

山杜英离体培养植株再生的研究

石大兴¹ 辜云杰¹ 王米力¹ 邓小敏² 张建康¹(¹ 四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014; ² 四川省沐川县林业局, 沐川 614500)

摘 要: 研究了山杜英 [*Elaeocarpus sylvestris* (Lour.) Poir.] 带芽茎段的离体培养及植株再生。筛选出最佳培养基: (1) 启动培养: MS + BA 1.0 ~ 2.0 mg · L⁻¹ (单位下同) + NAA 0.05 + 蔗糖 3%; (2) 愈伤组织发生型丛生苗增殖培养: MS + BA 1.0 + NAA 0.5 + 蔗糖 3%; 腋芽发生型丛生苗增殖培养: MS + BA 2.0 + IBA 0.1 + 蔗糖 3%; (3) 有效苗诱导培养: MS + BA 0.5 + IBA 0.1 + GA 1.0 + 蔗糖 3%; (4) 生根培养: 1/2 MS + IBA 3.0 + 蔗糖 2%。用透气膜封口比用聚乙烯菌膜生根率明显提高, 生根明显提前。

关键词: 山杜英; 离体培养; 植株再生; 封口材料

中图分类号: S 687 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0245-04

Plant Regeneration from in Vitro Culture of *Elaeocarpus sylvestris* (Lour.) Poir.

Shi Daxing¹, Gu Yunjie¹, Wang Mili¹, Deng Xiaomin², and Zhang Jiankang¹(¹ College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; ² Forestry Bureau of Muchuan District, Sichuan Province, Muchuan 614500, China)

Abstract: This paper mainly dealt with the study on shoot organogenesis culture in vitro and plant regeneration from sprout explants of *Elaeocarpus sylvestris* (Lour.) Poir. The results showed that the best media for various stages were as follows: (1) Initial medium: MS + BA 1.0 – 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.05 mg · L⁻¹ + 3% sucrose; (2) Clump shoot regeneration medium from callus proliferation: MS + BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + 3% sucrose; Clump shoot regeneration medium from axillary buds: MS + BA 2.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹ + 3% sucrose; (3) Efficiency seedling induction medium: MS + BA 0.5 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹ + GA 1.0 mg · L⁻¹ + 3% sucrose; (4) Rooting medium: 1/2 MS + IBA 3.0 mg · L⁻¹ + 2% sucrose. In root induction culture, the rate of root formation with membrane filter is higher than that of root formation with common membrane.

Key words: *Elaeocarpus sylvestris* (Lour.) Poir.; In vitro culture; Plant regeneration; Material of sealing

1 目的、材料与方法

山杜英 [*Elaeocarpus sylvestris* (Lour.) Poir.] 除其木材可供建筑、家具等用, 树皮纤维可造纸, 根皮可入药, 果可食用外, 其树冠圆整, 老叶变红, 常年红绿相间^[1], 近年在园林绿化上很受欢迎, 苗木供不应求。通过组培快繁可获得基因型一致的优质苗木。

以盆栽 3 年生山杜英的幼嫩枝条为材料, 剪取约 4 ~ 5 cm 带腋芽茎段, 先在加有洗衣粉的洗涤液中浸泡 5 min, 再用自来水冲洗 2 ~ 3 h, 剪去展开的叶片, 取 1.5 cm 左右带 1 个腋芽的茎段, 75% 酒精浸 20 s, 转入 0.1% 升汞溶液中灭菌 8 min, 用无菌水冲洗 5 ~ 6 次。

将已灭菌的外植体接种于启动培养基上, 暗培养 7 d 后转入光培养。启动培养基以 MS 为基本培养基并附加不同的生长调节剂, 琼脂 0.7% ~ 0.8%, pH 5.8 ~ 6.0; 培养温度 (26 ± 2) °C; 光照 12 h/d, 光照强度 2000 lx。每处理接种 30 个外植体, 培养 40 d 统计出芽率 (发生芽的外植体占无菌外

收稿日期: 2003 - 07 - 01; 修回日期: 2003 - 10 - 14

基金项目: 国务院三峡工程建设委员会移民开发局资助项目 (2000-020)

植体总数的百分率) 及出芽指数 (发生芽的外植体上的出芽数)。

初代培养 40~50 d 后, 将分化出芽的茎段接种于增殖培养基上, 经过 2~3 次继代后可在茎段基部形成愈伤组织并出现丛生芽。每个处理接种 20 个新芽茎段, 继代 4 次后统计月增殖倍数 (每个茎段上丛生芽数/每个茎段上原有腋芽数/继代次数) 以及每个茎段上的有效苗 (高 3 cm 以上) 数, 继代时间 30 d。

将继代 5 次以上的丛生芽置于有效苗诱导培养基上: MS + BA (0.5、1.0 mg · L⁻¹) + IBA (0.1 mg · L⁻¹) + GA (0.5、1.0 mg · L⁻¹), 每个处理接种 30 块 1 cm² 芽丛, 继代 3 次并统计月增殖倍数 (每块芽丛的丛生芽数/芽丛原有丛生芽数/继代次数), 以及每块芽丛的有效苗数和有效苗高。

将 3 cm 以上小苗切离转移到生根培养基培养, 培养基为 1/2 MS, 分别附加 IBA (0、0.5、1.0、2.0、3.0 mg · L⁻¹) 和 NAA (0、0.5、1.0、2.0、3.0 mg · L⁻¹)。在此试验结果的基础上比较使用聚乙烯菌膜和聚氟乙烯透气膜封口对生根的影响。

2 结果与分析

2.1 芽器官的诱导

将山杜英茎段接种于启动培养基中, 20 d 后腋芽萌动, 同时茎段切口处开始膨大。30~40 d 后相继出现 1~5 个新芽, 有的可长至 1.5~2.0 cm (图版, 1)。

从表 1 中可以看出, 出芽率和出芽指数都受生长调节剂及浓度影响, NAA 配合 BA 使用比 IBA 配合 BA 使用效果更好, 说明 NAA 更适合山杜英芽的诱导分化。结果表明代号 B₈ 和 B₉ 的培养基有较高的出芽率和出芽指数, 因此比较适宜山杜英芽的诱导分化培养基为 MS + BA 1.0~2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.05 mg · L⁻¹。

2.2 丛生苗的诱导

山杜英丛生苗的诱导中有两种类型。一种是在茎段基部形成愈伤组织, 其增殖很快, 只需一代就可从 0.5 cm² 长至 1 cm², 并且整个愈伤组织表面为白色小颗粒, 切开可以观测到内部为绿色致密小颗粒 (图版, 2), 愈伤组织表面逐渐分化出芽, 并进一步形成丛生苗, 这种形成方式被认为是愈伤组织发生型 (C 型, 图版, 3)。另一种是由腋芽直接萌发而成丛生苗, 被认为是腋芽发生型^[2] (A 型, 图版, 4), 这种类型增殖倍数比较适中, 一般月增殖倍数为 3~4 倍, 小苗粗壮, 叶片大小适中, 可以得到较多的有效苗, 工厂化育苗时选择 A 型为宜。

结果表明, 以 BA (1.0、2.0) 附加 IBA (0.1、0.5) 和 NAA (0.1、0.5) 效果较好, C₂ 培养基使 A 型的增殖倍数最高。C₇ 培养基使 C 型增殖倍数适中且有效苗数较多。

表 1 生长调节剂对启动培养的影响

Table 1 Effects of different growth regulator on initial culture

代号 Code	培养基 Media (mg · L ⁻¹)			样本数 Number of samples	出芽率 SFF (%)	出芽指数 SFI (%)
	BA	IBA	NAA			
A ₁	0.5	0.1	-	23	53.84	0.38
A ₂	0.5	0.5	-	26	47.06	1.12
A ₃	0.5	1.0	-	21	46.16	0.31
A ₄	1.0	0.1	-	25	42.86	0.50
A ₅	1.0	0.5	-	22	50.00	0.72
A ₆	1.0	1.0	-	20	46.67	1.20
A ₇	2.0	0.1	-	27	38.47	0.77
A ₈	2.0	0.5	-	22	31.58	0.83
A ₉	2.0	1.0	-	26	30.59	0.82
B ₁	0.5	0.01	-	23	70.59	1.18
B ₂	0.5	-	0.05	20	50.00	1.01
B ₃	0.5	-	0.1	21	64.70	1.18
B ₄	1.0	-	0.01	22	68.75	1.75
B ₅	1.0	-	0.05	28	78.94	2.11
B ₆	1.0	-	0.1	20	61.11	1.00
B ₇	2.0	-	0.01	27	70.00	1.90
B ₈	2.0	-	0.05	22	78.59	2.57
B ₉	2.0	-	0.1	24	60.00	1.66

Note: SFF, shoot forming frequency; SFI, shoot forming index.

表 2 培养基对丛生苗诱导的影响

Table 2 Effects of different media on clump shoots induction

代号 Code	培养基 Media (mg · L ⁻¹)			月增殖倍数 Ratio of monthly multiplication		有效苗数 Number of efficiency seedling	
	BA	NAA	IBA	A 型 Type A	C 型 Type C	A 型 Type A	C 型 Type C
C ₁	2.0	0	0.5	3.5	5.1	3.1	2.2
C ₂	2.0	0	0.1	4.1	3.2	4.2	2.5
C ₃	1.0	0	0.5	3.1	4.3	3.5	2.3
C ₄	1.0	0	0.1	3.2	4.2	3.1	2.4
C ₅	2.0	0.5	0	3.1	4.9	3.4	2.6
C ₆	2.0	0.1	0	2.4	3.1	3.9	2.1
C ₇	1.0	0.5	0	2.7	3.9	3.3	2.9
C ₈	1.0	0.1	0	3.1	3.7	3.6	2.7

注: A 型为腋芽发生型, C 型为愈伤组织发生型。

Note: Type A: clump shoot regeneration from axillary buds; Type C: clump shoot regeneration from calli.

2.3 有效苗的诱导

C 型丛生芽增殖系数较高, 丛生芽比较密集, 影响芽的抽长, 在培养时适当降低 BA 浓度并附加 GA (0.5、1.0) 对芽的抽长有明显的效果 (表 3), 采用 D₂ 培养基对有效苗的诱导有较好效果 (图版, 5)。

2.4 生根培养

切取有效苗转入生根培养基中培养, 30 d 统计生根情况 (表 4), 结果表明: 添加 IBA 和 NAA 对诱导生根有显著效果。在 IBA 和 NAA 添加浓度较低时, 相同浓度下, IBA 的效果好于 NAA。当二者的浓度都达到 3 mg · L⁻¹ 时, 生根率差异不大, 只是时间上有差异。诱导的根大多白色健壮且呈辐射状 (图版, 6、7、8)。

在此基础上选取 E₄ 和 E₈ 培养基比较不同封口材料对生根率的影响 (表 5)。使用聚氟乙烯透气膜后生根时间约提前 7 d, 生根率高达 98% 以上。生根条数和根长则无显著变化。可能是因为使用透气膜后有利于气体交换, 降低瓶内 CO₂ 浓度以及湿度而有利于根的发生^[3]。在以聚乙烯菌膜封口时, 大多数根为正常辐射根, 但有少数表现出异常状态, 向上生长 (图版, 9)。而以聚氟乙烯菌膜封口则没有这种异常状态。这可能是因为聚乙烯菌膜透气性不好, 使培养基中氧气较低以及湿度过大, 使根表现出向上生长。在使用聚氟乙烯菌膜时, 由于其良好的透气性使根生长只表现为向地性 (图版, 10)。

表 5 透气膜对生根的影响

Table 5 Effects of membrane filter on rooting

培养基 Media(mg · L ⁻¹)			封口膜 Membrane	生根率 Rooting ratio(%)	生根时间 Rooting time(d)	平均根数 Mean number of roots	平均根长 Mean length of roots(cm)
代号 Code	IBA	NAA					
E ₄	3.0	-	聚乙烯 POLY	89	18	6	4.1
E ₈	-	3.0	聚乙烯 POLY	85	20	5	5.9
E ₁₀	3.0	-	聚氟乙烯 PVF	100	11	7	6.3
E ₁₁	-	3.0	聚氟乙烯 PVF	98	15	6	6.7

2.5 炼苗移栽

生根苗在温室大棚中打开封口膜炼苗 2 d, 然后取出小苗洗净, 移栽到珍珠岩: 蛭石 = 1:1 的基质中, 置于半阴处, 注意浇水; 15 d 以后移栽到培养钵中, 成活率达 70% 以上 (图版, 11)。

田间生长的山杜英, 因其老叶变红而倍增观赏性。在山杜英离体培养中也发现叶片变红。在继代 5 次以后, 老叶和某些新叶变红 (图版, 12), 其机理尚需进一步研究。

参考文献:

- 1 陈有民主编. 园林树木学. 北京: 中国林业出版社, 1990. 561 ~ 562
- 2 石大兴, 石铁松, 王米力, 等. 巨桉芽器官离体培养与快繁体系建立的研究. 林业科学, 2003, 39 (1): 69 ~ 74
- 3 Tsuru M, Koda M, Inoue M. Efficient plant regeneration from multiple shoots using the 'open culture system'. Scientia Horticulturae, 2000, 86: 81 ~ 88

表 3 培养基对有效苗诱导的影响

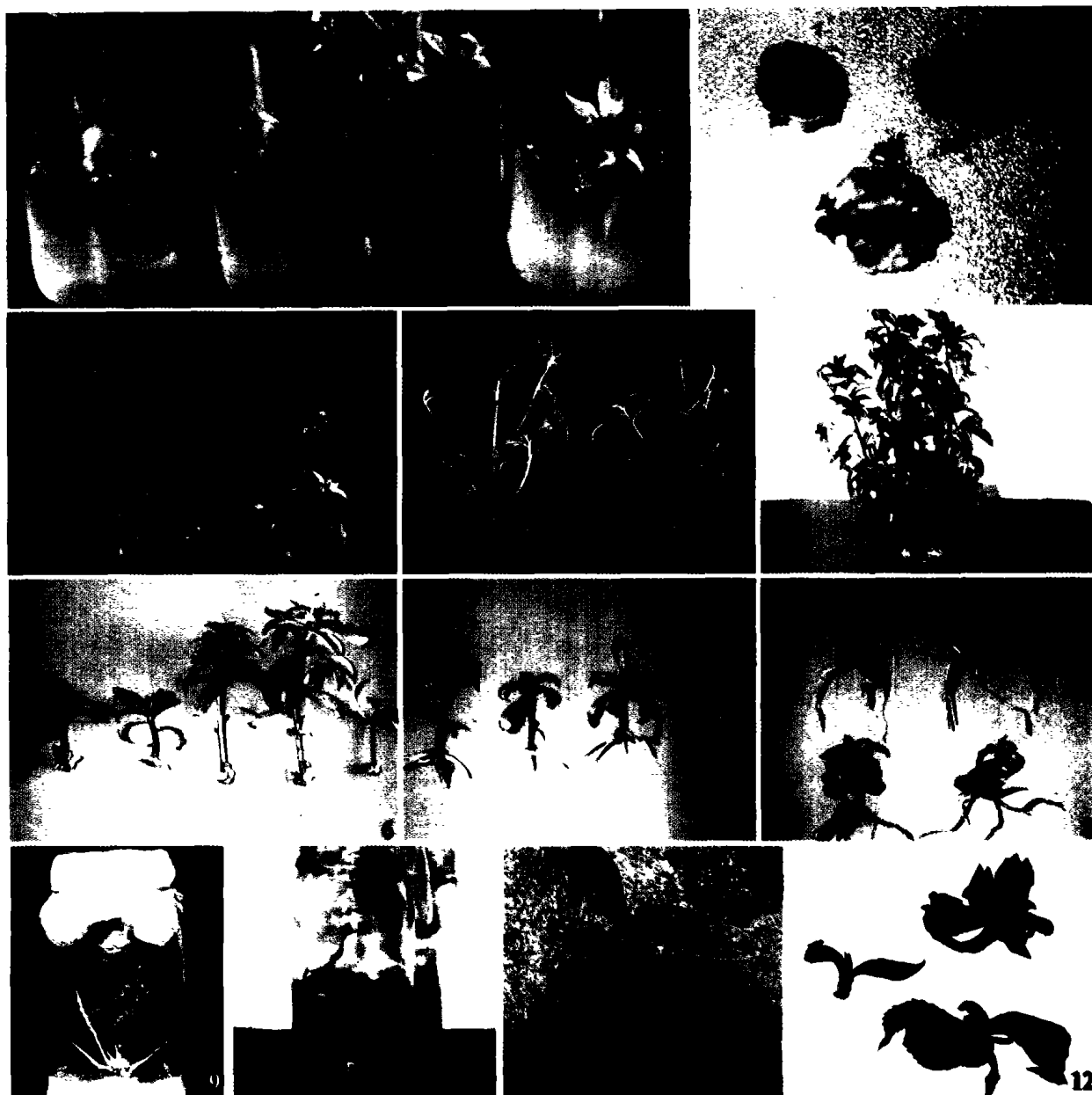
Table 3 Effects of different media on efficiency seedlings induction

培养基 Media(mg · L ⁻¹)				增殖倍数 Ratio of monthly multiplication	有效苗数 Number of efficiency seedling	有效苗高 Height of efficiency seedlings(cm)
代号 Code	BA	IBA	GA			
D ₁	0.5	0.1	0.5	3.3	6.3	3.5
D ₂	0.5	0.1	1.0	3.6	5.8	3.8
D ₃	1.0	0.1	0.5	4.1	4.7	3.2
D ₄	1.0	0.1	1.0	4.3	5.1	3.7

表 4 生长调节剂对生根的影响

Table 4 Effects of different growth regulator on rooting

培养基 Media(mg · L ⁻¹)			生根率 Rooting ratio (%)	生根 时间 Rooting time(d)	平均根数 Mean number of roots	平均根长 Mean length of roots (cm)
代号 Code	IBA	NAA				
E ₁	0.5	-	40	31	2	3.1
E ₂	1.0	-	53	30	5	3.3
E ₃	2.0	-	60	27	5	3.8
E ₄	3.0	-	89	18	6	4.1
E ₅	-	0.5	32	28	2	2.3
E ₆	-	1.0	33	28	3	2.8
E ₇	-	2.0	53	30	3	3.1
E ₈	-	3.0	85	10	5	5.9
E ₉	0	0	0	0	0	0



图版说明: 1. 启动培养; 2. 愈伤组织; 3. 丛生苗 (C 型); 4. 丛生苗 (A 型); 5. 有效苗的分化; 6. 生根苗 (10 d); 7. 生根苗 (15 d); 8. 生根苗 (30 d); 9. 根向性异常; 10. 根向性正常; 11. 移栽成活的试管苗; 12. 叶片花青素的变化。

Explanation of plates: 1. Initial in vitro culture; 2. Callus; 3. Type C of clump shoots; 4. Type A of clump shoots; 5. Differentiation of efficiency seedlings; 6. Rooting seedlings (10 d); 7. Rooting seedlings (15 d); 8. Rooting seedlings (30 d); 9. Rooting upward; 10. Rooting downward; 11. In vitro plantlets transplanted in a flowerpot; 12. Change of anthocyanidin in leaf.

· 新书推荐 · 《世界名花赏析》 主编 刘祖祺 (南京农业大学) 宛成刚 (南京金陵科技学院)

第一篇为春、夏、秋、冬四季名花与赏析, 介绍了 75 科 200 多种珍品、名品花卉, 展现了 100 多个国家的国花, 160 多个省、市市花, 并配有彩照近 600 幅。第二篇为花卉应用、赏析的基本知识和技艺, 介绍了赏花知识、赠花常识、插花技艺、鲜花保鲜方法等。本书突出了世界各国花文化的内容, 如典故、神话、传说、诗词等, 不仅可作为高等院校师生、园林花卉工作者及花卉爱好者借鉴与欣赏, 同时可作为高雅的礼品及珍藏品。原价 198 元, 8 折优惠。欲购者请直接与刘祖祺教授联系。邮编: 210095; 地址: 南京市卫岗, 南京农业大学生命科学学院。