

栀子花不同外植体愈伤组织诱导及一步成苗的研究

吴丽芳¹, 施晓东¹, 丁伟¹, 张鸭关¹, 陆伟东¹, 罗桂芬²

(1. 曲靖师范学院 云贵高原生物多样性保护研究所, 云南 曲靖 655011; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650201)

摘 要:以栀子花根、茎、叶为外植体, 在 MS 培养基上, 研究不同培养条件下植物生长调节剂对愈伤组织诱导及离体快繁的影响。结果表明: MS 培养基附加 6-BA 1.0~2.0 mg/L, NAA 0.5~1.0 mg/L, 2,4-D 0.5~1.0 mg/L, KT 0.5 mg/L 都可使根、茎、叶诱导形成愈伤组织, 其诱导效果根>茎>叶, 且暗培养条件下的诱导率优于自然条件下的培养, 并选出最佳培养基 MS+6-BA 1.0 mg/L+AA 1.0 mg/L; 以栀子花附芽痕茎段的外植体, 在自然光和暗培养条件下可一步成苗, 其出芽率自然光下优于暗培养条件下, 最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+AA 1.0 mg/L。

关键词: 栀子花; 外植体; 愈伤组织; 离体快繁

中图分类号: S 685.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)12-0202-03

栀子花(*Gardenia jasminoides* Ellis)又名栀子、山栀子, 属茜草科常绿灌木。栀子花喜温暖湿润、好阳光, 但不能经受强烈阳光照射, 适宜在疏松、肥沃、排水良好、轻粘性酸性土壤中生长(pH 5~6), 属典型的酸性花卉。栀子花芳香浓郁、色泽洁白, 有一定的耐荫能力, 具有抗烟尘、抗 SO₂ 能力, 故为良好的绿化、美化、香化植物, 可作林缘、庭前、院后配置点缀植于草坪边缘、行道、厂矿绿化, 还可盆栽观赏, 制作盆景。除具绿化观赏外, 其花、果实、叶和根可入药。花和果实被用作染料, 在我国

云南少数民族有用栀子染色年糕的习俗。栀子果实及花中含有藏花甙、藏花酸、栀子甙、去羟栀子甙、栀子酮甙等成分, 从果实起始, 可分离制备出多种色素, 用于食品着色, 如栀子黄色素在美国、英国、加拿大、挪威和卢森堡等国家均用于食品染色, 特别日本使用量较大。栀子根在我国华南地区, 尤其是广西、广东、福建民间应用十分普遍, 功能清热、凉血、解毒, 民间主要用于黄疸性肝炎、肾炎水肿、感冒高烧、出血吐血等病症的治疗。近年来有关栀子花的研究多有报道, 而多数是关于药物开发利用的^[1-3], 为了满足栀子对其生产要求, 采用组织培养以提高其繁殖系数, 缩短培养时间, 为适宜于工厂化生产达到快繁的目的。

1 材料与方法

1.1 试验设计

选用 MS 作为基础培养基, 附加生长素 2,4-D、NAA、细胞分裂素 6-BA、KT, 其组合见表 1。琼脂用量 0.7%, 蔗糖用量 3%, pH 5.8~6.0。

第一作者简介: 吴丽芳(1980-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为植物生理与组织培养。E-mail: wulifang0871@163.com。

通讯作者: 蓓(1964-), 男, 山东烟台人, 博士, 教授, 现从事濒危物种(灵长类)的行为学, 行为生态学和保护生物学的研究工作。

基金项目: 曲靖师范学院科技创新团队基金资助项目; 云南省教育厅科学研究基金资助项目(06Y133B); 曲靖师范学院研究基金资助项目(0513906)。

收稿日期: 2009-06-25

Study on Change Law of Blossom of *Common calla*

ZHANG Xuan-bo¹, CHEN Xun²

(1. Key Laboratory of Colleges and Universities for Research and Utilization of Distinctive Agricultural Undertakings, Neijiang Normal University, Neijiang Sichuan 641112, China; 2. Department of Science and Technology of Guizhou Province, Guiyang Guizhou 550001, China)

Abstract: Preliminary study on *Common calla* was carried out. The results showed that the flowering period of *Common calla* concentrate from February to May and October to December; prosperous period kept about 45 days in the first half year, and its yield was more than the second half year; Be subjected to the various influence, the quality of flower was not really perfect and need improved; Finally, the article carry on the summary and put forward some suggestions.

Key words: *Common calla*; Law of blossom; The flowering period

1.2 材料来源, 外植体的准备、接种及培养

材料来源于中国科学院昆明植物研究所馈赠的无菌苗。选择生长健壮、无枯黄且具根的培养苗, 在培养室内提前 3~5 d 打开瓶塞, 于正常室温下锻炼驯化。剪下叶(0.5~1 cm)、茎(0.5~1 cm)、根(0.5~1 cm), 用无菌水充分洗净, 在无菌条件下, 分别接种在愈伤组织诱导培养基中, 每种外植体在不同激素浓度组合的培养基上分别接种 24 瓶(①、②、③培养基上接种瓶数加倍), 每瓶接种 6~10 块。将①、②、③培养基上接种的材料半数放入光照培养箱中暗培养。温度 25℃, 湿度 40%~60%, 其余放在自然光条件下进行培养。

1.3 观察记录

培养 10、20、30、40、50 d 后记录其诱导效果的变化, 统计其诱导率、出芽率。诱导率=愈伤组织块数/接种块数×100%; 出芽率=出芽个数/接种数×100%。

表 1 培养基设计					
编号	生长素		胞分裂素		
	2,4-D	NAA	6-BA	KT	
①	1.0	—	1.0	—	
②	1.0	0.5	1.0	0.5	
③	0.5	0.5	1.0	0.5	
④	—	0.5	1.0	—	
⑤	—	1.0	1.5	—	
⑥	—	1.0	2.0	—	
⑦	—	0.5	2.0	—	

2 结果与分析

2.1 不同外植体愈伤组织的形成

栀子花的叶片在 MS 诱导培养基上 5 d 后, 叶片变浅黄, 皱褶, 10~15 d 后开始从切口边缘长出浅黄色愈伤组织, 40~50 d 内达到生长高峰, 以后逐渐停止生长; 茎段在 MS 培养基上, 在形成愈伤组织的过程中, 20~40 d 后伴有新芽的发生, 部分茎段接种 50~60 d 后, 即可长根, 达到一步成苗的快繁过程; 根在 MS 诱导培养基内 25~50 d 内可诱导出愈伤组织。

2.2 不同培养基不同培养条件下愈伤组织的诱导率

从表 2 可以看出, 根、茎、叶 3 种外植体在①、②、③种培养基上诱导效果比较理想, 诱导率没有明显差异, 表明生长素 2,4-D、NAA 配合一定的细胞分裂素 6-BA 和 KT 对愈伤组织的启动具有一定作用。从几种培养基激素组合来看, ②与③相比, 细胞分裂素类物质浓度相同, 差别仅在 2,4-D 上, 其结果根、茎外植体愈伤组织诱导率均为 100%, 叶在②培养基为 82%, ③培养基上为 77%, 因此②培养基较③好。从 2 类培养基的激素组合而言, 说明生长素类物质尤其 2,4-D 对诱导愈伤组织形成起着重要作用。①类和②类培养基相比, 根、茎外植体愈伤组织诱导率相同, 但②类培养基上多加了 2,4-D 和 KT, 一方面, 增加了经济成本, 另一方面, 从后续再分化和植株再生来讲, 2,4-D 浓度高时, 会抑制芽的形成,

适宜的用量范围较窄, 过量常有毒效应, 在诱导分化阶段多用 NAA、IBA、IAA 等。因此, 选择①类组合培养基会更佳。

表 2 暗培养条件下的愈伤组织诱导情况									
激素组合	不同外植体的诱导情况								
	叶			根			茎		
	接种数	出愈数	出愈率/%	接种数	出愈数	出愈率/%	接种数	出愈数	出愈率/%
①	168	168	100	192	192	100	180	180	100
②	222	183	82	174	174	100	150	150	100
③	219	168	77	147	147	100	159	159	100

表 3 自然光条件下愈伤组织诱导情况									
激素组合	不同外植体的诱导情况								
	叶			根			茎		
	接种数	出愈数	出愈率/%	接种数	出愈数	出愈率/%	接种数	出愈数	出愈率/%
①	162	12	7	153	153	100	147	93	63
②	168	141	84	183	177	97	141	132	94
③	171	159	93	165	165	100	177	126	71
④	186	24	13	153	153	100	138	75	54
⑤	165	15	9	141	141	100	153	105	69
⑥	144	6	4	159	159	100	141	126	89
⑦	183	9	5	153	153	100	204	165	81

表 3 统计得出, 在 7 种不同浓度组合的培养基上, 其诱导率根>茎>叶, 根在 7 种培养基上, 除了②类培养基上其诱导率为 97%, 其余均为 100%; 茎的诱导率②>⑥>⑦>③>⑤>①>④; 叶在不同培养基上, 诱导率参差不齐, 在③诱导率最高 93%, 其次是②为 84%, 诱导率最低的是⑥仅 4%, 从表中可以看出, 对于叶愈伤组织诱导, 2,4-D 对它的启动可能起到了重要作用; 根是最佳的外植体选材, 激素浓度 NAA 0.5~1.0 mg/L、6-BA 1.0~2.0 mg/L 都能诱导根、茎、叶形成愈伤组织。

从培养条件来看, 在①、②、③类培养基上, 暗培养的诱导效果明显优于自然光下的培养, 尤其对于叶外植体和茎外植体。这也说明愈伤组织诱导中, 暗培养一定时间较直接光照培养下诱导率高, 且从愈伤组织启动时间观察看, 暗培养较自然光培养下愈伤组织启动可提早 2~5 d。

2.3 不同培养基不同培养条件下茎外植体诱导一步成苗情况

表 4 为暗条件下, 茎段外植体一步成苗的统计结果, 从中可以看出, 出芽率①>②>③。

表 4 暗培养条件下茎外植体诱导一步成苗情况			
激素组合	出芽数	愈伤组织块数	出芽率/%
①	57	180	32
②	21	150	14
③	33	159	21

表 5 为自然光下茎段外植体直接出芽的试验统计, 从出芽率来看, 7 种培养基上并没有显著差异, ①68%>④56%>②51%=⑤51%>③43%>⑥40%>⑦36%,

选择①MS+NAA 1.0+6-BA 1.0 更佳。

从栀子花茎段诱导一步成苗结果比较中, 相同培养基上, 有光的培养远比暗培养效果好, 且研究发现, 茎段附芽痕的外植体可一步成苗, 勿需经愈伤组织诱导、脱分化和再分化过程, 没有芽痕的茎段仅形成愈伤组织。

表 5 自然光条件下茎外植体诱导一步成苗情况

激素组合	出芽数	愈伤组织块数	出芽率/%
①	63	93	68
②	67	132	51
③	54	126	43
④	42	75	56
⑤	54	105	51
⑥	51	126	40
⑦	59	165	36

3 讨论

自 1985 年李启任等用栀子茎段获得再生植株起^[4], 有关栀子花组织培养研究陆续展开了, 到目前为止, 组织培养已是一种较成熟的技术, 差别仅是培养基选择种类、激素组合比例、培养条件和外植体的选材上。在栀子花组培研究中, 多数学者选用茎段, 经增殖、继代培养, 最后诱导生根^[4-9], 各自选出了最佳激素组合的培养基, 建立了植株高频再生体系。该试验采用根、茎、叶为外植体, 在 MS 培养基, 多选用 6-BA、NAA 不同比例在自然光下和暗培养条件下进行愈伤组织诱导, 经 2 a 试验证明, 3 种外植体在 MS 培养基, 适当的 2, 4-D、KT、6-BA、NAA 都能诱导出愈伤组织, 其诱导率与外植体有密切关系, 根> 茎段> 叶, 这结果与前人的研究有所不同^[10-12], 他们的结论多是茎尖> 叶> 茎段。目前, 未见到以根为外植体的研究报道。试验证明, 根最易诱导愈伤组织, 若今后需用愈伤组织如提取某些色素或某些药物成分, 可尝试对根的培养研究。在栀子离体快繁研究

中, 附芽痕的茎段可诱导一步成苗, 这与彭远英等人的研究几乎一致^[13], 试验中筛选出的激素组合浓度也相一致, 现尝试利用自然光和暗培养以降低生产成本, 说明栀子培养中, 对光的要求可能并不十分严格, 同时也证实, 栀子快繁研究中, 茎段将是最佳外植体选材。

参考文献

[1] Liu B Z, Gao Y. Analysis of headspace constituents of Gardenia flower by GC/ MS with solid phase micro-extraction and dynamic headspace sampling[J]. Chinese journal of Chromatography, 2000, 18(5): 452-455.

[2] 李江, 林兴, 黄忠仕, 等. 栀子花根的生药学研究[J]. 华夏医学, 2004, 17(2): 149-151.

[3] 徐娟, 涂炳坤, 邓先珍, 等. 栀子成分开发利用研究进展[J]. 湖北林业科技, 2005(6): 33-38.

[4] 李启任, 陈善娜. 栀子花茎段组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1985(4): 40.

[5] 江洪如. 栀子花试管快速繁殖的研究[J]. 江西科学, 1994(1): 57-60.

[6] 韩传明, 段祖安, 张明忠, 等. 荷兰栀子组织培养和快速繁殖的研究[J]. 山东林业科技, 2003(2): 10-11.

[7] 赵长新, 廉美兰, 朴炫春. 栀子组织培养与快速繁殖[J]. 延边大学农学报, 2005, 27(3): 159-162.

[8] 胡彩英, 刘庆, 唐征, 等. 栀子花的组织培养与快速繁殖[J]. 温州农业科技, 2006(2): 22-23.

[9] 王育选, 石晓荟, 王玉国. 栀子组织培养及快速繁殖研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2008, 28(3): 206-262.

[10] 陆斐, 刘宝光, 刘玉波, 等. 栀子的组织培养快速繁殖技术[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2000(6): 77-79.

[11] 肖潇. 栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)愈伤组织诱导与快繁研究[D]. 成都: 四川大学硕士学位论文, 2005.

[12] 孟志卿. 红栀子愈伤组织诱导研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(20): 6044-6332.

[13] 彭远英, 彭正松, 胥晓. 栀子花组织培养一步成苗[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 476.

Studies on One-step Shoot Formation and Callus Induction of Different Explants from *Gardenia jasminoides* Ellis

WU Li-fang¹, SHI Xiao-dong¹, DING Wei¹, ZHANG Ya-guan², LU Wei-dong¹, LUO Gui-fen²

(1. Yunnan Plateau Institute of Biodiversity Conservation, Qujing Normal University, Qujing, Yunnan 655011, China; 2. Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: The different parts of *Gardenia jasminoides* Ellis were made induced culture. Plant growth regulator with MS for callus induction and in vitro rapid propagation were studied in different culture. According to experiments, MS supplemented with 6-BA 1.0 ~ 2.0 mg/L, NAA 0.5 ~ 1.0 mg/L, 2, 4-D 0.5 ~ 1.0 mg/L, KT 0.5 mg/L can induce callus. Inductive rate presents root> stem> leaf. Darken culture was better than that of natural light. The favourable basic medium for callus induction were MS, which work with NAA 1.0 mg/L and 6-BA 1.0 mg/L. Stem with buds can form one-step shoot in two culture. The budding rate was obtained in natural light. Ms supplemented with NAA 1.0 mg/L and 6-BA 1.0 mg/L was optimal for rapid propagation.

Key words: *Gardenia jasminoides* Ellis; Explants; Callus; *In vitro* rapid propagation