

# 南天竹离体初代培养条件优化

刘中兵, 孟媛

(武汉生物工程学院 园林系, 湖北 武汉 430415)

**摘 要:**以南天竹茎段为试材, 采用正交设计对初代培养中基本培养基类型、BA 浓度、NAA 浓度、蔗糖浓度 4 个因素进行优化, 旨在筛选最佳组合, 以提高初代培养的诱导率。结果表明: 4 个因子对南天竹愈伤组织或芽的诱导影响程度依次为基本培养基类型、蔗糖浓度、BA 浓度、NAA 浓度; 初代培养外植体的诱导最佳组合为 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+20 g/L 蔗糖, 诱导率达 74.4%。

**关键词:**南天竹; 离体; 初代培养; 正交设计; 诱导率

**中图分类号:**S 795.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0093-04

南天竹(*Nandina domestica* Thunb) 属小檗科南天竹属常绿小灌木, 是观花观果的佳品, 适于窗前、阶下、花台丛植或入口对植, 也可盆栽观赏, 亦可种植在植物群落下层, 丰富景观层次。同时, 其根、茎、叶均可入药, 因此, 集生态、观赏、药用等多种价值于一身的南天竹开发利用前景较大<sup>[1-3]</sup>。开发利用需要大量的种苗, 利用组织培养技术可以高效快速的繁殖南天竹, 黄一青等<sup>[4]</sup>、杜永芹等<sup>[5]</sup>、蒋泽平等<sup>[6]</sup>、王春等<sup>[7]</sup>先后建立了南天竹的离体培养体系, 并获得了试管苗。从报道来看, 南天竹在离体初代培养时, 其愈伤组织或芽的诱导率不高, 对其深入试验具有一定的限制。因此, 该试验拟采用正交设计, 对初代培养的几个重要的影响因子, 基本培养基类型、BA 浓度、NAA 浓度以及蔗糖浓度进行优化, 旨在筛选出最佳组合, 提高初代培养的诱导率, 为后续试验奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2011 年 9 月底采集位于武汉生物工程学院的南天竹无病毒、生长健壮的当年生枝条, 截取上部幼嫩茎段作为外植体。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料灭菌 用自来水冲洗茎段 20 min, 在无菌室内先浸入 75% 酒精中 20 s, 用无菌水冲洗 3 次后置于 1 g/L HgCl<sub>2</sub> 中消毒 7 min<sup>[8]</sup>, 为了克服内生菌污染, 在

培养的过程中, 培养基中添加了 1.5 g/L 的 50% 多菌灵可湿性粉剂<sup>[9]</sup>。

1.2.2 初代培养设计 为了探讨基本培养基类型, 不同浓度的 BA、NAA 和蔗糖对南天竹初代培养的影响, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计(表 1), 以筛选出最佳组合。将灭菌处理的材料在超净工作台内无菌条件下, 切成 0.5 cm 长的小段保持极性接入所制备的培养基, 每种处理接种 30 个, 重复 3 次, 培养 30 d 后统计诱导率。培养基中添加 0.7% 琼脂, pH 5.8。

表 1 南天竹茎段诱导试验  
L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计的因素和水平

Table 1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal design factors and levels of  
*Nandina domestica* Thunb stem section induction test

水平 Level	基本培养基类型 The basic culture medium type (A)	因素 Factor		
		BA 浓度 BA concentration /(mg · L <sup>-1</sup> ) (B)	NAA 浓度 NAA concentration /(mg · L <sup>-1</sup> ) (C)	蔗糖浓度 Sucrose concentration /(g · L <sup>-1</sup> ) (D)
1	1/2MS	0.5	0.3	20.0
2	MS	1.0	0.2	40.0
3	B <sub>5</sub>	1.5	0.1	60.0

1.2.3 培养条件 培养室温度(25±2)℃、每天光照 10~12 h, 光照强度 2 000~3 000 lx。

1.2.4 不同处理对外植体初代培养诱导情况 将外植体接入处理编号为 1~9 号的培养基中(表 2), 培养 30 d 时, 记录外植体的诱导数(包括愈伤化、萌发数)、计算其诱导率。

1.2.5 不同因素对外植体诱导情况的影响 对基本培养基类型、BA 浓度、NAA 浓度和蔗糖浓度不同水平进行 SSR 检验, 比较 4 个因素对外植体诱导情况的影响。

**第一作者简介:**刘中兵(1978-), 男, 湖北枝江人, 硕士, 副教授, 现主要从事植物资源利用与繁殖等研究工作。E-mail: lzb\_whsw@sohu.com.

**基金项目:**湖北省自然科学基金资助项目(2009CDZ034); 湖北省高等学校青年教师深入企业行动计划资助项目(XD2012507)。

**收稿日期:**2014-12-16

表 2 外植体诱导结果

Table 2 Results of the explant induction

处理 Treatment	因素 Factor				诱导率 Induced frequency/%			
	A	B	C	D	重复 1	重复 2	重复 3	均值
					Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	Average
1	1	1	1	1	13.3	13.3	16.7	14.4
2	1	2	2	2	33.3	30.0	36.7	33.3
3	1	3	3	3	13.3	10.0	6.7	10.0
4	2	1	2	3	33.3	33.3	36.7	34.4
5	2	2	3	1	73.3	80.0	70.0	74.4
6	2	3	1	2	20.0	23.3	23.3	22.2
7	3	1	3	2	3.3	6.7	3.3	4.4
8	3	2	1	3	10.0	6.7	6.7	7.8
9	3	3	2	1	26.6	30.0	30.0	28.9

2 结果与分析

2.1 不同处理对外植体初代培养诱导情况

所有处理均使外植体出现了启动现象,接种在 5 号培养基的诱导率最高,平均值达到 74.4%,且大部分诱导的愈伤组织出现在茎节部分(图 1);部分茎段萌发出芽,生长旺盛(图 2);随着培养的深入,培养物不断地增殖(图 3、图 4)。由表 3 方差分析可知,不同的基本培养



图 1 处理 5 培养 30 d 时愈伤组织状态  
Fig. 1 Callus status after 30 days (treatment 5)

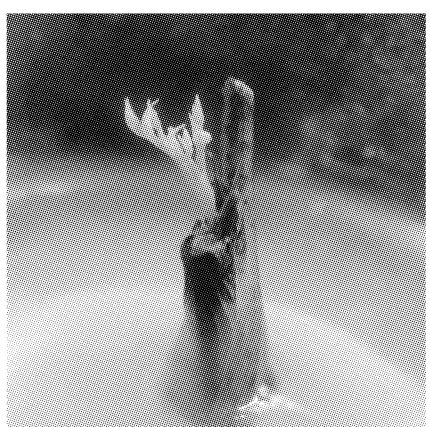


图 2 处理 5 培养 30 d 时芽萌发状态  
Fig. 2 Bud germination status after 30 days (treatment 5)



图 3 处理 5 培养 60 d 时愈伤组织增殖  
Fig. 3 Callus growth after 60 days (treatment 5)



图 4 处理 5 培养 60 d 时芽增殖  
Fig. 4 Bud growth after 60 days (treatment 5)

表 3 外植体诱导试验的方差分析

Table 3 Variance analysis of the explant induction

变异来源 Source of variation	df	ss	S <sup>2</sup>	F	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
A	2	4 581.6	2 290.8	290.0**	3.55	6.01
B	2	2 302.6	1 151.3	145.7**	3.55	6.01
C	2	1 586.4	793.2	100.4**	3.55	6.01
D	2	2 562.4	1 281.2	162.2**	3.55	6.01
误差 Error	18	141.5	7.9			
总变异 Total variation	26	11 174.5				

注:\*\*表示在 0.01 水平上差异极显著。  
Note:\*\* shows significant difference at 0.01 level.

基类型、BA 浓度、NAA 浓度和蔗糖浓度对外植体的诱导有极显著的影响。

2.2 不同因素对外植体诱导情况的影响

由表 4 可知,基本培养基类型、BA 浓度、NAA 浓度和蔗糖对南天竹外植体诱导都有影响。通过极差法分析得出  $R_A=30.0$ 、 $R_B=20.7$ 、 $R_C=17.4$ 、 $R_D=21.8$ ,故影响外植体诱导率最大的因素为基本培养基类型,其次是蔗糖浓度,然后是 BA 浓度、NAA 浓度。

表 4

基本培养基 3 个水平对诱导影响的 SSR 检验

Table 4

SSR test of 3 basic culture medium effect on induced

水平 Level	基本培养基诱导率均值 Average of the basic culture medium induced frequency/ %	BA 诱导率均值 Average of BA induced frequency/ %	NAA 诱导率均值 Average of NAA induced frequency/ %	蔗糖诱导率均值 Average of sucrose induced frequency/ %
1	19. 3aA	17. 8aA	14. 8aA	39. 2aA
2	43. 7bB	38. 5bB	32. 2bB	20. 0bB
3	13. 7cC	20. 4aA	29. 6bB	17. 4bB

2.2.1 基本培养基类型对外植体诱导的影响 基本培养基是植物组织培养的物质基础,也是植物组织培养能否获得成功的重要因素之一<sup>[10]</sup>。由表 4 可知,1/2MS、MS、B5 对外植体诱导的影响差异极显著。根据各水平的平均值大小进行比较,MS 诱导率最高,达 43.7%,所以,外植体诱导基本培养基首选 MS。

2.2.2 BA 浓度对外植体诱导的影响 细胞分裂素在组织培养中的主要作用是促进细胞的分裂和分化,诱导胚状体和不定芽的形成<sup>[10]</sup>。由表 4 可知,水平 1、3 对外植体的诱导影响差异不明显;水平 2 对外植体的诱导有极显著的影响。根据各水平的平均值大小进行比较,1.0 mg/L BA 诱导率最高,达 38.5%,所以,BA 浓度首选水平 2。

2.2.3 NAA 浓度对外植体诱导的影响 在组织培养中,生长素主要是用于诱导愈伤组织的形成,根的分化以及细胞的分裂和伸长<sup>[10]</sup>。由表 4 可知,水平 2、3 对外植体的诱导影响差异不显著,其平均诱导率均比水平 1 高,且差异达极显著水平。所以,NAA 浓度水平可选 2 或 3。

2.2.4 蔗糖浓度对外植体诱导的影响 糖类物质是培养物重要的碳源,在培养基中提供培养物所需的碳骨架和能源外,还可在一定程度调节培养基的渗透压,影响细胞的增殖和分化,一般来说,蔗糖是最好的糖源<sup>[10]</sup>。由表 4 可知,水平 2、3 对外植体的诱导影响差异不显著;水平 1 对外植体诱导的影响比水平 2、3 有极显著的差异,且平均诱导率是最高,因此,蔗糖浓度首选水平 1。

综上所述,在植物组织培养中,基本培养基和蔗糖是组织培养的物质基础,对外植体的启动有重要影响;植物生长调节物质则影响植物细胞的分裂、分化、发育,细胞分裂素和生长素配合使用,对外植体的诱导具有重要作用。选取各因素的最优水平,即 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+20.0 g/L 或 MS+BA 1.0 mg/L+

NAA 0.1 mg/L+20.0 g/L 蔗糖为最佳组合。结合表 1 正交实验方案和表 2 的外植体诱导率结果可以看出,5 号处理的诱导率均值为 74.4%,为 9 个处理中的最高值,因此该试验中 5 号处理为外植体诱导的最佳配方。

### 3 结论

该试验以南天竹幼嫩茎段作为外植体,基本培养基类型、BA 浓度、NAA 浓度以及蔗糖浓度对外植体的启动具有不同程度的影响,效应最大的是基本培养基类型,其次是蔗糖浓度、BA 浓度、NAA 浓度;诱导效果最佳的组合是 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+20.0 g/L 蔗糖,诱导率达 74.4%。

通过该试验优化了南天竹初代培养的条件,建立了南天竹的离体培养体系,为其快繁和遗传改良奠定了基础。但其增殖、生根培养、练苗、移栽等相关技术,都有待进一步的研究。

### 参考文献

- [1] 刘锦春. 南天竹资源利用与开发研究[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(6):22-23.
- [2] 卓丽环,陈龙清. 园林树木学[M]. 北京:中国农业出版社,2004:155.
- [3] 唐丽,刘友全. 南天竹种质资源及利用[J]. 湖南环境生物职业技术学院学报,2007,9(3):5-6.
- [4] 黄一青,王青华. 火焰南天竹的组织培养[J]. 农业科技通讯,2002(11):17.
- [5] 杜永芹,倪林娟,王玉勤. 耐寒彩叶树种火焰南天竹的快繁技术研究[J]. 上海农业学报,2004,20(4):1-4.
- [6] 蒋泽平,王福银,徐招娣,等. 火焰南天竹离体保存技术研究初报[J]. 江苏林业科技,2010,6(3):7-8.
- [7] 王春,张俊林. 南天竹组培快繁技术[J]. 林业科技开发,2011(2):85-88.
- [8] 赖玉洁,路丙社,陈书明,等. 青榨槭外植体消毒方法初步研究[J]. 河北林果研究,2007,22(2):144.
- [9] 周俊辉,周厚高. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物,2003,23(1):41-47.
- [10] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京:中国林业出版社,2005:37-46.

## Optimization of Primary Culture Conditions *in vitro* of *Nandina domestica* Thunb

LIU Zhong-bing, MENG Yuan

(Department of Landscape Architecture, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)



DOI:10.11937/bfyy.201505030

# 黑果腺肋花楸组织培养和快繁体系的优化研究

刘 青, 刘 颖, 李冬杰, 闫素红, 张冠华, 魏景芳

(河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050000)

**摘 要:**以黑果腺肋花楸带芽茎段为试验材料,采用组织培养的方法,研究不同激素含量和配比对其组织培养和快速繁殖的影响。结果表明:茎段在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上诱导芽最快最好,KT 能诱导愈伤组织,但对试管苗的芽诱导无明显影响;在 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L 培养基上继代 1 次,增殖系数就能达 6 倍以上;生根培养基 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 效果最好,生根率近 100%;移栽基质以草炭土:营养土:蛭石=1:2:1 的基质中最好,成活率达 100%。

**关键词:**黑果腺肋花楸;组织培养;优化;快速繁殖

**中图分类号:**S 687.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0096-04

黑果腺肋花楸(*Aronia melanocarpa*)属蔷薇科腺肋花楸属落叶灌木。树高 1.5~3.0 m。羽状单叶,复伞状花序,入秋叶色变红,抗旱抗病耐寒。浆果,果实为紫黑色球形,直径 1.5 cm 左右。根系属浅根性,水平根发达<sup>[1]</sup>。该树种在欧美和东亚地区园林绿化方面应用广泛。黑果腺肋花楸果实中的花青素和黄酮能够维持人的心脏和机体的健康,多酚类物质能够抑制人体内低密度蛋白和脂质体的氧化,对于预防心脏疾病和癌症、保持人体健康具有显著效果<sup>[2-3]</sup>。由其果实加工的药品、保健饮料和食品在市场上非常普及和流行<sup>[4]</sup>。因此,为满足庞大的市场需求,需要对其进行大规模的栽培。目前,有关其组织培养的研究已有报道,但仍有不少问题需深入研究<sup>[5-8]</sup>。该试验主要对黑果腺肋花楸组织培养和快速繁殖体系的进行了一系列的优化研究,以期整体提高组培的效率,实现其长期工厂化快速繁育的目的。

**第一作者简介:**刘青(1989-),女,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向为生物工程。E-mail:906459401@qq.com.

**责任作者:**魏景芳(1957-),男,河北沧州人,博士,教授,现主要从事植物细胞工程等教学与科研工作。E-mail:wjfang@126.com.

**基金项目:**河北省科技厅资助项目(14230910D)。

**收稿日期:**2014-11-10

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料采集于河北科技大学生物科学与工程学院植物组织培养实验室苗圃基地,以含有 1~2 个芽眼的黑果腺肋花楸 2 cm 幼嫩茎段为外植体。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体处理** 取 2 cm 带顶芽或腋芽的幼嫩茎段用流水冲洗 60 min,75%酒精浸泡消毒 40 s,0.1%升汞溶液消毒 4 min,无菌水冲洗 4~5 次,用滤纸吸去水分,将消毒后的外植体接种于不同的培养基上。每瓶接种 4 个茎段,每个编号接种 20 瓶,培养基中蔗糖浓度为 3%,琼脂浓度为 0.8%,pH 5.8。培养温度(25±2)℃,光照时间 10 h/d,光照强度 1 700 lx 左右。

**1.2.2 培养基配方** 试验所用培养基的具体配方见表 1。

**1.2.3 练苗** 当生根苗长至 5 cm 时,置于温室中逐渐揭去瓶盖练苗 4 d。然后用镊子将苗取出用流水洗去根部培养基。再用稀释 800 倍的多菌灵溶液浸过后,然后栽入苗床上,苗床基质分 4 个处理:营养土、草炭土、草炭土+营养土+蛭石(1:2:1)以及营养土+蛭石(2:1),定期浇以营养液,观察黑果腺肋花楸的生长状况,统计其成活率,并进行比较。

**Abstract:** The regenerations of *Nandina domestica* was investigated by using *in vitro* stem sections by the orthogonal experimental design. Stem sections were cultured on different basic medium supplemented different concentrations of benzyladenine (BA) in combination with different concentrations of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) and sugar, the experiment was to select the optimum combination, to improve callus formation. The results showed significant differences in the percentage of callus formation were observed among the basic medium, sugar, BA and NAA. The highest percentage of callus formation (74.4%) was obtained on MS medium with 1.0 mg/L BA, 0.2 mg/L NAA and 20 g/L sugar.

**Keywords:** *Nandina domestica* Thunb.; *in vitro*; primary culture; the orthogonal experimental design; the percentage of induction