

枳椇叶片再生体系的优化研究

孙叶芳¹, 郑 琪¹, 孙骏威², 陈 珍³, 周 丹²

(1. 绍兴市农业科学研究院, 浙江 绍兴 312003; 2. 中国计量学院 生命科学院生物系, 浙江 杭州 310018;

3. 台州学院 生命科学院, 浙江 台州 318000)

摘 要:以枳椇组培再生苗的叶片为外植体, 进行离体培养植株再生研究。结果表明: 外植体宜选择叶色浓绿的成熟叶片, 诱导愈伤组织和不定芽的最佳培养基为 1/2MS+BA 2.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L, 诱导率可超过 85%, 增殖率可超过 6.0; 最佳生根培养基为 1/4MS+NAA 0.1 mg/L, 添加 2% 蔗糖, 生根率可达 95% 以上。

关键词:枳椇; 植物生长调节剂; 再生苗叶片; 不定芽诱导; 生根诱导

中图分类号:S 718.3; Q 813.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0112-04

枳椇(*Hovenia acerba* Lindl.) 为鼠李科(Rhamnaceae)拐枣属落叶乔木, 因其果梗肉质膨大扭曲, 味甘甜如枣, 故又名拐枣、鸡爪梨。广泛分布于华北、华东、中南、西北、西南、华南各省。果梗除可以直接鲜食外, 还可蒸熟浸酒, 并可制作多种保健食品; 其种子可入药, 称枳椇子, 性平, 味甘, 入胃经、无毒, 具止呕、止渴除烦、解酒毒和利大小便之功效, 主治醉酒、烦热、口渴、呕吐、二便不利等症^[1-2]; 其果序轴可治疗风湿; 果梗可健胃、补血, 用于滋养补血^[1]; 其叶性凉, 味甘, 具清热解毒和除烦止渴之功效, 主治风热感冒、醉酒烦渴、呕吐和便秘^[2]; 其树皮治腓肠肌痉挛、小儿积食等^[1]; 其树干流出的汁液, 名枳椇木汁, 性平, 味甘, 具辟秽除臭之功效, 主治狐臭; 其根性温, 味甘、涩, 具祛风活络、止血和解酒之功效, 主治风湿筋骨痛、劳伤咳嗽、咯血、小儿惊风和醉酒^[2]。而且, 它对土壤、气候要求不严, 且生长速度快, 可作为绿化、退耕还林和水土保持的树种; 其木材纹理粗而美观、材质坚硬, 还适合做家俱和饰材^[3]。但枳椇目前多为野生状态, 由于种子不易发芽, 野生成林极为罕见。课题组曾对以枳椇叶片为外植体进行愈伤组织诱导到再生植株的组织培养过程^[4]及以再生苗叶片快速诱导不定芽等研究^[5]发表过相关报道, 该试验以前述试验为基础, 继续对枳椇再生苗叶片实现快速诱导不定芽进行相关研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据文献^[4], 获得枳椇组培再生植株, 将其完全伸

展的叶片切下, 作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 不同植物生长调节剂处理对叶片愈伤组织和不定芽诱导的影响 选择叶色浓绿、长势良好的叶片, 切成 1~3 cm² 的小块, 正面朝上, 平放于添加以下植物生长调节剂组合的、大量元素浓度减半的 MS 培养基中(简称 1/2MS, 下同): ① 6-BA 2.0 mg/L; ② 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; ③ NAA 0.1 mg/L; ④ TDZ 0.3 mg/L; ⑤ TDZ 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L; ⑥ IAA 0.5 mg/L; ⑦ TDZ 0.3 mg/L+IAA 0.5 mg/L; ⑧ 6-BA 2 mg/L+IAA 0.5 mg/L; ⑨ TDZ 0.3 mg/L+6-BA 2 mg/L。所有培养基均添加 3% 蔗糖和 0.7% 琼脂粉, pH 调节至 5.8~6.0, 下同。培养温度为 (25±1)℃, 光照强度为 30~40 mmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间为 14 h/d。25 d 时统计愈伤组织诱导率、丛生芽诱导率和不定芽数。

1.2.2 不定芽分化植物生长调节剂组合的优化 根据 1.2.1 试验的结果, 分别设置 5 个浓度梯度的 NAA (0、0.1、0.2、0.3 和 0.5 mg/L) 和 IAA (0、0.5、1.0、2.0 和 5.0 mg/L), 与 2.0 mg/L 6-BA 组成激素组合, 添加到 1/2MS 培养基中。按 1.2.1 的接种方法, 接入外植体。25 d 统计丛生芽诱导率和不定芽数。

1.2.3 不同叶片材料和放置方式对不定芽诱导的影响 各取再生苗的上部浓绿叶和下部黄绿叶切成小块, 并按叶片正面朝上和背面朝上分别放置, 接种于 1.2.2 方法筛选到的最适培养基上培养, 25 d 时统计丛生芽诱导率和不定芽数。

1.2.4 不同处理对生根的影响 将 1.2.2 方法筛选到的最适培养基培养的丛生芽切开, 分成单株, 分别接种于 3 个梯度的 MS (1/2、1/4 和 1/8) 和蔗糖 (3%、2% 和 1%) 浓度组合中, 均添加 0.1 mg/L NAA 的生根培养基中, 所有培养基均不添加肌醇。1/4MS 为 1/2MS 的各

第一作者简介:孙叶芳(1978-), 女, 硕士, 农艺师, 研究方向为经济植物的组织培养。E-mail: yefang524@163.com.

责任作者:孙骏威(1978-), 男, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为经济植物的组织培养。E-mail: juville@cjlu.edu.cn.

收稿日期:2012-10-18

元素均减半,1/8MS 为 1/4MS 的各元素均减半。培养 15 d 后统计生根率,并记录组培苗生长情况。

1.2.5 练苗和移栽 待 1.2.4 方法得到的生根苗继续培养 1 周后,微开培养瓶瓶盖进行练苗,1 d 后取出洗净根部附着的培养基再移入室温土中培养,土为小粉土,注意保持湿度,7 d 后统计成活率,随后带土移入大田栽培。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂处理对叶片愈伤组织和不定芽诱导的影响

由表 1 可知,除单独添加 NAA 或 IAA 外,其它植物生长调节剂组合均可诱导出愈伤组织,而且愈伤组织诱导率均接近 100%;但只有添加 6-BA 的组合(6-BA

2.0 mg/L、6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 和 TDZ 0.3 mg/L+6-BA 2.0 mg/L)才能大量诱导出不定芽,添加 TDZ 的组合要显著低于添加 6-BA 的,只有极个别的诱导出不定芽;6-BA 和 TDZ 之间也未出现协同作用,相反有拮抗作用;而添加 NAA 或 IAA 后,除不定芽诱导率有显著提高外,不定芽数(以可以诱导不定芽的叶盘为基数计算得到)也显著增加,高出约 10%,但添加 0.1 mg/L NAA 和 0.5 mg/L IAA 间并无显著差异。该试验观察发现,愈伤组织主要出现在叶柄端切口和主叶脉切口,而这 2 个地方也正是出现不定芽的主要位点,约占 90%。愈伤组织一般出现时间为 3~4 d,不定芽产生的最早时间可为 12 d,出现在 1/2MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的培养基中。

表 1 不同植物生长调节剂组织对叶片愈伤组织和不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of different plant growth regulator combinations on induction of callus and adventitious buds from leaves of regenerated *Hovenia acerba* shoots

序号 Sequence number	激素组合 Combination of hormone	愈伤组织诱导率 Frequency of callus induction/%	不定芽诱导率 Frequency of adventitious buds induction/%	不定芽诱导数 Adventitious buds number
1	6-BA 2.0 mg/L	96.7±3.3a	58.9±5.1b	5.10±0.09b
2	6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	96.7±3.3a	71.1±5.1a	5.68±0.21a
3	NAA 0.1 mg/L	0	0	—
4	TDZ 0.3 mg/L	97.8±3.8a	1.1±1.9d	0.33±0.58d
5	TDZ 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L	96.7±3.3a	2.2±1.9d	0.67±0.58d
6	IAA 0.5 mg/L	0	0	—
7	TDZ 0.3 mg/L+IAA 0.5 mg/L	96.7±0.0a	2.2±1.9d	1.0±1.0d
8	6-BA 2 mg/L+IAA 0.5 mg/L	98.9±1.9a	71.1±6.9a	5.80±0.29a
9	TDZ 0.3 mg/L+6-BA 2.0 mg/L	96.7±3.3a	41.1±1.9c	3.10±0.17c

2.2 不定芽分化植物生长调节剂组合的优化

由表 2 可看出,随着 NAA 和 IAA 浓度的增加,不定芽诱导率表现出逐渐上升并稳定的趋势,不定芽诱导数表现出逐渐增加的趋势,但 2 种生长素之间表现出差异,即添加 IAA 处理的增加幅度要大于添加 NAA 的处理。与不添加生长素的对照相比,不定芽诱导率最高可超过 40%,0.2~0.5 mg/L 的 NAA 处理间无显著差异,与 1.0~5.0 mg/L 的 IAA 处理间也无显著差异;0.2~0.5 mg/L 的 NAA 处理间的不定芽诱导数也无显著差异,但 1.0~5.0 mg/L 的 IAA 处理间表现出显著差异,5.0 mg/L 的 IAA 处理的不定芽诱导数要比对照超过近 60%。试验中观察发现,各处理间不定芽的产生时

间比较一致,均在 12 d 左右;随着 NAA、IAA 浓度的增加,茎变高,叶片变大,但 IAA 处理的促进作用要优于 NAA 处理。同时,随着生长素浓度的增加,不定芽的玻璃化程度加重,叶片和茎呈透明或半透明水渍化,在继代的过程中,这类不定芽很难再诱导出芽丛。故选择中等浓度的生长素(NAA 0.2 mg/L 或 IAA 1.0 mg/L)培养,既可保持较高的不定芽诱导率和不定芽诱导数,也能保证茎和叶较快较好生长,从而为不定芽的增殖和生根提供材料。综合比较 NAA 0.2 mg/L 或 IAA 1.0 mg/L 的处理,发现 IAA 1.0 处理优于 NAA 0.2 mg/L 处理。故愈伤组织和不定芽诱导的最佳培养基为 1/2MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L。

表 2 NAA 和 IAA 处理对叶片诱导不定芽的影响

Table 1 Effects of NAA/IAA treatments on induction of adventitious shoot from leaves of regenerated *Hovenia acerba* shoots

序号 Sequence number	NAA 浓度 NAA concentration/mg · L ⁻¹	IAA 浓度 IAA concentration/mg · L ⁻¹	不定芽诱导率 Frequency of adventitious buds induction/%	不定芽诱导数 Adventitious buds number	茎长短 Stem length	叶大小 Leaves size
1	0	0	60.0±3.3d	5.03±0.18f	+	+
2	0.1	0	71.1±1.9c	5.67±0.14e	++	++
3	0.2	0	81.1±5.1ab	5.81±0.03de	++	++
4	0.3	0	82.2±1.9ab	5.96±0.12cd	+++	+++
5	0.5	0	80.0±3.3b	5.95±0.17cde	+++	+++
6	0	0.5	72.2±5.1bc	5.74±0.11de	++	++
7	0	1.0	85.6±1.9a	6.14±0.08c	++++	++++
8	0	2.0	83.3±3.3a	6.70±0.09b	++++	++++
9	0	5.0	81.1±5.1ab	7.05±0.11a	+++++	+++++

2.3 不同叶片材料和放置方式对不定芽诱导的影响

以不同叶片材料和放置方式接种于 $1/2\text{MS}+6\text{-BA}$ $2.0\text{ mg/L}+\text{IAA}$ 1.0 mg/L 培养基上,其不定芽诱导结果见表3。叶片材料和放置方式均表现出显著差异,幼嫩的成熟叶片(浓绿叶片)不定芽诱导率和不定芽诱导数要远远高于衰老叶片(黄绿叶片),正面朝上放置方式的叶片也要显著高于背面朝上放置的叶片;故最佳的叶

表3 不同叶片材料和放置方式
对不定芽诱导的影响

Table 3 Effects of different material and placement of leaves on induction of adventitious buds from leaves of regenerated *Hovenia acerba* shoots

序号 Sequence number	叶片材料 Material of leaves	叶片放置方式 Placement way of leaves	不定芽诱导率 Frequency of adventitious buds induction/%	不定芽诱导数 Adventitious buds number
1	浓绿	正面朝上	$86.7 \pm 3.3a$	$6.22 \pm 0.23a$
2	浓绿	背面朝上	$45.6 \pm 3.8b$	$4.95 \pm 0.24b$
3	黄绿	正面朝上	$2.2 \pm 1.9c$	$1.33 \pm 0.58c$
4	黄绿	背面朝上	0	0

表4 不同 MS 和蔗糖浓度对生根的影响

Table 4 Effects of different concentrations of MS medium and sucrose on rooting rate from leaves of regenerated *Hovenia acerba* shoots

序号 Sequence number	MS 浓度 MS medium concentration	蔗糖浓度 Sucrose concentration/%	生根率 Rooting rate/%	根数 Root number/条	植株生长情况 Growth status
1	1/2	1	$88.9 \pm 1.9c$	$4.42 \pm 0.13e$	根较细长,叶较绿
2	1/2	2	$86.7 \pm 0c$	$4.21 \pm 0.10ef$	根粗且较长,叶绿且大
3	1/2	3	$84.4 \pm 3.8c$	$4.11 \pm 0.14f$	根粗且较长,叶绿且大
4	1/4	1	$95.6 \pm 1.9b$	$5.40 \pm 0.16c$	根细长,叶较黄
5	1/4	2	$94.4 \pm 1.9b$	$4.94 \pm 0.21d$	根较粗且较长,叶绿且大
6	1/4	3	$94.4 \pm 1.9b$	$4.59 \pm 0.17de$	根较粗且较长,叶绿且大
7	1/8	1	$98.9 \pm 1.9a$	$6.33 \pm 0.11a$	根很细长,叶黄且小
8	1/8	2	$98.9 \pm 1.9a$	$5.80 \pm 0.20b$	根较细长,叶较黄
9	1/8	3	$97.8 \pm 1.9ab$	$5.62 \pm 0.28bc$	根极细长,叶较黄

3 讨论与结论

该研究发现,再生植株的叶片通过1种培养基即可实现从愈伤组织到不定芽的诱导等2个过程,这与徐涌等^[5]的报道相一致。该试验还发现,完成这2个过程所需时间远远低于需要消毒的叶片培养方式,这可能是该研究中采用的外植体为无菌的叶片,避免了消毒剂对叶片的伤害,叶片可更好地启动分裂;另外的原因可能是由于外植体来自组培再生苗,其体内的各种激素可能更适用于不定芽的诱导。

此外,在用叶片作为外植体诱导不定芽时,不止叶柄端切口,叶片主叶脉切口也可诱导不定芽,这与董倩等^[6]的报道相同,这可能是一般维管组织周围都有一层或多层特化程度较低的薄壁细胞,比较容易脱分化进入再分化的过程的原因^[7]。同时,还发现叶片材料和放置方式对于不定芽的诱导影响显著,如果选取叶色黄绿或背面朝上,则叶柄端切口只产生愈伤组织,很难诱导分

片材料和叶片放置方式的组合为叶片浓绿且正面朝上放置。

2.4 不同 MS 和蔗糖浓度处理对生根的影响

由表4可知,MS和蔗糖对根的生长有显著影响,表现为随着MS和蔗糖浓度的降低,生根率提高,生根数增加,根变长变细,且MS和蔗糖有着协同作用,最高生根率和根数较最低的分别有近20%和50%的提高。但在试验过程中发现,高生根率处理培养的植株的根较低生根率的处理培养的细长,根毛的着生率也随之降低,且叶片颜色和大小也表现出变黄和变小的趋势。随着培养时间的延长(统计完生根率后),这种变化更加明显,严重的可导致落叶,可能是由于营养缺乏所致,故这类苗应及时练苗和移栽。在移栽过程中发现较粗根和叶色浓绿的再生苗有着快速的定植能力,在很短时间内恢复生长,其中以1/2、1/4MS和2%蔗糖、3%蔗糖形成的4个处理得到的植株为最佳,1/8MS+1%蔗糖处理得到的植株为最弱。综合各处理的生根率、根数和植株生长情况,1/4MS+2%蔗糖表现最佳且经济。

化。这种现象产生的原因可能是由于培养基中的物质不足以支持叶柄端诱导分化所需的养分,还需要吸收叶片提供的某些养分,叶片正是起到滋养看护^[6]的作用。

TDZ在蓬蘽^[8]和龙芽草(待发表)中均可诱导叶片直接产生不定芽。但在该研究中,TDZ不能诱导出不定芽,相反更阻碍了6-BA的诱导效果,这可能跟TDZ也可促进愈伤组织生长的另一个功能有关,因为TDZ具生长素和细胞分裂素双重作用,已有研究表明TDZ促进了喜树愈伤组织的生长^[9]。

以上结果表明,以再生苗叶片为外植体建立起了枳椇的离体快繁体系,即 $1/2\text{MS}+6\text{-BA}$ $2.0\text{ mg/L}+\text{IAA}$ 1.0 mg/L 处理诱导外植体获得的不定芽最佳,最佳外植体和放置方式为生长良好的成熟叶片和正面朝上放置,添加2%蔗糖的 $1/4\text{MS}+\text{NAA}$ 0.1 mg/L 为最适生根培养基。该研究结果也为外植体的获取和保存提供了一条新的途径。

山杏组培繁殖技术研究

郑可¹, 董胜君¹, 田明芳², 刘明国¹, 吴月亮¹, 安成亮¹

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 阜新蒙古族自治县林业科技示范中心, 辽宁 阜新 123000)

摘要:以山杏为试材,研究了外植体的消毒、基本培养基筛选、外植体的种类及不同浓度配比的激素对外植体各阶段生长的影响。结果表明:采用 1.0 g/L 的 HgCl_2 消毒 3 min 灭菌效果最好;以改良 $\text{MS}[\text{C}(\text{NH}_4^+):\text{C}(\text{NO}_3^-)=0.16]$ 为基本培养基,组培苗分化和生长效果较好;最适外植体为茎尖;初代培养最适的激素配比为 1.0 mg/L 的 6-BA 和 0.05 mg/L 的 NAA;继代培养最适的激素配比为 0.5 mg/L 的 6-BA 和 0.1 mg/L 的 NAA。

关键词:山杏;组培;繁殖技术

中图分类号:S 662.204⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0115-04

山杏(*Prunus sibirica*)属蔷薇科李属杏亚属落叶灌木或乔木。山杏是亚洲特有的生态经济型树种,其生态

特性为喜光,耐寒性强,耐干旱瘠薄^[1],是丘陵山区阳坡、半阳坡造林绿化的先锋树种;而且具有优良的水土保持和防风固沙功能,成为我国三北地区水土保持、防风固沙和小流域综合治理等生态建设工程的主要造林树种;山杏同时具有很高的经济价值,主要体现在杏仁、花、树皮、叶、核壳和杏肉等方面;山杏的树形优美,春季先叶开花,花色迷人,也是较好的园林绿化树种。因此,研究山杏的组培技术,为山杏的繁殖提供快速有效的方法,能使山杏在经济、生态、优良品系的保持上发挥重要

第一作者简介:郑可(1987-),女,硕士,现主要从事森林培育等方面的研究工作。E-mail:zhengke19870430@163.com.

责任作者:董胜君(1974-),男,博士,副教授,现主要从事森林培育及种子与苗木培育等研究工作。E-mail:dsj928@163.com.

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(201004034);中央财政林业科技推广示范资金资助项目([2010]02)。

收稿日期:2012-10-22

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996:1725.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:4174-4178.
- [3] 丁向阳. 枳椇种质资源及利用[J]. 经济林研究,2005,23(3):85-88.
- [4] 孙骏威,陈珍,李素芳,等. 枳椇的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2010,46(7):739-740.
- [5] 徐涌,孙骏威,陈珍. 不同植物生长调节物质处理对吴茱萸组织培养

的影响[J]. 浙江农林大学学报,2011,28(3):500-504.

[6] 董倩,李凤玉. 驱蚊草组织培养及其再生体系的建立与优化[J]. 福建师范大学学报(自然科学版),2006,22(1):72-76.

[7] 柯善强,傅俊,桂耀林,等. 裂叶悬钩子器官发生的细胞组织学观察[J]. 植物学报,1989,31(11):889-891.

[8] 刘卫平,孙骏威,李素芳. 蓬蘽的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2009,45(10):1013-1014.

[9] 康大力,张洪利,莫小路,等. TDZ 对喜树愈伤组织生长及色素积累的影响[J]. 生物技术,2012,22(1):83-85.

Study on Optimum for Regeneration System of Leaves in *Hovenia acerba*

SUN Ye-fang¹, ZHENG Qi¹, SUN Jun-wei², CHEN Zhen³, ZHOU Dan²

(1. Shaoxing Academy of Agriculture Sciences, Shaoxing, Zhejiang 312003; 2. Department of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang 310018; 3. School of Life Sciences, Taizhou University, Taizhou, Zhejiang 318000)

Abstract: A regeneration protocol for *Hovenia acerba* were set up via organogenesis from callus derived from leaf disc of regeneration *Hovenia acerba* plants *in vitro*. The results showed that the best explants were mature leaves with dark green color, and the best placement way of explants was face-up; the most appropriate medium for the induction of callus and adventitious buds was 1/2MS + BA 2.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L, with the induction rate more than 85% and proliferation rate more than 6.0; the most appropriate medium for the rooting was 1/4MS + NAA 0.1 mg/L, with addition of 2% sucrose, in which the rooting rate exceeded 95%.

Key words: *Hovenia acerba*; plant growth regulator; leaf disc of regeneration plants; adventitious buds induction; rooting induction