

香果树茎段和叶片的组织培养

宿静¹, 汤庚国^{1,①}, 万劲¹, 汤诗杰^{1,2}, 武文婷¹, 李玉萍¹

(1. 南京林业大学, 江苏南京 210037; 2. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014)

摘要: 以香果树 (*Emmenopterys henryi* Oliv.) 实生苗带芽茎段和叶片为外植体进行组织培养。结果表明, 香果树带芽茎段愈伤组织的最适诱导培养基为含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基, 愈伤组织诱导率达 100%; 愈伤组织分化的最适培养基为添加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基; 在含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基上, 叶片诱导不定芽的效果较好, 诱导率可达 80%; 在含有 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基上, 不定芽的增殖系数可达 3~4; 以含有 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 的 1/2MS 培养基为生根培养基, 香果树试管苗生根率达 72.73%。移栽至大田后, 香果树试管苗的成活率达到 30%。

关键词: 香果树; 组织培养; 茎; 叶

中图分类号: S723.1+32; Q943.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2008)01-0071-04

Tissue culture of stem and leaf of *Emmenopterys henryi* SU Jing¹, TANG Geng-guo^{1,①}, WAN Jin¹, TANG Shi-jie^{1,2}, WU Wen-ting¹, LI Yu-ping¹ (1. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(1): 71-74

Abstract: Tissue culture of *Emmenopterys henryi* Oliv. has been investigated using leaf and stem as explants. The results show that MS medium containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA is suitable for inducing callus from stems, the induced rate reaches to 100%. MS medium containing $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT and $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA is the best suitable medium for callus differentiation. On MS medium containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, inducement effect of adventitious shoot from leaf is better and the induced rate reaches to 80%. The perfect medium for adventitious shoot proliferation is the MS medium containing $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA and the proliferation coefficient reaches to 3-4. Rooting rate of *E. henryi* plantlets can reach to 72.73% by using 1/2MS medium containing $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA as rooting medium. Survival rate of *E. henryi* plantlets is about 30% after transplanting to field.

Key words: *Emmenopterys henryi* Oliv.; tissue culture; stem; leaf

香果树 (*Emmenopterys henryi* Oliv.) 隶属于茜草科 (Rubiaceae) 香果树属 (*Emmenopterys* Oliv.), 为单属单种子遗植物^[1], 树姿高大优美, 是珍稀观赏树种之一, 其木材是雕刻、家具和建筑的优质材料^[2]。香果树在植物系统发育过程中具有特殊地位, 为中国特有的古老速生珍贵树种之一, 对植物系统发育和植物地理学研究具有重要价值。目前, 有关香果树群落、遗传多样性及繁育等方面的研究已有一些研究报道^[3-6]。虽然香果树分布较广, 但均零星生长, 未见大面积分布, 资源极少。由于香果树母树在光照不足的密林中难以开花结实, 且具有典型的间歇性结实特性, 间隔期长达 2~4 a, 因此, 香果树更

新所需的种子来源有限, 幼苗竞争能力较弱, 天然更新受阻。开展香果树无性繁殖技术研究, 提高其繁殖系数, 对于香果树资源保存和扩大栽培及利用具有极其重要的意义。作者以香果树的带芽茎段和叶片作为外植体, 探索香果树的组织培养技术, 以期为香果树的保护和种苗繁育提供实验依据。

收稿日期: 2007-06-04

基金项目: 浙江省教育厅中青年教师资助项目(20020259)

作者简介: 宿静(1981—), 女, 山东东营人, 博士研究生, 主要从事植物繁殖技术的研究。

① 通讯作者 E-mail: ggatang@njfu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

以30 d苗龄的香果树实生苗带芽茎段和叶片为外植体,进行组织培养研究。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导和分化 将外植体用流水冲洗6 h,用体积分数75%的乙醇消毒30 s,再用质量体积分数0.1%的 HgCl_2 消毒3 min,无菌水清洗3次,灭菌滤纸吸干表面水分后,将外植体接入分别含有 1.0 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, 1.0 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT和 0.1 、 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS及1/2MS培养基(含蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8)中,置于光照度 1200 lx 、光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 条件下培养,38 d后观察愈伤组织的诱导状况并统计诱导率。

选择生长状态一致的愈伤组织接种到不同的分化培养基(MS和1/2MS培养基,配方同上)中,在上述条件下培养38 d后,观察并统计愈伤组织的分化情况。

1.2.2 叶片不定芽的诱导和增殖 切取叶片上带有中脉的片段($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$),接入分别含 1.0 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, 1.0 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT和 0.1 、 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS及1/2MS培养基(含蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8)中,置于光照度 1200 lx 、光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 条件下培养,30 d后观察并统计不定芽的分化情况。

将培养30 d后生长一致的不定芽接种到不定芽增殖培养基(MS培养基,配方同上,分别添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA)中,在上述条件下培养30 d后,统计各培养基中不定芽的增殖情况。

1.2.3 根的诱导 挑选生长状况一致、高 $3 \sim 4 \text{ cm}$ 的无根试管苗接种到生根培养基上,生根培养基为1/2MS培养基,含蔗糖 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8,分别添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 1.0 或 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。置于光照度 1200 lx 、光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 条件下培养,观察并统计试管苗的生根情况。

1.2.4 试管苗的移栽 将生根试管苗在实验室散

射光下盖膜炼苗5 d,洗去根部培养基并移栽到装有混合基质(营养土和珍珠岩等体积混合)的塑料杯中,保持空气相对湿度在90%以上。10 d后逐渐降低空气相对湿度,30 d后移栽到大田中。

1.3 数据分析

采用SPSS分析软件对实验数据进行方差分析,其中百分数需经过反正弦转换。

2 结果和分析

2.1 不同培养基中香果树带芽茎段愈伤组织诱导率的比较

不同培养基中香果树愈伤组织的诱导率见表1。由表1可见,MS培养基的诱导效果普遍优于1/2MS培养基,最高诱导率可以达到100%。其中以添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基(含蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8)的诱导效果最好,诱导率达100%。接种15 d后,外植体茎段基部开始出现愈伤组织,在接种后第38天,诱导出的愈伤组织直径最大可达 2.5 cm 。

实验发现,香果树的愈伤组织有2种形态,即白色疏松型和淡绿色致密型。淡绿色致密型的愈伤组织与外植体紧密连接,而白色疏松型的愈伤组织则围绕在淡绿色愈伤组织的周围。

2.2 不同培养基中香果树愈伤组织分化率的比较

不同培养基中香果树愈伤组织的分化率见表2。由表2可以看出,在添加了 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基、添加了 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的1/2MS培养基、添加了 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的1/2MS培养基上愈伤组织的分化情况较好,在前2种培养基中愈伤组织的分化率都为66.67%,高于第3种培养基(愈伤组织分化率50.00%)。上述3种培养基中添加的细胞分裂素类激素的浓度均是生长素浓度的200倍,据此可认为,这一激素浓度配比有利于香果树愈伤组织进行分化。

实验过程中还发现,在添加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的1/2MS培养基、添加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的1/2MS培养基中,通过愈伤组织分化得到的试管苗分别存在玻璃化和生根现象,因此,添加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基(含蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼

表1 不同培养基中香果树带芽茎段愈伤组织诱导状况的比较

Table 1 Comparison of inducement status of callus from *Emmenopterys henryi* Oliv. stem in different media

培养基 Medium	激素浓度/mg · L ⁻¹ Conc. of phytohormone			外植体接种数 Inoculation number of explant	愈伤组织数 Number of callus	愈伤组织诱导率/% Induced rate of callus	愈伤组织直径/cm Diameter of callus
	6-BA	KT	NAA				
MS	1.0		0.01	32	32	100.00	2.5
MS	2.0		0.01	36	36	100.00	1.0
MS	1.0		0.10	21	18	85.71	2.5
MS		1.0	0.01	28	4	14.29	2.0
MS		2.0	0.01	28	12	42.86	1.0
MS		1.0	0.10	30	30	100.00	2.2
1/2MS	1.0		0.01	32	24	75.00	2.0
1/2MS	2.0		0.01	35	30	85.71	2.5
1/2MS	1.0		0.10	35	20	57.14	1.0
1/2MS		1.0	0.01	36	12	33.33	2.0
1/2MS		2.0	0.01	30	12	40.00	2.0
1/2MS		1.0	0.10	21	3	14.29	2.5

表2 不同培养基中香果树愈伤组织分化状况的比较

Table 2 Comparison of differentiation status of *Emmenopterys henryi* Oliv. callus in different media

培养基 Medium	激素浓度/mg · L ⁻¹ Conc. of phytohormone			愈伤 组织数 Number of of callus	分化数 Number of differentiation	分化率/% Differentiation rate
	6-BA	KT	NAA			
MS	1.0		0.01	41	0	0.00
MS	2.0		0.01	36	4	11.11
MS	1.0		0.10	30	10	33.33
MS		1.0	0.01	37	0	0.00
MS		2.0	0.01	30	20	66.67
MS		1.0	0.10	32	0	0.00
1/2MS	1.0		0.01	31	0	0.00
1/2MS	2.0		0.01	30	20	66.67
1/2MS	1.0		0.10	41	0	0.00
1/2MS		1.0	0.01	42	0	0.00
1/2MS		2.0	0.01	28	14	50.00
1/2MS		1.0	0.10	34	0	0.00

脂 7 g · L⁻¹, pH 5.8) 是比较理想的香果树愈伤组织分化培养基, 可用于工业化生产。

2.3 不同培养基中香果树叶片不定芽诱导率的比较

接种后约 10 d, 香果树叶片开始膨大; 至接种后约 17 d, 叶片接触培养基的一面首先分化出颗粒状突起; 接种 25 d 后, 颗粒状突起遍布叶片各个部位, 当这些突起直径达到约 0.2 cm 时便不再膨大, 并直接分化出不定芽。观察发现, 这些不定芽不是由愈伤组织分化而来的, 而可能是由芽原基直接分化而来的, 其内部的组织起源有待进一步的解剖学鉴定。

根据不同培养基中不定芽的诱导状况可知(表 3), 在添加 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA 和 0.1 mg · L⁻¹ NAA

的 MS 培养基及添加 2.0 mg · L⁻¹ 6-BA 和 0.01 mg · L⁻¹ NAA 的 1/2MS 培养基上, 香果树叶片不定芽的诱导率较高, 分别达到 80.00% 和 100.00%。比较发现, 前一种培养基上不定芽的生长状态优于后者, 由于不定芽的生长状态直接关系到增殖效果, 因此, 确定最理想的香果树叶片不定芽诱导培养基为添加 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA 和 0.1 mg · L⁻¹ NAA 的 MS 培养基(含蔗糖 30 g · L⁻¹、琼脂 7 g · L⁻¹, pH 5.8)。

表3 不同培养基中香果树叶片不定芽诱导状况的比较

Table 3 Comparison of inducement status of adventitious shoot from *Emmenopterys henryi* Oliv. leaf in different media

培养基 Medium	激素浓度/mg · L ⁻¹ Conc. of phytohormone			接种数 Inoculation number	分化数 Number of differentiation	诱导率/% Induced rate
	6-BA	KT	NAA			
MS	1.0		0.01	40	5	12.50
MS	2.0		0.01	30	18	60.00
MS	1.0		0.10	30	24	80.00
MS		1.0	0.01	31	0	0.00
MS		2.0	0.01	34	0	0.00
MS		1.0	0.10	43	0	0.00
1/2MS	1.0		0.01	32	16	50.00
1/2MS	2.0		0.01	32	32	100.00
1/2MS	1.0		0.10	30	6	20.00
1/2MS		1.0	0.01	36	0	0.00
1/2MS		2.0	0.01	32	8	25.00
1/2MS		1.0	0.10	41	0	0.00

2.4 不同培养基中香果树不定芽增殖状况的分析

在设定的 4 个香果树不定芽增殖培养基中, 以添加 2.0 mg · L⁻¹ KT 和 0.1 mg · L⁻¹ NAA 的 MS 培

培养基(含蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8)对香果树不定芽的增殖效果最好,平均增殖系数可以达到3~4。

2.5 不同培养基中香果树试管苗生根状况的分析

当增殖的不定芽长到3~4 cm时即可转入生根培养基中进行生根培养,30 d后香果树试管苗开始生根,40 d后长出3~4条根。在添加不同激素的1/2MS培养基上,香果树试管苗的生根率有一定的差异(表4),以添加 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA的1/2MS培养基的生根效果较好,生根率可以达到72.73%。实验结果表明,单独使用生长素 IBA 诱导香果树试管苗生根的效果优于细胞分裂素和生长素的配比组合。方差分析结果表明,不同激素处理组间的生根率有极显著差异。

表4 不同激素浓度对香果树试管苗生根的影响
Table 4 Effect of different concentrations of phytohormone on rooting of *Emmenopterys henryi* Oliv. plantlets

培养基 Medium	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of phytohormone			接种数 Inoculation number	生根数 Number of rooting	生根率/% Rooting rate
	6-BA	IBA	NAA			
1/2MS	1.0	1.0	0.5	25	5	20.00
1/2MS	1.0	1.5		30	12	40.00
1/2MS		1.5		44	32	72.73

在实验室条件下将生长健壮的香果树生根试管苗炼苗5 d,然后移栽至混合基质中进行过渡培养,30 d后移栽至大田栽培,香果树试管苗的成活率可以达到30%。

3 讨论和结论

韦小丽^[3]等发现,最适宜香果树叶片愈伤组织诱导和芽增殖的培养基是添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT 的 MS 培养基,愈伤组织诱导率达35.6%;徐杏阳^[7]等也曾用香果树叶片作为外植体

诱导植株再生,发现在含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT 的培养基上香果树愈伤组织的诱导率可达92.9%;谈锋^[8]等人也采用芽作为外植体对香果树丛生芽诱导状况进行了研究。作者的研究结果表明,采用叶片作为外植体,可不经愈伤组织阶段直接诱导出不定芽,而且采用茎段也可诱导出愈伤组织,在添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基上愈伤组织的诱导率可达100%,高于前人的研究结果,且诱导中使用的 NAA 成本低于 ZT,更适宜于工厂化生产。

研究发现,香果树不定芽的平均增殖系数只有3~4,其增殖系数还有待进一步提高。在1/2MS培养基中只添加生长素 IBA 就能使香果树试管苗的生根率达到72.73%,生根培养基简单、成本低。值得注意的是,香果树试管苗移栽至大田后的成活率较低,仅为30%,因此,仍需要对香果树试管苗的移栽条件进行进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 罗献瑞,高蕴璋,陈伟球,等. 中国植物志 第七十一卷 第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 242-244.
- [2] 姬飞腾,李凤兰,高述民,等. 香果树体细胞胚胎发生[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 619-621.
- [3] 韦小丽,朱忠荣,廖明,等. 香果树组织培养技术研究[J]. 种子, 2005, 24(10): 27-29.
- [4] 徐小玉,姚崇怀,潘俊. 湖北九宫山香果树群落结构特征研究[J]. 西南林学院学报, 2002, 22(1): 5-8.
- [5] 杨开军,张小平,张中信,等. 安徽天堂寨保护植物香果树群落现状分析[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(1): 79-80.
- [6] 李钧敏,金则新. 香果树 RAPD 扩增条件的优化及遗传多样性初步分析[J]. 福建林业科技, 2004, 31(2): 36-40.
- [7] 徐杏阳,洪树荣,吴立廉. 香果树叶外植体诱导植株再生[J]. 植物学通报, 1983, 1(1): 40-42.
- [8] 谈锋,刘玉成,王晓龙. 香果树的快速繁殖[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1992, 17(2): 260-263.