

对于肉苁蓉花粉管出现分枝现象的原因及其对结实的影响,还有待进一步的深入研究。

References

- [1] Ma Y Q. *Inner Mongolia Flora* (内蒙古植物志) [M]. Tomus 5. Huhhot: Inner Mongolia People's Press, 1980.
- [2] Fu L G. *The Rare and Immiment Danger Plant in China* (中国珍稀濒危植物) [M]. Shanghai: Shanghai Educational Press, 1989.
- [3] Tu P F, He Y P, Lou Z C. Herbalogical study on *Cistanche deserticola* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 19 (1): 3-5.
- [4] Zhang Z Y. Study on Chinese Orobanchaceae (one) [J]. *Plant Res* (植物研究), 1984, 4(4): 111-119.
- [5] Ma K. *General Horticulture* (园艺通论) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2001.
- [6] Yang J Q, Zhang X Y, Chai S Z. Technology of planting *Haloxylon ammodendron* and *Cistanche deserticola* artificially [J]. *Modern Agric* (现代农业), 2002, (12): 14-15.
- [7] Song J L, Zhang Y O. Cultivation and collection of *Cistanche deserticola* [J]. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2001, 21(2): 59-60.
- [8] Hu S Y. Botany experimental method (one) detemination of pollen viability [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1993, 10 (2): 60-62.
- [9] Zhang Z Y. Studies on the pollen morphology and seed coat of the genus *Cistanche* (or Orobanchaceae) in China [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1990, 28(4): 294-298.
- [10] Hu S Y. *Angiosperm Embryology* (被子植物胚胎学) [M]. Beijing: People's Educational Press, 1982.
- [11] Wang Q L, Lu L D, Wu X Q, et al. Pollen storage and viability detemination [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2002, 19(3): 365-372.

喜树茎尖组织培养与植株再生

吕立堂, 朱冬雪*, 赵德刚*

(贵州大学 农业生物工程省级重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 目的 探索喜树的人工快繁。方法 以喜树幼苗的茎尖作为外植体, 培养在附加不同激素的培养基上。结果 以 B5 培养基附加 6-BA 0.2 mg/L, BA 0.05 mg/L 和 AS (afenine sulfate, 10 mg/L) 对丛生芽的诱导与增值效果最佳, 而附加 BA 0.5 mg/L, KT 0.1 mg/L 和 AS 10 mg/L 的生根效果最佳。试管苗移栽到珍珠岩-土壤 (3:7) 的基质中生长良好, 成活率高达 96%。结论 为喜树的开发利用提供了一条新途径。

关键词: 喜树; 植株再生; 组织培养

中图分类号: R 282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)05-0682-03

Tissue culture of shoot-tip and plantlet regeneration of *Campotheca acuminata*

LU Li-tang, ZHU Dong-xue, ZHAO De-gang

(Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: **Object** To explore the artificial propagation of the medicinal plant, *Campotheca acuminata* Decne. **Methods** The shoot-tip was tested as the explants and cultured on culture media with different portions of hormone. **Results** The best medium for bud induction was the B5 basic medium with additions of 6-BA (0.2 mg/L), BA (0.05 mg/L), and AS (afenine sulfate, 10 mg/L). While B5 with the additions of BA (0.5 mg/L), KT (0.1 mg/L), and AS (10 mg/L) was suitable for rooting. The seedling was cultivated and grew well on the base material mixed with perlite-soil (3:7). The survival rate of transplant was up to 96%. **Conclusion** The above mentioned method provides a new effective way to exploit this plant resources.

Key words: *Campotheca acuminata* Decne; plantlet regeneration; tissue culture

喜树 *Campotheca acuminata* Decne 是珙桐科 (Nyssaceae) 的一种落叶阔叶树^[1], 主要分布在我国长江流域及西南各省。其树干通直圆满, 枝条平向外展, 树冠倒卵形, 姿态端直雄伟, 为优良的园林绿化树种, 其木材适于做造纸原料、室内装饰材料等。

另外喜树还是我国民间的一种中药材, 其果实、根、树皮、树枝和叶均可入药, 其中主要含有抗肿瘤作用的喜树碱 (campothecin)。喜树碱主要通过抑制 DNA 拓扑异构酶 I 的活性及逆转录病毒的复制来阻止细胞 DNA、RNA 的合成, 使细胞凋亡^[2]。因而

* 收稿日期: 2003-09-10

基金项目: 贵州省科学技术基金资助 (20023033); 贵州省科技厅专项基金 (黔科合字 (2003) JN 012)

作者简介: 吕立堂 (1978—), 男, 山东莱芜人, 贵州大学农业生物工程重点实验室在读硕士研究生, 从事植物基因工程及其次生代谢产物方面的研究。

* 通讯作者 Tel: (0851) 3865027 E-mail: Zhudongxue@163.com; degangzhao@Yahoo.com

喜树碱具有广泛的抗肿瘤、抗白血病、抗免疫缺陷病毒等活性。临床上用于治疗肝癌、胃癌、肠癌、卵巢癌、膀胱癌、食道癌、早期白血病等,其疗效显著。由于喜树碱在植物组织中含量的低,且野生状态下喜树资源不稳定,随着市场上喜树碱需求量的增加,生产上消耗的喜树也越来越多。因此,大规模的种植栽培已势在必行。本研究通过喜树茎尖培养初步建立起喜树的快繁体系,为今后加速喜树的人工繁殖及喜树药用林培育提供了一条新途径。

1 材料与方法

1.1 材料与培养条件

1.1.1 材料处理:喜树种子于 2001 年 11 月采自贵州大学校园,将种子播在基质为珍珠岩的花盆中,于 20℃ 培养 3 d,选取生长健壮的喜树幼苗茎尖作为外植体。用 75% 酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次,然后用 0.1% 升汞消毒 3 min,无菌水冲洗 5 次,无菌纱布吸干水分。将茎尖切成约 2 cm 垂直插在培养基中。所用培养基为 B5 基本培养基,附加 30 g/L 蔗糖,8 g/L 琼脂,pH 5.8,121℃ 灭菌 15 min。

1.1.2 培养条件:光照强度为 2 000 lx,每日光照 12 h,培养温度 (25±1)℃。

1.2 方法

1.2.1 茎尖丛生芽诱导的正交实验设计:根据有关资料及以往工作经验,选取 6-BA (A)、BA (B)、AS (C) 3 种激素进行试验,每种激素分为 3 个水平(浓度均为 mg/L),选用 L₉(3⁴) 正交表,考察激素对丛生芽的诱导效果。根据设计安排 9 次试验,每次实验 40 个外植体。因素水平安排见表 1。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factor and level of orthogonal test

水 平	因 素		
	A	B	C
1	0.05	0	5
2	0.10	0.05	10
3	0.20	0.10	20

1.2.2 单芽的培养与根的诱导:待单芽长到约 1 cm 时,切取单芽将其转移到壮芽培养基上培养,当单芽在壮芽培养基上长到 2.5 cm 时,转移到生根培养基上诱导生根。

1.2.3 组培苗的移栽:待苗长出 3~6 条长达 2 cm 左右的根时,将组培瓶的瓶口打开,置于室内光照下炼苗 3 d,然后移至装有不同基质的花盆中,4 周后统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 培养基 6-BA (A), BA (B), AS (C) 对茎尖

丛生芽诱导的影响:外植体接种 2 周后,下部茎段愈伤化,上部丛生芽开始萌动,5 周后统计芽诱导率,结果见表 2。

表 2 丛生芽诱导结果

Table 2 Result of inducing multiple shoots

实验号	A	B	C	平均单芽数
1	0.05	0.00	5	1.4
2	0.05	0.05	10	3.0
3	0.05	0.10	20	3.6
4	0.10	0.00	10	3.5
5	0.10	0.05	20	4.5
6	0.10	0.10	5	2.5
7	0.20	0.00	20	8.0
8	0.20	0.05	5	9.0
9	0.20	0.10	10	12.0

由表 2 可知,各种处理对丛生芽诱导的影响差异很大,多数处理均能诱导出丛生芽,其中以 7,8 和 9 号 3 组处理诱导效果较好。在这 3 组处理中,又以 9 号诱导效果最好,8 号次之,表明 AS 的浓度以 10 mg/L 为宜。丛生芽的诱导增殖效果随 6-BA 浓度的升高而提高,当 6-BA 的浓度达到 0.2 mg/L 时,诱导效果最好。BA 的浓度以 0.1 mg/L 为宜,浓度过底,不利于细胞的分裂,从而影响丛生芽的增殖与生长。从表 3 极差分析结果来看,试验安排的 3 种激素对丛生芽诱导的影响作用以 6-BA 为最大,其次为 AS,3 种激素对丛生芽的诱导作用大小依次为:6-BA,AS,BA,诱导喜树丛生芽产生的最佳激素配比为 A₃B₃C₂即 B5+ 6-BA 0.2 mg/L + BA 0.1 mg/L + AS 10 mg/L,诱导的丛生芽见图 1。为进一步反映各因素对丛生芽诱导的影响,笔者对实验结果进行了方差分析,结果见表 4。由表 4 可知,6-BA,BA 和 AS 对丛生芽诱导的影响差异均无显著性。

表 3 极差分析表

Table 3 Analysis of extreme differences

K _{ij}	平均诱导单芽数		
	6-BA	BA	AS
K ₁	2.7	4.3	4.3
K ₂	3.5	5.5	6.2
K ₃	9.7	6.0	5.4
R	7.0	1.7	1.9

2.2 壮芽与生根培养:在 3 种不同的壮芽培养基(B5+ 6-BA 1.0 mg/L + KT 0.1 mg/L, B5+ 6-BA 0.5 mg/L + KT 0.1 mg/L, B5+ NAA 2.0 mg/L + KT 0.2 mg/L) 中,以 B5 附加 6-BA 0.5 mg/L 和 KT 0.1 mg/L 的培养基上的芽生长既快又好,18 d 单芽可长到 2.5 cm,且芽苗粗壮。将所得的芽苗接种在生根培养基上,生根效果(表 5)以 B5+ BA 0.5 mg/L + KT 0.1 mg/L + AS 10 mg/L 最好,诱

导生根时间为 16 d, 生根率达到了 90%, 生根苗见图 2。表 5 中 2 号培养基生根率也达到了 90%, 但诱导生根所需时间比 1 号培养基长。

表 4 丛生芽诱导的方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值
6-BA	85.40	2	42.7	15.60
BA	4.74	2	2.37	0.86
AS	5.27	2	2.64	0.96
误差	5.50	2	2.75	
总和	100.91	8		

$F_{0.05} = 19.00$ $F_{0.01} = 99.00$

表 5 诱导生根结果

处理号	培养基 /(mg · L ⁻¹)	生根时间 /d	生根率 /%	根数
1	B5+ BA 0.5+ KT 0.1+ AS 10	16	90	7±1
2	B5+ BA 1+ KT 0.1	19	90	5±1
3	B5+ NAA 2+ KT 0.2	14	78	5±1

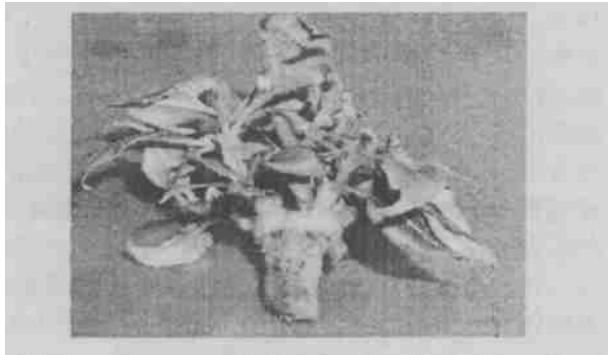


图 1 丛生芽

Fig 1 Multiple shoots

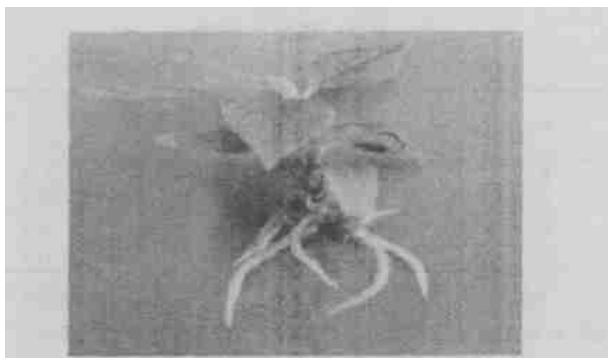


图 2 生根苗

Fig 2 Rooting shoots

2.3 移栽: 从表 6 结果看出, 喜树组培苗在经过灭菌的基质中的移栽成活率均高于 70%, 其中以经过灭菌的珍珠岩-田土 (3:7) 的基质效果最好, 成活率达到了 96%, 其次为灭过菌的田土。而未经灭菌的基质的移栽成活率在 50% 左右。表明再生幼苗的抵抗能力弱, 基质中的各种细菌或真菌对幼苗根系的生长不利, 从而影响移苗成活。

表 6 移栽成活结果

基 质	成活率/%	
	消毒	未消毒
珍珠岩	78	46
田土	92	40
珍珠岩-田土 (3:7)	96	53

3 讨论

本实验通过正交试验设计, 研究了不同浓度的 3 种激素配合使用对喜树茎尖丛生芽诱导和增殖培养条件。结果表明丛生芽的诱导增殖效果与 6-BA 浓度成正相关, 当 6-BA 的浓度达到 0.2 mg/L 时, 诱导效果最好, 这一结果与 W iedenfeld 等^[3]的研究有较大的差异, 可能是由于本次实验所用外植体为盆栽苗的茎尖, 而 H e m u t 等所用外植体为无菌苗的茎尖。另外, 进一步加大 6-BA 的浓度是否能提高丛生芽的诱导效果还有待进一步研究。壮芽培养是为了提高芽的生长适应能力, 对生根及移栽成活率有较大影响。未壮芽的单个芽苗如果直接诱导生根, 生根所需时间长, 且生根率较低。壮芽后的芽苗诱导生根较为容易, 其中以 B5+ BA 0.5 mg/L + KT 0.1 mg/L + AS 10 mg/L 的培养基效果最佳, 生根率高且粗壮。喜树再生苗的移栽成活率与基质及其处理有关, 基质经消毒, 有利于苗移栽成活。

References:

- [1] Feng J C, Zhang Y J, Tan Y D, et al The Development in research on *Camptotheca acum inata* and utilization of camptothecin [J]. *Sci Silvae Sin*, 2000, 36(5): 100-108.
- [2] Kjeldsen E, Svejstrup J Q, Gromova I I, et al Camptothecin inhibits both the cleavage and relegation reactions of eukaryotic DNA topoisomerase [J]. *J M ol B iol*, 1992, 28: 1025-1030.
- [3] W iedenfeld H, Fumanowa M, Roeder E, et al Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acum inata* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, 49: 213-218.
- [4] Van Hengel A J, Harke M P, W icher H J, et al Characterization of calls fomation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acum inata* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1992, 28: 11-18.

保 护 自 然

保 护 植 被