

杜仲带芽茎段的组织培养

罗 丽¹, 赵德刚²

(1. 连云港师范高等专科学校自然科学系, 江苏连云港 222006; 2. 贵州大学, 贵州贵阳 550025)

摘要:以杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)为材料,进行带芽茎段的组培快繁试验,结果表明,以成年植株的带芽茎段为外植体进行快速繁殖,1年内以4~5月份所取的腋芽萌发和伸长最好,中部和顶部腋芽的萌发效果较基部的好。以4月份所取腋芽为外植体,筛选出最佳诱导萌发培养基和继代增殖培养基。

关键词:杜仲;带芽茎段;组织培养

中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-1302(2007)05-0174-03

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)是杜仲科杜仲属植物,是我国特有的第三纪孑遗植物,雌雄异株、异花授粉。杜仲一直是我国推崇的常用贵重中药之一,也是温带最有开发利用前景的胶源植物^[1]。种子繁殖是当前大量繁殖杜仲的主要方法,但一般情况下实生苗定植7~8年甚至10年以后才能开花结果,而且通过种子繁殖虽然可以迅速扩大杜仲的数量,但却不能满足建立优株无性系。当繁殖目的是建立优株无性系或选择性地扩繁雌株时,则可采用带芽茎段为外植体组培快繁^[2]。本文报道杜仲成年植株带芽茎段快速繁殖培养的研究结果,旨在为杜仲工厂化育苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

贵州大学校园内杜仲成年植株带芽茎段。

1.2 材料处理与培养条件

将取回的枝条剪成3~4 cm长的单芽茎段,用含清洁剂的水清洗茎段,并用软毛刷蘸取清洁剂轻刷外植体表面,将茎段用流水冲洗2~3 h,沥干,75%酒精消毒30 s,3% H₂O₂浸泡20 min后,0.1% HgCl₂加数滴Tween80浸泡10 min,吸干表面水分。将经过表面消毒的茎段切去两端与消毒液接触的少许部分,使之形成新切口,直立接种于附加0.1 mg/L

6-BA的MS培养基上。接种20 d后统计污染率及成活率。培养条件为25±2℃,光照16 h/d,光照强度为2 500 lx,基本培养基为MS培养基,其中加0.6%琼脂、3%蔗糖,pH值5.8,高压灭菌20 min。

1.3 带芽茎段的诱导培养

1.3.1 取材时间对腋芽萌动的影响 试验了不同时间取材对腋芽萌动的影响,观察并记录各月上旬的腋芽萌动情况及污染情况。

萌发率 = (腋芽萌发的外植体数 ÷ 接种的外植体数) × 100%

污染率 = (污染的芽苗数 ÷ 接种的外植体数) × 100%

1.3.2 腋芽着生部位对萌动的影响 芽在茎段上的着生位置可分为顶部芽(茎顶端1~3个芽)、中部芽(第4~7个芽)、基部芽(第8~9个芽)。接种于附加0.1 mg/L 6-BA的MS培养基上,观察腋芽的萌发情况,15 d后统计萌发率。

1.3.3 带芽茎段的诱导培养 在上述试验基础上,选择最佳的取材方式,将带芽茎段接种到诱导培养基上,观察各种培养基配方对腋芽诱导的效果。统计腋芽萌发率及萌发后能伸长生长的百分率。

1.4 茎段芽苗的增殖培养

将萌发后长度达到1.5 cm左右的腋芽从外植体上切下,在增殖培养基中继代,以期芽苗能够健壮生长并产生丛生芽进行继代增殖。每30 d继代1次,统计芽苗总数及芽苗的平均高度,计算增殖系数和生长系数,继代1次算1次重复,共继代3次。

增殖系数 = 增殖30 d统计的芽苗数 ÷ 接种时的芽苗数

生长系数 = 增殖30 d统计的平均苗高 ÷ 接种

收稿日期:2007-02-28

基金项目:教育部优秀青年教师资助计划项目及贵州省优秀教育科技人才省长专项基金(编号:黔科合字2001-3-2)。

作者简介:罗 丽(1977—),女,贵州安龙人,硕士,讲师,主要从事植物生理学、微生物教学与研究。E-mail:dd212901@163.com。

时的平均苗高

1.5 芽苗的生根培养

将生长健壮的芽苗转入生根培养基,诱导其生根成为完整植株,移栽生根芽苗。计算芽苗生根率以及移栽成活率。

生根率(%) = (生根的芽苗数 ÷ 接种的芽苗数) × 100

移栽成活率(%) = (移栽成活的植株数 ÷ 移栽的植株总数) × 100。

2 结果与分析

2.1 取材时间和取材部位对腋芽诱导生长的影响

图1为不同月份的材料诱导培养20 d的污染情况。4、5、7月份取材污染率较低,尤其是在春季取材;其他月份取材污染率较高,尤其是在冬季取材。可能由于春季新生枝条抽长,所取的茎段幼嫩,在空气中与有菌物接触时间不长;而冬季枝条木质化,其表层粗糙,易于藏匿菌体,污染较为严重。

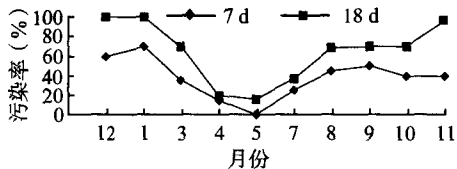


图1 杜仲带芽茎段取材时间对组培污染率的影响

外植体的生理状态及着生部位是组培影响因素之一^[3],本试验所取材料均为10年生以上成年树的茎段。在试验中,取同一枝条上不同生长部位的腋芽接种,以比较腋芽的萌发情况,发现不同部位的芽萌发状况各不相同(表1)。从表1可以看出中部和顶部茎段的芽萌动率没有明显的区别,不同月份中取材的萌动率几乎都在50%以上,12月顶部与中部腋芽萌动率均高于70%,而基部腋芽的萌动率相对较低,萌动率没有超过40%的。本试验条件下,取材时采用中部和顶部的带芽茎段较好。

由表2看出,周年取材,腋芽萌动率均超过45%,说明杜仲快速繁殖,带芽茎段是很好的外植

体,取材不受时间的限制。其中4月和5月腋芽萌动率最高,污染也少,萌动后的腋芽容易抽长生长。休眠芽中,以10、11、12月的腋芽萌发率高,可能是由于休眠芽内营养物质充足,本试验培养条件下易于打破休眠,但较之春季的取材容易污染,且萌动后的腋芽抽长生长速度较慢。

表2 杜仲带芽茎段不同月份取材在 A₂ 培养基中的萌发状况

取材时间 (月份)	培养时间 (d)	芽萌动率 (%)	芽明显伸长比例 (%)
9	7	53.3	
10	7	83.9	
11	7	80.0	
12	7	78.8	
1(次年)	7	48.4	
2(次年)	7	50.0	
3(次年)	7	55.0	
4(次年)	9	96.7	86.7
5(次年)	7	93.3	83.3
7(次年)	9	53.3	45.5
8(次年)	9	45.5	

注:接种茎段数为 31 ± 1。

2.2 不同激素组合对诱导腋芽萌发和生长的影响

用4月份的带芽茎段为材料,以MS为基本培养基,设计不同的激素配组,筛选腋芽萌发的最适培养基(表3)。由表3可以看出,在适宜的季节取材, A₁、A₂和 A₃培养基上腋芽的萌动率均较高,但各有差异。A₁中腋芽萌发后伸长的叶片生长较为正常, A₂中伸长的腋芽不如 A₁中的健壮,但腋芽伸长所需时间短, A₃中萌发的细小,伸展的叶片细长。总的看来,只要取材生长季节适宜,不加或加少量细胞分裂素,腋芽萌发快,生长好,随着细胞分裂素浓度增加,芽伸长生长逐渐不正常。在试验中试用了

表3 不同激素组合杜仲腋芽萌动和生长情况

培养基号	激素种类与含量 (mg/L)	培养时间 (d)	腋芽萌动 率(%)	芽明显伸长 比例(%)
A ₁		4	58.1	
		9	90.3	
		20	93.5	77.4
A ₂	6-BA, 0.1	4	70.0	
		9	96.7	
		20	96.7	73.3
A ₃	6-BA, 1.0	4	60.0	
		9	93.3	
		20	83.3	50.0
A ₄	6-BA, 1.0; NAA, 0.1	20	16.7	
A ₅	6-BA, 1.0; IAA, 0.1	20	18.2	
A ₆	6-BA, 1.0; IBA, 0.1	20	20.9	
S	TDZ, 0.001	20	80.0	73.3

注:基本培养基为 MS; 每处理接种茎段数为 31 ± 1。

表1 杜仲不同部位带芽茎段在 A₂ 培养基中的萌动状况

取材时间 (月/日)	萌动率(%)		
	基部芽	中部芽	顶部芽
12/6	40.0	70.0	87.5
1/8(次年)	26.7	46.7	50.0
2/5(次年)	29.0	51.6	48.5
3/8(次年)	36.7	53.3	56.7

注:接种茎段数为 31 ± 1。

TDZ, TDZ 具有极高的细胞分裂素活性^[4-5]。较低浓度的 TDZ 可促进杜仲腋芽的萌动及伸长, 但伸长的芽多为爪状畸形。细胞分裂素与不同生长素搭配使用, 对促进腋芽萌动的效果不明显, 结果表明本试验条件下生长素不利于腋芽的萌动及伸长。

2.3 腋芽芽苗的继代培养

将萌发伸长的腋芽切割下来转入继代培养基中, 让其生长健壮或诱导丛生芽生长。每 30 d 统计 1 次芽苗的总数及平均高, 并计算增殖系数、生长系数。结果(表 4)表明, 茎段芽苗增殖需要高浓度的 6-BA (2.0 mg/L) 和低浓度的 NAA (0.05 mg/L), 而对于生长来说, 则需要低浓度 6-BA 和低浓度 NAA。为达到芽苗增殖, 首先是要提高增殖系数, 得到大量芽苗, 其次才是使芽苗生长达到一定高度。

表 4 激素配比对杜仲茎段芽苗增殖的影响

培养基号	激素种类与浓度 (mg/L)	增殖系数	生长系数
1	NAA 0.05 + 6-BA 1	2.51	3.67
2	NAA 0.05 + 6-BA 2	3.69	3.20
3	NAA 0.05 + 6-BA 4	3.24	2.15
4	NAA 0.1 + 6-BA 1	1.91	3.85
5	NAA 0.1 + 6-BA 2	2.91	2.60
6	NAA 0.1 + 6-BA 4	2.60	2.20
7	NAA 0.2 + 6-BA 1	1.67	3.45
8	NAA 0.2 + 6-BA 2	2.47	2.85
9	NAA 0.2 + 6-BA 4	1.73	2.34

注: 接种芽苗数为 15。

2.4 诱导芽苗生根培养

将高 4 cm 左右生长健壮的芽转入生根培养基 (1/2MS + IBA 1.5 mg/L + 蔗糖 20 g/L) 中, 诱导不定根发生。芽苗转接 12 d 后可观察到 2~3 条白色的根自基部长出, 暴露在培养基外部的根上有白色的根毛, 45 d 统计生根率达 90%。待根长到 6 cm 时, 将苗根部琼脂洗净, 移入灭菌后的珍珠岩基质中, 浇足水, 初始 2 d 置于阴凉处, 再逐渐过渡到阳光充足的地方。30 d 后统计成活率都在 80% 以上, 再将小苗移入疏松富含有机质的土壤中。

3 讨论与小结

3.1 取材对杜仲腋芽离体培养萌发的影响

取材对于组织培养效果起关键作用。本试验采用杜仲成年植株带芽茎段进行快繁有利于保持母株特性, 研究表明, 取材时间和取材部位对带芽茎段外植体腋芽萌发有较大影响。在 4~5 月份取材的腋芽萌发率达 90% 以上, 是最佳取材时间, 10~12 月

份取材培养腋芽萌发率也在 80% 左右, 其他月份腋芽萌发率则相对较低。以杜仲成年植株带芽茎段为外植体进行快繁, 不仅有利于保持母株特性, 尽管取材时间对腋芽离体萌发率有一定影响, 但各月份取材腋芽萌发率均在 45% 以上, 全年均可取材培养, 不受时间限制, 有效克服了谷文英等采用 2 年生杜仲带芽茎段进行快繁中存在取材时期过早 (3 月) 或过晚 (11 月) 腋芽不能萌发的问题^[6]。从取材部位来看, 茎段中部和顶部腋芽的萌发率较基部要高。不同地域、不同品种以及不同性别植株取材对外植体腋芽离体培养萌发的影响尚待深入研究。

3.2 培养基对萌发与增殖的影响

植物各部位离体培养要求条件不同, 适宜的培养基, 尤其是培养基中激素的配比非常关键。一般来说, 在茎尖培养和芽诱导时主要采用 MS 为基本培养基, 本试验也证明, 只要取材季节适宜, 在 MS 基本培养基上也可诱导腋芽萌发。激素中细胞分裂素与生长素的比例决定着芽和根的分化。在 MS 基本培养基中只添加低浓度的细胞分裂素即可诱导腋芽萌发, 细胞分裂素浓度升高腋芽萌发伸展的叶片不正常。添加低浓度 TDZ 也能诱导腋芽萌发, 而且萌发率高, 这与 TDZ 可引起细胞分裂素的生物合成, 并抑制内源生长素的降解有关, 但腋芽萌发生长往往畸形, 是否由于苯基脲衍生物导致的扁平化现象尚待探讨^[7]。生长素不利于腋芽的萌发, 即使在培养基中只添加极少量的生长素与 6-BA 1.0 mg/L 搭配使用, 也会使腋芽萌发率降低。在芽苗的增殖过程中, 较高浓度的细胞分裂素 (6-BA 2.0 mg/L) 与低浓度生长素 (NAA 0.05 mg/L) 搭配, 既可促进芽苗增殖, 又可促使芽苗生长健壮。

参考文献:

- [1] 周政贤. 中国杜仲[M]. 贵阳: 贵州科学技术出版社, 1993: 1-10.
- [2] 李俊明, 陈光友. 杜仲的研究与开发[J]. 生物学通报, 1996(6): 43-44.
- [3] 曹改义. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 41-42.
- [4] 杨业正. TDZ 与植物组织和细胞培养[J]. 贵州农业科学, 1991(6): 45-48.
- [5] 王关林, 方宏筠, 那杰. 高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 1997(3): 48-54.
- [6] 谷文英, 裴德清, 朱登云. 杜仲茎段培养的初步研究[J]. 莱阳农学院学报, 1999, 16(1): 8-11.
- [7] 徐华松, 徐九龙, 黄学林. TDZ 在植物组织培养中的作用[J]. 广西植物, 1996(1): 77-80.