

栝楼组织培养中植株再生的研究

山西师范大学生物系(临汾 041004)

陈 惠*

广西师范大学生物系

梁清华

摘 要 栝楼的叶柄切段、子叶和叶片小切块在不同培养基上培养,诱导愈伤组织和不定根均较易,却不易分化不定芽。而栝楼的完整小叶和大的叶片切段及不定根尖在 MS+6-BA 5mg/L 培养基上均可诱导产生不定芽,不定芽经继代培养可大量繁殖。不定根尖芽在 MS+NAA 0.5mg/L+6-BA 0.5mg/L 培养基上壮苗培养可产生小苗,在 MS+NAA 0~1mg/L 培养基上可再生出完整植株,经移栽培养植株易萎蔫,成活率不高。本文还讨论了叶片的取材大小和切割方式与不定芽分化的关系。

关键词 栝楼 叶片 不定根尖 组织培养 植株再生

栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 是常用中药,其种子、果实、果皮均可入药,能化痰散结,治咳嗽、胸闷,能滑肠通便,治便秘。栝楼的块根入药称天花粉,含皂甙,天花粉蛋白,多种氨基酸、糖类等,可治疗多种疾病,如糖尿病,绒毛膜上皮癌等,天花粉针剂可使中期妊娠引产^[1]。

栝楼是雌雄异株植物,用种子繁殖,雌雄难辨。用分根法繁殖系数低,使发展良种生产受到一定限制。利用组织培养法进行繁殖,具有繁殖系数高,速度快和成苗率高等优点,可作为栝楼良种快速繁殖的有效途径。以前,我们曾用栝楼实生苗的茎段及不定根尖作为外植体诱导产生丛生芽及不定芽^(2,3)。本次又以叶器官尤其是叶片为外植体进行培养,并对不定根产生的不定芽进行壮苗、生根及再生植株移栽等研究,以寻找栝楼试管苗生产的最佳生产工艺,为其工厂化生产提供实验基础。

1 材料与方法

栝楼为临汾当地市售果实,取出种子剥去硬种皮,常规消毒后接种于 1/2 MS(只含大量元素)的固体培养基上,约 15d 后实生苗

长约 8~12cm,供剪取外植体用。成年植株为当年播种于土壤中开花的植株。

基本培养基全部用 MS,加蔗糖 3%,琼脂 0.7%,pH 为 5.8,附加激素种类(浓度为 mg/L),在实验结果中具体说明。

2 结果与分析

2.1 叶器官(叶柄、叶片、子叶)培养及器官分化

2.1.1 叶柄、子叶和叶片小切块的培养:不同苗龄(12、20、40d 龄)的叶柄均取 0.5cm 长切段,子叶、叶片切块为 $0.5 \times 0.5\text{cm}^2$ 大小,接种在以下 3 种培养基上,a)在 MS0 上均可脱分化产生少量愈伤组织。b)NAA 1 对 3 种外植体有促进生根的作用,40d 龄 3 种外植体根分化率分别为 31.3%、54.0%、85.7%。c)6-BA5 可诱导 3 种外植体产生大量愈伤组织。

为了探索多种有效的成苗途径,本试验又用 4 种激素,每一激素取 4 个浓度:6-BA (0.5, 2.5, 5, 10),NAA (0.01, 0.1, 1, 2),ABA (0.5, 5, 10, 20),TA 即三十烷醇(0.1, 0.5, 1, 2)按 $L_{16}(4)^5$ 正交法设计了 16 种培养基对来自子叶的愈伤组织(6-BA 上诱导,2.

* Address: Chen Hui, Department of Biology, Shanxi Teachers' University, Linfen

4-D0.3+椰子乳5%的培养基上继代一次)进行了培养实验,结果愈伤组织只表现为增殖生长而没有器官的分化。

此外,愈伤组织也可以分化出不定根。将6-BA5上诱导的子叶愈伤组织转移到2、4-D1的培养基上培养两周,然后再继代培养一次,这时平均每块愈伤组织可分化产生2条不定根。

由上可知,梧楼的以上3种外植体其愈伤组织的诱导产生、增殖和分化不定根都容易,但不易分化不定芽。

2.1.2 叶片取材方法与不定芽的产生:将1.5~2cm²大小的叶片切成0.5×0.5~1×1cm³的小方块,培养在NAA或NAA与6-BA相组合或6-BA单独使用的多种培养基上,诱导生根和愈伤组织都很容易,但无不定芽的形成。经进一步研究,取材方法变为将同样约1.5~2cm²大小的叶子从中部横切一刀,分为上下两切段,下段在叶柄与叶片交汇处横切一刀去掉叶柄;着生在苗顶部面积小于0.5cm²的叶子则不切割,去掉叶柄后,接种在含6-BA5培养基上光培养,结果都有不定芽的发生。不定芽分化的部位有下面两种情况:a)小叶片不定芽发生在叶缘,先是叶缘齿状突膨大成瘤状组织,然后分化出不定芽。b)较大叶片切块,无论上切段或下切段都在切口处(上下切口处均可)的大的叶脉上分化出绿色的芽,如图中1~2,分化出的芽单生或丛生。将叶片上下切段长出的芽转移到新

鲜培养基上,芽可大量增殖。

2.1.3 不同苗龄植株上叶片外植体分化不定芽能力的比较:将15、30、60d苗龄及成年植株不同叶面积大小的叶切段在6-BA5培养基上光照培养一个月,结果见表1。15、30d苗龄、叶面积在0.5~1.5cm²之间的叶切段均可诱导出不定芽,60d龄和成年植株叶切块诱导芽频率降低或无,较大的叶片无芽分化能力。分化芽频率最高者为苗龄是30d,叶面积大小为0.5~0.8cm²,并切割成上下两段的叶片。

表1 不同苗龄植株上不同面积大小的叶片外植体在6-BA5上分化芽能力的比较

苗龄 (d)	叶面积 (cm ²)	叶切割情况	接种数	诱愈率 (%)	芽分化 块数(%)
15	0.5~1	上下两段	21	95.2	5 23.8
	0.5~0.8	上下两段	6	100.0	3 50.0
30	1	上下两段	25	100.0	8 32.0
	1.5	上下两段	14	100.0	5 35.7
	0.8~1.5	全叶	6	100.0	1 16.7
		上段	6	100.0	0 0.0
60	0.8~1.5	下段	6	100.0	0 0.0
		全叶	11		0 0.0
	3~7	上段	6	—	0 0.0
		下段	6	—	0 0.0
成年植株	1	上下两段	20	—	3 15.0
	4	切成1×1cm ²	30	100	0 0.0

2.1.4 无根苗的生根:将以上长为2~3cm的不定芽伸长的小苗接种在MS₀或MS+NAA0.5的培养基上,无根小苗可再生出完整植株(图,3)。

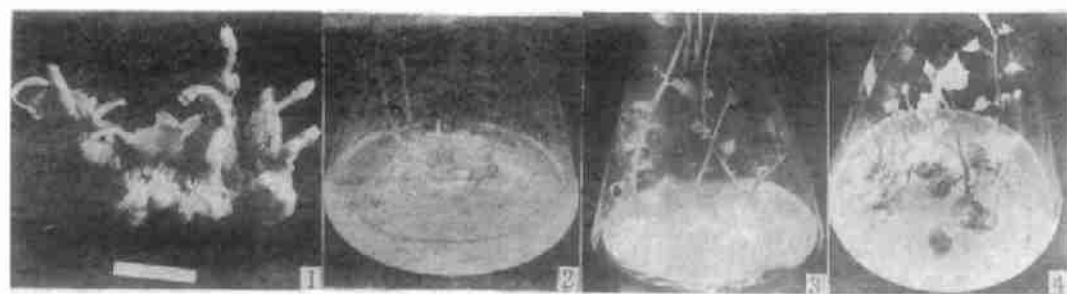


图 叶片培养产生不定芽

1-叶片下切段基部分化的不定芽 2-叶片上切段切口处分化的不定芽 3-叶片不定芽长成的小苗生根 4-不定根尖球状膨大后分化的芽在壮苗培养基上长成的小苗

2.2 不定根尖分化的不定芽的壮苗及生根研究

2.2.1 不定根尖分化的不定芽的壮苗培养：将在 6-BA5 上培养半个月至一个月的不定根尖芽球切下，接种在表 2 中所列的 5 种培

养基上培养 20d，结果以 5 号培养基根球上芽伸长为苗的百分率最高为 82.6%，但按平均每个根芽球伸长的小苗数，则以 3 号培养基为好(图,4)。

表 2 不同培养基对不定根尖芽伸长的影响

编号	培养基	接种根芽球数	具伸长苗的根球数及百分率	具伸长苗总数	平均每个根球具伸长苗数
1	NAA0.5+6-BA0.1	9	6 66.7%	9	1
2	NAA0.1+6-BA0.5	9	5 55.6%	15	1.67
3	NAA0.5+6-BA0.5	13	8 61.5%	23	1.76
4	NAA0.5+6-BA1	19	9 47.4%	20	1.05
5	TA0.5+NAA0.5+6-BA0.5	23	19 82.6%	31	1.38

2.2.2 不定根尖无根苗的生根研究：待根芽苗长到 2~3cm 高时，从基部截取并转移到以下 3 种培养基上 a) MS0 b) MS+NAA0.5。c) MS+NAA1 各 20 株，结果都能 100%地诱导生根，使芽长成完整植株，后两种培养基产生的根生长粗壮。

2.3 试管苗移栽：将由叶片和根尖产生的不定芽生根后的完整植株从试管取出；将根部培养基用自来水冲洗干净，转移到装有蛭石的塑料钵中，浇以 1/2MS 培养液，罩以塑料袋，其顶部开一小口，置于培养室内日光灯下，一周后将小口开大，两周后将塑料摘除，锻炼一周后，置于室外阴棚下，然后再移至半阴半阳条件下约一周，其成活率可达 48%左右，与自己做过的菊花^[4]，烟草试管苗相比，其移栽成活率低，在低湿条件下易萎蔫，其原因有待进一步研究。

3 讨论

3.1 叶片的取材大小和切割方式与分化不定芽的关系：栝楼叶片的取材大小和切割方式与芽的分化有密切关系，同是 0.8~2cm² 面积的叶片，当截成 0.5×0.5cm² 的小块时，在 6-BA5 上不能分化出不定芽，只是有愈伤组织的产生，而当在叶片中央横切一刀将其分为上下两段时，则在上段的切口处和下段的基部可分化出单个或多个丛生的不定芽。当叶片面积为 0.5×0.5cm² 或更小时，不切也能在叶缘齿状突上分化出不定芽。这些结

果说明，除了外源激素的作用外，器官的分化还受内源激素的制约。这在前人工作中还有很多例子，如 Vardian 和 Nitsch(1961)在菊苣根的再生中，观察到愈伤组织在形成芽的部位含有较高水平的内源细胞分裂素，而在形成根的区域生长素占优势。此外，外植体的大小不同所含内源激素的量也不同。大的材料内源激素含量多，小的材料内源激素含量少。Bonnett(1966)用田旋花的根切段做实验不加任何激素，当切段长为 1.5mm 时，完全没有器官的形成，当长度为 2.6mm 时，平均每段可形成一个器官(根或芽)^[5]。Warmk(1950)报道，蒲公英的根切段在直径小于 1.25mm，长度短于 6~10mm 就无芽的产生。推测栝楼叶片培养的结果具有类似的道理，小切块内源激素含量少，不利于芽的产生，大切段内源激素含量高有利于芽的产生。

3.2 栝楼植株再生的两种培养程序：从栝楼组织培养研究可知，栝楼植株再生有两种培养程序即 a) 小叶片不切割或取 30d 龄实生苗植株上 0.5~0.8cm² 叶片上下分成两段在 MS+6BA5 上培养产生出不定芽→继代于新鲜培养基上产生大量芽→芽长至 2~3cm 时在 MS+NAA0~0.5 上生根→移栽。b) 不同外植体在 MS+NAA1 上生根→根尖培养在 MS+6-BA2~5 上诱导产生大量不定芽→MS+NAA0.5+6-BA0.5 上壮苗→2~3cm 长小苗在 MS+NAA0~1 上生根→移

栽。

致谢:本实验承蒙中科院上海植生所李文安、许智宏教授和罗士韦老教授的指导。

参考文献

- 1 四川医学院主编. 中草药学. 北京:人民卫生出版社, 1979:361
- 2 陈惠,等. 植物生理学通讯,1987(6):48

- 3 陈惠,等. 山西师大学报(自然版),1994,8(1):53
- 4 陈惠,等. 山西师大学报(自然版),1995,9(1):39
- 5 Bonnett H. T. J. R and Torrey, J. G 1996 chemical control of Organ formation in root segments of *covolvulus* cultured in vitro PL. *Physiol, lancaster* 1996, 40:1228

(1996-05-27 收稿)

Studies on Plantlet Regeneration of Monogolian Snakegourd (*Trichosanthes kirilowii*) in Tissue Culture

Chen Hui, Liang Qianhua

When petiole segment, blade and cotyledon slice of *Trichosanthes kililowii* were cultured on MS medium with different growth regulators, callus and adventitious root were induced easily but with difficulty for adventitious bud. Yet adventitious bud can be induced when whole small blade, large blade segment and adventitious root tip were cultivated on MS medium with 0.5mg/L of 6~13 A and propagated extensively when transplanted on new media for successive transfer culture. When adventitious root bud was cultivated on MS medium with 0.5mg/L of NAA and 0.5mg/L of 6~13A, shoot appeared, which can be grown into plantlet though the survival rate was not very satisfactory when further transplanted. Effect of blade segment size and its slicing technique, on the differentiation of adventitious bud was discussed.

厚朴新害虫——横沟象

浙江省松阳县林业科学研究所(323400)

陈汉林*

浙江省龙泉市森林病虫害防治站

陈正国

摘要 横沟象 *Dyscerus* sp. 是厚朴 *Magnolia officinalis* 和凹叶厚朴 *M. biloba* 的毁灭性新害虫, 在浙江省龙泉、景宁、松阳等县市的厚朴产区造成严重损失。本文首次报道其对厚朴的危害及其防治方法。

关键词 横沟象 厚朴 凹叶厚朴

横沟象 *Dyscerus* sp. 隶鞘翅目 *Coleoptera*, 象虫亚目 *Rhynchophora*, 象虫科 *Curculionidae*。成虫和幼虫都为害我国特产的珍贵木本中药厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 和凹叶厚朴 *M. biloba* (Fehd. et wils) Cheng. 常造成很大损失, 严重影响上述两种药材的生产。有关此虫尚未见报道, 现将作者的观察结果报告如下。

1 分布与为害

横沟象在浙江省丽水地区的松阳、遂昌、龙泉、云和、景宁、丽水等县市都有分部。除为害厚朴、凹叶厚朴外, 还能有害黄山木兰 *M. cylindrica* Wils.、紫玉兰 *M. liliiflora* Desr. 和马褂木 *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.。

横沟象成虫取食嫩梢皮、芽苞、叶片、花

* Address: Chen Hanlin, Zhejiang Provincial Songyang County Institute of Forestry Sciences, Songyang