

香榧的组织培养和快繁*

刘海琳^{1,2}, 陈力耕¹, 王辉¹

1. 浙江大学园艺系, 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 浙江杭州 (310029)

2. 河南科技大学林业职业学院, 河南洛阳 (471000)

摘要: 本文分别对香榧愈伤组织、丛生芽、腋芽进行诱导, 并通过继代培养和生根培养获得了香榧的完整植株。这为以后开展香榧的遗传转化和品种改良研究奠定了基础。不同外植体, 其愈伤组织的诱导率和继代能力不同。叶片、芽、茎段的诱导率分别达到 81.7%、79.8%、84.2%。但易褐化死亡。只有茎段形成的愈伤组织可以在 B₅+BA 0.5 mg/L+ 2, 4-D 0.5 mg/L 的培养基上继续继代。茎段形成的愈伤组织经四到五次继代后转入 B₅+BA 0.1 mg/L+ NAA 2.0 mg/L 培养基上, 培养 20 天后有丛生芽发生。茎段在 B₅+KT 0.1mg/L+NAA 2.0 mg/L 培养基上易诱导出腋芽, 诱导率最高可达 14.4%。利用腋芽增殖和丛生芽诱导的方法均获得了完整的再生植株。这是国内外首次通过组织培养成功获得香榧完整植株的报道。

关键词: 香榧; 愈伤组织; 茎段; 组织培养

0. 前言

香榧(*Torreya grandis*)属红豆杉科香榧属,第三纪孑遗植物^[1,2],是我国特有的珍稀经济林树种。它集果用、油用、药用、材用和绿化观赏为一体,经济价值非常高。香榧种子胚乳含有营养丰富的油脂、碳水化合物、蛋白质和氨基酸^[3],是我国著名的干果和食用油原料之一^[4]。种仁炒熟后松脆可口,营养丰富,香味独特。种仁可入药,有化痰、止咳、润肺、明目、杀虫、杀菌的功效^[4]。香榧油可预防动脉硬化、冠心病^[5]。另外,香榧与其它红豆杉树木一样,也含有具有抗癌活性的生理活性物质——紫杉醇^[6]。由于香榧的珍贵及其较高的开发利用价值,近年来,学者们对香榧的研究报道逐渐增多,但研究领域主要集中在资源、栽培和良种选育等方面^[7-12]。随着生物技术和研究手段的进步,近来对香榧的探讨已进入细胞水平和分子水平的深层研究^[1,13]。因为紫杉醇被公认为具有抗癌活性,所以寻找和扩大紫杉醇的药源途径,以及通过细胞培养而研究生物碱特性方面的研究已引起科学家们的极大兴趣^[14-15]。香榧为雌雄异株,自然条件下,种子萌发缓慢,繁殖周期长,现有的繁殖方式如实生播种、嫁接、扦插法,成苗比较困难,成活率低,难以满足生产上的要求。由于榧属植物组织培养相当困难,至今国内外少有香榧组织培养方面的报道。香榧与红豆杉同科,国内外对红豆杉体细胞胚的研究已经有少量的报道^[1,2],通过组培也可能获得香榧的体细胞胚^[5],为此我们进行了本试验,为进一步建立香榧离体再生系统和快繁体系打下基础,从而为种质改良和遗传转化提供科学依据和技术支撑。

1 材料与方 法

供试材料香榧茎段采自浙江省诸暨市林业局赵家镇钟家岭和西坑村。茎段外植体采取健壮无病虫害的嫩梢,经过流水冲洗 2hr.后,在超净工作台上用 75%乙醇表面灭菌 1 min,无菌水冲洗 3 次,0.1% HgCl₂ 灭菌 8 min,无菌水冲洗 4 次,用手术刀切成 1cm 左右的小段,接种于诱导培养基中。每瓶接 5 个。。愈伤诱导和继代的基本培养基为 SH^[3],体细胞胚诱导和生长基本培养基为 1/2 SH,均添加琼脂 0.05%,葡萄糖 2%,pH 值为 5.8。培养基在 121℃ 下高压灭菌 18 分钟。培养室温度为 22±1℃,光照 16 h/d,光照强度 2000 lx,后转入暗培养。

* 本课题得到教育部博士点基金(20030335118)项目资助。

1.1 不同外植体来源对愈伤组织诱导效果的影响

以叶片、茎段、顶芽为外植体，分别接种于基本培养基 B₅ 上，添加 6-BA、KT、NAA、2,4-D、IBA 不同浓度组合，浓度范围为 0.1mg/L—2.0mg/L，进行愈伤组织的诱导，观察其生长情况。

1.2 不同品种的茎段对愈伤组织诱导效果的影响

分别采取当年生优株 1 号、2 号、3 号、4 号、6 号、象牙榧、两性梅、细榧 7 号、细榧 8 号、米榧、雄株的幼嫩茎段，接种于同一培养基上，观察其愈伤组织生长情况。

1.3 腋芽的诱导与培养

将当年生嫩枝剥离叶片，常规消毒截成 0.5—1.0cm 茎段，接种于 B₅ 培养基上进行培养，两周后可观察到腋芽开始发育生长。

1.4 腋芽及丛生芽腋芽生根诱导

茎段诱导的腋芽及愈伤组织诱导的丛生芽、不定芽，转入生根培养基上进行诱导。

2 结果与分析

2.1 茎段愈伤组织的诱导结果

将切成 0.5—1.0cm 的茎段接种到不同激素浓度组合的培养基上进行培养。愈伤组织形成最短时间为 9 天，最慢的为 17 天，诱导率 20 天后趋于稳定，此时观察各个处理的诱导结果，并统计数据。结果显示：在表 2 中列出的培养基上，A—V1 培养基对茎段的愈伤组织诱导效果不太理想，只有在培养基 Z 上其诱导率超过 60%，而在 O、P 培养基上大部分外植体诱导出腋芽。试验结果显示，KT 与 IBA 的不同浓度组合在茎段的愈伤组织诱导中效果较好（见表 1），其中在 1/2B₅+KT0.1 mg/L+IBA0.8mg/L 的培养基上出愈率最高，达 84.2%，并且这些愈伤组织诱导时间最短，生长迅速。

表 1 KT 和 IBA 对茎段愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effect of KT and IBA on the callus induction of shoots

KT mg/L	IBA mg/L	接种数 number of explants	出愈数 number of calli	诱导率(%) induction rate	出愈时间(d) time to form calli	愈伤生长量 amount of calli
0.1	0.1	120	77	64.2	11	++++
0.1	0.2	120	80	66.7	11	++++
0.1	0.4	120	82	68.3	11	++++
0.1	0.6	120	98	81.7	9	+++++
0.1	0.8	120	101	84.2	9	+++++
0.1	1.0	120	99	82.5	9	+++++
0.5	0.1	120	67	55.8	12	+++
0.5	0.2	120	70	58.3	12	+++
0.5	0.4	120	70	58.3	12	+++
0.5	0.6	120	78	65.0	11	++++
0.5	0.8	120	83	69.2	11	++++
0.5	1.0	120	76	63.3	11	++++

注：以上基本培养基（Basal media）:1/2SH

由表 1 可以看出, 在 KT 质量浓度为 0.1—0.5mg/L, IBA 质量浓度为 0.5—1.0 mg/L 时愈伤组织的诱导效果较好。

茎段的愈伤组织诱导中, 大部分外植体中部膨大、裂开, 于裂口处形成愈伤组织, 也有少部分外植体于端部切口处形成愈伤组织, 随后整个茎段都愈伤化, 由茎段形成的愈伤组织呈淡黄绿色, (图 1), 质地较为坚硬。

2.2 不同品种的茎段诱导愈伤组织的结果

实验分别采取优株 1 号、2 号、3 号、4 号、6 号、象牙榧、两性梅、细榧 7 号、细榧 8 号、米榧、雄株十一种不同品种幼嫩茎段, 接种于 $1/2B_5+KT0.1 \text{ mg/L} + IBA0.8\text{mg/L}$, 40 天后统计实验结果见表 2。

表 2 不同品种对茎段愈伤组织诱导效果的影响
Table 2 Effect of different variety on the callus induction of shoots

品种 variety	接种数 number of explants	出愈数 number of calli	诱导率(%) induction rate	出愈时间(d) time to form calli	愈伤生长量 amount of calli
优株 1 号	120	82	68.3	13	+++
优株 2 号	120	90	75.0	11	++++
优株 3 号	120	94	78.3	11	++++
优株 4 号	120	97	80.8	10	+++++
优株 6 号	120	91	75.8	11	++++
象牙榧	120	88	73.3	12	++++
两性梅	120	85	70.8	12	+++++
细榧 7 号	120	80	66.7	13	+++
细榧 8 号	120	83	69.2	13	+++
米榧	120	80	66.7	13	+++
雄株	120	107	89.2	9	+++++

由表 2 可以看出, 优株 4 号其愈伤组织诱导率高于其他品种。雄株的愈伤组织诱导能力明显偏高。

茎段形成的愈伤组织在 $B_5+BA 0.5 \text{ mg/L} + 2, 4-D 0.5 \text{ mg/L}$ 的培养基上经四到五次继代之后, 颜色转为明亮的淡黄色, 愈伤组织生长迅速, 先形成一些突起的细胞团, 以后这些细胞团快速增大, 彼此接触, 使组织块体积增大 2—3 倍, 此时, 愈伤组织结构松散, 用镊子即可夹开。随后转入 $B_5+BA 0.1 \text{ mg/L} + NAA 2.0 \text{ mg/L}$ 培养继上, 培养 20 天后有丛生芽、不定芽 (见图 2) 发生。

2.3 腋芽的诱导及培养

将当年生嫩枝剥离叶片, 常规消毒截成 0.5—1.0cm 茎段, 接种于 B_5 培养基上进行培养, 两周后可观察到腋芽开始发育生长 (见图 3), 经 40 天后, 统计各处理诱导率, 结果见表 3。腋芽在 KT 和 NAA 的协同作用下诱导效果较好, 随着 KT 浓度的增加诱导率降低, NAA 浓度增大则诱导率升高, 其中在 $B_5+KT 0.1\text{mg/L}+NAA 2.0 \text{ mg/L}$ 时, 诱导效果最好, 诱导率可达 144%, 且腋芽生长速度较快。生成的腋芽转入继代培养基 40 天后, 腋芽生长成 5cm 左右的无根苗 (图 4), 然后转入生根培养基诱导生根。

表 3 KT 和 NAA 对茎段腋芽诱导效果的影响
Table 3 Effect of KT and NAA on the axillary bud induction of shoots

KT mg/L	NAA mg/L	接种茎段个数 number of shoot	出芽个数 number of buds	芽诱导率 Induction rate of buds
0.1	0.1	100	82	82
0.1	0.5	100	93	93
0.1	1.0	100	110	110
0.1	1.5	100	119	119
0.1	2.0	100	144	144
0.5	0.1	100	56	56
0.5	0.5	100	69	93
0.5	1.0	100	75	75
0.5	1.5	100	83	83
0.5	2.0	100	97	97
1.0	0.1	100	35	35
1.0	0.5	100	47	47
1.0	1.0	100	80	80
1.0	1.5	100	82	82
1.0	2.0	100	94	94

2.4 腋芽及丛生芽的生根诱导

本实验曾做了大量的关于无根苗生根诱导组合实验,但大部分无根苗仍褐化死亡,现在仅得到少量生根苗(图 5),实验过程中发现,减少无机盐如用 1/4 B₅ 培养基和添加激素 IBA 有利于香榧无根苗生根,培养基和激素浓度最佳组合还需要进一步深入研究。

3 讨论

影响茎段愈伤组织和腋芽诱导的因素很多。实验通过对采优株 1 号、2 号、3 号、4 号、6 号、象牙榧、两性梅、细榧 7 号、细榧 8 号、米榧、雄株十一种不同品种幼嫩茎段的培养,发现优株 4 号其愈伤组织与腋芽诱导率明显高于其他品种,这说明生产实践中筛选出的优良株系不仅品质、产量上乘,其生长势和茎段的再生能力也较强;通过对香榧雌、雄株幼嫩茎段的分别培养发现:同一种培养基,雄株愈伤组织诱导率高于雌株,雌株腋芽诱导率高于雄株。即在同样的培养基与激素组合下雄株易诱导出愈伤组织,雌株易诱导出腋芽。这可能与雌雄株外植体本身所含内源激素的种类和浓度水平不同有关;通过对不同时期采集当年生和二年生幼嫩枝梢的培养发现:不同时期的茎段接种后其生长速度不同,以四月下旬到五月中旬采样接种的当年生茎段出愈伤或腋芽时间最短,平均 14—15 天即可观察到,且生长速度最快、污染率低。这可能与香榧本身的生长节律有关,因为这一时期,正是香榧抽发新枝、花芽萌动时期,此时的生理活性高,代谢旺盛。

褐变是因为在愈伤组织生长过程中,外植体受伤分泌酚类物质过多,这类酚类渗出物积累氧化形成醌类物质,从而造成组织褐化、细胞死亡。这也是香榧愈伤组织生长缓慢的原因之一。

利用微繁的方式实现香榧的再生繁殖,将是一个有利的途径,通过微繁体系可以避免突变的发生,而且通过成年的外植体可以大大的缩短童期,因此,对腋芽、丛生芽促发众多根

系进一步深入研究具有重要意义。

生产中香榧繁殖速度太慢,加之砧木种子都是混采混播,实生后代性状发生分离或变异,影响优良单株嫁接后的纯度和一致性。因此,以成年树香榧茎段为外植体进行快速繁殖,对于香榧产业的开发、发展和增加农民收益意义十分重大。

本实验通过诱导香榧茎段形成愈伤组织后,再经愈伤组织诱导丛生芽,可以在短时间内增加繁殖系数,并且能够使其继续生长分化并最终形成完整植株,这是目前香榧进行再生繁殖的有效办法。

作为木本裸子植物,香榧的组织培养方面的研究极少。本实验的目标是实现香榧的组培快繁和遗传转化体系的建立,为进一步开展香榧的遗传改良和转基因研究打下良好的基础。本实验,对不同外植体和不同发育途径做了大量的探索研究,最终分别通过丛生芽、腋芽、体细胞胚获得完整植株。虽配方还不是很稳定,但为香榧快繁的深入研究打下了基础。

本实验成功获得了完整植株,从茎段接种到植株生根历时 10 个月,期间以愈伤组织的继代和植株生根所需时间最长。今后通过进一步改善培养条件,有望缩短培养过程并提高再生率,从而达到香榧快速繁殖的目的,为进一步开展基因转化和品种改良的研究提供技术平台。香榧的快速繁殖特别是对选育的香榧优良株系,可以直接用其茎段等微小器官培育成苗,既可保证其优良种性和纯度,又可在较短时间内培育出大量苗木,这对香榧的产业化发展、优良品种、品系的繁育推广和提高香榧的品质均具有很大的开发应用价值;对于香榧老产区的品种改良更新和新产区的推广利用更是具有巨大的意义和市场前景;由此可见,利用茎段进行香榧快繁具有重要的意义和应用前景。

参考文献

- 1 Salandy A, Grafton L, Uddin M R, et al. Establishing an embryogenic cell suspension culture system in florida yew(*Taxus floridana*). In vitro Cell Dev Biol,1993,29:75A
- 2 邱德有,李如玉,李铃. 红豆杉及南方红豆杉体细胞胚发生的研究. 林业科学, 1998,34(6): 50-54
- 3 Schenk T & Hildebrand. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicot plant cell cultures. Can. J. Bot., 1972. 50: 199-204
- 4 王向阳,修丽丽.香榧的营养和功能成分综述.食品研究与开发,2005(4):20-22
- 5 姜新兵,陈力耕,何新华.香榧体细胞胚发生的研究.园艺学报,2004,31(5):654~656
- 6 胡芳名,谭晓风,李红.香榧种子胚乳 DNA 抽提.经济林研究.1999,17(4):5-7
- 7 陈力耕,王辉,童品璋.香榧的主要品种及其开发价值.中国南方果树.2005,34(5):33-34
- 8 陈红星,陈华,张龙满,等.浙江省磐安县香榧种质资源调查.林业科学研究,2004,17(5): 660-665
- 9 《香榧资源调查及区划》协作组. 浙江省绍兴市香榧资源调查及区划. 1988
- 10 任钦良.香榧生物学特性的研究.经济林研究,1989,7(2):56-60
- 11 徐小彪,李卫华,蔡祖国.香榧的发展前景与栽培利用.江西园艺,2004,6:49-50
- 12 杨一光.香榧资源的生态地理分布及开发利用.湖南林业科技,1990,4:38-40
- 13 Hamrick , J . L. et al. Allozyme diversity in plantspecies, In Brown A. H. D. et al. (eds.) Plant.Population Genetics, breeding, and Genetic Resources, Sunderland: Sinauer,1990,43- 63
- 14 Magurran,A.E..*Ecological diversity and its measurement*.New Jersey:Princeton University Press,1988
- 15 Jian S G, Shi S H, Zhong Y, Tang T, Zhang Z H. Genetic diversity among South China *Heritiera littoralis* detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis. *J Genet Mol Biol*, 2002,13:272-276



图 1 茎段形成的愈伤组织

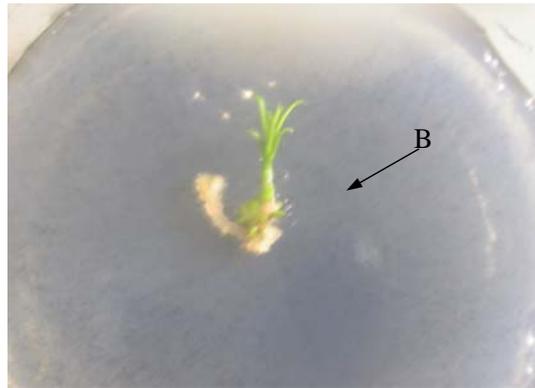


图 2 茎段形成的单根从生芽



图 3 诱导的腋芽



图 4 腋芽形成的无根苗



图 5 茎段愈伤组织诱导的植株



图 6 完整植株

Tissue culture and rapid-propagation in *Torreya grandis*

Hailin LIU^{1,2} Ligeng CHEN¹ Hui WANG¹

1. Department of Horticulture, Zhejiang University, The State Agriculture Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Biotechnology, Hangzhou 310029;

2. College of Forestry Vocation, He Nan Sci-Technology University, Luo Yang 471002,China

Abstract

This paper studied tissue culture and rapid-propagation of *Torreya grandis*. Through callus induction, multiple shoots and axillary bud induction and subsequent subculture, plantlets were obtained at last. Various explants have different callus induction rate. From leaf, bud and shoot 81.7%, 79.8%, 84.2% callus was induced. Callus from leaf and bud was not stable and couldn't proliferate on subsequent subculture due to browning which led to its death. The callus from shoot was sub-cultured on B₅ medium supplemented with 0.1-0.5mg/L 6-BA and 0.1-0.5mg/L 2,4-D. After several subculture of the callus from shoot, it was changed in- to B₅ medium supplemented with 0.1 mg/L 6-BA and 2.0 mg/L NAA for 20 days, then multiple shoots turned up and can keep on growing on appropriate medium.

The axillary bud can be induced on B₅ medium supplemented with KT 0.1mg/L and NAA 2.0mg/L. The highest frequencies was 14.4%, and the axillary bud grew well. Plantlets were obtained from multiple shoots and axillary buds. This research will establish a base for the genetic transformation and improvement of *Torreya grandis* in the future.

Keywords: *Torreya grandis*; callus; nodes with axillary bud; tissue culture