

珍稀濒危植物毛柄小勾儿茶的离体培养

李洪林, 付志惠, 杨波*

(中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 以珍稀濒危植物毛柄小勾儿茶(*Berchemiella wilsonii* (Schneid.) Nakai var. *pubipetiolata* H. Qian)嫩梢为外植体进行组织培养实验, 结果表明: 以 1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 为芽诱导培养基、MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 为增殖培养基, 可以得到大量的毛柄小勾儿茶试管苗。

关键词: 珍稀植物; 毛柄小勾儿茶; 组织培养

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)05-0503-02

Tissue Cultures of *Berchemiella wilsonii* var. *pubipetiolata*

LI Hong-Lin, FU Zhi-Hui, YANG Bo*

(Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: The tissue culture of *Berchemiella wilsonii* (Schneid.) Nakai var. *pubipetiolata* H. Qian was studied. The stem apex was used as explants and several kinds of MS media with different hormone combinations were tested in the experiment. The result showed that the optimal media for the induction of bud was 1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L, the beneficial media for seedling growth was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L.

Key words: Endangered and rare species; *Berchemiella wilsonii* var. *pubipetiolata*; Tissue culture

毛柄小勾儿茶[*Berchemiella wilsonii* (Schneid.) Nakai var. *pubipetiolata* H. Qian]为鼠李科小勾儿茶属(*Berchemiella*)植物, 国家三级保护物种, 为中国特有种^[1-3], 间断分布于浙江临安的湍口、马啸和安徽大别山地区的霍山等地。在浙江临安地区, 由于当地老乡砍柴烧炭和种植经济作物, 致使该物种所残存的植株已十分稀少, 其生境破坏严重。在大别山东北坡发现有保存尚好的天然植株, 结实数量虽多, 但林地未见幼苗、幼树, 天然更新不良^[4]。小勾儿茶属植物对研究鼠李科植物属间的分类系统演化具有重要的科学价值^[5], 而且毛柄小勾儿茶具有祛风、活血等功效, 具有较大的药用价值。有关毛柄小勾儿茶的离体培养未见报道, 我们对其开展了组织培养和快繁技术研究, 以期对这一珍稀物种的保护和开发利用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料

从野外毛柄小勾儿茶 *Berchemiella wilsonii*

(Schneid.) Nakai var. *pubipetiolata*^[1]植株上选取当年抽生的新梢为外植体, 将新梢去除叶片, 切成一芽一节的茎段备用。

1.2 外植体消毒

取毛柄小勾儿茶嫩梢用自来水浸泡冲洗 5~10 min。在超净工作台内用 0.1% 氯化汞溶液表面消毒 5~8 min, 用无菌水冲洗 3~4 次。将嫩梢放在无菌滤纸上沿着节茎段切割, 一个茎段一节使外植体保持有 1 个腋芽。

1.3 培养基及培养条件

芽诱导培养基: ① 1/2 MS+6-BA 0.5+NAA 0.05 (除特别注明外, 浓度单位均为 mg/L; 1/2 MS 指 MS 中的大量元素量减半, 其余不变, 下同), ② MS+6-BA 0.5+NAA 0.05, ③ VW+6-BA 0.5+NAA 0.05; 芽增殖培养基: ④ MS+6-BA 0.2+NAA 0.05, ⑤ MS+6-BA 0.5+NAA 0.05, ⑥ MS+6-BA 1.0+NAA 0.05, ⑦ MS+6-BA 2.0+NAA 0.05; 所有培养基中均添加琼脂 0.65%, 蔗糖 3%, pH5.8。培养条件: 培养温度(25±2)℃, 连续光

收稿日期: 2004-12-29, 修回日期: 2005-05-26。

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-104)。

作者简介: 李洪林(1964—), 女, 实验师, 主要从事植物组织培养方面的科研工作。

* 通讯作者(Author for correspondence)。

1) 实验用毛柄小勾儿茶采自安徽大别山地区, 由中国科学院武汉植物园江明喜研究员鉴定。

照12 h/d,光照强度 2 000 lx。

2 结果与讨论

2.1 不同芽诱导培养基配方对毛柄小勾儿茶腋芽萌发的影响

不同的基本培养基对毛柄小勾儿茶腋芽萌发的影响见表 1。

表 1 不同芽诱导培养基配方对小勾儿茶腋芽萌发的影响
Table 1 Effects of different media on the axillary bud bourgeoning of *Berchemiella wilsonii* var. *pubipetiolata*

培养基(mg/L) Culture medium	腋芽萌发率(%) The rate of germination	芽平均高度(cm) Average height	褐化情况 Browning
①1/2 MS+6-BA 0.5+NAA 0.05	70	2.0	—
②MS+6-BA 0.5+NAA 0.05	40	0.4	+
③VW+6-BA 0.5+NAA 0.05	20	0.2	+++

注: +++,表示褐化严重; +,表示发生褐化; —,表示未发生褐化。
Notss: +++,Heavy browning; +,Light browning; —,No browning.

从表 1 中可见,离子浓度的高低对芽的诱导影响较大,在高离子浓度的培养基③中,外植体接入后 1 d基部发生褐变,1周后培养基中便有明显的褐色物质积累,腋芽萌发率只有20%,腋芽萌发的平均高度也只有0.2 cm。在培养基①中,经过40 d生长,腋芽萌发率在70%,平均高度在2 cm,而且没有褐化现象,实验结果表明培养基①是芽诱导的最佳培养基。

2.2 不同 6-BA 浓度对小勾儿茶增殖的影响

不同浓度 6-BA 对毛柄小勾儿茶的增殖有明显的影 响,由表2中看出,在一定的范围内,繁殖系数随着 6-BA 浓度的提高而增加,在同一 NAA 浓度作用下,6-BA 的浓度在 0.5 mg/L 时为最佳,增殖系数高(见图 1)。此后,随着 6-BA 浓度的进一步增加,

表 2 不同浓度 6-BA 对小勾儿茶增殖的影响

Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA on multiplication of *B. wilsonii* var. *pubipetiolata*

不同浓度6-BA培养基(mg/L) Culture media with different concentrations of 6-BA	增殖系数 Multiplication coefficient	生长状况 Growth state
④MS+6-BA 0.2 +NAA 0.05	5	叶绿,苗小
⑤MS+6-BA 0.5 +NAA 0.05	7	叶绿,苗大
⑥MS+6-BA 1.0 +NAA 0.05	5	叶黄,有叶脱落现象
⑦MS+6-BA 2.0 +NAA 0.05	3	叶黄,有成花现象



图 1 毛柄小勾儿茶的增殖培养

Fig. 1 The Multiplication culture of *Berchemiella wilsonii* var. *pubipetiolata*

诱导率下降,同时生长状况变差,出现叶黄及脱落并有成花现象,影响了苗的生长。

2.3 讨论

将毛柄小勾儿茶嫩梢腋芽接种到诱导培养基②、③上,3~5 d 后基部位开始变褐色,1 周后发现这些褐色物质对腋芽的萌发和生长具有明显的抑制作用,并导致外植体严重褐化,成活率降低。对许多木本植物而言,初代培养时,培养基中过高的无机盐浓度会引起酚类等外溢物质的大量产生,并导致外植体褐变,影响腋芽的萌发及增殖;降低无机盐浓度可降低褐变程度,并提高腋芽萌发率及增殖数量^[6,7],这一现象在本实验中也得到了证实。将 MS 大量元素用量减半,可明显提高毛柄小勾儿茶嫩枝茎段腋芽的萌发率及增殖系数;在本研究中,低盐培养基中有轻度褐化现象,这可能是由于培养基中除 NO₃⁻、NH₄⁺ 外,其它离子的浓度及比例不同所造成。

有研究报道,木本植物茎段培养过程中,在培养基中添加 6-BA 可解除顶芽对腋芽的抑制作用,且随着浓度的增加这种作用会增强,但 6-BA 浓度过高反而不利于腋芽的增殖^[8],毛柄小勾儿茶嫩枝茎段培养过程中适当增加 6-BA 的浓度可提高腋芽增殖系数,但随着 6-BA 浓度进一步提高增殖系数反而下降。实验中还发现,在 1/2 MS 培养基中经过几代的继代增殖后,出现苗细弱、叶色偏淡的现象,将苗转入以 MS 为基本培养基中培养后,苗壮、叶变绿且无褐化现象,这可能是植物在经过几代培养后逐渐适应了培养的环境及条件;而提高培养基中的离子浓度,则增加了植物生长所需的养分,所以在以后的培养中以 MS 为基本培养基可起到壮苗的作用。毛柄小勾儿茶在无菌培养条件下发现有成花现象,有关原因与机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 安徽植物志协作组编.安徽植物志(第3卷)[M]. 芜湖:中国展望出版社,1988. 396.
- [2] 王诗云,彭辅松,蒋祖德.华中珍稀濒危植物物种及其保存(第1册)[M]. 北京:科学出版社,1995. 15-16.
- [3] 钱宏.东亚特有属——小勾儿茶属的研究[J]. 植物研究, 1988, 8(4): 119-127.
- [4] 胡理乐,江明喜,党海山,黄汉东.从种间联结分析濒危植物毛柄小勾儿茶在群落中的地位[J]. 植物生态学报, 2005, 29(2): 258-265.
- [5] 胡理乐,江明喜,黄汉东,党海山,向启波,黄辉.濒危植物小勾儿茶伴生群落特征研究[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(4): 327-331.
- [6] 高国训.植物组织培养外植体褐变的研究问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 501-506.
- [7] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭.植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业学报, 1999, 21(3): 78-84.
- [8] 李春瑶,吴国团,唐莲英,梁倩华.枇杷成年茎段离体培养及植株再生[J]. 广西师范大学学报, 1995, 13(2): 77-80.