

波叶红果树叶片愈伤组织诱导研究

邢小明, 林夏珍, 王旭艳, 李琳, 阮颖

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300)

摘 要:以波叶红果树无菌苗叶片为外植体,研究了生长素(NAA、2,4-D)、细胞分裂素(6-BA)以及不同植物激素组合对波叶红果树愈伤组织诱导和生长的影响。结果表明:以 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 激素组合愈伤组织诱导效果最佳,诱导率高达 95.00%,生长旺盛。

关键词:波叶红果树;叶片;愈伤组织诱导

中图分类号:S 336;S 686 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0108-03

波叶红果树(*Stranvaesia davidiana* var. *undulate*)属蔷薇科红果树属(*Stranvaesia*)常绿小乔木,野生分布于浙江、江西、湖北、湖南、广西、四川、贵州、云南、陕西等地,在浙江主要分布于淳安、遂昌、龙泉、庆元、云和、景宁、泰顺等海拔 1 300~1 900 m 的山地^[1]。波叶红果树初夏花繁色白,秋末红果累累,经冬不凋,是珍贵的观果花木,株高 30~80 cm,常披散伏地,耐修剪,少病虫害,是应用于园林地被植物的极佳品种之一,在园林应用上具有广阔的发展前景。波叶红果树多采用种子繁殖、扦插嫁接,但繁殖系数较低,远远不能满足市场需求,组织培养快繁是提高波叶红果树繁殖系数的有效手段。白伟琴^[2]以波叶红果树无菌苗的带腋芽茎段为外植体进行离体培养研究,结果表明,在培养基 MS+TDZ 0.20 mg/L 上增殖效果最佳,增殖系数达 6.68,但植株

生长势弱,不利于驯化移栽;在 MS+6-BA 1.0 mg/L 植株生长势较好,但增殖系数仅为 3.94,不能满足工厂化、规模化生产。国内对波叶红果树愈伤组织诱导的研究尚鲜见报道。现以波叶红果树叶片为外植体,研究了波叶红果树愈伤组织诱导的最佳诱导条件,以期提供波叶红果树快繁的最佳途径及愈伤组织的增殖分化培养奠定理论与技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为生长 30 d 的波叶红果树组培苗。将波叶红果树叶片在超净工作台内剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,接种在不同激素浓度与激素组合的 MS 培养基中。在蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.8,温度 25℃,暗培养(无光照)条件下培养。

1.2 试验方法

1.2.1 单激素对愈伤组织诱导的影响 以 MS 为基本培养基,单独添加 2,4-D、NAA、6-BA,浓度均为 0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/L。每处理接外植体数 20 个,3 次重复,25 d 后统计其诱导率、褐化率。

第一作者简介:邢小明(1987-),女,硕士,研究方向为园林植物栽培与管理。E-mail: xingxiaoming5719@126.com.

责任作者:林夏珍(1965-),女,博士,教授,现主要从事园林植物栽培与应用研究工作。E-mail: linxz100@souhu.com.

收稿日期:2013-01-25

Study on the Callus Induction from *Epimedium koreanum* Nakai

WANG Jing, LI Jing, JIA Ling-yun, ZENG Wen-wen, LIU Peng-peng, LU Jin-cai

(School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning 110016)

Abstract: Taking the young leaf, stem apex and petiolesuitable of *Epimedium koreanum* Nakai as explants, the condition of its callus induction was studied, in order to provide scientific basis for large scale production of tissue culture. The results showed that the stem apex was the best production material of tissue culture. The optimum medium for callus induction was MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L. In the temperature of 25℃, the induction effect was good under the cultured conditions of dark, and taken out, then cultured in the light intensity 2 000 lx.

Key words: *Epimedium koreanum* Nakai; callus; induction

1.2.2 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响 以 MS 为基本培养基,6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L)、2,4-D(0.1、0.5、1.0 mg/L)、NAA(0.1、0.5、1.0 mg/L),采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,共 9 个处理(表 1)。每处理接外植体数 20 个,3 次重复,25 d 后统计诱导率、褐化率。诱导率(%)=愈伤组织诱导数/接种外植体数 \times 100;褐化率(%)=褐化外植体数/接种外植体数 \times 100。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验设计

处理	6-BA/mg \cdot L $^{-1}$	2,4-D/mg \cdot L $^{-1}$	NAA/mg \cdot L $^{-1}$
1	0.5	0.1	0.1
2	0.5	0.5	0.5
3	0.5	1.0	1.0
4	1.0	0.1	0.5
5	1.0	0.5	1.0
6	1.0	1.0	0.1
7	2.0	0.1	1.0
8	2.0	0.5	0.1
9	2.0	1.0	0.5

1.3 数据分析

通过观察记录数据,统计其诱导率及褐化率,并运用 Excel 和 SPSS 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织形态

接种 7 d 后叶片普遍出现明显的膨大、反曲现象,14 d 后叶片切口处出现少量愈伤组织,出现黄绿色或白色的瘤状愈伤组织,其中具叶脉的切口部位先产生愈伤组织。随着时间的延长,愈伤组织体积逐渐增大,但经过 25 d 之后,愈伤组织体积增大现象不明显。从形态和质地上可分为以下 3 种类型:I 型,乳白色或白色,质地松软;II 型,透明,质地疏松;III 型,淡黄绿色或半透明白色,表面呈突起小颗粒状,质地致密。

2.2 单激素对愈伤组织诱导的影响

将波叶红果树无菌苗叶片分别接种在添加不同浓度 6-BA、2,4-D、NAA 的 MS 培养基上,进行不同激素对愈伤组织诱导的影响试验。研究表明,单独使用 6-BA,诱导率极低,最高达到 3.33%(6-BA 1.0 mg/L),且褐化率高达 36.67%。其余处理无愈伤组织形成。

2.2.1 单独使用 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响 由表 2 可知,单独使用 2,4-D,在一定范围内诱导率随着激素浓度升高而升高,2,4-D 为 1.00 mg/L 时,诱导率最高,达 91.67%,与浓度为 0.10、0.50 mg/L 的处理均无显著性差异($P<0.05$)。单独使用 2,4-D 诱导的愈伤组织多为 I、II 型愈伤组织。2,4-D 浓度过大(4.0 mg/L)时,对愈伤组织诱导产生了明显的抑制作用。植物激素浓度过大,不利于愈伤组织的形成,且容易出现褐化现象。诱导愈伤组织的最佳激素种类及浓度范围为 2,4-D 0.10~1.00 mg/L。

表 2 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

2,4-D 浓度/mg \cdot L $^{-1}$	诱导率/%	褐化率/%	产生愈伤组织量
0.05	56.67b	0.00a	+
0.10	85.00a	5.00b	++
0.50	90.00a	6.67bc	+++
1.00	91.67a	8.33cd	+++
2.00	58.33b	11.67d	++
4.00	28.33c	21.67e	-

注:“-”无愈伤组织产生;“+”产生愈伤量极少;“++”产生愈伤量较少;“+++”产生愈伤量一般;“++++”产生愈伤量较多;“+++++”产生愈伤量很多。下同。

2.2.2 单独使用 NAA 对愈伤组织诱导的影响 由表 3 可知,单独使用 NAA,在一定范围内,诱导率随着激素浓度升高而升高,褐化率随着 NAA 浓度升高而降低,但过高的 NAA 浓度(4.00 mg/L)易出现褐化现象,不利于愈伤组织形成。浓度 NAA 为 1.00 mg/L 时,诱导率最高,褐化率最低,此处理与浓度为 2.00 mg/L 时的诱导率、褐化率在 $P<0.05$ 均无显著差异,但与其它处理的诱导率有显著差异。因此,单独使用 NAA 的最佳浓度为 1.00~2.00 mg/L。

表 3 不同浓度 NAA 对愈伤组织诱导的影响

NAA 浓度/mg \cdot L $^{-1}$	诱导率/%	褐化率/%	产生愈伤组织量
0.05	5.00c	40.00b	+
0.10	6.67bc	35.00b	+
0.50	13.33b	30.00ab	+
1.00	28.33a	26.67a	++
2.00	25.00ab	33.33ab	++
4.00	8.33bc	38.33b	+

2.3 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

由表 4 可知,细胞分裂素和生长素的结合促进了波叶红果树愈伤组织诱导。通过 6-BA、2,4-D、NAA 各因素水平的比较,得到最佳的水平组合为处理 5(MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L),此时诱导率达 95.00%,并与处理 4 无显著性差异($P<0.05$),但与其它处理的诱导效果具显著性差异。不同激素组合处理形成的愈伤组织多为淡黄绿色,结构致密,生长状态良好,产生愈伤组织的量也较多,这与单独使用植物激素产生的愈伤组织形态有很大不同,这主要是生长素与细胞分裂素相互作用共同影响的结果。

表 4 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

处理	诱导率/%	褐化率/%	产生愈伤组织量
1	41.67e	36.67d	+++
2	78.33bc	11.67ab	+++
3	75.00bc	30.00cd	+++
4	83.33ab	10.00ab	+++
5	95.00a	8.33ab	+++++
6	80.00b	5.00a	+++++
7	65.00cd	15.00b	+++++
8	71.67bc	23.33c	+++
9	63.33d	30.00cd	+++

3 结论与讨论

该研究结果表明,单独使用 6-BA、NAA 诱导率较

低,褐化率较高,说明单独使用 6-BA、NAA 不利于叶片愈伤组织的诱导;单独使用 2,4-D,当浓度为 0.10、0.50、1.00 mg/L 时,诱导率较高,分别为 85.00%、90.00%、91.67%,褐化率较低且多形成 I 型愈伤组织。6-BA、2,4-D、NAA 3 种激素正交实验处理,MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 为最佳培养基,其诱导率为 95.00%,褐化率仅 8.33%。

作为建立再生体系的前提和基础,愈伤组织的诱导是非常关键的。植物生长调节剂是植物愈伤组织诱导和分化的重要因素之一,能否诱导出优良的愈伤组织,所使用的植物生长调节剂的种类和浓度最为重要^[3]。多数植物在离体培养诱导愈伤组织时通常都需要添加 NAA、IAA、2,4-D 等多种生长调节剂^[4],而该试验探索了 NAA、2,4-D、6-BA 及其不同激素配比对波叶红果树愈伤组织诱导的影响。试验结果表明,使用的植物生长调节剂及其浓度不同,愈伤组织诱导率、褐化率以及愈伤组织的大小和形态等各不相同。MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 为最佳培养基,其诱导率为 95.00%,愈伤组织生长旺盛。

在诱导波叶红果树愈伤组织形成过程中,单独使用生长素类物质 NAA、2,4-D 均产生愈伤组织,但 2,4-D 诱导愈伤效果明显优于 NAA,其愈伤组织诱导率及形成的量远大于 NAA,由此表明,就生长素而言,2,4-D 对诱导波叶红果树愈伤作用优于 NAA。此结果与‘Arapaho’黑莓^[5](*Rubus* spp. ‘Arapaho’)研究结果一致。

不同浓度的 6-BA 诱导作用不太理想,各处理诱导率较低且产生愈伤组织的量极少,这与何浚等^[6]、李琰等^[7]对杜仲(*Eucommia ulmoides*)的研究结果相一致,但与朱向涛^[8]对牡丹(*Paeonia osstii* ‘Fengdan’)及宁强等^[9]对冬枣(*Zizyphus jujuba*)的研究结果不一致。这可能是由于不同植物愈伤组织形成所需要的激素种类不同所造成的。

另外,大量基础试验表明,波叶红果树叶片不同部位对愈伤组织诱导的影响无显著性差异,这可能是因为波叶红果树无菌苗叶片较小,其结构对形成愈伤的影响作用也较小;在形成愈伤组织过程中,光照、黑暗条件对

诱导愈伤无显著性差异,主要原因可能是诱导愈伤对光照条件要求不高;叶片近轴面与叶片远轴面接触培养 2 种放置方式对波叶红果树叶片愈伤组织形成无显著影响。这与苹果(*Malus domestica*)叶片^[10-11]愈伤组织研究结果不一致,可能是因为不同植物叶片结构有差异而导致对愈伤诱导影响有很大不同。

愈伤组织具有易于繁殖、生长同步、细胞组成均一、培养条件可控、处理方便等优点^[12]。但要使愈伤组织发育成一个完整的植物体,还要经过诱导再分化阶段,这也是波叶红果树实现快速繁殖的又一个关键技术环节。现以波叶红果树离体叶片为外植体诱导愈伤组织获得成功,但对于波叶红果树愈伤组织诱导分化技术的研究尚鲜见报道,有待以后进一步研究。

参考文献

- [1] 韦直,何业祺. 浙江植物志[M]. 3 卷. 杭州:浙江科学技术出版社,1986.
- [2] 白伟琴. 波叶红果树离体培养再生体系建立及试管开花研究[D]. 临安:浙江农林大学,2011.
- [3] 王玉英,高新一. 植物组织培养技术手册[M]. 北京:金盾出版社,2006.
- [4] 翟丙年,郑险峰,杨岩荣,等. 植物生长调节物质的研究进展[J]. 西北植物学报,2003,23(6):1069-1075.
- [5] 王鲁北,张春红,王小敏,等. ‘Arapaho’黑莓叶片与叶柄愈伤组织的诱导[J]. 中国南方果树,2011,40(2):19-23.
- [6] 何浚,申延,秦俊哲,等. 杜仲愈伤组织诱导与增殖的研究[J]. 陕西科技大学学报,2006,24(2):21-25.
- [7] 李琰,姜在民,唐锐. 杜仲叶片愈伤组织诱导的激素优化研究[J]. 植物研究,2006,26(2):182-186.
- [8] 朱向涛. 凤丹体胚发生及愈伤组织诱导芽分化研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2010.
- [9] 宁强,刘晓光,刘孟军. 冬枣叶片愈伤组织诱导研究[J]. 河北林果研究,2008,23(4):348-352.
- [10] 崔美,焦其庆,陈学森,等. 苹果叶片愈伤组织的诱导培养[J]. 山东农业科学,2012,44(3):17-20.
- [11] 李艳红,冯宝焜. 苹果砧木 M26 离体叶片愈伤组织发生及分类研究[J]. 果树科学,1999,16(4):259-262.
- [12] Thulaseedharan A, Vaidyanathan C S. Induction of callus and plant regeneration in *Vicco indica* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990(10):45-48.

Study on Callus Inducement of Leaf Explant from *Stranvaesia davidiana* var. *undulate*

XING Xiao-ming, LIN Xia-zhen, WANG Xu-yan, LI Lin, RUAN Ying

(School of Landscape and Architecture, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300)

Abstract: Taking leaves of tube plantlets of *Stranvaesia davidiana* var. *undulate* as explants, the effects of different concentrations of 2,4-D, NAA, 6-BA and different hormone combinations on the status of callus induced were studied. The results showed that callus of most vigorous growth were induced by the media 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L, and the induction rate reached 95.00%.

Key words: *Stranvaesia davidiana* var. *undulate*; leaf; callus inducement