

# 西南桦愈伤组织培养试验

陈 荣<sup>1,2</sup>, 冯立新<sup>2</sup>, 刘 颖<sup>1</sup>, 杨跃生<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学 生命科学院与药用植物研究中心, 广东 广州 510642; 2. 广西生态工程职业技术学院 生态工程系, 广西 柳州 545004)

**摘 要:**以西南桦 60 d 龄无菌苗茎、根、叶为外植体, 研究不同种类和浓度的植物生长调节剂对西南桦愈伤组织诱导的影响。结果表明: 当 TDZ 浓度为 0.05 mg/L 时诱导效果较好。BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 组合愈伤组织鲜重较高, KT 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的激素组合诱导的愈伤组织质量高, 大部分愈伤组织表面疏松, 灰白色, 并有大量再生根缠绕。叶外植体用于愈伤组织诱导培养比茎、根外植体效果好。生长曲线表明, 最佳的继代培养时间为 45 d。

**关键词:**西南桦; 组织培养; 生长曲线

**中图分类号:**S 792.15 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0158-03

西南桦(*Betula alnoides* Buch. Ham. ex D. Don) 是桦木科的乔木树种, 是北半球桦木科桦木属分布最南的暖热类群。是我国云南、广西等西部省区水源涵养林的主要树种之一, 具有重要的生态价值。随着西南桦木材用途的逐步开发, 木材畅销于国际国内市场, 其经济价值日益重要, 目前西南桦在我国华南、西南多省大面积推广, 已成为我国热带、亚热带地区的重要造林树种<sup>[1]</sup>。

西南桦的组织培养研究从以芽繁殖和愈伤组织 2 条途径进行。刘英等<sup>[2]</sup>建立了西南桦的以芽繁殖快繁体系。而樊国盛等<sup>[3]</sup>的报道中仅简单提及西南桦愈伤组织诱导率为 25.4%, 认为低比例的愈伤组织形成状况是导致其快速繁殖困难的主要原因。目前西南桦并无专门的愈伤组织诱导研究报告, 而愈伤组织诱导的研究, 有利于建立愈伤组织出芽的再生体系, 该再生体系的建立对西南桦的倍性育种及遗传转化具有重要的应用价值。基于此, 该研究设计不同植物生长调节物质对西南桦愈伤组织诱导的影响试验, 旨在提高愈伤组织诱导率及愈伤组织质量, 从而为西南桦的组织培养和染色体工程育种提供有效的技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试种子由广西壮族自治区百色市林业局提供, 采自田林县, 采后冷藏(4℃)约 8 个月后用于无菌萌发。切取 60 d 苗龄无菌苗的茎、根、叶做为外植体用于愈伤组织诱导试验, 茎、根切成 0.5~0.7 cm 长度, 叶切成 0.3 cm × 0.3 cm 的小方块。

第一作者简介: 陈荣(1977-), 男, 博士, 讲师, 现从事药用植物栽培教学及植物倍性育种研究工作。

基金项目: 广西壮族自治区林业厅“十五”科技项目(桂林科字(2001)第 80 号)。

收稿日期: 2011-04-28

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基及培养方法 1/2MS+2% 蔗糖+0.6% 琼脂为萌发培养基, pH 5.8~6.0, 暗培养 10 d; 3/4 改良 MS 大量+MS 其它+2.5% 蔗糖+0.65% 琼脂+肌醇 0.1 mg/L 为愈伤组织诱导基本培养基, pH 5.8~6.0, 通过改变激素浓度进行试验比较, 改良 MS 大量元素母液配制方法为 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 减半 KNO<sub>3</sub> 加倍。培养基按常规方法配制。培养环境温度为(24±2)℃, 光强约为 2 000 lx, 光照时间为 12 h/d。

1.2.2 无菌苗获得方法 将经过挑选的表面洁净的带膜翅饱满西南桦种子装入培养皿中, 放入 210 mm 玻璃干燥器内, 培养皿盖斜放保持透气, 另用一广口玻璃瓶装入 25 mL 的 6% NaOCl 原液, 放入玻璃干燥器内, 量取 8 mL 的 36% HCl 倒入玻璃瓶中, 迅速盖上涂抹过凡士林的玻璃干燥器盖, 利用反应产生的氯气进行消毒。消毒处理时将玻璃干燥器放在通风橱中进行。消毒时间为 20 min, 消毒完成后在超净工作台内将种子接入萌发培养基中。

1.2.3 不同浓度 TDZ 对西南桦愈伤组织诱导的影响 设计 TDZ 浓度为 0.025、0.05、0.1、0.4 mg/L 共 4 个处理, 3 次重复, 每瓶接种 10 个外植体, 所有处理均添加 NAA 浓度为 0.2 mg/L。

1.2.4 不同浓度 BA 与 NAA 组合对西南桦愈伤组织诱导的影响 设定 BA 浓度为 0.5、1.5、3 mg/L 及 NAA 浓度 0.1、0.2、0.5 mg/L 共 9 个处理的组合试验, 3 次重复, 每瓶接种 10 个外植体。

1.2.5 不同浓度 KT 对西南桦愈伤组织诱导的影响 设计 KT 浓度为 0.5、1、1.5、3 mg/L 共 4 个处理, 3 次重复, 每瓶接种 10 个外植体, 所有处理均添加 NAA 浓度为 0.2 mg/L。

1.2.6 西南桦愈伤组织生长曲线的建立 在愈伤组织基本培养基中加入 BA 1.5 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L, 接入茎外植体, 分别在接种后的第 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 天测定每外植体愈伤组织鲜重, 取 30 个外植体鲜重平均值为愈伤组织生

长量,以培养天数为横坐标,以愈伤组织生长量为纵坐标作出西南桦愈伤组织生长曲线,该试验中使用的西南桦无菌苗为 90 d 苗。

1.2.7 数据统计与分析 愈伤组织诱导试验接种后第 45 天统计愈伤组织诱导率和愈伤组织鲜重,愈伤组织诱导率=形成愈伤组织外植体数/接种外植体数×100%。采用 Microsoft Excel 进行数据处理和制作图表,SAS 统计分析软件进行方差分析和多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 TDZ 对西南桦愈伤组织诱导的影响试验

由表 1 可知,在 4 种 TDZ 浓度处理中,就叶外植体

表 1 不同浓度 TDZ 对西南桦不同外植体愈伤组织培养的影响

TDZ 浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	不同外植体				愈伤组织鲜重/g			
	叶	茎	根	平均值	叶	茎	根	平均值
0.025	100 Aa	60.0 Bb	53.3 Ba	71.1	0.19 c	0.17 b	0.15 b	0.17
0.05	100 Aa	93.3 Aa	66.7 Ba	86.7	0.36 Aa	0.29 Aa	0.21 Ba	0.29
0.1	100 Aa	96.7 Aa	53.3 Ba	83.3	0.27 Ab	0.23 ABab	0.18 Bab	0.23
0.4	23.3 Ab	16.7 ABc	10.0 Bb	16.7	0.11 Ad	0.06 Bc	0.04 Bc	0.07
平均值	80.8	66.7	45.8	—	0.23	0.19	0.15	—

注:数据后字母不同表示在 P 5%水平存在显著差异,大写字母是横向比较,小写字母是纵向比较。下同。

### 2.2 BA 和 NAA 组合对西南桦愈伤组织诱导的影响

由表 2 可看出,在所有激素组合处理中,叶外植体的愈伤组织诱导率均为 100%,在 BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 处理时得到了最高的愈伤组织鲜重,为 0.36 g,显著高于 BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 处理时的 0.06 g,在同一 BA 浓度的前提下,随着 NAA 浓度的增加,愈伤组织鲜重有逐渐增加的趋势;对于茎外植体来说,在 BA 为 1.5 mg/L 的 3 个处理中,2 个愈伤组织诱导率为 100%,且 BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 组合得到了最高的愈伤组织鲜重 0.29 g,显著高于除 BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 组合外的其它 7 个组合处理;根外植体的变化趋势与叶、茎外植体的变

表 2 BA 和 NAA 组合对西南桦不同外植体愈伤组织培养的影响

激素浓度/mg·L <sup>-1</sup>		愈伤组织诱导率/%			愈伤组织鲜重/g		
BA	NAA	叶	茎	根	叶	茎	根
0.5	0.1	100	76.7 b	30.0 bc	0.06 d	0.05 e	0.03 cd
	0.2	100	93.3 ab	36.7 bc	0.14 c	0.11 cd	0.05 bc
	0.5	100	96.7 ab	73.3 a	0.21 b	0.17 b	0.10 a
1.5	0.1	100	86.7 ab	43.3 bc	0.23 b	0.11 cd	0.05 bc
	0.2	100	100 a	50.0 ab	0.32 a	0.22 ab	0.07 b
	0.5	100	100 a	76.7 a	0.36 a	0.29 a	0.13 a
3	0.1	100	80.0 b	23.3 c	0.20 b	0.09 d	0.02 d
	0.2	100	83.3 ab	36.7 bc	0.21 b	0.14 bc	0.04 c
	0.5	100	96.7 ab	50.0 ab	0.27 ab	0.18 b	0.06 b

### 2.3 KT 对西南桦愈伤组织诱导的影响试验

由表 3 可知,在 4 种不同浓度 KT 处理中,就叶外植体来说,当 KT 为 1.5 mg/L 时愈伤组织鲜重最高,为 0.23 g,显著高于其它 3 个处理,此时的愈伤组织诱导率为 100%,KT 浓度为 0.5 mg/L 时愈伤组织诱导率及鲜重最低,且显著低于其它 3 个处理。茎外植体对 4 种不同浓度 KT 处理的反应与叶外植体反应趋势基本一致,愈伤组织诱导率及鲜重与在 KT 浓度为 1.5 mg/L 时得到最大值。以根为外植体时,愈伤组织诱导

来说,当浓度为 0.4 mg/L 时愈伤组织诱导率最低,此时的愈伤组织鲜重也最低,二者均显著低于其它 3 个处理,其它 3 种浓度叶愈伤组织诱导率均为 100%,在浓度为 0.05 mg/L 时叶外植体得到了最高的愈伤组织鲜重且显著高于其它 3 个处理;其它 2 种外植体在 4 种浓度 TDZ 处理下变化趋势与叶外植体基本一致。结合平均值来看,4 种浓度处理愈伤组织诱导率最高且鲜重最大的为 TDZ 0.05 mg/L 的处理,叶外植体的愈伤组织诱导率及鲜重均高于茎、根外植体。同时观察到当 TDZ 浓度大于 0.05 mg/L 时,愈伤组织呈水浸透明状,在所有处理中得到的愈伤组织呈淡绿色,质地松软。

化趋势基本一致,但是其愈伤组织诱导率及鲜重均低于叶、茎外植体。在 3 种外植体中,叶外植体的培养效果最好,根外植体的培养效果最差,在激素组合中,BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 组合取得了最好的诱导效果。经过观察 BA 与 NAA 的所有组合处理得到的愈伤组织,发现 BA 3.0 mg/L 的 3 个处理获得的愈伤组织呈深绿色,质地坚硬,切开中部呈黄绿色且空心,可能不适合下一步的胚状体诱导,BA 为 0.5 mg/L 的 3 个处理相对颜色要淡,组织比较松软。同时发现,在接种 70 d 后,大部分愈伤组织开始褐化,随着 BA 浓度的增加,褐化变的严重。

率在 4 个处理浓度下均低于 40%,浓度为 0.5 mg/L 时诱导率最低,低至 16.7%,根外植体诱导的愈伤组织鲜重和愈伤组织诱导率在 4 种外植体中最低。结合平均值来看,4 种 KT 浓度处理效果最好的为 1.5 mg/L,此时的愈伤组织诱导率及鲜重最大,叶外植体的愈伤组织诱导率及鲜重平均值均高于茎、根外植体。结合观察,该试验中得到的愈伤组织外部呈淡白色,内部呈淡绿色,愈伤组织呈扁平状生长,在大多数愈伤组织表面有根长出。

表 3 不同浓度 KT 对西南桦不同外植体愈伤组织培养的影响

KT 浓度 /mg · L <sup>-1</sup>	不同外植体				愈伤组织鲜重/g			
	叶	茎	根	平均值	叶	茎	根	平均值
0.5	86.7 Ab	50 Bc	16.7 Cb	51.2	0.11 Ac	0.08 Ab	0.05 Bc	0.08
1.0	100 Aa	73.3 Bb	30.0 Cab	67.8	0.16 Ab	0.11 Bb	0.07 Cbc	0.11
1.5	100 Aa	100 Aa	36.7 Ba	78.9	0.23 Aa	0.19 Aa	0.12 Ba	0.18
3	100 Aa	56.7 Bbc	23.3 Cab	60.0	0.15 Ab	0.09 Bb	0.10 Bab	0.11
平均值	96.7	70.0	26.7	—	0.16	0.12	0.09	—

## 2.4 西南桦愈伤组织生长曲线的建立

由不同培养天数西南桦的愈伤组织鲜重建立了西南桦愈伤组织生长曲线(图 1),从图 1 可以看出,西南桦愈伤组织生长启动较慢,接种后的前 20 d 生长曲线较为平滑,可见愈伤组织重量增加缓慢。从第 25~45 天,愈伤组织生长曲线斜率变大,可见期间为愈伤组织快速生长期。从第 45~60 天,愈伤组织生长变缓。可见西南桦愈伤组织最佳的继代培养时间为 45 d 左右。

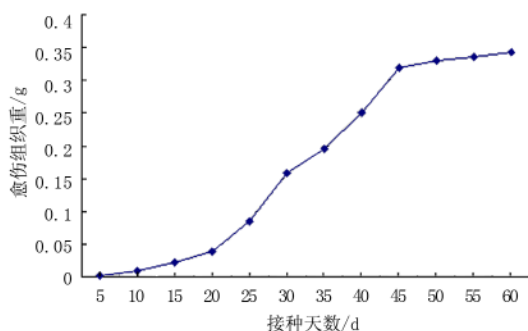


图 1 西南桦愈伤组织生长曲线

## 3 讨论与结论

植物生长调节剂对植物离体培养具有非常重要的调控作用,选择合适的生长调节剂种类和浓度是愈伤组织诱导和生长的关键因素。该试验探讨了 TDZ、BA、NAA、KT 对西南桦愈伤组织培养的影响,结果表明,在 TDZ 浓度为 0.5 mg/L 时效果较好,当浓度高于该值时愈伤组织玻璃化严重。BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 取得了好的愈伤组织诱导效果,得到的愈伤组织鲜重小

于 BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 处理,但是愈伤组织呈淡白色,后者愈伤组织深绿色且有一定硬化,质量不高;同时前者的愈伤组织诱导率在使用叶、茎为外植体时达到了 100%,远高于樊国盛等报道的 25.4%,其可能的原因是跟使用的基因型有关系或者与在愈伤组织培养时使用的基本培养基为 MS 改良培养基有关。KT 试验结果表明,KT 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的激素组合愈伤组织诱导率理想,且大部分愈伤组织表面疏松、灰白色、并有大量再生根缠绕,虽然 KT 试验中得到的愈伤组织鲜重低于其它 2 个试验,但是其愈伤组织的高质量及好的分化生长状态值得关注,是否有利于芽的诱导还有待于进一步研究。在 3 个激素试验中均使用叶、茎、根为外植体,试验结果一致表明,叶外植体用于愈伤组织诱导培养效果最佳。生长曲线表明,最佳的继代培养时间为 45 d 左右,同时发现在使用苗龄较短的西南桦无菌苗作为外植体来源时,愈伤组织快速生长期有所提前,王秀杰等<sup>[4]</sup>对蒙古黄芪研究后发现其最佳的继代培养时间为 24 d 左右。由此可见,不同的植物在进行愈伤组织诱导时,都会有其特殊的生长周期,同时其周期可能还跟外植体的幼嫩程度有关系。

### 参考文献

- [1] 曾杰,郭文福,赵志刚,等. 西南桦研究的回顾与展望[J]. 林业科学研究, 2006, 19(3): 379-384.
- [2] 樊国盛,邓莉兰. 西南桦组织培养研究[J]. 西南林学院学报, 2000, 20(3): 147-151.
- [3] 刘英,曾炳山,裴珍飞,等. 西南桦以芽繁殖组培快繁研究[J]. 林业科学研究, 2003, 16(6): 715-719.
- [4] 王秀杰,马琳,高文远. 不同激素对蒙古黄芪愈伤组织诱导的影响[J]. 中国现代中药, 2008, 10(1): 32-33.

## Experimental Report on Inducement of Callus in *Betula alnoides*

CHEN Rong<sup>1,2</sup>, FENG Li-xin<sup>2</sup>, LIU Ying<sup>1</sup>, YANG Yue-sheng<sup>1</sup>

(1. Center for Medicinal Plant Research, College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642;  
2. Department of Eco-engineering, Guangxi Eco-engineering Vocational and Technical College, Liuzhou, Gansu 545004)

**Abstract:** Leaf, root and stem explants were taken from six-months-old *in vitro* grown plants of *Betula alnoides* B. Callus inducing was studied under culture media with different kinds and concentrations of hormones. The results indicated that 0.05 mg/L TDZ was suitable for the induction of callus. The highest weight had got with BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L. Calluses were enlarged and rooting with KT 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, on this condition the callus grew well and offered the foundation of further study. The leaf explant was better than stem and root for callus induction. Growth curve of callus showed that the best time of subculture was about 45 days.

**Key words:** *Betula alnoides*; tissue culture; callus; growth curve