

不同因素对贺兰山 香愈伤组织诱导的影响

任 辉 丽¹, 邱 景 宝¹, 曹 君 迈², 李 吉 宁¹, 陈 彦 云¹

(1. 宁夏大学 宁夏 银川 750021; 2. 西北第二民族学院 宁夏 银川 750021)

摘 要: 利用正交实验设计研究 4 种因素(6-BA、NAA、2,4-D、外植体)对贺兰山 香愈伤组织诱导的影响, 筛选出最佳的愈伤组织诱导条件为 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L, 其中 6-BA 的浓度和外植体类型对贺兰山 香种苗的出愈率有极显著影响($P=0.01$)。同时发现子叶和胚轴均可作为外植体材料, 且以胚轴为外植体在最佳诱导条件下出愈率高达 93.3%。

关键词: 贺兰山丁香; 不同因素; 愈伤组织诱导; 正交实验

中图分类号: S 685.26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)08-0181-03

贺兰山丁香(*Syringa pinnatifolia* Hemsl. var. *alashanensis* MaetS. Q. Zhou)是木犀科(Oleaceae)丁香属(*Syringa*)羽叶丁香(*Syring pinnatifolia*)下的一个变种^[1-3], 为贺兰山特有的濒危物种, 被列为国家三级保护植物^[3-4]。仅见于贺兰山东坡甘沟、榆树沟, 西坡南段的峡子沟、赵池沟等沟谷内, 生长于 1 800~2 300 m 山地的荫坡、半荫坡^[5]。为落叶灌木群落, 一般株高 1.5~2.5 m, 个别可达 3.5 m 左右, 生境严酷的地段往往不足 1 m^[5-7]。丁香是著名的观花灌木, 在研究丁香的无性繁殖技术方面, 比如激素的组合优化、外植体的选择等, 已有前人对多个丁香种类(如裂叶丁香^[8]、小叶丁香^[9]、暴马丁香^[10]、紫丁香^[11]等)做了详细研究, 但目前, 国内外对变种贺兰山丁香的研究主要是对其在分类学^[12-15]、生药学^[16]及生态价值^[5-7]等方面的讨论, 而对该植物在形态、结构和生殖等方面尚缺乏基础性研究, 仅李吉宁等^[18]对贺兰山丁香叶片的解剖结构作了一些研究。加之贺兰山丁香地域分布范围狭窄, 开发较晚, 迄今对其在组织培养方面的报道甚少。为此, 现以贺兰山丁香无菌种子叶、胚轴和胚根为外植体, 在 MS 附加不同生长调节物质配比的培养基中, 对其愈伤组织的诱导作了初步研究, 希望能为其他研究的开展提供一些理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料来源 试验选用贺兰山丁香种子作试材, 2006 年 10 月采自贺兰山甘沟海拔 2 100 m 的山地半

荫坡。

1.1.2 无菌种苗的获得 将经过充分休眠的贺兰山丁香种子流水冲洗 30 min, 置于超净工作台上, 用体积分数为 75% 的酒精预消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 再用质量分数为 0.1% HgCl₂ 消毒 8~10 min, 无菌水冲洗 5 次。用无菌滤纸吸干材料表面上的水分, 接种于 MS 培养基上, 置于(28±2)℃黑暗条件下培养 5 d, 然后移至光照 1 800~2 000 lx、14~16 h/d 的培养室中。当子叶变绿至未完全展开时取出作为供试无菌种苗(见图 1)。

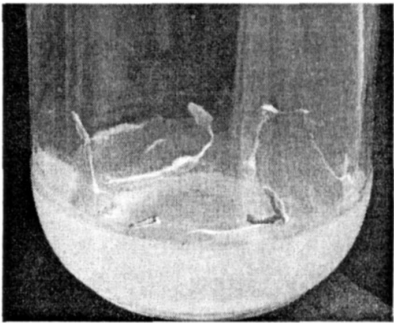


图 1 贺兰山丁香无菌种苗

1.2 试验设计与测定方法

1.2.1 试验设计与方法 试验采用 L₉(3⁴)正交实验表头设计^[19-20], 试验因素及水平排列如表 1 所示。试验共设 4 因素, 每因素各具 3 水平, 共 9 个处理, 重复 3 次, 在 MS 基本培养基中添加不同处理的激素配比, 配制各处理培养基, 并附加琼脂 6 g/L 和蔗糖 20 g/L, 用 NaOH 调节 pH 5.8。在无菌条件下切取无菌种子叶(去其边缘成四方形, 纵切一刀, 分为 2 块)、胚轴(取 1 cm 长)、胚根(取 1 cm 长)作为外植体, 每处理接种 6 瓶, 每瓶接种外植体个数 5 个, 培养条件为光照 1 800~2 000 lx、6~8 h/d 组培室中培养, 温度(25±2)℃。

第一作者简介: 任辉丽(1982-), 女, 宁夏石嘴山人, 硕士, 现主要从事植物资源学方面的研究工作。E-mail: renhuili8305@sina.com。
通讯作者: 陈彦云。E-mail: nxchenyy@163.com。
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30460030); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”资助项目(NCET-05-0896)。
收稿日期: 2008-03-10

表 1 L₉ (3⁴) 正交实验表头设计

因素	A/ mg · L ⁻¹	B/ mg · L ⁻¹	C/ mg · L ⁻¹	D
水平	6-BA 浓度	NAA 浓度	2,4-D 浓度	外植体类型
1	0	0	0.05	胚根
2	0.5	0.5	0.10	胚轴
3	1.0	1.0	0.15	子叶

表 2 贺兰山丁香出愈率与愈伤组织的生长情况

处理号	出愈率/ %				愈伤组织颜色	愈伤组织生长状况
	I	II	III	Σ		
1	0.00	0.00	0.00	0.00	—	—
2	20.00	40.00	20.00	80.00	淡黄色	愈伤化程度低, 呈松散态, 透明
3	0.00	20.00	0.00	20.00	—	—
4	60.00	100.00	80.00	240.00	黄绿色(较深)	愈伤化程度高, 致密有光泽, 长势旺盛, 绿色芽点多
5	40.00	40.00	20.00	100.00	淡黄色	—
6	80.00	60.00	80.00	220.00	黄绿色	愈伤化程度高, 致密不透明, 长势较快, 绿芽点多
7	60.00	20.00	60.00	140.00	黄绿色(较浅)	愈伤化程度低, 疏松, 长势弱
8	20.00	40.00	40.00	100.00	浅绿色	—
9	20.00	0.00	0.00	20.00	—	—

2 结果与分析

2.1 不同处理条件对贺兰山丁香愈伤组织诱导的影响

贺兰山丁香在 9 种处理条件下的出愈率及愈伤组织生长情况如表 2 所示。对贺兰山丁香的出愈率进行极差分析, 如表 3 所示。

表 3 贺兰山丁香出愈率的极差分析

因素	A/ mg · L ⁻¹	B/ mg · L ⁻¹	C/ mg · L ⁻¹	D
水平	6-BA 浓度	NAA 浓度	2,4-D 浓度	外植体类型
X ₂	62.22 **	31.11	37.78	48.89 **
X ₃	28.89 *	28.89	28.89	40.00 **
X ₁	11.11	42.22	35.56	13.33
R	51.11	13.33	8.89	35.56

根据表 2 和表 3 结果可以看出, 不同处理条件对贺兰山丁香愈伤组织诱导的差异很大。从 X 值大小可以看出 A、B、C、D 4 个因素的各水平最佳组合为 A₂B₁C₂D₂, 即 6-BA 浓度以 0.5 mg/L 为最佳, NAA 浓度以 0 mg/L 为最佳, 2,4-D 浓度以 0.1 mg/L 为最佳, 外植体类型以胚轴为最佳。但值得一提的是, 该组合并未在 9 个设计的试验号中出现, 由此可见采用正交实验设计的科学性、全面性, 对于最优配比组合的选择通过部分实施就能够实现。

在该组试验中 4 号出愈率最高, 平均可达到 80.0%, 其次为 6 号, 而 1、3 和 9 号出愈率平均值均低于 10%, 也就是说这几种培养基的激素配比不适合愈伤组织形成。

再观察表 3 中极差值 R, R 值愈大, 激素对试验结果的影响越显著。由于 R_A > R_D > R_B > R_C, 即各因素影响从大到小依次为 A (6-BA 浓度) > D (外植体类型) > B (NAA 浓度) > C (2,4-D 浓度), 说明试验中的 A 因素 (6-BA 浓度) 为主要影响因子, 其次为外植体类型。

对正交试验结果进行方差分析, 可以得出: A、B、C、D 4 个因素的 F 值分别为 31.46、2.38、1.00、16.00, 因此

1.2.2 测定方法 每处理于接种后第 40 天统计出愈外植体数, 计算出愈率^[2]。出愈率(%) = 出愈块数/接种外植体个数 × 100%, 并观察外植体在每种组合培养基上愈伤组织的生长状况。

对贺兰山丁香愈伤组织诱导影响的主次关系为 A (6-BA 浓度) > D (外植体类型) > B (NAA 浓度) > C (2,4-D 浓度), 与直观分析的结论一致; 且 4 因素中 6-BA 浓度、外植体类型对贺兰山丁香愈伤组织诱导的影响达到极显著水平; 经新复极差检验 (SSR), A 因素 (6-BA 浓度) 中 X₂ 与 X₃ 和 X₁ 之间差异均达到极显著水平, X₃ 与 X₁ 之间差异达到显著水平, D 因素 (外植体类型) 中 X₂ 和 X₃ 与 X₁ 之间均达到极显著水平 (见表 3)。

由表 3 可知, 培养基中的 6-BA 浓度对贺兰山丁香种苗的出愈率有极显著影响, 发挥重要的促进作用, 随其浓度的升高, 出愈率明显增加, 至 0.5 mg/L 达到最高, 随后逐渐下降。同时发现随 6-BA 浓度升高也加快了愈伤组织的褐化; 随 NAA 浓度的升高, 出愈率缓慢下降; 随着 2,4-D 浓度的增加, 出愈率呈现先升后降的趋势, 且趋势较缓。

2.2 不同类型外植体与愈伤组织诱导形成的关系

以 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 为诱导培养基, 接种不同类型的外植体, 观察记载愈伤组织诱导情况, 见表 4。在黑暗中培养 10 d 子叶切口处出现淡黄色条带状愈伤组织, 并继续扩增, 30 d 左右基本形成大块近瘤状愈伤组织, 颜色为黄绿色; 胚轴变化情况基本同上; 而胚根仅有膨大现象, 且相当部分不能出愈。由表 4 可见, 外植体类型不同对愈伤组织的诱导效果也有很大差异, 胚轴の出愈率高达 93.3%, 与方差分析结果一致, 是理想的外植体材料, 其次是子叶为外植体材料, 而胚根难以诱导愈伤组织的形成。

表 4 不同外植体类型的出愈情况

外植体类型	出愈率/ %	愈伤直径/ cm	发育状况
子叶	83.3	1.8	黄绿色
胚轴	93.3	2.5	淡黄绿色
胚根	60	—	仅有膨大现象

3 结果与讨论

愈伤组织的形成是由培养基成分、外植体材料、光照条件及温度等诸要素之间互相作用的复杂过程^[22-24]。其中,生长调节物质的种类、浓度及配比是调控植物细胞产生愈伤组织的主导因素,起着至关重要的作用。该研究不同生长调节物质配比对愈伤组织诱导的结果表明:贺兰山丁香外植体愈伤组织高效诱导的最优组合是MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L。

外植体类型是影响愈伤组织形成的另一重要因素,双子叶植物常用外植体有子叶、胚轴、胚根、根尖、芽尖、叶片等^[23-24],该试验过程中发现胚轴、子叶均可作为贺兰山丁香愈伤组织诱导的外植体材料,以胚轴为佳,诱导胚根出愈的条件有待进一步研究。另外,该试验曾以根尖作为外植体材料,但却几乎没有出现膨大现象,与根尖细胞分裂分生能力强的特性不一致,有待探讨。

光照条件是影响愈伤组织诱导和生长发育的重要因素,该试验虽未系统地开展研究,但通过试验观察,首先在黑暗条件下启动,然后在辅助光照条件下扩增,今后可进一步研究光照时间对愈伤组织诱导及生长的影响。

参考文献

[1] 马毓泉.内蒙古植物志[M]. 1版.呼和浩特:内蒙古人民出版社,1980.
[2] 马德滋,刘惠兰.宁夏植物志[M]. 银川:宁夏人民出版社,1986.
[3] 傅立国.中国植物红皮书—稀有濒危植物[M]. 北京:科学出版社,1991:484-485.
[4] 赵一之.内蒙古珍稀濒危植物图谱[M]. 北京:中国农业科技出版社,1992:126-127.
[5] 梁存柱,朱宗元.贺兰山植物群落类型多样性及空间分异[J].植物生态学报,2004,28(3):361-368.
[6] 宛涛,蔡萍,伊卫东,等.贺兰山5种国家级保护植物的花粉形态研

究[J].宁夏大学学报(自然科学版),2006(4):354-356.
[7] 吕海军,都震.宁夏贺兰山濒危植物资源现状[J].宁夏农林科技,2000(增刊):39-43.
[8] 李鸿杰,石峰.裂叶丁香无性繁殖技术研究[J].甘肃林业科技,2004,29(2):63-65.
[9] 王贞,刘燕.小叶丁香的组织培养及植株再生[J].植物生理学通讯,2006,42(3):487.
[10] 刘华英,沈海龙.暴马丁香下胚轴的离体培养和植株再生[J].植物生理学通讯,2003(4):351-352.
[11] 刘建斌,赵祥云,王俊娟,等.紫丁香的组织培养[J].北京农学院学报,2001,16(4):42-45.
[12] Basc P. Stomatal Types in Icacnaceae. Additional observation on genera outside Malaysia[J]. Acta. Bot. Nerr., 1974, 23(3):193-200.
[13] 刘华英,沈海龙.离体条件下暴马丁香切种子的萌发[J].植物研究,2004,24(2):245-247.
[14] 郭本兆.青海经济植物志[M]. 西宁:青海人民出版社,1987.
[15] 狄维忠.贺兰山维管植物[M]. 西安:西北大学出版社,1987:1-26.
[16] 庞秀生,赵明升,王晋.蒙药山沉香的生药学研究[J].中国民族医药杂志,2000,6(12)(增刊):59.
[17] 陶玲,李新荣.中国珍稀濒危荒漠植物保护等级的定量研究[J].林业科学,2001,37(1):52-57.
[18] 李吉宁,苏建宇,李志刚,等.三种丁香叶片的比较解剖学观察[J].宁夏农林科技,2000(S1):36-38.
[19] 周莉,代力民,苏宝玲,等.利用正交法研究丁香幼胚离体培养的影响因素[J].安徽农业大学学报,2003,30(3):304-307.
[20] 李春喜,王志和.生物统计学[M]. 北京:科学出版社,2000:149-153.
[21] 王雅梅,曹孜义.葡萄胚珠诱导成苗的研究[J].甘肃农业大学学报,2005,40(2):167-172.
[22] 焦海华.不同植物生长调节物质对一品红愈伤组织形成及其生长势的影响[J].晋东南师范专科学校学报,2001,18(3):14-16.
[23] 郑先波,夏国海.无籽西瓜种苗愈伤组织诱导研究[J].河南农业大学学报,2003,37(3):39-43.
[24] 陈智勇,易自力.提高高羊茅愈伤组织诱导率的研究[J].草业学报,2003,12(4):69-72.

Influence of Different Factors on the Callus Induction of *S. pinnatifolia* var

REN Hui-li¹, QIU Jing-bao¹, CAO Jun-mai², LI Ji-ning¹, CHEN Yanyun¹

(1. Ningxia University, Ningxia Yinchuan 750021, China; 2 The Second Northwest University for Nationalities, Ningxia, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The influences of 4 factors (6-BA, NAA, 2,4-D and explants) on inducing calluses of *S. pinnatifolia* var were investigated with the method of orthogonal design. The optimal inducing conditions for culture were the concentrations and explants as Ms+6-BA 0.5mg/L+2,4-D 0.1 mg/L, in which 6-BA had the most significant effect on the induction rate for callus of *S. pinnatifolia* var. ($P=0.01$). At the same time, cotyledons and hypocotyls were found to be the best materials for explants. When hypocotyls were used as explants, the induction rate reached 93.3% under the best inducing conditions.

Key words: *S. pinnatifolia* var; Different factors; Callus induction; Orthogonal test