

# 对节白蜡愈伤组织诱导的研究

董社琴<sup>1</sup>, 李冰雯<sup>2</sup> (1. 长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025; 2. 西北工业大学, 陕西西安 710068)

**摘要** [目的] 寻找有效的种苗快速繁殖途径, 保护濒危的对节白蜡。[方法] 以对节白蜡顶芽做外植体, 接种于添加不同浓度 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和 6-苄基腺嘌呤(6-BA)的 MS 固体培养基上, 比较其愈伤组织的诱导率及长势。[结果] 取用 0.1% 的氯化汞消毒 10 min 的顶芽做外植体较理想; 树龄对顶芽形成愈伤组织没有明显影响, 而激素的种类和它们在 MS 固体培养基上的浓度对对节白蜡愈伤组织的诱导有显著影响。试验结果表明 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L 2,4-D 为最佳培养基, 产生的愈伤组织生长快, 将此愈伤组织继代培养可加速增殖, 能在短期内获得大量遗传性一致的再生植株。[结论] 采用生长良好的愈伤组织进行大规模快速繁殖是保护、开发、利用对节白蜡的最优途径。

**关键词** 对节白蜡; 愈伤组织; 诱导; 增殖

**中图分类号** S722.3<sup>+</sup>7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)26-11228-02

## Study on Callus Induction in *Fraxinus hupehensis*

DONG She-qin et al (College of Life Sciences, Changjiang University, Jingzhou, Hubei 434025)

**Abstract** [Objective] The aim was to find the effective methods for rapid propagation of seedlings to protect the endangered *Fraxinus hupehensis*. [Method] With the terminal bud of *F. hupehensis* as explant, it was inoculated on MS solid medium added different concentrations of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzyladenine (6-BA) to compare the callus induction rate and growth vigor of *F. hupehensis*. [Result] The terminal bud disinfected with 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 10 min was used to be ideal explant. The tree age had no obvious influence on the terminal bud forming callus, while hormone kinds and their concentrations in MS solid medium had significant influence on callus induction of *F. hupehensis*. The experiment result showed that the optimum medium was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L 2,4-D, which produced the callus with fast growth, and subculture of the callus could accelerate proliferation and obtain a great deal of regeneration plants with consistent hereditary in a short time. [Conclusion] Applying well-grown callus for the rapid propagation on a large scale was the optimum approach for protecting, developing and utilizing *F. hupehensis*.

**Key words** *Fraxinus hupehensis*; Callus; Induction; Proliferation

植物愈伤组织的形成和分化是植物快速繁殖的主要方式,也是生产实践中最主要和最有效组织培养技术。对节白蜡属木犀科、白蜡属,是观赏性珍稀植物,是世界景点、盆景、根雕家族中的极品,被誉为“活化石”和“盆景之王”,在全国范围内,仅湖北北京山、钟祥特有。通过对对节白蜡愈伤组织诱导的研究,获得生长良好的愈伤组织进而进行大规模快速繁殖,以保护该濒危珍稀物种。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 取长江大学图书馆前生长 20 年的对节白蜡树和长江大学植物园生长 3、5、10 年的对节白蜡树的顶芽,2004~2006 年 3 月 10 日和 4 月 15 日连续 3 年采样。

## 1.2 方法

**1.2.1 外植体的获得。**切取不同来源的顶芽用自来水冲洗数次,用 70% 酒精表面消毒 25 s,分别置于 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 溶液中,加 2 滴吐温-20,浸 8、10、12 min;用 10% Ca(ClO)<sub>2</sub> 浸泡 15、20、25 min,消毒期间要不停摇动。然后用无菌水冲洗数次,用无菌滤纸吸干表面水分,无菌条件下接种,先置于黑暗条件下培养 3 d,再转入光照培养,光照周期 12 h/d,光照强度 2 000~3 000 lx,整个培养期间温度控制在 25~27℃,湿度 65%~75%。

**1.2.2 愈伤组织的诱导。**将 3 月 10 日和 4 月 15 日采集的顶芽在解剖镜下处理,小的直接接种,大的纵切为二,长 0.3~0.5 cm 的外植体,接种于添加不同浓度 6-BA 和 2,4-D 的 MS 培养基上(pH 值 5.8)。浓度设 6-BA 0、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L,2,4-D 0、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L,按正交试验设计共设 25 个处理。第 3 天开始统计愈伤组织萌动的时间,每

天早晚观察 1 次,7 d 后隔天早晚观察 1 次,统计愈伤组织的长势、质地,每种处理接种材料 60 个。

**1.2.3 继代培养。**21 d 后,将优化培养基中的愈伤组织转接到相同培养基中继代培养,每隔 21 d 转接 1 次,挑选生长旺盛的愈伤组织进行培养,连续继代 3 次,同时把其他培养基上的愈伤组织转移到优化的培养基中继续培养,3~5 d 后长势明显好转,继续挑选出良好的愈伤组织做继代培养。

## 2 结果与分析

**2.1 不同消毒剂消毒时间对外植体接种的影响** 由表 1 可见,0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min,污染率较小,顶芽死亡率很低,是最好的无菌处理方法,10% Ca(ClO)<sub>2</sub> 消毒 20 min 的处理效果次之。0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 消毒 8 min 和 10% 的 Ca(ClO)<sub>2</sub> 消毒 15 min,造成细菌性污染严重,分别达 99% 和 92%,而消毒时间过长又使顶芽的细胞受到损伤被杀死,所以在之后的试验中均采用 70% 酒精浸 25 s,再用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 加 2 滴吐温-20 浸 10 min 倒出,无菌水冲洗数次后接种。

表 1 不同消毒剂消毒时间对外植体接种的影响

Table 1 Effects of disinfection time by different disinfectors on explant inoculation

消毒剂 Disinfectant	消毒时间//min Disinfection time	外植体//个 Explant	死亡率 Mortality %	污染率//% Contamination rate
0.1% HgCl <sub>2</sub>	8	25	0	99
0.1% HgCl <sub>2</sub>	10	25	1	12
0.1% HgCl <sub>2</sub>	12	25	60	1
10% Ca(ClO) <sub>2</sub>	15	25	3	92
10% Ca(ClO) <sub>2</sub>	20	25	20	12
10% Ca(ClO) <sub>2</sub>	25	25	40	8

**作者简介** 董社琴(1958-),女,山西运城人,教授,从事植物细胞工程基因工程的教学和研究。

**收稿日期** 2008-06-23

**2.2 不同浓度 6-BA、2,4-D 对对节白蜡顶芽愈伤组织诱导的影响** 将顶芽外植体分别接种于 25 个处理的培养基中,每个处理接种 60 个,从表 2 可看出,单因素植物激素对愈伤组织诱导不利,在 6-BA 一定的条件下,2,4-D 浓度增加,则愈伤组织的诱导率、质地、长势均发生明显的变化,在 2 种激素不同配比的培养基上,95% 的外植体在接种 5~8 d 后,开始拱起,切口处膨大,颜色渐渐变黄,15~18 d 切口处形成松脆的颗粒状愈伤组织,处理⑬、⑭、⑱、⑲出愈率高,质地好,改变激素水平和配比继续培养就会有再生植株,其最佳培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L 2,4-D。

表 2 不同浓度激素对对节白蜡愈伤组织诱导的影响  
Table 2 Effects of different concentrations on the callus induction of *Fraxinus hupehensis*

处理 Treatment	6-BA mg/L	2,4-D mg/L	外植体 数//个 Explant number	出愈率 % Callus rate	愈伤组织质量 Callus quality
①	0	0	60	0	很少生长
②	1.0	1.0	60	50	小,生长缓慢
③	2.0	1.5	60	53	小,色泽暗淡,生长缓慢
④	3.0	2.0	60	55	稍大,色泽暗淡,生长缓慢
⑤	4.0	2.5	60	56	稍大,色泽暗淡,生长缓慢
⑥	0	1.0	60	47	稍大,色泽暗淡,生长缓慢
⑦	1.0	1.5	60	62	大,色泽淡黄,生长慢
⑧	2.0	2.0	60	65	大,色泽淡黄,生长慢
⑨	3.0	2.5	60	66	外部松软,内部实硬,生长慢
⑩	4.0	0	60	68	外部松软,内部实硬,有芽点
⑪	0	1.5	60	52	稍大,色泽暗淡,生长缓慢
⑫	1.0	2.0	60	67	外部松软,内部实硬,有芽点
⑬	2.0	2.5	60	68	外部松软,内部实硬,芽点多
⑭	3.0	0	60	68	外部松软,内部实硬,芽点多
⑮	4.0	1.0	60	70	外部松软,内部实硬,芽点多
⑯	0	2.0	60	50	稍大,色泽暗淡,生长缓慢
⑰	1.0	2.5	60	70	外部松脆,质地致密,生长快
⑱	2.0	0	60	94	外部松脆,质地致密,生长快,出现小硬颗粒
⑲	3.0	1.0	60	96	外部松脆,质地致密,生长快,表面有许多突起
⑳	4.0	1.5	60	96	外部松脆,质地致密,生长快
㉑	0	2.5	60	51	稍大,松软,生长慢
㉒	1.0	0	60	88	外部松软,内部实硬
㉓	2.0	1.0	60	90	外部松脆,生长过旺
㉔	3.0	1.5	60	94	外部松散,质地细软,属亢进型
㉕	4.0	2.0	60	91	外部松散,质地细软,属亢进型

**2.3 愈伤组织的继代培养** 将生长 21 d 的松脆愈伤组织转接到培养基中进行继代培养,10~20 d 后,再次长出新鲜的松脆型淡黄色的愈伤组织,生长速度明显加快,因此每隔 21 d 挑取长势好的愈伤组织继代,连续继代 3 次,同时将处理⑦、⑧、⑨、⑩、⑫、⑬、⑭、⑮、⑰、⑱、⑲的愈伤组织转接到优化培养基上继续培养,7~10 d 后相继长出新鲜的松脆型淡黄色的愈伤组织,连续继代 2 次,发现第 3 次继代后愈伤组织质地松软不理想。

**3 讨论**

(1)对节白蜡萌发力强,目前繁殖多以扦插为主,在组织培养方面国内外均没有报道。用对节白蜡顶芽诱导愈伤组织,通过愈伤组织的途径获得组培苗,其特点是成功率高,繁殖系数大,但遗传稳定性较差,对要求遗传稳定性高的作物品种,一般不采用这一途径繁殖<sup>[1]</sup>。而对节白蜡是以观赏、盆栽为主,即使产生变异也不会影响其商品价值和经济效益,所以适于采用愈伤组织增殖途径来进行种苗快速繁殖,是保护、开发和利用对节白蜡的有效途径。

(2)在对节白蜡的顶芽组织培养中,3 月和 4 月取样出愈率没有明显差别,考虑到操作方便,4 月份顶芽较大,做外植体较理想;树龄对顶芽形成愈伤组织没有明显影响,不同激素的种类以及水平和它们之间浓度配比对对节白蜡愈伤组织的诱导有显著影响。试验结果表明,MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L 2,4-D 为最佳培养基,产生的愈伤组织生长快,质地松脆并有许多突起、芽点,将此愈伤组织继代培养可加速增殖,能在短期内获得大量遗传性一致的再生植株,可为盆景制作提供丰富的材料,从而达到保护野生对节白蜡,保护生物多样性的目的。

(3)愈伤组织的继代培养要适可而止,不同基因型的外植体继代次数不同<sup>[2]</sup>,不同激素水平以及它们之间的浓度配比都和继代次数密切相关,要综合各方面因素,做到适中才能使愈伤组织有目的地生长。

**参考文献**

[1] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.  
 [2] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.  
 [3] 刘军民, 徐鸿华. 国产沉香研究进展[J]. 中药材, 2005, 28(7): 627-632.  
 [4] 周光雄, 杨永春, 石建功. 祖师麻活性化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 555-557.  
 [5] 姜秀莲, 曲淑岩, 李伟. 瑞香素对血清脂质及脂蛋白胆固醇含量的影响[J]. 药学学报, 1987, 22(1): 53-55.  
 [6] 倪奕昌, 徐月琴, 王鸣杰. 瑞香素的抗溶血和抗膜脂质过氧化作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(2): 87-89.  
 [7] 倪奕昌, 倪齐珍, 徐月琴, 等. 瑞香系抗红后期原虫作用的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(1): 30-32.  
 [8] QU S Y, JIANG X L, ZHAO X H, et al. Antithrombotic effect of daphnetin in the rat[J]. Yao Xue Xue Bao, 1986, 21(7): 498-501.  
 [9] 曲淑岩, 姜秀莲, 赵学慧, 等. 瑞香素抗血栓作用[J]. 药学学报, 1986, 21(7): 498-501.  
 [10] FINN G J, CREAVEN B S, EGAN D A. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 67(9): 1779-1788.  
 [11] 叶和杨, 熊小琴, 邱伟, 等. 瑞香素对醋酸、热板及电刺激致小鼠的镇痛作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(22): 174-176.  
 [12] 周彦忠. 生物技术在农业上的应用[J]. 现代农业科技, 2008(4): 217-217.  
 [13] 周艳, 陈训. 活性炭在高山杜鹃组织培养中的应用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1419-1420, 1704.  
 [14] 马慧, 张立军, 阮燕燕, 等. 植物组织培养技术的现状及发展趋势[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(6): 1602-1604.

(上接第 11227 页)

定了基础。

**参考文献**

[1] 刘军民, 徐鸿华. 国产沉香研究进展[J]. 中药材, 2005, 28(7): 627-632.  
 [2] 周光雄, 杨永春, 石建功. 祖师麻活性化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 555-557.  
 [3] 姜秀莲, 曲淑岩, 李伟. 瑞香素对血清脂质及脂蛋白胆固醇含量的影响[J]. 药学学报, 1987, 22(1): 53-55.  
 [4] 倪奕昌, 徐月琴, 王鸣杰. 瑞香素的抗溶血和抗膜脂质过氧化作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(2): 87-89.  
 [5] 倪奕昌, 倪齐珍, 徐月琴, 等. 瑞香系抗红后期原虫作用的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(1): 30-32.  
 [6] QU S Y, JIANG X L, ZHAO X H, et al. Antithrombotic effect of daphnetin