	10	66.7	
16	B5	4.0	0.127	58.3		
17	B5	4.0	0.2	12	7	58.3
18	B5	4.0	0.4	15	6	40.0

注:诱导率 = 形成愈伤的外植体数/接种的外植体数 × 100%。污染或褐化的外植体未参与计数。

以幼嫩茎段为外植体接入培养基,外植体很容易褐化,在较高温度下接种和培养这种情况尤为突出^[4]。在本实验中,添加还原剂维生素 C 和尽量缩短接种时间能在一定程度上遏制褐化。外植体接入培养基 15 d 就开始膨大,25 d 开始形成少量的绿色愈伤组织,30 d 后不再有形成愈伤的外植体出现,这时进行结果统计。从表 1 可看出,培养基的基本成分对诱导率影响不大,但总体上 MS 培养基稍优于 B5 培养基。激素的浓度和组合对愈伤的诱导表现出较大的影响,当 2,4-D 从 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导率表现出较大幅度的增加,而 2,4-D 从 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导率出现一定幅度下降。添加一定浓度的 6-BA 对诱导率表现一定促进作用。第 5 号培养基的诱导率较高,是愈伤诱导较适合的培养基。诱导形成的愈伤见图 1。

2.2 不同培养基及继代代数为愈伤组织增殖的影响

不同培养基对愈伤组织增殖影响的结果见表 2。

表 2 不同培养基对愈伤组织增殖的影响

培养基 编号	2,4-D 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接入的愈伤 重量(g)	培养后的愈伤 重量(g)	增殖率 (%)	增殖后愈 伤的质量
1	1.0	0.56	0.79	41.1	+++
2	2.0	0.52	0.95	82.7	+++
3	4.0	0.50	0.96	92.0	+

注:培养基的基本成分是 MS。增殖率 = (增殖后的愈伤重量 - 接入的愈伤组织重量) / 接入的愈伤重量 $\times 100\%$, “+++”代表愈伤组织质地松散,翠绿,从外观看质量较好,“+”代表愈伤质地硬,含水量较多,质量较差。

从表 2 可看出,随着 2,4-D 浓度的增加,愈伤的增殖率也随之增加,但质量也随之下落,从两方面考虑,2,4-D 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 较合适。

从快繁效率考虑,一般愈伤增殖越多越好,但在很多植物的组培上已发现,继代增殖培养的代数越多,其愈伤分化的效率就越低。为了解继代培养代数对金边瑞香愈伤分化的影响,将直接诱导出的愈伤、增殖一代的愈伤及增殖两代的愈伤分别接入分化培养基 $1/2\text{MS} + 6\text{-BA} 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分化培养的结果列于表 3。

表 3 继代培养代数对愈伤分化的影响

继代代数为	接种的愈伤块数	分化成苗的愈伤块数	分化率
0	15	12	80.0
1	15	11	73.3
2	15	4	26.7

注:继代代数为 0 表示直接从外植体上诱导出的愈伤。

从表 3 可看出,随着继代代数的提高,愈伤的分化能力表现出下降的趋势。特别是经过两次增殖培养后,愈伤分化率呈现极大的下降。要获得最高的培养效率,需要愈伤尽可能大倍数的增殖,且增殖的愈伤分化能力要尽可能强,在增殖与分化相矛盾的情况下,综合考虑,对诱导出的愈伤进行一次增殖培养是较合适的。

2.3 不同培养基及脱水处理对愈伤组织分化的影响

将增殖后的愈伤一半接到 9 种不同激素配比的培养基,将另一半经干燥处理后接入上述 9 种不同的培养基,培养结果见表 4。从表中可看出,随着 6-BA 浓度由 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升到 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,分化率有较大幅度的提高,当浓度提高到 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,分化率则不再提高,NAA 的加入在一定程度上提高了分化率。比较不同激素组分,组合 $6\text{-BA} 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 表现较好。对水稻愈伤组织进行脱水处理能提高其分化率^[5],这可能是因为脱水处理增加了愈伤组织的胚性,从而有利于其分化。本研究对金边瑞香愈伤进行脱水处理也表现出较好的效果。愈伤分化成苗见图 2。

表4 不同激素配比及干燥处理对愈伤分化的影响

激素浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		愈伤是否经 脱水处理	接种愈伤 块数	分化的愈伤 块数	分化率(%)
6-BA	NAA				
1.0	0	否	15	0	0
1.0	0.1	否	15	0	0
1.0	0.2	否	15	1	6.67
2.0	0	否	15	8	53.3
2.0	0.1	否	15	8	53.3
2.0	0.2	否	15	9	60.0
4.0	0	否	15	9	60.0
4.0	0.1	否	15	8	53.3
4.0	0.2	否	15	8	53.3
1.0	0	是	15	2	13.3
1.0	0.1	是	15	1	6.67
1.0	0.2	是	15	2	13.3
2.0	0	是	15	10	66.7
2.0	0.1	是	15	11	73.3
2.0	0.2	是	15	14	93.3
4.0	0	是	15	10	66.7
4.0	0.1	是	15	9	60.0
4.0	0.2	是	15	8	53.3

注:培养基的基本成分为1/2MS。分化率=分化的愈伤块数/接种的愈伤块数 $\times 100\%$ 。



图1 茎段形成的愈伤



图2 愈伤形成的苗

3 结论

1) 金边瑞香属木本植物,其外植体接到培养基上比较容易容易出现褐化现象,在培养基中加入一些还原性物质,如维生素C,并降低接种时间、湿度和培养温度,能在一定程度上减少褐化。

2) 外植体宜选用较幼嫩茎段,一般都是当年萌发的无木质化的新梢,愈伤诱导宜选用培养基MS + 2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3) 愈伤增殖所用培养基2,4-D浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 综合效果较佳,增殖培养不宜超过1代。

4) 愈伤组织的分化培养最适培养基为1/2MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对愈伤组织进行脱水处理能较大幅度提高分化率。

[参考文献]

- [1] 刘 惠. 金边瑞香生物学特性和栽培要点[J]. 江西园艺, 2003(4): 33 - 35.
- [2] 赵 绮, 周冬法, 周能辉, 等. 金边瑞香离体培养中芽和愈伤组织诱导初步研究[J]. 浙江林业科技, 2003(6): 20 - 24.
- [3] 廖雄平, 李惠荣. 金边瑞香快速的芽增殖和发根[J]. 宁德师专学报, 1994(6): 32 - 36.
- [4] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 71 - 72.
- [5] 杨跃生, 简玉瑜. 脱水处理对水稻组织植株再生的高效调控作用[C]. 农业科学集刊(2集). 北京: 中国农业出版社, 1995: 39 - 46.

Study on the Rapid - propagation Technical System with the Stem in *Daphne Odora* Var. *marginata* as Explants by Tissue Culture

LI Xian - liang

(Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei, 448000, China)

Abstract: These young stems as explants placed on different media formed calli, whose amount then increased by different cultures on different media and for different generations. After that, a part of the propagated calli and the other through dehydration treatment differentiated and form seedlings on different media. The results were as follows:

- 1) The best medium for inducement of calli from the young stems was MS + 2, 4 - D₂. 0 mg · L⁻¹ + 6 - BA 0. 2 mg · L⁻¹.
- 2) It was appropriate for the calli to propagate for one generation and on the media MS + 2, 4 - D₂. 0 mg · L⁻¹.
- 3) The calli through dehydration treatment can form more seedlings on the media 1/2MS + 6 - BA 2. 0 mg · L⁻¹ + NAA 0. 2 mg · L⁻¹.

Key words: *Daphne odora* var. *marginata*; stems; calli; forming seedlings

学院启动专家委员会筹建工作

为充分发挥专家教授在我院教学科研等方面的权威性智囊作用, 增强决策和管理的科学性, 近期, 学院启动了三个专家委员会的筹建工作, 即教学指导委员会、学术委员会和教授委员会。

教学指导委员会是学院行政在教学管理方面的咨询和审议机构, 其主要职能是对学院各项教学管理工作进行宏观评价和指导, 审议有关教学管理制度规定并提出权威性建议和意见。学术委员会是学院最高学术审议、评定与咨询机构, 承担学院科研课题立项、成果鉴定、“产学研”合作、学科孵化等活动的评审、评议、评价以及相关制度建设的职责。教授委员会是学院行政决策的咨询机构, 为学院的重大宏观行政决策提供建议和意见, 是建立“教授治学”新型高校管理模式、加强学院民主管理与自主发展的重要组织形式。

我院刚刚升格为本科院校, 很多方面, 特别是教学和科研工作方面尚缺少本科院校应有的制度规范, 因此, 成立这三个专家委员会, 充分发挥专家在重大决策中的指导作用, 必将对学院制度建设、规范运行、科学评价、民主决策, 实现由专科向本科办学模式转变起到重要推动作用。

(学报编辑部)