

素心蜡梅组织培养及其体外植株再生技术

赵振利¹, 曹艳春², 刘荣宁³

(1. 河南农业大学 林学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南职业技术学院 环境艺术工程系, 河南 郑州 450046;

3. 河南农业职业学院 农业工程学院, 河南 中牟 451450)

摘要:以素心蜡梅幼嫩叶片和茎段为试材,进行了组织培养及其体外植株再生技术的研究,为其快速繁殖及工厂化生产奠定基础。结果表明:素心蜡梅的茎段为适宜的外植体,其愈伤组织、芽和根诱导的最适培养基分别为 MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA、MS+0.7 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA 和 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA。

关键词:素心蜡梅;组织培养;培养基;植株再生

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)03-0112-04

蜡梅(*Chimonanthus praecox* (L.) Link.)是落叶或半常绿丛生灌木,是我国特有的传统名花,因花开于寒月早春,花黄如蜡,清香四溢,为冬季观赏佳品。蜡梅作为灌木花丛,可进行街道绿化、城市园林景观设计,蜡梅的根、茎、叶、花、果均可入药,蜡梅也是一种重要的香源植物,因此,蜡梅具有重要的经济价值。素心蜡梅(*Chimonanthus praecox* cv. *Luteus*)为蜡梅变种,耐旱和耐半阴,有“早不死的素心蜡梅”之说,因其内外轮花被片均为纯黄色,具有香味浓等特点,市场潜力巨大。目前,国内外对素心蜡梅的研究较少,主要集中于挥发油成分分析、水孔蛋白等方面^[1-2],尚鲜见对其组织培养的研究报道。该研究旨在找出适合素心蜡梅组织培养的基本培养基和植物生长调节剂种类、水平及使用比例,从而建立其高效的体外植株再生体系,以期为其利用生物技术进行新品种培育、无性繁殖及工厂化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为在河南省中牟县白沙镇建立的蜡梅资源圃中选择的2年生素心蜡梅(*Chimonanthus praecox* Link. var. *concolor*)健康植株,取其幼嫩叶片、茎段作为外植体,进行素心蜡梅的组织培养和体外植株再生体系的研究工作。

第一作者简介:赵振利(1979-),男,博士,副教授,研究方向为森林培育。E-mail:zhaozh2006@126.com.

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(200904009)。

收稿日期:2016-10-08

1.2 试验方法

1.2.1 素心蜡梅外植体的预培养 将所采集的素心蜡梅幼嫩叶片、茎段用乙醇(75%)消毒30 s,无菌水清洗后用0.1% HgCl₂消毒5 min,清洗后放置于含有生长调节物质的MS基本培养基(附加蔗糖20 g·L⁻¹,琼脂粉4.6 g·L⁻¹)上,生化培养箱内培养。

1.2.2 素心蜡梅叶片、茎段愈伤组织诱导 在含有蔗糖(20 g·L⁻¹)、琼脂粉(4.6 g·L⁻¹)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)(1.5 g·L⁻¹)的MS培养基中添加NAA和6-BA,其中NAA试验梯度设为0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mg·L⁻¹,6-BA试验梯度设为2、4、6、8、10、12 mg·L⁻¹。将处理过的叶片和茎段分别放入上述添加有各种生长调节物质的培养基中诱导愈伤组织。每个组合共计60个外植体,培养50 d后根据愈伤组织诱导情况确定其适宜的愈伤组织诱导培养基。愈伤组织诱导率(%)=诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体数×100。

1.2.3 生长调节物质诱导素心蜡梅发芽 将诱导产生的素心蜡梅愈伤组织置于MS附加NAA和6-BA的芽诱导培养基上,NAA和6-BA浓度梯度设置同上,在培养室内进行芽的诱导。每个组合60个外植体。30 d时统计芽的分化情况,根据芽诱导率选出适宜的芽诱导培养基。芽诱导率(%)=诱导出芽的外植体数/接种的外植体数×100。

1.2.4 生长调节物质诱导素心蜡梅生根 将素心蜡梅的芽剪下后置于1/2MS生根培养基上,生根培养基中含有浓度梯度为0.0、0.1、0.3、0.5 mg·L⁻¹的NAA,生根诱导试验在生化培养箱内进行。20 d

后计算素心蜡梅的生根情况并依此筛选出适宜的根诱导培养基。根诱导率(%)=生根的芽数/接种的芽总数×100。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2007 和 SPSS 19.0 软件进行处理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 生长调节物质对素心蜡梅叶片、茎段愈伤组织诱导的影响

由表 1 可知,植物生长调节物质对素心蜡梅叶片和茎段愈伤组织有显著的影响。当 NAA 质量浓度为 0.1~1.1 mg·L⁻¹ 时,随着 6-BA 质量浓度的增大,素心蜡梅叶片愈伤组织诱导率逐渐减小;其中当 NAA 质量浓度为 0.9~1.1 mg·L⁻¹ 时,随着 6-BA 质量浓度的增大,素心蜡梅叶片愈伤组织褐化现象十分严重。素心蜡梅叶片愈伤组织诱导率在培养基组合是 MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA 时最大,为 99.89%,素心蜡梅叶片愈伤组织诱导图片见图 1-A。茎段的愈伤组织诱导率受 6-BA 的影响较大,在低浓度 6-BA(2~4 mg·L⁻¹) 时诱导率都达到 100.00%,但随着 6-BA 浓度的增大而迅速降低,其中在培养基组合为 MS+1.1 mg·L⁻¹ NAA+12 mg·L⁻¹ 6-BA 时的诱导率最小为 1.23%,素心蜡梅茎段愈伤组织的诱导情况见图 1-B。综上可知,选择素心蜡梅的茎段为最适外植体,其愈伤组织诱导最适培养基为 MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA。

2.2 生长调节物质对素心蜡梅芽诱导的影响

由表 1 还可知,当 NAA 质量浓度在 0.1~1.1 mg·L⁻¹ 时,随着 BA 质量浓度的增大,叶片愈伤组织芽诱导率均为 0。素心蜡梅茎段愈伤组织芽诱导率也不高,NAA 质量浓度在 0.1~1.1 mg·L⁻¹ 时,随着 6-BA 质量浓度的增大,茎段愈伤组织芽诱导率逐渐增高,其中浓度组合为 MS+0.7 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA 时,茎段的芽诱导率最大为 66.32%。芽诱导试验结果表明,茎段是素心蜡梅的适宜外植体且芽诱导的最适培养基组合为 MS+0.7 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA。素心蜡梅芽诱导试验结果见图 1-C。

2.3 生长调节物质对素心蜡梅根诱导的影响

由表 2 可知,素心蜡梅根诱导的试验结果显示其受生长调节物质的影响较小,素心蜡梅在 1/2MS 培养基都可以促使根生长且生根率均为 100%,但其

中根的生长状况不同,有的纤细而有的粗壮。根据根的具体生长情况筛选素心蜡梅芽生根的适宜培养基组合为 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA。素心蜡梅根诱导结果见图 2。

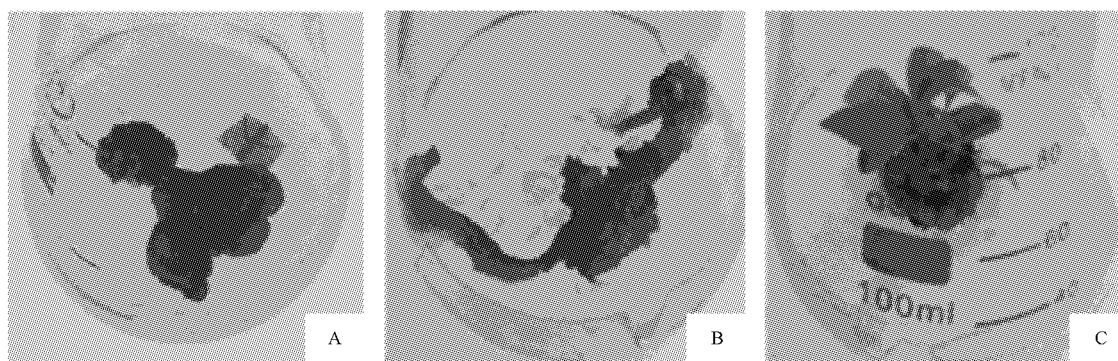
表 1 植物激素对素心蜡梅愈伤组织和芽诱导率的影响

Table 1 Effect of various plant hormone combinations on inductions rate of embryogenic calli and shoot of *Chimonanthus praecox*

植物激素 Phytohormone/(mg·L ⁻¹)		愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%		芽诱导率 Bud induction rate/%	
NAA	6-BA	叶片 Leaf	茎段 Stem	叶片 Leaf	茎段 Stem
0.1	2	42.33d	100.00a	0a	0.00g
0.1	4	25.00e	100.00a	0a	0.00g
0.1	6	10.00f	90.00b	0a	0.00g
0.1	8	0.00g	29.78g	0a	0.00g
0.1	10	0.00g	15.69h	0a	0.00g
0.1	12	0.00g	9.26i	0a	0.00g
0.3	2	90.00ab	100.00a	0a	22.22d
0.3	4	57.23c	100.00a	0a	1.67f
0.3	6	52.36c	100.00a	0a	0.00g
0.3	8	0.00g	75.00de	0a	0.00g
0.3	10	0.00g	42.11f	0a	0.00g
0.3	12	0.00g	8.67i	0a	0.00g
0.5	2	99.89a	100.00a	0a	21.60d
0.5	4	97.33a	100.00a	0a	20.00d
0.5	6	9.20f	90.00b	0a	5.00e
0.5	8	0.00g	80.00c	0a	1.33f
0.5	10	0.00g	40.74f	0a	0.00cde
0.5	12	0.00g	15.00m	0a	0.00g
0.7	2	98.12a	100.00a	0a	66.32a
0.7	4	96.67a	100.00a	0a	50.46b
0.7	6	96.58a	100.00a	0a	36.67c
0.7	8	85.23b	91.67b	0a	10.00e
0.7	10	53.33c	53.33e	0a	0.00g
0.7	12	0.00g	48.33j	0a	0.00g
0.9	2	98.33a	100.00a	0a	24.56d
0.9	4	96.67a	100.00a	0a	10.33e
0.9	6	44.42d	92.00b	0a	1.67f
0.9	8	0.00g	58.33e	0a	0.00g
0.9	10	0.00g	68.42e	0a	0.00g
0.9	12	0.00g	63.33e	0a	0.00g
1.1	2	28.20e	100.00a	0a	0.00g
1.1	4	9.33f	100.00a	0a	0.00g
1.1	6	0.00g	46.40ef	0a	0.00g
1.1	8	0.00g	43.00f	0a	0.00g
1.1	10	0.00g	32.33g	0a	0.00g
1.1	12	0.00g	1.23j	0a	0.00g

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.



注:A. 叶片愈伤组织;B. 茎段愈伤组织;C. 芽诱导。

Note: A. Calli of the leaves; B. Callus from stem segment; C. Bud induction.

图1 素心蜡梅体外植株再生体系建立

Fig. 1 Establishment of the system of *in vitro* plantlet regeneration of *Chimonanthus praecox*

表2 素心蜡梅根诱导结果

Table 2 Result of rooting inducing of *Chimonanthus praecox*

NAA /(mg · L ⁻¹)	生根百分率 Rooting percentage /%	平均根数 Average root number/条	平均根长 Average root length/cm	根生长情况 Root growth
0.0	100	3	2.3	纤细
0.1	100	5	3.2	粗壮
0.3	100	2	1.4	粗壮
0.5	100	2	1.1	粗壮



图2 素心蜡梅根诱导

Fig. 2 Rooting induction of *Chimonanthus praecox*

3 结论与讨论

植物体外植株再生与植物品种、植物基因型和培养条件密切相关,在建立再生体系时,植物生长调节物质的种类和作用浓度因植物品种等因素的不同而差异显著^[3-6]。该研究在素心蜡梅的基本培养基、植物生长调节物质种类和浓度水平方面进行了试验,筛选出了其愈伤组织、芽诱导和根诱导的适宜培养基组合分别为 MS+0.1 mg · L⁻¹ NAA+

2.0 mg · L⁻¹ 6-BA、MS+0.7 mg · L⁻¹ NAA+2.0 mg · L⁻¹ 6-BA 和 1/2MS+0.1 mg · L⁻¹ NAA。该研究发现由于 6-BA 浓度的增大而导致素心蜡梅的愈伤组织诱导率明显降低,说明 6-BA 在细胞脱分化转变为具有分化能力的愈伤组织时具有抑制作用,这些现象在研究泡桐、灰楸等植物的体外植株再生体系时均有体现^[6-7],在素心蜡梅芽诱导率的研究中也发现了相同的规律。此外,加入 NAA 对根诱导有一定的促进作用,查向浩等^[8]研究悬铃木得出了相似的研究结果。该研究发现 6-BA 对愈伤组织和芽诱导有抑制作用,出现这种现象的原因可能是 6-BA 在发挥促进非分化组织分化的功能方面受到了 NAA 的影响。

参考文献

- [1] 李正国,刘明春,邓伟,等.素心蜡梅和红心蜡梅鲜花挥发油成分分析[J].精细化工,2008,25(10):985-989.
- [2] 方子义,宋晓惜,赵世萍,等.素心蜡梅水孔蛋白基因的克隆与序列分析[J].北方园艺,2013(21):99-10.
- [3] BERGMAN B A, MOON H K. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(5): 315-319.
- [4] FAN G Q, ZHAI X Q, ZHAI C J. Callus induction from different *Paulownia* plant leaves and their plantlet regenerations[J]. Journal of Forestry Research, 2001, 12(4): 209-214.
- [5] 余茂云,殷桂香,赵佩,等.植物组织培养过程中器官发生途径再生植株分子机制研究进展[J].科技导报,2015,33(2):91-98.
- [6] 张变莉,王杨,刘荣宁,等.同源四倍体台湾泡桐体外植株再生体系的建立[J].河南农业科学,2015,44(7):119-123.
- [7] 翟晓巧,聂琳,张晓申.灰楸体外植株再生体系建立[J].江西农业学报,2011,23(3):17-19.
- [8] 查向浩,易海艳.二球悬铃木的组织培养和体外植株再生研究[J].安徽农学通报,2010,16(13):72-73.

山杏 SSR-PCR 反应体系优化

张皓凯¹, 董胜君¹, 刘明国¹, 仲维平², 卢彩云¹, 金玲¹

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 南京林业大学 林学院, 江苏 南京 210037)

摘要:以4种山杏群体为试材,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计,研究了适合4种山杏群体的SSR-PCR反应体系。结果表明:总反应体系为20 μ L,其中DNA模板量20 ng,引物浓度0.15 μ mol \cdot L⁻¹, Mg^{2+} 2.0 mmol \cdot L⁻¹,*Taq*聚合酶量1.0 U,dNTPs 0.25 mmol \cdot L⁻¹。采用引物Y45对43个山杏无性系的DNA进行扩增,扩增产物在100~200 bp,多态性良好,稳定度高,可以用于山杏SSR分子标记研究。

关键词:山杏;SSR-PCR;反应体系;优化

中图分类号:S 662.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)03-0115-06

山杏(*Armeniaca sibirica* (L.) Lam.)为野生的蔷薇科杏属植物的统称,为亚洲特有的生态经济型树种,历史悠久,分布较广,大部分处于野生和半野生状态^[1]。同时由于具有自交不亲和的特性,种间杂

交现象普遍。一方面使得山杏种质资源异常丰富,但另一方面也为种质资源的识别、鉴定造成了困难。传统形态学分类不能得到准确的结果^[2]。SSR分子标记是指串联重复DNA序列,一般多为1~5个碱基组成,其广泛分布于基因组的不同位置,长度一般较短^[3]。SSR分子标记技术具有重复性好、共显性遗传、信息量丰富等优点^[4]。而且,国内已有将小麦、海岛棉、仁用杏等作为研究对象,采用SSR分子标记技术,对其遗传多样性进行了研究^[5-7]。针对山杏种质资源的特点,现以西伯利亚杏(*Armeniaca sibirica* (L.) Lam.)、东北杏(*Armeniaca mandshurica* Maxim.)、野杏(*Armeniaca vulgaris* Lam. var. *ansu* (Maxim.) Yü et Lu)和普通杏(*Armeniaca vulgaris* Lam.)为试验材

第一作者简介:张皓凯(1992-),男,辽宁盘锦人,硕士研究生,研究方向为山杏种质资源与多样性。E-mail:zhanghaokail@126.com

责任作者:董胜君(1974-),男,辽宁瓦房店人,硕士,副教授,现主要从事林木种苗和经济林等研究工作。E-mail:dsj928@163.com

基金项目:中央财政林业科技示范推广资助项目(辽A(2015)01)。

收稿日期:2016-09-27

Tissue Culture and Plantlet Regeneration Technology of *Chimonanthus praecox* cv. *Luteus*

ZHAO Zhenli¹, CAO Yanchun², LIU Rongning³

(1. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002; 2. Department of Environmental Art Engineering, Henan Polytechnic College, Zhengzhou, Henan 450046; 3. College of Agricultural Engineering, Henan Vocational College of Agriculture, Zhongmu, Henan 451450)

Abstract: Young stem segments and leaves of *Chimonanthus praecox* cv. *Luteus* were used as materials. A study was conducted on the technology of tissue culture and *in vitro* plantlet regeneration to provide references for the quick propagation and factory production of *Chimonanthus praecox* cv. *Luteus*. The results showed that stem segment was the appropriate explant, and its appropriate media for callus induction, shoot induction and rooting induction were MS+0.1 mg \cdot L⁻¹ NAA+2.0 mg \cdot L⁻¹ 6-BA, MS+0.7 mg \cdot L⁻¹ NAA+2.0 mg \cdot L⁻¹ 6-BA and 1/2MS+0.1 mg \cdot L⁻¹ NAA, respectively.

Keywords: *Chimonanthus praecox* cv. *Luteus*; tissue culture; medium; plantlet regeneration