

火棘离体叶片愈伤组织的诱导研究

陈文武

(徐州生物工程职业技术学院, 江苏 徐州 221006)

摘要:为了获得优质的愈伤组织,以火棘的离体叶片为外植体,MS为基本培养基,研究2,4-D和6-BA以不同浓度组合,叶片的暗处理以及不同部位的叶片对愈伤组织诱导的影响。结果表明:培养基MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.5 mg·L⁻¹ 6-BA对愈伤组织的诱导最好;暗处理10 d,然后转入光照下培养可提高叶片愈伤组织的诱导效果;较上部叶片愈伤组织诱导率可达96.7%。

关键词:火棘;叶片;愈伤组织;诱导

中图分类号:S686

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)07-0021-02

火棘[*Pyracantha fortuneana* (Maxim) Li], 别名救兵粮、火把果和赤阳子等,为蔷薇科苹果亚科火棘属的常绿野生灌木果树植物。世界上火棘属植物共有10种,中国发现7种,在四川、云南、贵州、陕西、甘肃、湖南和湖北等地均有大量发现,野生资源极为丰富,且分布集中。

火棘为常绿灌木,喜强光,耐贫瘠,抗干旱,亦较耐寒,可忍受-20℃的低温,火棘种子发芽力强,发芽率可达92.1%,几乎无休眠期;硬枝和绿枝扦插均易成活,在自然条件下成活率可达60%,移栽成活率可达80%以上,亦可分根繁殖。

近些年来,国内外的学者对火棘的生物学及形态解剖学、栽培学、营养成分、药理与毒理等方面进行了广泛的研究并对其保健类、酒类、饮料类等产品的生产工艺进行了阐述^[1]。但对火棘组织培养的报道很少,在火棘的茎尖培养与快速繁殖的研究基础上,进行了火棘离体叶片愈伤组织诱导的初步研究,为进一步开展火棘的器官分化、遗传转化或细胞培养奠定基础^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料

供试火棘为徐州生物工程职业技术学院校园观赏火棘植株。按上中下不同部位剪取生长旺盛的火棘植株的叶片。

以MS为基本培养基,蔗糖浓度为3%,pH 5.8~6.0,用约0.7%琼脂固化,分装后115℃条件下灭菌20 min。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒 将叶片放置烧杯中,用洗衣粉和多菌灵(少量)加适量清水搅动洗涤5~10 min后,用流动的自来水将叶片表面的尘土冲

洗干净,在超净工作台上先用70%酒精浸泡30~40 s,再用0.1%升汞消毒10~15 min,之后用无菌水冲洗3~4次,最后用无菌面巾纸吸干叶片水分,用剪刀将其修饰为15 mm×10 mm大小的接种体,然后接种到培养基上培养。

1.2.2 培养条件 培养室温度(25±2)℃,光暗周期为12 h/12 h,光照强度约1 500~2 000 lx,黑暗处理时,完全不照光。

2 结果与分析

2.1 不同浓度6-BA与2,4-D组合对火棘离体叶片诱导愈伤组织形成的影响

以MS为基本培养基按不同浓度组合附加6-BA与2,4-D,配制成多种培养基对火棘叶片进行培养^[3],由表1可以看出,6种培养基都能不同程度诱导出愈伤组织,单独使用6-BA,浓度0.5 mg·L⁻¹时,形成的愈伤较少,呈黄色。6-BA与2,4-D以不同浓度组合对叶片进行诱导时,5种浓度组合形成的愈伤组织数亦有显著差异,以MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.5 mg·L⁻¹ 6-BA组合效果最好,诱导率高达86.7%,且愈伤组织结构紧密,呈黄绿色,高浓度或低浓度的6-BA和2,4-D的组合形成愈伤组织的效果并不理想。

2.2 暗培养条件对火棘离体叶片诱导愈伤组织形成的影响

将叶片外植体接种于培养瓶后,放于不同暗培养条件下,然后转入光培养,培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.5 mg·L⁻¹ 6-BA。试验结果(见表2)表明,接种后直接光培养,愈伤组织诱导率只有53.3%;接种初期经过10 d的暗培养后,再进行光培养,叶片的愈伤组织诱导率达98.3%,诱导效果最理想;接种初期经过15 d的暗培养后,再进行光培养,愈伤组织诱导率也达100%,但愈伤组织出现白化,活性不强,且质地较松散^[4]。

收稿日期:2014-03-14

作者简介:陈文武(1975-),男,山东省陵县人,学士,讲师,从事生物技术和植物保护研究。E-mail:75413976@sina.com。

表 1 不同浓度 6-BA 与 2,4-D 组合对火棘愈伤组织形成的影响

Table 1 Effect of different concentrations of 6-BA and 2,4-D on callus induction of *Pyracantha fortuneana*

6-BA/ mg·L ⁻¹	2,4-D/ mg·L ⁻¹	接种数 Number of leaf inoculated	完全形成愈伤组织数 Number of callus	诱导率/% Formation rate of callus
0.5	0	30	7 d	23.3 d
1.0	0.5	30	11 c	36.3 c
1.5	1.0	30	13 c	43.3 c
2.0	1.5	30	20 b	66.7 b
2.5	2.0	30	26 a	86.7 a
3.0	2.5	30	20 b	66.7 b

表 2 暗培养条件对火棘离体叶片愈伤组织形成的影响

Table 2 Effect of dark culture time on callus induction of *Pyracantha fortuneana*

黑暗培养天数/d Days for dark	接种数 Number of leaf inoculated	完全形成愈伤组织数 Callus number	诱导率/% Formation rate of callus	愈伤颜色 Callus color	愈伤组织状态 Callus shape
0	30	16	53.3	浅绿色	表面光滑紧密
5	30	18	60.0	黄绿色	表面光滑紧密
10	30	29	98.3	黄绿色	质地坚硬紧密
15	30	30	100.0	乳白色	质地松散

2.3 火棘不同部位离体叶片诱导愈伤组织形成的影响

以 MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.5 mg·L⁻¹ 6-BA 为诱导培养基,观察火棘不同部位离体叶片的愈伤组织诱导率。由表 3 可以看出,以较上部叶片诱导形成愈伤组织数诱导率最高,达 96.7%(接近 100%),以幼嫩叶片诱导形成愈伤组织数诱导

率次之,达 83.3%,中部叶片和下部叶片诱导形成愈伤组织数诱导率急剧下降。中部叶片和下部叶片很难诱导出愈伤组织,主要是其成熟度高,细胞分化程度高,脱分化能力较差,而幼嫩叶片和较上部叶片成熟度低,细胞分化程度低,在外源激素的作用下细胞很容易脱分化,使得其有很高的愈伤组织数和诱导率,是适宜的诱导材料。

表 3 火棘不同部位叶片对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of various leaf parts on callus induction of *Pyracantha fortuneana*

外植体部位 Explant parts	接种数/个 Number of leaf inoculated	完全形成愈伤组织数/个 Callus number	诱导率/% Formation rate of callus
幼嫩叶片 Tender leaves	30	25	83.3
较上部叶片 Upper leaves	30	29	96.7
中部叶片 Mid leaves	30	14	46.7
下部叶片 Base leaves	30	8	26.7

3 结论

试验结果表明,当 6-BA 和 2,4-D 的浓度分别为 2.5 和 2.0 mg·L⁻¹ 时愈伤组织的诱导率最高可达 86.7%。同时经过 10 d 暗处理诱导愈伤组织效果最佳,出现愈伤组织的时间短,愈伤组织生长速度快。

外源激素影响着外植体能否形成愈伤组织,不同部位叶片诱导愈伤组织的效果不同,试验结果表明火棘较上部叶片诱导愈伤组织的效果最好。

该试验以火棘离体叶片为外植体诱导愈伤组

织获得成功,也为进一步开展火棘的器官分化、遗传转化或细胞培养奠定基础。

参考文献:

- [1] 曾令贵,钟露苗.火棘的研究现状与应用概况[J].中国药事,2009(10):1021-1023.
- [2] 陈文武,李清秀.火棘的茎尖培养与快速繁殖[J].北方园艺,2007(9):202-203.
- [3] 崔美,焦其庆.苹果叶片愈伤组织的诱导培养[J].山东农业科学,2012(3):17-20.
- [4] 宁强,刘晓光.冬枣叶片愈伤组织诱导研究[J].河北林果研究,2008(4):348-352.

Study on Inducing Callus of Vitro Leaves of *Pyracantha fortuneana*

CHEN Wen-wu

(Xuzhou Vocational College of Bioengineering,Xuzhou,Jiangsu 221006)

Abstract: In order to obtain callus with high quality,taking the vitro leaves of *Pyracantha fortuneana* as explant and taking MS as basic medium,the effect of different concentrations of 2,4-D and 6-BA, as well as illumination time and different parts of leaves on callus induction of were studied. The results showed that the medium of MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.5 mg·L⁻¹ 6-BA was the best for callus induction;dark treatment for 10 days,and then light cultivating could improve the effect of callus induction,callus induction rate of the upper leaves could amount to 96.7%.

Key words: *Pyracantha fortuneana*; vitro leaves; callus; induction