

杜敏华,柯 涛,韩雪梅,等. 连香树下胚轴高频离体再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):47-49.

连香树下胚轴高频离体再生体系的建立

杜敏华,柯 涛,韩雪梅,张可可,何雨晴,周 亮

(南阳师范学院生命科学与技术学院,河南南阳 473061)

摘要:以连香树(*Cercidiphyllum japonicum*)下胚轴为外植体进行离体培养,以 MS、1/2MS 和 B5 为基本培养基,附加不同浓度的细胞分裂素(CPPU、6-BA)及生长素(2,4-D)诱导下胚轴直接再生不定芽。结果表明,不定芽未经过愈伤组织而直接产生于下胚轴的表皮或近表皮等表层细胞;不同激素浓度和组合、不同培养基对不定芽的分化有影响;下胚轴的不同部位不定芽的分化能力差异显著。适宜不定芽分化的最佳培养体系为 1/2MS + AgNO₃ 3.5 mg/L + 蔗糖 3.5% + 琼脂 0.5% + 2,4-D 0.4 mg/L + CPPU 1.5 mg/L,最佳外植体为靠近子叶端的下胚轴部分,分化率最高达 89.3%,最高的平均每个外植体再生芽数达到 18.07;生根培养基选用 1/4MS + 蔗糖 4.5% + 琼脂 0.5% + 活性炭 2.5% + DA-6 3.5 mg/L + CSN 2 mg/L,生根率为 83.6%,平均根数 8.2。

关键词:连香树;离体培养;下胚轴;不定芽;植株再生

中图分类号:Q943.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)10-0047-03

连香树(*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc.)为连香树科连香树属原始木本植物^[1]。上白垩纪和第三纪曾广泛分布北半球,第四纪冰川期后分布区急剧缩小,现星散分布于皖、浙、赣、鄂、川、陕、甘、豫及晋东南地区,数量不多,已成为东亚著名孑遗植物之一,对于研究第三纪植物区系起源以及中国与日本植物区系关系等具有很高的科研价值,被定为国家二级重点保护植物^[2-3]。连香树除在用材、食品、医药和化工等领域具有较高利用价值外,还作为彩叶树种被世界各国广泛引种栽培,具有较高的经济价值和观赏价值^[1,4]。连香树雌雄异株,天然更新能力较差,现多为单株分布,结实量少,种子极小,出苗纤细,难以成苗^[5-6],通过植物组培快繁技术,可在短期内获得基因型一致的优质连香树苗,大大加快连香树育苗进程,为珍稀濒危树种连香树种质资源的保存开辟了一条新途径。组织培养繁殖连香树,仅见麦苗苗^[6]等以带腋芽茎段的离体快繁初步研究,但不定芽分化率和生根率偏

低,目前国内外尚未见到以连香树离体下胚轴为外植体而建立的高效再生体系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试连香树种子由河南省内乡宝天曼自然保护区提供。

1.2 方法

1.2.1 连香树下胚轴外植体的获得 在无菌条件下取连香树种子(子叶期),75%乙醇表面消毒 35 s,无菌水冲洗 3~5 次,然后 2%次氯酸钠灭菌 15 min,无菌水冲洗 4~6 次;最后接种到不含激素的 MS 培养基上,当下胚轴长至 3~4 cm 时,将下胚轴切成 3~5 mm 长的小段作为外植体,用于不定芽的诱导。

1.2.2 连香树下胚轴不定芽分化 将下胚轴切成 3~5 mm 长的小段,接种到含不同植物激素浓度及组合的 MS 培养基上(激素配比见表 1),根据相关报道^[7-8]与预试验,确定所有培养基中均附加 3.5 mg/L AgNO₃,3.5%蔗糖、0.5%琼脂粉,pH 值 5.6。培养条件:25℃±2℃、光强为 26 μmol/(m²·s)、光-暗周期为 15 h-9 h。每个处理最少接种 80 个外植体,3 次重复。以培养 5 周后的不定芽分化率和外植体平均再生芽数为考察指标。

收稿日期:2013-03-19

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:0524050006);南阳师范学院 SPCP 项目。

作者简介:杜敏华(1964—),男,河南南阳人,硕士,教授,主要从事植物组织培养及食品生物技术研究。E-mail:duminhua@163.com。

[4] Hayashi K, Kamiya M, Hayashi T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV[J]. *Planta Medica*, 1995, 61(3): 237-241.

[5] 籍秀梅,马丽萍. 鱼腥草的研究进展[J]. 河南职工医学院学报, 2007, 19(1): 91-93.

[6] 宋志军,王潮临,程建祥,等. 鱼腥草、田基黄和丁公藤注射液对大鼠免疫功能的影响[J]. 中草药, 1993, 24(12): 643-644, 648.

[7] 邵 兰,于庆海,黄 晴,等. 合成鱼腥草素对脾切除动物细胞免疫功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(1): 51-54.

[8] 国家卫生部. 关于进一步规范保健食品原料管理的通知[S]. 2002.

[9] 黄世琼,肖礼娥. 药用植物鱼腥草的研究进展[J]. 现代医药卫

生, 2010, 26(19): 2953-2954.

[10] 龚 伟,胡庭兴,官澜波,等. 鱼腥草组织培养研究[J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(1): 60-62.

[11] 袁 艺,李 燕,应 明. 鱼腥草组织培养的研究[J]. 激光生物学报, 2004, 13(6): 414-417.

[12] 傅华英. 鱼腥草愈伤组织的诱导技术[J]. 亚热带农业研究, 2010, 6(4): 225-227.

[13] Chakraborti S, Sinha S, Sinha R K. High-frequency induction of multiple shoots and clonal propagation from rhizomatous nodal segments of *Houttuynia cordata* Thunb. - An ethnomedicinal herb of India[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2006, 42: 394-398.

1.2.3 不同培养基对不定芽分化的影响 以 MS、1/2 MS、B5 为基本培养基,附加成分及培养条件同“1.2”节,所加激素为“1.2”节试验中筛选出的最佳浓度及组合。接种 5 周后统计分化率和外植体平均再生芽数。

1.2.4 不同部位下胚轴的分化能力 为了研究下胚轴不同部位的再生能力,将下胚轴切成 3 部分,靠上部(近子叶端)、中部及下部(靠近胚根端),分别接种在相同条件及成分培养基上,附加成分及培养条件同“1.2”节,所加激素为“1.2”节试验中筛选出的最佳浓度及组合。接种 5 周后统计分化率和外植体平均再生芽数。

1.2.5 再生苗增殖及生根移栽 当不定芽 2~3 cm 时,切下长 1.5 cm 以上的独立不定芽接种在 1/4MS 生根培养基上附加胺鲜酯(DA-6)/吡啶哌啉(CSN)(激素配比见表 4),蔗糖 4.5%、琼脂粉 0.5%、活性炭 2.5%。每个生根处理包含 60 个外植体。35 d 后统计生根情况,记录每个外植体的生根

数,计算生根率。将生根的健壮苗经炼苗后进行移栽。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对比对下胚轴不定芽再生的影响

不同激素组合对连香树下胚轴不定芽的诱导效果有差异(表 1)。与 6-BA 相比,CPPU 对诱导连香树的下胚轴不定芽再生更有效,在含有 CPPU 的培养基上,7~9 d 即可出现绿色可见芽点,以后逐渐增多,而在 6-BA 的培养基上,不定芽出现较晚,在 13d 左右才开始出现芽点。下胚轴接种 3.5 周后在供试培养基上均有不定芽的分化,不同培养基上下胚轴分化频率和外植体平均再生不定芽数不同。含 CPPU 的培养基不定芽分化频率高,分化芽数多,其中在 CPPU 1.5 mg/L 和 2,4-D 0.4 mg/L 相配合的培养基上,下胚轴不定芽再生频率高达 85.6,下胚轴平均再生不定芽数也达到 12.8 个/植,不定芽诱导效果最佳。

表 1 不同浓度配比的 CPPU、6-BA 与 2,4-D 组合对连香树下胚轴不定芽再生的影响

2,4-D (mg/L)	CPPU (mg/L)	不定芽再生率 (%)	外植体平均再生芽数 (个/株)	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	不定芽再生率 (%)	外植体平均再生芽数 (个/株)
0.2	1.0	48.1f	5.6cd	0.1	1.5	15.8f	3.3e
0.2	1.5	56.8e	5.3cd	0.3	2.0	45.8b	3.6e
0.2	2.0	51.2f	4.2e	0.5	2.5	41.3bc	2.8f
0.4	1.0	72.3c	5.1d	0.1	1.5	21.2d	3.4e
0.4	1.5	85.6a	12.8a	0.3	2.0	52.8a	5.7b
0.4	2.0	84.6a	5.3d	0.5	2.5	41.2bc	4.3c
0.6	1.0	69.0c	10.6b	0.1	1.5	22.3d	4.1d
0.6	1.5	79.2b	12.0a	0.3	2.0	52.6a	6.3a
0.6	2.0	62.3d	6.3c	0.5	2.5	39.2c	4.6c

注:同列中数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。表 2~表 4 同。

2.2 培养基种类对下胚轴不定芽形成的影响

在 MS、1/2MS、B5 培养基(植物生长调节激素为 0.4 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L CPPU)上接种外植体的试验结果(表 2),连香树下胚轴在 MS 和 1/2MS 培养基上不定芽分化率没有明显差异,但是其外植体平均不定芽数差异显著。结果说明,在相同的激素种类和激素浓度条件下,培养基的成分及其含量不仅影响不定芽形成率而且影响外植体再生不定芽数。最高的平均每个外植体再生芽 17.63 个,发生在 1/2MS 培养基上,表明 1/2MS 为连香树下胚轴不定芽诱导的较适培养基。

不定芽再生频率以 1/2MS 效果最佳,可能与 NH₄⁺/NO₃⁻ 盐浓度有关。Fasolo 等研究表明,降低 NH₄⁺/NO₃⁻ 的浓度有利于提高木本植物的不定芽再生频率,1/2MS 的 NH₄⁺/NO₃⁻ 浓度为 MS 的 50%,其他条件不变^[9]。

表 2 不同培养基对连香树下胚轴不定芽分化的影响

培养基种类	分化数 (个)	外植体平均不定芽数 (个)
B5	33.5b	8.75c
MS	85.3a	12.3b
1/2 MS	88.5a	17.63a

2.3 下胚轴不同部位的分化能力

接种不同部位的下胚轴均有不定芽产生(表 3),但分化

不定芽能力有所不同,下胚轴形态学上部切段再生能力较强,每外植体分化不定芽数较多,其次为中部切段,下部切段再生能力较差。靠近子叶端的下胚轴(上部)分化率最高,为 89.3%,平均外植体分化不定芽数目为 18.07 个,与其他两位比较,差异达显著水平,与 Nagori 等在番荔枝(*Annona squamosa*)下胚轴再生过程中的研究结果一致^[10]。下胚轴外植体不同部位分化能力的差异可能是下胚轴极性生长造成。

表 3 外植体取材部位对连香树下胚轴不定芽再生的影响

下胚轴部位	分化数 (个)	外植体平均不定芽数 (个)
上部	89.3a	18.07a
中部	80.5b	12.91b
下部	53.5c	7.75c

2.4 DA-6 和 CSN 对连香树再生不定芽生根的影响

当不定芽 2~3 cm 时,切下长 1.5 cm 以上的独立不定芽接种在 1/4MS 生根培养基上附加 DA-6/CSN(激素配比见表 4),蔗糖 4.5%、琼脂粉 0.5%、活性炭 2.5%。从表 4 可以看出,DA-6 和 CSN 对连香树再生不定芽的生根有很大的促进作用,尤其是在 DA-6 和 CSN 联用时,连香树的生根率大大提高。最佳组合为 DA-6 3.5 mg/L + CSN 2 mg/L,最大生根率为 83.6%,平均根数 8.2 条,而且 DA-6/CSN 诱导形成的不定根是直接从不定芽基部的形成层长出。

表 4 不同浓度配比的 DA-6 和 CSN 组合对连香树再生不定芽生根的影响

DA-6 (mg/L)	CSN (mg/L)	生根率 (%)	平均根数 (条)
1.5	0	21.0e	3.2e
2.5	0	61.7c	3.7e
3.5	0	70.3bc	7.2b
4.5	0	57.1cd	6.1c
5.5	0	55.6cd	5.3d
3.5	1	70.2bc	6.9b
3.5	2	83.6a	8.2a
3.5	3	75.8b	5.8c
3.5	4	39.5d	4.9d

3 讨论

以连香树下胚轴为试材,采用 6-BA 与 2,4-D、CPPU 与 2,4-D 2 种不同类型植物生长调节剂组合,研究连香树下胚轴不定芽发生情况,建立高效的连香树下胚轴离体培养再生体系。CPPU 是苯基脲类细胞分裂素,是新型植物生长调节剂,具有嘌呤型细胞分裂素更强的细胞分裂活性,并具有良好的促进花芽分化、保花、保果、使果实膨大和诱导单性结实及延缓衰老等方面的作用^[11],应用于香树科连香树属植物的组培中还未见相关报道。本试验采用 6-BA 和 CPPU 分别于 2,4-D 组合,比较了 2 种细胞分裂素对连香树下胚轴再生作用上的差异,试验结果,CPPU 的作用效果要比 6-BA 好,其中在 CPPU 1.5 mg/L 和 2,4-D 0.4 mg/L 配合的培养基上,以靠近子叶端的下胚轴部分为外植体,分化率最高达 89.3%,最高的平均每个外植体再生芽数达到 18.07 个,不定芽诱导效果最佳,明显高于麦苗苗等带腋芽茎段的离体快繁初步研究^[6]。2,4-D 等生长素在组织培养中主要被用于诱导刺激细胞的分裂和根的分化^[12-15],对培养物的形态建成起着重要作用,细胞分裂素和生长素的比值大可促进不定芽的形成^[16]。

在连香树下胚轴不定芽再生中,极性现象普遍存在。造成极性现象的原因之一是植物组织中某些化学物质的存在表现出梯度^[17]。连香树下胚轴在进行不定芽分化时,表现出明显的极性现象。下胚轴的上部切段不定芽再生能力强,而中部和下部切段再生能力弱。植物生长点集聚着大量的内源激素,有利于细胞的生长和分化。连香树下胚轴上部切段由于靠近茎尖生长点,能获得较多的有利于分化的物质,分化能力强;中部和下部切段由于缺少分化物质,不定芽再生受到抑制。

在预备试验中,发现 IBA 处理幼苗基部形成大量的愈伤组织,在愈伤组织表面分化形成一些不定根,生根率很低,从愈伤组织长出的根与组培苗的主茎维管束联系不紧密且易脱落;NAA 处理的幼苗在基部形成大量的愈伤组织,无不定根的分化。而 DA-6 和 CSN 是 2 种新型植物生长调节物质,两

者对连香树下胚轴离体不定芽生根有很强的促进作用,DA-6/CSN 诱导形成的根是直接从嫩枝的基部长出来。DA-6 可以调节植物体内的生长素、赤霉素、脱落酸、乙烯等活性和合理配比平衡;CSN 可以赋予细胞活性,与植物接触后能迅速渗透到植物体内,增强植株活力,加快植物生根速度,对植物营养生长和生殖生长有促进作用,具有促使植物体生根作用。本试验把这 2 种植物生长调节物质 DA-6 和 CSN 应用到香树科连香树属组织培养,取得了较好的效果。

参考文献:

- [1] 汪传佳,方 腾,洛文坚,等. 珍稀濒危树种繁育技术[M]. 北京:中国农业出版社,2001:142-144.
- [2] 钱啸虎. 连香树[M]//傅立国. 中国植物红皮书——稀有濒危植物:第一册. 北京:科学出版社,1992:212-213.
- [3] 任全进,于金平. 古老稀有植物——连香树[J]. 中国野生植物资源,1998,17(4):37-38.
- [4] Gibbons B. Tree of Britain and Europe[M]. London:Chancer Press, 1995:43.
- [5] 黄绍辉. 几种珍稀树种的引种繁育及生态学研究[D]. 南京:南京林业大学,2004:59.
- [6] 麦苗苗,石大兴,王米力,等. 连香树离体快繁初步研究[J]. 园艺学报,2006,33(1):186-189.
- [7] Barve D M, Lyer R S, Kendurkar S, et al. An efective method for rapid propagation[J]. Indian Journal of Horticulture, 1984, 41 (1/2):1-7.
- [8] Debasis C, Azad M, Datta S K. In vitro propagation of rose cultivars [J]. Indian Journal of Plant Physiology, 2000, 5(2):189-192.
- [9] Fasolo F, Zinnemam R H, Fordham I. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1989, 16:75-86.
- [10] Nagori R, Purohit S D. In vitro plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments [J]. Scientia Horticulturae, 2004, 99:89-98.
- [11] 李 英,喻景权,朱祝军,等. CPPU 对瓠瓜单性结实的诱导作用及对细胞分裂和内源激素水平的影响[J]. 植物生理学报, 2001, 27(2):167-172.
- [12] 张振超,戴忠良,毛忠良,等. 青花菜雄性不育系组培快繁技术研究[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(3):680-681.
- [13] 姜灵敏,徐有明,张冬梅,等. 红刺玫愈伤组织诱导再生体系的建立[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(4):914-916.
- [14] 崔瑞峰,杜 娟,轩 阁. 陆地棉愈伤组织诱导影响因素初探 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8):70-71.
- [15] 周金梅. 欧李芽离体诱导培养技术研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6):97, 110.
- [16] Ibrahim R, Debergh P C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formaiton and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of rose[J]. Scientia Horticulturae, 2001, 88(1):41-57.
- [17] 黄学林,李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控 [M]. 北京:科学出版社,1995:23-25.