

DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201803023](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201803023)

牛角瓜种子萌发和组培快繁技术研究*

严乔顺^{1,2}, 何俊¹, 李村富¹, 耿彦飞^{1,2}, 阎凯¹, 许建初^{1**}

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 资源植物与生物技术重点实验室, 云南昆明 650201;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 【目的】对牛角瓜种子萌发及组培快繁技术进行研究, 使其在短期内大量萌发和快速扩繁。【方法】用机械破壳处理使种子快速萌发, 以无菌苗带芽茎段为外植体, 选择不同的基本培养基和植物生长调节剂, 对牛角瓜组培快繁技术进行研究。【结果】牛角瓜种子物理休眠使种子萌发不均一, 机械破壳处理后种子萌发率达 98%, 发芽指数为 29.6; 与对照组相比, 萌发率提高 24%, 发芽指数提高 21。在 MS+2.0 mg/L 6-BA 培养基上培养时, 外植体芽的诱导率最高及平均芽最多, 分别为 100% 和 4.9; 最适生根培养基为 WPM+0.15 mg/L IBA, 其生根率和平均根数分别为 100% 和 11.6 条。以 WPM 为基本培养基的牛角瓜苗移栽成活率达 90%, 与以 1/2 MS 为基本培养基的牛角瓜相比, 其成活率提高了 30%。【结论】该研究提供了合适的牛角瓜种子萌发方法并建立了组培快繁体系, 为其短期内大量繁殖提供理论基础与技术指导。

关键词: 牛角瓜; 种子休眠; 组培快繁; 发芽指数; 萌发率

中图分类号: S 642.904.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2019)02-0318-07

Study on the Seed Germination and Rapid Propagation Technology of *Calotropis gigantea*

YAN Qiaoshun^{1,2}, HE Jun¹, LI Cunfu¹, GENG Yanfei^{1,2}, YAN Kai¹, XU Jianchu¹

(1. Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Purpose] This study focused on the germination and tissue culture of *Calotropis gigantea* and aims to make it germination and propagation rapidly. [Method] The seeds were quickly germinated in mechanical treatment, and rapid propagation technology was studied by taking stem with buds of aseptic seedling as explants, and different basic media and plant growth regulators were tested. [Result] The seed germination of *C. gigantea* was not homogeneous because of the physical dormancy. The germination rate was 98% and the germination index was 29.6 after mechanical treatment. Compared with control group, their germination rate and index of the test material increased by 24% and 21, respectively. We found the ideal rapid propagation medium for explant bud was MS+2.0 mg/L 6-BA, and the average number of induced buds was 4.9 and the frequency of shoot induction was 100%. Whereas the optimal medium for root induction was WPM+0.15 mg/L IBA, and root frequency was up to 100%, and every explant had 11.6 roots. The survival rate of rooted saplings

收稿日期: 2018-03-19 修回日期: 2018-04-03 网络出版时间: 2019-01-28

*基金项目: 中国科学技术部(2017YFC0505101)。

作者简介: 严乔顺(1990—), 女, 云南大理人, 在读硕士研究生, 主要从事植物生理与分子生物学研究。

E-mail: yanqiaoshun@mail.kib.ac.cn

**通信作者 Corresponding author: 许建初(1964—), 男, 云南昆明人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事民族生态学。E-mail: jxu@mail.kib.ac.cn

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201803023](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201803023)

was up to 90% when using WPM as the basic culture medium. The survival rate increased by 30% compared with the rooted saplings which used 1/2 MS as basic culture medium. [Conclusion] This study identified the suitable seed germination method and the establishment of the rapid propagation system, which in turn provided the theoretical basis and technical guidance for the large propagation of the plant material in the short term.

Keywords: *Calotropis gigantea*; seed dormancy; tissue culture and rapid propagation; germination index; germination rate

牛角瓜 (*Calotropis gigantea* L.) 属龙胆目 (Gentianales) 萝藦科 (Asclepiadaceae) 牛角瓜属 (*Calotropis*) 直立灌木。主要分布在非洲和亚洲的热带亚热带地区, 国内主要分布在云南、四川、广西和广东等省区^[1]。牛角瓜的种毛纤维纺织的面料既具有丝绸的滑质感, 又有类似棉织物的透气性和舒适感^[2], 废弃后还能自然降解, 是一种绿色、生态及环保的高档纺织原料, 具有广泛应用前景^[3]。同时, 牛角瓜纤维具有很好的吸油性, 可以作为天然的污水净化剂^[4-5]; 牛角瓜全株都含有丰富的药用成分, 具有抗菌^[6]、消炎^[7]、驱虫^[8]及止痛^[9]等作用; 对癌症^[10]、发烧^[11]、腹泻^[12]及高血压^[13]等疾病具有显著的疗效。牛角瓜含烷烃等类石油成分, 从而被誉为“石油植物”^[14]; 牛角瓜对干热河谷地区、盐碱地、沙滩等生态环境瘠薄脆弱地区具有很强的适应性^[15], 可以在无法农耕栽培的荒山荒坡进行大规模种植, 是防止水土流失和土地沙漠化的先锋树种。国内的牛角瓜基本为野生种, 其资源数量少, 缺乏优良品种, 不足以满足商业化开发利用。因此, 牛角瓜优良品种的培育和大规模的种植势在必行。

牛角瓜的繁殖方法主要有扦插、组织培养及种子繁殖。扦插容易受母体材料、季节和气候的限制, 不宜进行大规模生产。组织培养是牛角瓜短期内大量增殖最有效的途径, 但其相关研究报道较少。ROY 等^[16-17]和李克烈等^[18]对牛角瓜的愈伤组织诱导及植株再生进行了研究; 孙健^[19]以牛角瓜叶片、茎段和下胚轴等为起始材料研究表明: 牛角瓜组织对激素不敏感, 很难从愈伤途径分化产生再生芽。因此, 愈伤途径不是牛角瓜快速扩繁的最佳选择。唐军荣等^[20]以牛角瓜的茎尖为外植体进行离体快繁, 对优良单株扩繁比较合适, 但由于外植体表面有一层厚厚的灰白色绒毛, 加之微生物容易通过乳汁器进入植物体内部, 使内生菌数量增多。以这些材料为外植体消

毒困难, 污染率及死亡率较高^[21], 而且还会受季节的限制, 不利于优良品种的培育和快速扩繁。与其他外植体相比, 种子具有耐表面消毒、储存时间长和方便携带等优点, 是组织培养快速获取无菌外植体的理想材料, 也是遗传转化法培育优良品种时获取幼嫩外植体的最佳材料。但成熟的牛角瓜种子萌发不均一, 萌发周期长, 不利于牛角瓜无菌苗的获取, 而牛角瓜种子萌发相关研究尚未报道其萌发不均一的原因。此外, 牛角瓜是木本植物, 大多数木本植物组培过程更适合以低盐的 WPM 为基本培养基^[22], 但针对牛角瓜还没有相关研究。因此, 本研究以牛角瓜种子为材料进行无菌萌发, 进一步以获得的无菌苗带芽茎段为外植体开展牛角瓜组培快繁技术研究, 旨在为牛角瓜快速获取无菌苗及短期内大量扩繁提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

牛角瓜完全成熟的种子和未完全成熟 (花落后约 35 d) 的种子, 于 2016 年 6 月采自云南省红河州红河县大羊街乡牛角瓜种植示范基地。牛角瓜果实成熟期大约 40 d, 单果平均种子数为 113 粒, 千粒重 3.753 g, 种子平均长度 0.61 cm, 平均宽 0.33 cm。

1.2 研究方法

1.2.1 牛角瓜种子的无菌播种

(1) 成熟种子机械处理: 取适量的牛角瓜种子, 在无菌水中浸泡 24 h 后, 75% 的乙醇消毒 5 min, 无菌水洗 3 次, 然后用 0.1% 的升汞消毒 15 min, 无菌水洗 5 次, 用无菌剪刀将种子种皮剪破。无菌滤纸吸干表面液体, 播种于 1/2 MS 培养基中, 接种完后分成两组, 每组 10 瓶, 每瓶 10 粒种子, 分别在光照和黑暗条件下培养。培养温度为 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$; 光照强度 $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照时间 16 h/d。从种子萌发日起, 逐日统计种

子萌发数量,最后统计种子的萌发率与发芽指数。

(2) 成熟种子直接播种:消毒[方法同(1)]后,无菌滤纸吸干之后直接播种于 1/2 MS 培养基中。接种完后分成两组,每组 10 瓶,每瓶 10 粒种子,分别在光照和黑暗条件下培养[方法同(1)]。从种子萌发日起,逐日统计种子萌发数量,最后统计种子的萌发率与发芽指数。

(3) 未成熟牛角瓜种子播种:取未完全成熟的牛角瓜果实(花落后约 35 d),用自来水将表面冲洗干净,75%乙醇消毒 5 min,无菌水洗 2 次,0.1%升汞消毒 15 min,无菌水洗 3 次,去掉果皮。种子接种于 1/2 MS 培养基中,每瓶接 10 粒种子,10 个重复。光照培养[方法同(1)],从萌发日起,逐日统计种子萌发数量,最后统计种子的萌发率与发芽指数。

萌发率=(发芽种子数/供试种子数)×100%;
发芽指数(GI)= $\sum(G_t/D_t)$ 。

式中, G_t 为第 t 天种子发芽数; D_t 为相应的时间, d。

1.2.2 牛角瓜丛生芽诱导

当无菌苗长到 3~5 cm 时,去掉无菌苗的根和叶片,以每一个带芽的茎段为 1 个外植体,接

种到增殖培养基中(表 1)。以 MS 和 WPM 为基本培养基,添加不同质量浓度的 6-BA、NAA 和 TDZ,其中 6-BA 的质量浓度为 0.5、1.0、2.0 和 3.0 mg/L, NAA 的质量浓度为 0.2 mg/L, TDZ 的质量浓度为 0.5、1.0 mg/L。所有培养基都添加 30 g/L 的蔗糖,5.6 g/L 的琼脂,pH 为 5.8。试验设 16 个处理,每个处理 4 瓶,3 次重复,每瓶接种 5 个外植体。外植体接种后,置于(28±2)℃,光照 12 h/d 的条件下培养。35 d 后统计外植体的芽诱导率和平均芽数。

芽诱导率=(诱导出芽的外植体数/总接种的外植体数)×100%;

平均芽数=总芽数/长芽的外植体数。

1.2.3 牛角瓜无菌苗生根诱导

丛生芽长到 3~5 cm 后,选择长势良好,大小均匀的丛生芽接到生根培养基(表 2)中进行不定根诱导,以 1/2 MS 和 WPM 为基本培养基,添加不同质量浓度的 IBA (0.05、0.15 和 0.25 mg/L),以不加激素的 1/2 MS 和 WPM 为对照组。试验设 8 个处理,每个处理 4 瓶,3 个重复,每瓶 5 个外植体。培养基中添加琼脂 5.6 g/L,蔗糖 20 g/L, pH 5.8。培养温度(28±2)℃,光照 12 h/d。从开

表 1 不同培养基对丛生芽诱导的影响(mean±SE)

Tab. 1 The effects of different media on the axillary bud induction

No.	基本培养基 basal medium	$\rho/(mg \cdot L^{-1})$			芽诱导率/% rate of bud induction	平均芽数/个 average number of buds	芽生长情况 growth situation of buds
		6-BA	NAA	TDZ			
1	MS	1	—	—	95±3.04 cd	3.5±1.1 de	芽健壮,数量少
2	MS	2	—	—	100 d	4.9±0.9 f	芽数量多,健壮,长势好
3	MS	3	—	—	100 d	4.3±0.68 f	芽节间缩短,生长慢
4	MS	0.5	0.2	—	97.5±2.65 cd	3.51±1.04 de	基部有少量愈伤,芽不整齐
5	MS	1	0.2	—	97.5±2.65 cd	4.2±0.96 ef	基部有愈伤,芽不整齐
6	MS	2	0.2	—	100 d	4.32±0.57 f	基部有愈伤,芽脆弱,茎尖枯死
7	MS	—	0.2	0.5	25±3.04 ab	1.1±0.14 a	芽数量过少,有根和愈伤形成
8	MS	—	0.2	1	30±3.26 b	1.05±0.21 a	芽数量过少,有根和愈伤形成
9	WPM	1	—	—	90±3.26 c	1.9±0.33 b	芽健壮,数量少
10	WPM	2	—	—	95±3.25 cd	1.92±0.38 b	芽健壮,数量少
11	WPM	3	—	—	97.5±2.65 cd	3.17±1.34 cd	芽瘦弱,生长情况不佳
12	WPM	0.5	0.2	—	95±3.25 cd	1.9±0.64 b	芽数量少,生长情况不佳
13	WPM	1	0.2	—	97.5±3.65 cd	2.3±0.67 b	基部有愈伤,长势不佳
14	WPM	2	0.2	—	100 d	2.6±0.64 bc	基部有愈伤,生长情况差
15	WPM	—	0.2	0.5	20±2.31 a	1.02±0.07 a	芽数量过少,有根和愈伤形成
16	WPM	—	0.2	1	27.5±3.21 ab	1.07±0.09 a	芽数量过少,有根和愈伤形成

注:同列数值间不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);下同。

Note: Values with different lowercase letters in each column mean significant difference at $P<0.05$; the same as below.

始生根起, 每天记录牛角瓜生根情况, 30 d 后统计生根率及平均根数。

生根率=(生根的芽数/总接种的芽数) \times 100%;
平均根数=总根数/总生根的芽数。

表 2 不同培养基对牛角瓜生根的影响 (mean \pm SE)

Tab. 2 The effects of different media on rooting induction of *C. gigantea*

编号 No.	基本培养基 basal medium	ρ (IBA)/(mg·L ⁻¹)	根诱导率/% rate of root induction	平均根数/条 average root number	平均根长/cm average root length	根系生长情况 growth situation of roots
1	1/2 MS	—	90.5 \pm 3.95 a	5.4	1.8	根部有愈伤组织, 根粗
2	1/2 MS	0.05	93.9 \pm 3.53 ab	6.3	2.1	根部有少量愈伤组织, 根脆弱
3	1/2 MS	0.15	98.6 \pm 2.19 ab	7.9	2.8	根部有少量愈伤组织, 根脆弱
4	1/2 MS	0.25	100 b	7.6	2.7	根部有少量愈伤组织, 根脆弱
5	WPM	—	91.1 \pm 3.55 a	9.3	2	根较细, 出根不整齐
6	WPM	0.05	95.8 \pm 2.74 ab	10.2	2.8	根系均匀, 出根整齐
7	WPM	0.15	100 b	11.6	3.2	根系均匀, 出根整齐
8	WPM	0.25	100 b	18	2.7	根数量多、太细

1.2.4 牛角瓜炼苗及移栽

生根结束后, 将牛角瓜移到温室, 松开瓶盖炼苗 1 周。炼苗结束后洗去牛角瓜基部培养基, 用 300 倍多菌灵消毒 10 min 后晾干多余的水分。以不同基本培养基为标准将牛角瓜分成两组移栽, 栽后淋足定根水, 温度保持在 25~32 ℃ 之间, 湿度保持在 70% 左右。基质配比为 $V_{草炭土} : V_{珍珠岩} : V_{蛭石} : V_{椰糠} = 4 : 3 : 2 : 1$, 移栽前用 1% 的高锰酸钾溶液对基质消毒, 然后用塑料布覆盖 1 周后揭开。移栽 30 d 后统计牛角瓜各组的成活率。

成活率=(成活苗数/移栽总苗数) \times 100%。

1.3 数据处理

数据使用 Excel 2013 和 SPSS 17 中的 ANOVA 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 牛角瓜种皮和光照对种子萌发的影响

牛角瓜未成熟种子萌发周期为 5 d, 萌发率为 100%, 发芽指数为 30.3。剪破种皮的成熟种子萌发周期为 5 d, 萌发率 98%, 发芽指数为 29.6, 无菌苗如图 1a 所示。不剪破种皮的成熟种子萌发持续大约 1 个月且萌发率只有 74%, 发芽指数为 8.6。结果分析表明: 光照对种子萌发没有显著影响 ($P>0.05$), 牛角瓜未完全成熟种子与剪破种皮的成熟种子在萌发率与发芽指数之间都没有显著差异, 而与未剪破种皮的成熟种子之间存在极显著差异 (图 2)。结合不同处理组的种子萌发

结果可知: 成熟牛角瓜种皮阻碍种子萌发, 光照对种子萌发没有影响。



注: a) 无菌苗; b) 诱导的丛生芽; c) 生根苗; d) 移栽苗。

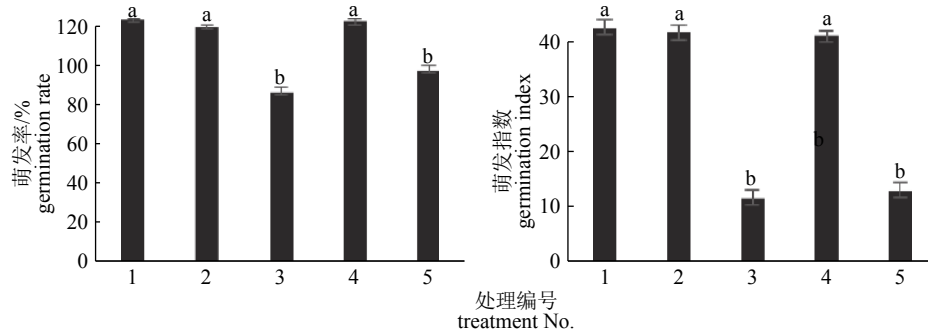
Note: a) aseptic seedling; b) induced buds; c) rooted plantlet; d) transplant seedlings.

图 1 牛角瓜无菌播种、芽诱导、生根及移栽

Fig. 1 The asepsis seeding, adventitious shoot induction, root induction and transplant seedlings of *C. gigantea*

2.2 不同培养基对牛角瓜丛生芽诱导的影响

牛角瓜带芽茎段在接种后的 3 周内生长缓慢, 之后为快速生长期, 40 d 左右即可进行继代培养。用不同基本培养基、不同种类及质量浓度的激素对牛角瓜丛生芽进行诱导可知: WPM 基本培养基和 MS 基本培养基的诱导率没有显著差异, 而平均芽有显著差异 (表 1)。相同激素条件下 MS 培养基中的平均芽明显高于 WPM 培养基中的平均芽, 而且芽更健壮。对所添加的植物激



注: 1. 未成熟种子光照; 2. 成熟种子剪破种皮并光照处理; 3. 成熟种子未剪破种皮并光照处理; 4. 成熟种子剪破种皮并黑暗处理; 5. 成熟种子未剪破种皮并黑暗处理。

Note: 1. immature seeds under light; 2. mature seeds with broken seed coat under light; 3. mature seeds with complete seed coat under light; 4. mature seeds with broken seed coat under dark; 5. mature seeds with complete seed coat under dark.

图 2 不同播种条件下种子的萌发率和发芽指数

Fig. 2 The seed germination rate and germination index in different sowing conditions

素, 只添加低质量浓度的 6-BA 时, 对丛生芽诱导有明显的促进作用, 诱导的丛生芽比较整齐、健壮, 当 MS 培养基中添加 2 mg/L 6-BA 时, 诱导率达 100%, 平均芽为 4.9 (图 1b); 当 6-BA 质量浓度高于 3 mg/L 时, 丛生芽节间缩短, 苗丛密集, 无效苗较多。添加 TDZ 时, 外植体生长缓慢, 且有根和愈伤组织生成, 增殖系数最高只有 1.1。当诱导培养基里添加 NAA 之后, 苗基部愈伤组织较多, 芽不整齐, 茎段较脆弱, 有部分带芽茎段继代之后丧失诱导能力。结合外植体的增殖系数, 再生率和丛生芽的长势等综合评价, MS+2.0 mg/L 6-BA+5.6 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖是牛角瓜丛生芽诱导的最适培养基。

2.3 不同培养基对牛角瓜丛生芽生根的影响

牛角瓜在不同培养基中的生长情况如下: 两种基本培养基在生根诱导率上没有显著差异 ($P > 0.05$), 在基本培养基相同的情况下, 添加不同浓度的 IBA 对牛角瓜生根具有显著的促进作用 (表 2)。其中在没有添加激素的 1/2 MS 培养基中诱导的根, 其根系较短粗且愈伤化, 移栽过程中极易脱落和腐烂。在 1/2 MS 培养基中添加不同浓度的 IBA 使根系变细, 但大部分芽基部仍然存在少量的愈伤组织, 移栽过程中极易脱落, 成活率较低。在没有添加激素的 WPM 培养基中, 牛角瓜的基部无愈伤组织形成, 根系比较细且分枝多。但与添加了不同浓度 IBA 的 WPM 培养基相比, 添加适当浓度的 IBA 可以加快生根过程, 增加生根的数量以及使出根整齐。其中, 在 WPM 培养基中加 0.15 mg/L IBA 时, 诱导率达 100%, 平均

根数为 11.6 条, 平均主根长 3.2 cm, 根系均匀 (图 1c)。IBA 质量浓度超过 0.15 mg/L 时, 根数增加, 但根系太细。结合牛角瓜生根时间、生根数量、平均根长、根诱导率及根的脆弱程度综合评价可知, 牛角瓜较适的生根诱导培养基为 WPM+0.15 mg/L IBA+5.6 g/L 琼脂+20 g/L 蔗糖。

2.4 无菌苗移栽

经过炼苗、移栽后, 以 WPM 为基本培养基的牛角瓜成活率达 90% (图 2d), 以 1/2 MS 为基本培养基的牛角瓜成活率为 60%。

3 讨论

种子的休眠主要分为生理休眠和物理休眠^[23]。生理休眠主要是由种子的胚发育不完全而造成的休眠, 需要后熟时间才能萌发, 很难在播种后短期内大量萌发, 而牛角瓜未完全成熟的种子和剪破种皮的成熟种子均能在短期内快速萌发。由此可知: 牛角瓜种子不存在生理休眠过程。物理休眠主要是种皮的透性障碍或机械障碍^[24]。透性障碍是种子成熟脱水时形成不透水层使种子发生休眠, 在不透水层形成之前种子不存在物理休眠^[25-26]。本研究发现: 牛角瓜未完全成熟的种子和剪破种皮的种子能在短时间内大量萌发, 其萌发率和发芽指数之间都无显著性差异, 而与未剪破种皮的成熟牛角瓜之间有显著性差异。所以, 成熟的牛角瓜种子萌发率低主要是受种皮透性障碍的影响, 是牛角瓜萌发率低和萌发周期长的主要原因, 解决种皮透性障碍是提高萌发率最有效的途径之一。

关于破除种皮对种子萌发影响的方法主要有物理法、化学法和生物法。罗瑛等^[27]和连洁琼^[28]的研究表明:物理法中的机械处理是目前最直接、最有效的方法之一。该研究以机械法将种皮剪破,在短时间内获得大量的无菌苗。此外,EL-KEBLAWY^[29]研究发现:光照能打破种子休眠,促进萌发。本研究发现:在光照与黑暗条件下培养的种子萌发率之间没有显著差异,说明光照对牛角瓜种子萌发没有显著促进作用,其种子休眠主要由种皮引起。

植物生长调节剂是培养基中的关键性物质,对植物组织培养起着决定性作用。同一植物在各个生长阶段所需的植物生长调节剂种类及其浓度都有很大的差异。因此,要根据组织培养的目的、材料的种类及生长情况来确定植物生长调节剂的种类和浓度^[30]。植物组织培养中的生长调节物质主要有细胞分裂素和生长素,在木本植物丛生芽诱导过程中,6-BA和TDZ应用更广泛^[31]。所以,本研究采用6-BA和TDZ两种细胞分裂素,结果表明:在添加了TDZ的培养基中丛生芽诱导率低,生长速度慢,还有大量愈伤组织和根的形成,其原因可能是TDZ同时具有生长素和细胞分裂素双重功能有关^[32]。6-BA对牛角瓜丛生芽诱导促进作用随浓度增加而先升高后降低,最适质量浓度为2.0 mg/L,这种现象与樱桃(*Prunus avium*)茎尖培养研究结果^[33]一致。前人相关研究采用诱导丛生芽的培养基都添加不同浓度的NAA,但本研究发现添加不同浓度的NAA之后,丛生芽基部形成愈伤组织较多,丛生芽脆弱,有部分芽在继代时散失再生能力,继代过程中诱导率低,原因可能与NAA具有诱导愈伤组织产生有关^[34]。

选择基本培养基时,除根据待培养植物的基因型外,通常应考虑培养基的种类、总离子浓度、总氮水平及氮源种类与比例、钙和氯化物的含量等^[35-36]。培养过程应以培养阶段和培养目的选择合适的基本培养基^[37]。本研究发现:丛生芽诱导过程中MS明显优于WPM。生根过程中以1/2 MS为基本培养基会使大部分无菌苗根部有愈伤组织生成,移栽成活率只有60%,与ROY等^[17]的研究结果一致,主要原因可能是基部愈伤组织形成,影响根与芽之间维管组织的形成。以WPM为基本培养基的牛角瓜基部无愈伤组织形

成,移栽成活率高。这与马缨杜鹃(*Rhododendron delavayi*)^[38]和牡丹(*Paeonia suffruticosa*)^[39]等木本植物的研究结果一致。

本研究采用机械破壳法处理,在短期内获得大量的牛角瓜无菌苗,为遗传转化的研究提供良好材料。同时开展牛角瓜组培快繁技术研究,为牛角瓜组培快繁不同生长阶段找到合适的基本培养基和植物生长调节剂,降低了牛角瓜诱导过程中的基部愈伤化程度,解决了继代过程中成活率低、根易断裂及移栽成活率低等问题,为牛角瓜商业化开发利用提供了技术支撑。

[参考文献]

- [1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [2] ASHORI A, BAHREINI Z. Evaluation of *Calotropis gigantea* as a promising raw material for fiber-reinforced composite[J]. Journal of Composite Materials, 2009, 43(11): 1297. DOI: 10.1177/0021998308104526.
- [3] 田湘, 严理, 唐丹, 等. “全能灌木”牛角瓜研究热点及发展趋势[J]. 山西农业科学, 2015, 43(8): 1061. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2481.2015.08.37.
- [4] ZHENG Y A, ZHU Y F, WANG A Q, et al. Potential of *Calotropis gigantea* fiber as an absorbent for removal of oil from water[J]. Industrial Crops and Products, 2016, 83: 387. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.01.009.
- [5] ZHENG Y, CAO E J, TU L X, et al. A comparative study for oil-absorbing performance of octadecyltrichlorosilane treated *Calotropis gigantea* fiber and kapok fiber[J]. Cellulose, 2017, 24(2): 989. DOI: 10.1007/s10570-016-1155-z.
- [6] MBHELE N, BALOGUN F O, KAZEEM M I, et al. *In vitro* studies on the antimicrobial, antioxidant and anti-diabetic potential of *Cephalaria gigantea*[J]. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2015, 10(1): 214. DOI: 10.3329/bjp.v10i1.21716.
- [7] ADAK M, GUPTA J K. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Calotropis gigantea* (AKANDA) in various biological system[J]. Nepal Medical College Journal, 2006, 8(3): 156.
- [8] KOVENDAN K, MURUGAN K, KUMAR K P, et al. Mosquitocidal properties of *Calotropis gigantea* (Family: Asclepiadaceae) leaf extract and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis*, against the mosquito vectors[J]. Parasitology Research, 2012, 111(2): 531. DOI: 10.1007/s00436-012-2865-2.
- [9] PATHAK A K, ARGAL A. Analgesic activity of *Calotropis gigantea* flower[J]. Fitoterapia, 2007, 78(1): 40. DOI: 10.1016/j.fitote.2006.09.023.
- [10] PARHIRA S, ZHU G Y, CHEN M, et al. Cardenolides from *Calotropis gigantea* as potent inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity[J]. Journal of

- Ethnopharmacology, 2016, 194(24): 930. DOI: [10.1016/j.jep.2016.10.070](https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.070).
- [11] CHITME H R, CHANDRA R, KAUSHIK S. Evaluation of antipyretic activity of *Calotropis gigantea* (Asclepiadaceae) in experimental animals[J]. Phytotherapy Research, 2005, 19(5): 454. DOI: [10.1002/ptr.1672](https://doi.org/10.1002/ptr.1672).
- [12] CHITME H R, CHANDRA R, KAUSHIK S. Studies on anti-diarrheal activity of *Calotropis gigantea* R. Br. in experimental animals[J]. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2004, 7(1): 70.
- [13] RATHOD N R, CHITME H R, IRCHHAIYA R, et al. Hypoglycemic effect of *Calotropis gigantea* Linn. leaves and flowers in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Oman Medical Journal, 2011, 26(2): 104. DOI: [10.5001/omj.2011.26](https://doi.org/10.5001/omj.2011.26).
- [14] PHOO ZWMM, RAZON LF, KNOTHE G, et al. Evaluation of Indian milkweed (*Calotropis gigantea*) seed oil as alternative feedstock for biodiesel[J]. Industrial Crops and Products, 2014, 54(4): 226. DOI: [10.1016/j.indcrop.2014.01.029](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.029).
- [15] 魏静, 赵元藩, 张燕平. 牛角瓜的栽培管理技术及应用前景[J]. 林业调查规划, 2013, 38(2): 112. DOI: [10.3969/j.issn.1671-3168.2013.02.026](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-3168.2013.02.026).
- [16] ROY A T, KOUTOULIS A, DE D N. Cell suspension culture and plant regeneration in the latex-producing plant, *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br.[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 63(1): 15. DOI: [10.1023/A:1006497220647](https://doi.org/10.1023/A:1006497220647).
- [17] ROY A T, DE D N. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br.[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 20(3): 229.
- [18] 李克烈, 罗联忠, 陈伟, 等. 牛角瓜的组织培养[J]. 广西农业生物科学, 2007, 26(3): 247.
- [19] 孙健. 牛角瓜及其发根中碳氢化合物与强心苷的代谢调控[D]. 北京: 中国科学院, 2012.
- [20] 唐军荣, 李斌, 刘惠民, 等. 牛角瓜离体快繁技术研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2016, 31(4): 658. DOI: [10.16211/j.issn.1004-390X\(n\).2016.04.012](https://doi.org/10.16211/j.issn.1004-390X(n).2016.04.012).
- [21] 刘进平, 莫绕. 热带植物组织培养[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [22] 曹昆, 李霞. 木本植物组织培养不定芽诱导研究进展[J]. 江苏林业科技, 2008, 35(5): 43.
- [23] BEWLEY J D, BLACK M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination[M]. New York: Springer-Verlag, 1978.
- [24] LI P, WU H, GENG S L, et al. Germination and dormancy of seeds in *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae)[J]. Seed Science and Technology, 2007, 35(1): 9. DOI: [10.15258/sst.2007.35.1.02](https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.1.02).
- [25] LI X J, BASKIN J M, BASKIN C C. Comparative morphology and physiology of fruit and seed development in the two shrubs *Rhus aromatica* and *R. glabra* (Anacardiaceae)[J]. Merican Journal of Botany, 1999, 86(9): 1217. DOI: [10.2307/2656769](https://doi.org/10.2307/2656769).
- [26] JAYASURIYA K M G G, BASKIN J M, GENEVE R L, et al. Seed development in *Ipomoea lacunosa* (Convolvulaceae), with particular reference to anatomy of the water gap[J]. Annals of Botany, 2007, 100(3): 459. DOI: [10.1093/aob/mcm137](https://doi.org/10.1093/aob/mcm137).
- [27] 罗瑛, 吴开永, 刘国道. 不同处理对银合欢种子发芽率的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(13): 6227. DOI: [10.13989/j.cnki.0517-6611.2009.13.113](https://doi.org/10.13989/j.cnki.0517-6611.2009.13.113).
- [28] 连洁琼. 三种豆科树种硬实形成机制及破除方法的初步研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [29] EL-KEBLAWY A. Germination response to light and temperature in eight annual grasses from disturbed and natural habitats of an arid Arabian desert[J]. Journal of Arid Environments, 2017, 147: 1. DOI: [10.1016/j.jaridenv.2017.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2017.08.002).
- [30] 程世昌, 王小琳. 重庆植物组织培养[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 2011.
- [31] 马燕, 韩瑞超, 臧德奎, 等. 木本观赏植物组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(4): 1956. DOI: [10.13989/j.cnki.0517-6611.2012.04.201](https://doi.org/10.13989/j.cnki.0517-6611.2012.04.201).
- [32] 徐晓峰, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 227.
- [33] 沈焯. 根癌农杆菌介导的甜樱桃茎尖遗传转化体系的建立[D]. 重庆: 西南农业大学, 2002.
- [34] 施翔. 杂交松组织培养研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2005.
- [35] KUMAWAT S, KACHHWAHA S, KOTHARI S L. Micronutrient optimization in the basal medium improves *in vitro* plant regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.)[J]. Propagation of Ornamental Plants, 2013, 13(1): 3.
- [36] HAND C, REED B M. Minor nutrients are critical for the improved growth of *Corylus avellana* shoot cultures[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2014, 119(2): 427. DOI: [10.1007/s11240-014-0545-x](https://doi.org/10.1007/s11240-014-0545-x).
- [37] 郭颖. 三种高山杜鹃组织培养快繁技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2015.
- [38] 程雪梅. 马缨杜鹃种子萌发与组织培养技术体系研究[D]. 昆明: 西南林学院, 2008.
- [39] 刘会超, 贾文庆. 基本培养基及植物生长调节剂对牡丹组培苗生根的影响[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2010, 38(2): 32. DOI: [10.3969/j.issn.1008-7516.2010.02.008](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-7516.2010.02.008).

责任编辑: 何馨成