

古侧柏组织培养研究

徐龙光, 郭军战*, 严 婷

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:以陕西省黄陵县轩辕庙院内千年树龄黄帝手植柏(古侧柏)嫩枝为外植体进行茎段组织培养试验研究。经过初代培养和继代增殖培养,研究了不同植物生长调节剂种类及浓度、活性炭在组培各阶段的作用,并测定不同年龄段侧柏组织培养前后的硝酸还原酶活性。结果表明:最适启动培养基为 1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+椰乳 100 mL/L,适宜的继代培养基为 1/2 或 1/4MS+ 6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.1 mg/L+椰乳 100 mL/L;活性炭对增殖无显著作用;古侧柏组织培养后硝酸还原酶活性可达到幼嫩水平。

关键词:黄帝手植柏(古侧柏);茎段;组织培养;硝酸还原酶

中图分类号:S722.37 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2014)05-0092-04

Tissue Culture of Ancient *Platycladus orientalis*

XU Long-guang, GUO Jun-zhan*, YAN Ting

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to inherit the historical culture and reserve the valuable plant genetic resources of the ancient *Platycladus orientalis*, tissue culture technique of the ancient *P. orientalis* grown on the Xuanyuan Temple in Shaanxi Province was examined. After primary culture and propagation culture, the roles of different plant growth regulator types and concentrations, activated carbon in the various stages of tissue culture were studied, and the activities of nitrate reductase of the plant tissues with different ages before and after tissue culture were measured. The results showed that the best media for initiating culture were 1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+ coconut milk 100 mL/L. The optimum culture proliferation media were 1/2MS+ 6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.1 mg/L+ coconut milk 100 mL/L. Activated carbon could not promote proliferation. The activity of nitrate reductase of ancient trees can back to the level as the same as the young after culture.

Key words: ancient *Platycladus orientalis*; stem; tissue culture; nitrate reductase

古树泛指树龄在 100 a 以上的树木,属于宝贵的种质资源和重要的历史文物,它既记录了一个地区的气候、水文、地质、生态等自然状况,同时也反映了该地区人类活动和社会发展的历史进程^[1]。古树超越时空和意识的局限,连接历史,连接自然与人文,是具有极高保护价值的不可再生的自然遗产和文化遗产^[2]。陕西省黄帝陵内的古柏群大约有 82 000 多株,总占地面积约为 87 hm²,其中千年以

上的古柏大约有 30 000 余棵,是全国最大面积的古柏林^[3]。生长百年以上的古柏林已进入缓慢生长阶段,干径增粗极慢^[4],已进入缓慢生长阶段,树龄的老化,使根吸收水分、养分的能力越来越不能满足地上部分的需要从而导致内部生理失去平衡^[5],加之外界人为和环境因素的侵袭,树体均受到不同程度的影响和侵蚀^[6]。本文所用试验材料取自黄帝陵黄帝手植柏,我国林学家考证其树龄约 3 000 a,并已

收稿日期:2014-01-06 修回日期:2014-03-18

基金项目:黄帝手植柏组培繁殖(K332021313)。

作者简介:徐龙光,女,在读硕士,研究方向:林业生物技术。E-mail: 616030274@qq.com

* 通信作者:郭军战,男,副教授,硕士,硕士生导师,研究方向:林木遗传育种。E-mail: guojunzhan@163.com

进入如上文所述衰老阶段,种子虽可以育苗但不能保留全部性状,可供扦插的枝条数量较少,而组织培养不受季节、取材数量等方面的限制,一旦组培技术获得突破,则可进行大规模育苗。不同植物组织培养成效不同,柏科植物组织培养成功的范例还很少,但经过多年的探索仍取得了很大进展,特别是在外植体选择、培养基制备、诱导分化、试管苗生根、组培苗移栽等关键环节上积累了一些成功的经验^[7]。因此,为传承历史文化,保留古柏全部优良性状,保持其濒危种质资源,现尝试于实验室内建立其组织快繁体系,对扩繁和保护古树优良资源具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料取自陕西黄帝陵黄帝手植柏近年生幼嫩枝条,另采集西北农林科技大学校园和西北农林科技大学林学院试验苗圃的侧柏嫩叶用于硝酸还原酶活性的测定。于 4 月和 9 月剪取近几年生的幼嫩枝条,放入大烧杯内,用纱布和麻绳封口后,清水冲洗过夜。待多数污渍和油脂去除后,将幼嫩鳞叶作为外植体进行组织培养。

1.2 方法

将幼嫩鳞叶用 0.1% 氯化汞消毒,分别处理 8、10、12 min 和 14 min(多次搅动,外植体要与消毒液充分接触),再用 75% 乙醇进行表面消毒 30 s,无菌水洗涤 3~4 次;用无菌滤纸擦干水分后,切除茎段与消毒液接触的伤口部位,在无菌培养皿内将其剪成 2 cm 的茎段,分别接种于启动培养基上,分别置于光下和暗处培养。待其不定芽生长至 1 cm 以上,剪取叶尖接种在分化培养基上进行增殖继代培养,获得一定长度的不定芽后将其转入生根培养基进行生根培养。

根据李合生《植物生理生化实验原理和技术》一书中的活体法测定植物硝酸还原酶活性^[8],取组培前生长良好的幼嫩鳞叶和组培后的不定芽提前一天诱导酶的产生,分别称取 0.5 g 3 份,其中 1 份作对照,另外 2 份作酶活性测定用。

1.3 培养条件及培养基(激素浓度 mg/L)

启动培养阶段:1)1/2MS + 0.1NAA + (0.1、0.2、0.4、0.5)6-BA

2)1/2MS + 0.1NAA + 0.26-BA+100 mL 椰乳

继代培养阶段:1)1/2MS + 0.1NAA + (0.2、0.4、0.6、1.0)6-BA+100 mL 椰乳

2)1/4MS + 0.1NAA + (0.2、0.4、0.6、1.0)6-

BA+100 mL 椰乳

生根培养阶段:1)1/2MS + 0.1NAA + (0.2、0.4)IBA + (0.2、0.4)6-BA

2)1/2MS + 0.1NAA + (0.2、0.4)IBA + (0.2、0.4)6-BA+100 mL 椰乳

3)1/2WPM + 1NAA + (0、0.4)IBA

上述培养基内均附加蔗糖 30 g/L 和琼脂 7.0 g/L,后期为增加湿度改为琼脂 6.0 g/L,pH 值 5.8。培养温度为(23±2)℃,光照强度为 2 000~3 000 lx,连续光照 14 h。

2 结果与分析

2.1 无菌体系的建立

外植体表面消毒中筛选适当的消毒剂以及确定合适的消毒处理时间是建立无菌体系的重要环节。首先将冲洗后的嫩叶,用 0.1% 氯化汞充分浸泡消毒,再用 75% 的乙醇表面消毒 30 s,然后用无菌水冲洗 3~4 次,接到不定芽诱导培养基上,1 周后观察其体表消毒灭菌效果(表 1)。

表 1 0.1% 氯化汞对外植体体表消毒效果

Table 1 Effect of disinfection for explant surface by 0.1% mercuric chloride

消毒时间/min	污染瓶数/个	接种瓶数/个	污染率/%
8	15	27	0.55
10	17	28	0.60
12	12	26	0.46
14	11	25	0.44

由表 1 可知,用 0.1% 氯化汞体表消毒 12 min 效果最好,12 min 以上效果变化不明显。侧柏年龄过大,表面细菌较多,鳞叶间隙溶液难以完全接触,故而消毒时间只能消除一定程度上的污染;消毒时间过长则容易将组织细胞杀死,使材料褐化后干枯死亡。

2.2 启动培养阶段

这个阶段的目的是诱导生长缓慢的鳞叶恢复活性并萌生不定芽,形成无菌苗。以 1/2MS 为基本培养基,附加细胞分裂素 6-BA0.1、0.2、0.4、0.5 mg/L,生长素 NAA 的质量浓度为 0.1 mg/L。发现在上述培养基中,鳞叶都可以萌发并生长,但生长矮小,易干枯死亡,而添加 100 mL 椰乳的培养基中,叶片颜色嫩绿、生长迅速,转入继代培养基中可形成愈伤组织,亦可生长为大量丛生苗(图 1)。

2.3 继代与增殖培养阶段

此阶段的目的是在短期内获得大量适合生根的嫩芽。将上一阶段培养的无菌苗切割成小段,分别转接到以 1/2MS 为基础的增殖培养基(1)中。试验表明:转入增殖培养基后,丛生苗植株明显增加,而

不同浓度激素对继代增殖影响效果差距不大,但 6-BA0.4 mg/L 时褐化较少发生。继代 3 次以上,丛生苗吸收能力减弱,激素积累导致弱化,尤其当培养基中加入 6-BA 为 1.0 mg/L 时,丛生苗生长减慢,瘦弱甚至干枯,不利于组织培养及以后的再生。所以,为减缓弱化,可降低盐浓度至 1/4MS,6-BA 浓度低于 0.6 mg/L,琼脂调整为 6 g/L,即可产生大量的丛生苗(图 2)。因此,可以将初代培养的嫩芽,转接到组合为 1/2 或 1/4MS+6-BA0.2、0.4 mg/L+NAA0.1 mg/L+100 mL 椰乳的培养基中以利于组培苗的生长,减轻褐化。



图 1 不定芽生长状况:左为含椰乳培养基,右为一般激素培养基

Fig. 1 The growth condition of adventitious bud; left contains coconut milk, right is the ordinary one

2.4 生根培养阶段

当分化产生的不定芽,生长健壮,约长 2 cm 时,在启动和增殖培养基激素调节的基础上,加入

表 3 不同的植物生长调节物质种类和浓度对根系诱导的影响

Table 3 Affection of taking root by different types and concentrations of plant growth regulating substances

序号	NAA/(mg · L ⁻¹)	IBA/(mg · L ⁻¹)	6-BA/(mg · L ⁻¹)	椰乳/(ml · L ⁻¹)	时间/d	生长状况
1	0.1	0.2	0.2	无	30	茎条细小,茎高一般,生长慢
2	0.1	0.2	0.4	无	30	茎条细小,茎高一般,生长慢
3	0.1	0.4	0.4	无	30	茎条细小,茎高一般,生长慢
4	0.1	0.2	0.2	100	30	茎条粗壮,茎高较高,生长快
5	0.1	0.2	0.4	100	30	茎条粗壮,茎高较高,生长快
6	0.1	0.4	0.4	100	30	茎条细小,茎高一般,分丛生多

在培养基中添加活性炭 1.3 g/L,不仅未达到生根效果,反而降低了生长速度,导致植株褐化死亡。因此活性炭对古侧柏增殖和生根无作用,甚至抑制生长。

3 硝酸还原酶活性测定

硝酸还原酶是高等植物氮素同化的限速酶,可直接调节硝酸盐还原,从而调节氮代谢,并影响到光合碳代谢和部分抗逆性^[10],对于植物生长有重要作用。本试验的目的是以硝酸还原酶为代表,验证组培前后古侧柏生长活性的恢复情况,以证实最适培

IBA0.2、0.4 mg/L 尝试生根培养,另根据齐力旺^[9]等研究建立 3)组培养。结果表明,1/2WPM 不仅不能生根,甚至会导致丛生苗枯黄死亡(表 2)。

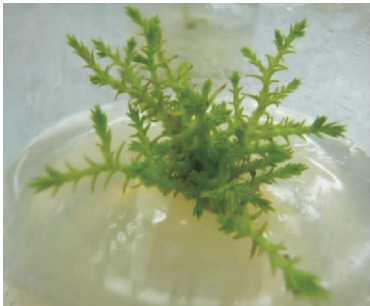


图 2 古侧柏的增殖

Fig. 2 The proliferation of ancient arborvitae ancient *P. orientalis*

表 2 不同培养基对生根的影响

Table 2 Influence of different culture medium to take root

培养基类型	丛生苗	时间/d	生长状况
1/2MS	有	30	茎条粗壮,颜色浅绿,未生根
1/2WPM	无	30	茎条瘦弱,不能分化,颜色转黄后死亡

为了研究 1/2MS 生根培养基中 IBA 和 6-BA 浓度的影响,设计不同浓度梯度水平进行试验。结果表明,丛生苗能生长但不能生根,NAA 和 IBA、6-BA 组合均会使芽底部产生愈伤。说明 IBA、6-BA 都对再生芽生根有效,还需通过与其他激素配合使用,改变培养条件对再生芽生根作进一步研究(表 3)。

培养基的生长状况。分别取组织培养前后的 3~5 年生、30~40 年生以及 3 000 年生黄帝手植柏 0.5 g 各 3 份,1 组对照,2 组测定,依照李合生的活体法^[7]测定并计算侧柏的硝酸还原酶活性(表 4)。

表 4 组培前后硝酸还原酶活性变化

Table 4 Nitrate reductase activity changes before and after the tissue culture

树龄	组培前活性 /(μg · g ⁻¹ · h ⁻¹)	组培后活性 /(μg · g ⁻¹ · h ⁻¹)	活性 变化/%
3~5 年生	15.603	16.993	8.91
30~40 年生	11.563	13.300	15.02
3 000 年生	5.305	12.613	137.78

由表 2 可知,组织培养能促使古侧柏的硝酸还原酶活性恢复到幼嫩侧柏的水平,进而延缓衰老,恢复其吸收营养物质和生长的能力,虽然不能完全达到幼年侧柏的生长状态,但是极大的改善了其自身活力。说明组织培养对于古侧柏复壮有着积极的作用。

4 结论

通过多次比较试验获得黄帝陵古侧柏组织培养最适培养基及激素配比如下:最适启动培养基为 1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+椰乳 100 mL/L,椰乳在恢复嫩芽组织健壮和快速生长上有重要作用。适宜的继代培养基为 1/2 或 1/4MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.1 mg/L+椰乳 100 mL/L,继代 3 次以上时,外植体出现激素中毒现象,丛生苗由基部开始黄化,叶片小且弯曲,最终死亡,所以在多次继代后,继代培养基减为 1/4MS 并降低培养基硬度和激素浓度,可以延缓此问题的发生。在古侧柏的离体培养过程中,IBA 和 6-BA 都能促进丛状芽的形成,有利于组培苗的大量繁殖,但现有配比不能诱导根系产生,并且根据文献[9]以 WMP 为基础的生根培养也没有达到预期效果。但硝酸还原酶活性测定表明,组织培养对于古侧柏恢复生长活力有重要意义。

黄帝手植柏既是华夏文化的重要组成部分,同时也是珍贵的种质资源,因此通过克隆手段对其进行保护和繁殖具有重要意义。试验表明传统的扦插方法不能对古柏进行繁殖。本文研究了植物激素、光照、生长温度和水分等因素等对再生芽生根的影响,为后续的古侧柏组织快繁体系的构建提供理论参考。

参考文献:

[1] 谢媛媛,吴海龙,黄灏峰,等. 北京古树健康评价[J]. 林业资源管理,2012(6):71-75.
XIE Y Y, WU H L, HUANG H F, *et al.* Ancient trees' health evaluation in Beijing[J]. Forest Resources Management, 2012 (6):71-75. (in Chinese)

[2] 王晓晖. 北京古树生态监测与评价[D]. 北京:北京林业大学, 2011.

[3] 黄锡梅. 桥山黄帝陵[J]. 审计与理财, 2006(11):64.

[4] 王雅群,李辛晨,陈玉珍. 北京颐和园西堤古柳组织培养体系的建立[J]. 林业科技开发, 2009, 23(3):48-51.
WANG Y Q, LI X C, CHEN Y Z. Tissue culture technique of ancient willows from the summer palace, Beijing [J]. China Forestry Science and Technology, 2009, 23(3):48-51. (in Chinese)

[5] 孙光明,宋瑞珍,冯少锋,等. 古树名木保护及复壮措施初探[J]. 河南林业科技, 2002, 22(4):51-52.

[6] 魏胜林,茅晓伟,肖湘东,等. 沧浪亭古树树体现状和症状及保护技术研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(19):11603-11605, 11617.

[7] 金江群,韩素英,郭泉水. 柏科植物组织培养研究现状与展望[J]. 世界林业研究, 2012, 25(2):34-40.
JIN J Q, HAN S Y, GUO Q S. Research advances and prospect in tissue culture of cupressaceae[J]. World Forestry Research, 2012, 25(2):34-40. (in Chinese)

[8] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000.

[9] 齐力旺,杨云龙,韩素英,等. 侧柏的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1995(4):284-285.
QI L W, YANG Y L, HAN S Y, *et al.* Tissue culture and plantlet regeneration of *Platyeladus orientalis*[J]. Plant Physiology Journal, 1995(4):284-285. (in Chinese)

[10] KYAING M S, 顾立江,程红梅. 植物中硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的作用[J]. 生物技术进展, 2011, 1(3):159-164.
KYAING M S, GU L J, CHENG H M. The role of nitrate reductase and nitrite reductase in plant[J]. Current Biotechnology, 2011, 1(3):159-164. (in Chinese)

(上接第 46 页)

[17] 洪涛,许大全. 珊瑚树和大豆叶片叶绿素荧光的非光化学猝灭[J]. 植物生理学报, 1999, 25(1):15-21.
HONG T, XU D Q. Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in soybean and sweet viburnum leaves[J]. Acta Phytobiologica Sinica, 1999, 25(1):15-21. (in Chinese)

[18] 魏亦农,孔广超,曹连蒲. 新小黑麦 1 号光合速率及叶绿素荧

光特性的研究[J]. 麦类作物学报, 2002, 22(4):91-93.
WEI Y N, KONG G C, CAO L P. Study on photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence character in New Triticale 1 [J]. Journal of Triticeae Crops, 2002, 22(4):91-93. (in Chinese)