

天台鹅耳枥的组织培养与快速繁殖

陈 珍¹, 陈模舜¹, 孙骏威², 蒋 明¹

(1. 台州学院生命科学学院, 台州 318000; 2. 中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 为了首次建立天台鹅耳枥的组织培养与植株再生体系, 以其茎段、未萌发的新芽及萌发后的嫩芽、叶片等为外植体进行离体培养试验。结果表明, 以新生的嫩芽为外植体, 成功诱导不定芽的分化与增殖, 最佳培养基配方为 1/2 MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+PVP 0.2%。壮苗培养基配方为 1/2MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹; 最佳生根培养基配方为 1/4 MS+IBA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹。

关键词: 天台鹅耳枥; 组织培养; 不定芽增殖; PVP

中图分类号: S792.15; S723.132.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)06-1009-04

Tissue culture and rapid propagation of *Carpinus tientaiensis*

CHEN Zhen¹, CHEN Mo-shun¹, SUN Jun-wei², JIANG Ming¹

(1. College of Life Sciences, Taizhou University, Taizhou 318000; 2. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018)

Abstract: To establish a system of tissue culture and plantlet regeneration from *Carpinus tientaiensis*, stem segments, buds, or buds under germination and leaves were used as explants. The results showed that the optimum medium for induction and multiplication of adventitious shoots was 1/2 MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+ PVP 0.2% when buds was used as explants. The medium for cultivating strong seedling was 1/2 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+ NAA 0.05 mg·L⁻¹, and the optimum medium for root regeneration was 1/4 MS+IBA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹.

Key words: *Carpinus tientaiensis*; tissue culture; multiplication of adventitious shoots; PVP

天台鹅耳枥 (*Carpinus tientaiensis*), 桦木科 (Betulaceae) 鹅耳枥属落叶乔木, 生于海拔 800~1 000 m 的山林中, 为浙江特有种^[1-2]。由于生境的严重碎化和繁殖能力较弱, 天台鹅耳枥濒临灭绝, 植株的数量十分稀少, 分布区域狭窄, 仅在天台华顶山西茅栅山坡林中存有 21 株, 分布面积约 0.3 hm², 处于极危状态, 被列为国家二级重点保护野生植物^[3-4]。天台鹅耳枥对研究桦木科植物地理、植物区系和生物多样性等方面均有重要的科研价值。目前国内外有关天台鹅耳枥的研究还甚少, 陈贝贝等^[5]利用 ITS 序列进行了进化分析, 陈模舜等^[2]研究了其营养器官的解剖学结构, 但天台鹅耳枥的繁育尚未有前人研究。因此亟需深入开展天台鹅耳枥的育苗和保护生物学研究。本试验首次探究天台鹅耳枥的组织培养体系, 以期为其生物技术育种、种质资源保存、快速繁殖、人为控制生长发育等研究

奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及外植体的选择

2010 年冬末春初, 采集天台鹅耳枥 (*Carpinus tientaiensis*) 带芽枝条, 以饱满待萌发的新芽、刚萌发的嫩芽、茎段及幼嫩的叶片作为外植体, 进行组织培养研究。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的处理与接种 待萌发的新芽: 摘取含苞待放的新芽, 加少量洗洁精洗涤后流水冲洗, 于超净工作台前以 70% 酒精消毒 60 s, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 最后以无菌水冲洗 6~8 次。接种时用无菌滤纸吸去残留水分, 直接接种, 或先于无菌培养皿上剥去外层叶片, 获得茎尖, 再接种到各种诱导培养基上。

收稿日期: 2013-02-26

基金项目: 浙江省台州市科技计划项目 (1202TG01, 071KY07) 资助。

作者简介: 陈 珍, 女, 博士, 讲师。E-mail: chenzh@tzc.edu.cn

带芽茎段：剪取 1.0~2.0 cm 长的节段，按上述方法清洗后酒精消毒 90 s，升汞消毒 15 min，无菌水冲洗后切取 0.5~1.0 cm 的茎段，接种于各种诱导培养基上。

萌发的嫩芽：枝条采回后于实验室插在水中，置于阳光可见处，春暖后新芽萌发，剪取新生嫩芽以酒精消毒 30 s，升汞消毒 8 min 后以无菌水冲洗，接种于各种诱导培养基上。

叶片：将新生的叶片灭菌处理后切成 0.5 cm × 0.5 cm 见方的叶盘，接种于各种诱导培养基上。

1.2.2 培养基配方的选择 各种诱导培养基见表 2，蔗糖为 3%，琼脂为 0.7%。壮苗培养基为 S8：1/2MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹。生根培养基见表 1，正交设计，不含肌醇，蔗糖为 2%，琼脂 0.7%。

表 1 天台鹅耳枥不定根诱导培养基

培养基编号 Number of medium	基本培养基 Basic medium	NAA /mg·L ⁻¹	IBA /mg·L ⁻¹
R1	1/4 MS	0.1	1.0
R2	1/4 MS	0.5	0.5
R3	1/4MS	1.0	0.1
R4	1/2MS	0.1	0.5
R5	1/2MS	0.5	0.1
R6	1/2MS	1.0	1.0
R7	MS	0.1	0.1
R8	MS	0.5	1.0
R9	MS	1.0	0.5

1.2.3 培养条件 外植体接种到相应培养基上，置于温度 (25±1) °C、光照强度 100 μmol·m⁻²·s⁻¹，光

照时间 12 h·d⁻¹ 的条件下培养。

1.2.4 炼苗和移栽 待植株健壮生根后，打开培养瓶，敞口适应 3 d，洗去根部培养基，栽植在基质中，以保鲜膜覆盖保湿，待苗健壮后移入山土中栽植。

1.2.5 统计分析 数据采用平均数±标准差表示，数据分析采用 DPS 软件进行 LSD 检验和方差分析，显著水平为 P<0.05。

2 结果与分析

2.1 天台鹅耳枥不同外植体的诱导培养

以未萌发的芽苞和茎段直接接种，容易滋生霉菌，污染率高而诱导率低。剥取茎尖，又易造成枯萎而未能获得芽的生长和增殖。以幼嫩叶片为外植体，可获得愈伤组织，但愈伤组织如何分化成芽，还需实验探索。以萌发的嫩芽为外植体，成功获得不定芽的增殖，诱导率可达 100%。

2.2 不同培养基对天台鹅耳枥叶片愈伤组织形成的影响

叶片外植体接种到诱导培养基上，叶片逐渐膨大，在切口处可见致密的愈伤组织形成 (图 1)，但愈伤组织在继代时未能分化形成不定芽，这还需要进一步的试验。从愈伤组织诱导率来看，基本培养基为 1/2 MS 时，细胞分裂素和生长素比例为 1:1 (6-BA 和 NAA 均为 0.5 mg·L⁻¹)，愈伤组织形成率可达 100%；6-BA 浓度过低，愈伤组织的诱导率低；而当 6-BA 达 2.0 mg·L⁻¹ 时，与 NAA 0.2 mg·L⁻¹ 组合，并不能诱导愈伤组织的形成 (表 2)。此时，改变基本培养基成分，可诱导愈伤组织形成，当基本培养基为 MS 或者改良基本培养基的无机盐成分，80% 左右的叶盘切口处能形成愈伤组织 (表 2)。

表 2 不同培养基配方对天台鹅耳枥叶片愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different culture media on callus induction from leaves of *C. tientaiensis*

培养基编号 Number of medium	基本培养基 Basic medium	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	活性炭/% Activate carbon	聚乙烯吡咯烷酮 PVP /%	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus
S1	1/2 MS	0.05	0.1	0	0	30
S2	1/2 MS	0.5	0.5	0	0	100
S3	1/2 MS	1.0	0.1	0	0	50
S4	1/2 MS	2.0	0.2	0	0	0
S5	MS	2.0	0.2	0	0	77.78
S6	N6 大量+MS 微量 +B5 有机物	2.0	0.2	0.2	0	80
S7	1/2 MS	2.0	0.2	0.2	0	0
S8	1/2 MS	2.0	0.2	0	0.2	0

2.3 不同培养基对天台鹅耳枥新芽生长与不定芽增殖的影响

天台鹅耳枥枝条在实验室中扦插 15~30 d 后，新

芽萌发，以新生芽为外植体，成功避免了外植体的污染，污染率降为 0。新芽存活后，在不同培养基上可诱导其增殖形成不定芽。由表 3 可知，6-BA 浓度

过低,不能启动不定芽的分化,当 6-BA 浓度增加到 $0.5\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,能在一定程度上诱导不定芽的形成,新芽分化获得一定数目的不定芽,但增殖系数较低。提高 6-BA 浓度有利于促进芽的分化,只是尽管 6-BA 浓度提高到 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每个芽的增殖系数也只有 4~7,且芽生长缓慢。改变基本培养基成分,为 MS 全配方培养基或者调整后的配方(N6 大量+MS 微量+B5 有机物),依然不利于不定芽的增殖。

表 3 不同培养基配方对天台鹅耳枥新芽分化启动与增殖的影响

Table 3 Effects of different culture media on axillary bud multiplication of *C. tientaiensis*

培养基编号 Number of medium	接种外植体数 Number of explants	新芽分化与增殖系数 Bud formation and proliferation coefficient
S1	20	1.00 ± 0.00^d
S2	20	2.80 ± 0.83^c
S3	20	5.20 ± 0.45^b
S4	20	5.80 ± 1.30^b
S5	20	1.00 ± 0.00^d
S6	20	1.00 ± 0.00^d
S7	20	1.00 ± 0.00^d
S8	20	15.83 ± 2.26^a

注: 同列中不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

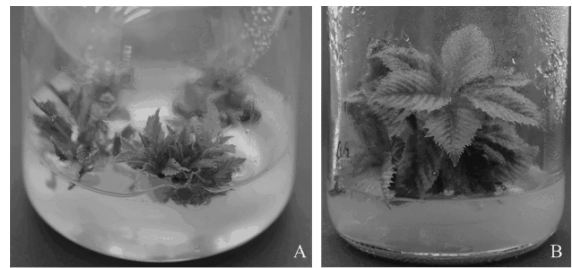
Note: The different letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level.



图 1 天台鹅耳枥叶片诱导的愈伤组织

Figure 1 The callus induction from leaves of *C. tientaiensis*

虽然在外植体基部未见褐化现象,但木本植物往往会分泌一些物质影响外植体的诱导或增殖,因此在培养基中添加了活性炭(AC)或聚乙烯吡咯烷酮(PVP),结果表明,活性炭抑制了天台鹅耳枥不定芽的增殖,而 PVP 却可显著促进其不定芽的增殖,半个月就可使增殖系数增加到 15.83,极大地缩短了生长周期(图 2A)。因此天台鹅耳枥不定芽诱导和增殖的最佳培养基配方为: $1/2\text{ MS}+6\text{-BA } 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{PVP } 0.2\%$ 。此外,我们在后续的继代实验中还发现,经过 PVP 处理后获得的不定芽在继代增殖时可不添加或减少 PVP 的添加,仍有较好的增殖效果。



A: 不定芽的增殖; B: 壮苗培养

A: Multiplication of adventitious shoots; B: strong seedling culture

图 2 天台鹅耳枥不定芽的增殖与生长

Figure 2 The multiplication and growth of adventitious shoots of *C. tientaiensis*

2.4 天台鹅耳枥组培苗的壮苗与生根

切取天台鹅耳枥不定芽,转至激素浓度降低的壮苗培养基($1/2\text{ MS}+6\text{-BA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)中,一个月后幼苗健壮生长(图 2B)。然后转移至生根培养基中(图 3)。天台鹅耳枥较难生根。表 1 所设计的 9 种生根培养基配方,R1 最适合,可使天台鹅耳枥的生根率达 67%以上;R2 培养基上有 50%左右的外植体生根,R3 仅有 33.3%外植体生根,而 $1/2\text{ MS}$ 和 MS 均不能诱导天台鹅耳枥不定根的形成。

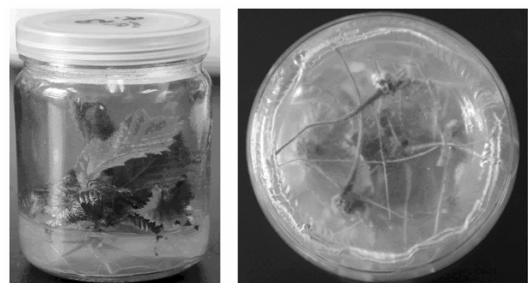


图 3 天台鹅耳枥不定根的诱导

Figure 3 The induction of adventitious roots of *C. tientaiensis*

2.5 天台鹅耳枥组培苗的炼苗与移栽

待试管苗健壮生根后,微开培养瓶盖进行炼苗。3 d 后取出并洗净根部附着的培养基,移入培养基质(蛭石:珍珠岩:松木屑=3:1:1)种植,初期以保鲜膜覆盖保湿。移栽成活率在 70%以上。

3 小结与讨论

播种、扦插和嫁接等是目前木本植物常采用的育苗方式,但从已有的研究来看,同属的欧洲鹅耳枥种子繁殖过程复杂,如要在种子未成熟时收集,经过 3~4 个月层积及变温处理,方能打破休眠,但发芽率仍不甚理想;欧洲鹅耳枥的木质部为散孔材,扦插繁殖生根困难,且技术要求较高^[6]。利用组织培

养技术探索天台鹅耳枥的繁殖,可克服上述问题,实现濒危植物的种质资源保护。黄丽春等^[7-8]以普陀鹅耳枥的种胚和芽体为外植体,成功获得了普陀鹅耳枥的再生苗。作者以珍稀濒危植物天台鹅耳枥的茎段、未萌发的新芽及萌发后嫩芽、叶片等为外植体进行离体培养试验,成功建立了再生体系。诱导愈伤组织的最佳外植体为新生叶片,最佳培养基为 $1/2\text{ MS}+6\text{-BA}0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA}0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;诱导不定芽的最佳外植体为新生的嫩芽,最佳培养基配方为 $1/2\text{ MS}+6\text{-BA}2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA}0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{PVP}0.2\%$,增殖系数可达15.83。经壮苗培养($1/2\text{ MS}+6\text{-BA}0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA}0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)后诱导生根,最佳生根培养基配方为 $1/4\text{ MS}+\text{IBA}1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA}0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

木本植物的特殊结构、细胞组成与木质化程度,均影响着其组织培养的成功率和生长周期。有报道认为,木本植物初代培养时无机盐浓度过高可引起酚类物质的大量外溢,影响芽的形成与生长,因而常采用低盐基本培养基如 $1/2\text{ MS}$ 或 WPM ^[9-10]。研究表明,减少无机盐的用量,以 $1/2\text{ MS}$ 作为基本培养基,有利于天台鹅耳枥不定芽的增殖。

细胞分裂素与生长素是决定器官分化的关键物质。1990年,Chalupa^[11]成功地利用欧洲鹅耳枥的茎为初始外植体快繁出欧洲鹅耳枥植株,并发现附加高浓度的BAP($0.6\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)虽能促进不定芽的形成,但不定芽生长缓慢且较短,而低浓度的BAP($0.1\sim 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)更有利于不定芽的形成与分化^[11]。本试验却发现,不定芽诱导启动时,低浓度的6-BA并不利于天台鹅耳枥不定芽的形成与分化,提高6-BA浓度有利于提高增殖系数。但6-BA浓度高时芽的生长也是较短小,因此在壮苗时降低6-BA浓度,以实现茎的伸长和叶的生长(图2B)。

目前,植物组织培养中采用的抗褐化剂主要有硫代硫酸钠、Vc等抗氧化物质和活性炭、PVP等吸附剂,但不同的抗褐化剂在不同植物种类组织培养过程中的作用存在差异^[12-13]。培养基中加入活性炭抑制了天台鹅耳枥不定芽的增殖和生长,可能活性炭具有较强的吸附能力,使得培养基内有效物质浓度降低而限制芽的增殖。PVP为聚乙烯吡咯烷酮。顾福根等^[14]报道在培养基中加入一定量的PVP可有效防止白萼吊钟海棠外植体褐变,提高外植体的分化率和增殖倍数。本试验结果表明,PVP对天台鹅耳枥不定芽的启动诱导起着十分重要的作用,能显著促进不定芽的增殖。但在乌药等植物的组织培

养中,PVP对芽的分化没有显著的促进效果^[15-16]。

试管苗生根时常通过降低培养基的营养元素、糖浓度来提高生根率;而且,由于肌醇对生根影响不大,某些条件下甚至起抑制作用,故去除^[17]。以MS或 $1/2\text{ MS}$ 为基本培养基,调整激素组合,均未能诱导天台鹅耳枥的生根。只有当无机盐降为 $1/4\text{ MS}$ 时,才可见天台鹅耳枥组培苗的生根。IBA和NAA均为不定根诱导时常用的激素。从实验结果看,IBA更利于促进天台鹅耳枥不定根的生成,因此选用 $1/4\text{ MS}+\text{IBA}1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA}0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最佳的生根培养基配方。

参考文献:

- [1] 林夏珍,楼炉煊.浙江省国家重点保护野生植物资源[J].浙江林学院学报,2002,19(1):31-35.
- [2] 陈模舜,柯世省,杨勇宇,等.珍稀濒危植物天台鹅耳枥营养器官的解剖学研究[J].浙江林业科技,2010,30(5):14-19.
- [3] 王昌腾,叶春林.浙江省特有野生珍贵植物濒危原因及保护对策[J].福建林业科技,2007,34(2):203-204.
- [4] 谢金华,林君阳,王国英,等.天台县林木种质资源及保护利用[J].华东森林经理,2009,23(1):54-58.
- [5] 陈贝贝,李温平,周晶,等.天台山4种鹅耳枥属植物ITS序列的克隆与分析[J].浙江农业学报,2011,23(6):1107-1112.
- [6] 祝遵凌,许园园.欧洲鹅耳枥繁殖技术研究[J].安徽农业大学学报,2012,39(1):88-91.
- [7] 黄丽春,俞慈英,张翠萍,等.普陀鹅耳枥芽体培养基及组培快繁方法[P].200810121614.X.2008a.
- [8] 黄丽春,俞慈英,张翠萍,等.普陀鹅耳枥种胚培养基及组培快繁方法[P].200810121615.4.2008b.
- [9] 孙骏威,陈珍,李素芳,等.枳椇的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2010,46(7):739-740.
- [10] 张翔宇,杜亚填,龚雪元.南方红豆杉试管微芽诱导培养及其紫杉醇类化合物的积累[J].植物生理学报,2012,48(9):864-868.
- [11] Chalupa V. Micropropagation of Hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and Ash (*Fraxinus excelsior* L.)[J]. Biologia Plantarum (prana), 1990, 32 (5): 332-338.
- [12] 张明文,陈力耕.银杏组织培养中控制褐化的研究[J].中国南方果树,2003,32(3):51-52.
- [13] 周音,张智奇,张建军,等.3种抗氧化剂对茶条槭(*Acer ginnala* Maxim.)组织培养污染及褐化的影响[J].上海农业学报,2007,23(1):5-7.
- [14] 顾福根,陈瑞卿,万志刚,等.白萼吊钟海棠的组织培养与快速繁殖[J].植物资源与环境学报,2006,15(3):55-59.
- [15] 周俊辉,王国彬,曾浩森.观赏凤梨嫩吸芽离体培养中褐化防止的初步研究[J].仲恺农业技术学院学报,2000,13(1):5-9.
- [16] 陈珍,孙骏威,许海丹,等.天台乌药的组织培养与快速繁殖[J].浙江农业学报,2012,24(2):243-246.
- [17] 徐涌,孙骏威,陈珍.不同植物生长调节物质处理对吴茱萸组织培养的影响[J].浙江农林大学学报,2011,28(3):500-504.