

唐古特瑞香愈伤组织培养与再生体系建立

季元祖^{1,2},雷颖³,李晓玲³,吴利红³,赵忠^{2*}

(1. 甘肃省林业科学研究院,甘肃 兰州 730000;2. 西北农林科技大学,陕西 杨陵 712100;

3. 甘肃林业职业技术学院,甘肃 天水 741020)

摘要:以唐古特瑞香幼嫩叶片为材料,进行愈伤组织诱导与植株再生试验,以期建立唐古特瑞香再生体系,为其无性系的快速繁殖奠定基础。将幼嫩叶片进行表面灭菌后接种于初代培养基中,初代培养时,存在褐化现象,愈伤诱导前需进行除褐培养,除褐后的外植体经愈伤诱导、不定芽分化、增殖培养、生根培养和幼苗出瓶移栽的试验过程,筛选出了最佳培养方案。除褐培养基以 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+PVP 200 mg·L⁻¹效果较好,在此培养基上连续转移 3 次后褐变消失。愈伤诱导培养基为 MS+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+2,4-D 2.0 mgL⁻¹,诱导率 95.5%;芽苗分化培养基为 MS+ZT 2.0 mg·L⁻¹+TDZ 0.1 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹,分化率 93.2%,平均芽数为 8.66 条;不定芽增殖培养基为 MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+IBA 0.3 mg·L⁻¹,增殖倍数为 12.21,平均苗高 4.81 cm;生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.5 mg·L⁻¹,生根数平均为 3.83 条,生根率为 88.72% 以上;组培苗移栽于珍珠岩中生长良好,成活率达 90% 以上。本研究初步建立了唐古特瑞香再生体系,为其无性繁殖奠定了理论基础。

关键词:唐古特瑞香;幼嫩叶片;愈伤组织诱导;植株再生

中图分类号:S722.33 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2018)06-0094-06

Establishment of the Tissue Culture and Regeneration System of *Daphne tangutica*

JI Yuan-zu^{1,2}, LEI Ying³, LI Xiao-ling³, WU Li-hong³, ZHAO Zhong^{2*}

(1. Gansu Provincial Forestry Research Institute, Lanzhou, Gansu 730000, China; 2. Northwest A&F University, Yangling,

Shaanxi 712100, China; 3. Gansu Forestry Professional Technology College, Tianshui, Gansu 741020, China)

Abstract: This study focused on the callus induction and plant regeneration of *Daphne tangutica* with young leaves for the establishment of an efficient regeneration system. The young leaves were surface sterilized and cultured into primary culture medium. Browning parts resulting from the primary culture were removed before successive inducing callus, and the best culture solution was selected through the process of callus induction, adventitious bud differentiation, proliferation culture, rooting culture and seedling transplanting. The MS medium contained 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 200 mg·L⁻¹ PVP appeared to be the optimum treatment in which browning disappeared from the third transferred medium. The MS medium contained 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D appeared to be the optimum medium for callus induction, from which up to 95.5% induction rate was achieved. The MS medium contained 2.0 mg·L⁻¹ ZT, 0.1 mg·L⁻¹ TDZ, 0.5 mg·L⁻¹ NAA appeared to be the optimum medium for bud differentiation with up to 93.2% differentiation rate and average 8.66 buds. The MS medium contained 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.3 mg·L⁻¹ IBA appeared to be the optimum medium for adventitious bud proliferation with 12.21 proliferation rate and average 4.81cm of plantlet height. The 1/2 MS medium contained 0.5 mg·L⁻¹ NAA appeared to be the opti-

收稿日期:2018-02-08 修回日期:2018-03-27

基金项目:甘肃省重点研发计划项目(2015GS05042)。

作者简介:季元祖,男,研究员,在读博士,研究方向:森林培育、植物栽培与养护。E-mail:chinajyz909@163.com

*通信作者:赵忠,男,教授,博士,博士生导师,研究方向:森林培育理论与技术。E-mail:zhaozh@nwsuaf.edu.cn

mum medium for rooting with over 88.72% rooting rate and the average 3.83 roots. All vitro plantlets grew well after transplanting into the perlite media with over 90% survival rate. The regeneration system established in this study would lay theoretical foundation for asexual reproduction of *D. tangutica*.

Key words: *Daphne tangutica*; young leaf; callus induction; plantlet regeneration

唐古特瑞香(*Daphne tangutica*)为瑞香科常绿灌木,别名陕甘瑞香、小冬青等,高 0.6~1 m。花冠外面紫红色或浅紫色,内白色,具芳香味,常数朵成顶生头状花序,核果红色,卵形。花期 4 月,果期 7 月^[1]。唐古特瑞香枝条婆娑,叶片常绿,开花早且花期长,花大色艳,香味浓烈,是园林绿化的良好材料。生长于海拔 1 500~3 000 m 的林缘山地,主要分布于甘肃省迭部、舟曲、卓尼、天水、武都、文县等地,青海、四川、陕西等省区也有分布。其干燥茎皮及根皮入药称为祖师麻^[2-3],有镇痛、活血、消肿、祛风湿之用,唐古特瑞香作为民间草药用外,还有毒鱼、杀鼠和杀虫的作用^[4],对植物病原菌也具有较弱的抑制作用^[5]。具有很高的药用和观赏价值,市场前景广阔。

因繁育技术相对困难,瑞香属树种在生产实践中人工栽培较少,一定程度影响和制约了其药用及其他经济价值的利用。通过组织培养,可以有效解决快速繁殖技术,为有效开发利用其多种价值提供基础。组织培养与快速繁殖的方法具有生长周期缩短,保留原品种的优良性状得到无病毒植株,达到快速繁殖优良品种的优点。对于此方面的研究多见于金边瑞香组织培养,通过利用嫩茎和茎尖^[6]、叶片^[7-8]进行愈伤组织的诱导或离体培养;洪军孟^[9]以细胞分裂素 6-BA 和生长激素 NAA 两种激素为例对金边瑞香组织培养中常遇到的玻璃苗和生根问题进行了研究;赵琦^[10]等对金边瑞香及愈伤组织的诱导培养基进行筛选,添加激素 KT、NAA、BA、IAA、ZT 进行试验,以 MS 附加 ZT 1.0 mg/L 芽的诱导率最高。对于唐古特瑞香作者曾以茎尖为材料进行过尝试^[11],但以叶片为材料的试验研究,目前还未见报道。本文利用野生唐古特瑞香的幼叶为材料,进行组织培养试验研究,以期建立其组织培养再生体系,使唐古特瑞香得到广泛的繁殖和应用,有效发挥其药用和其他价值。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

采集地点为甘肃省小陇山林区,采集时间为初夏,取唐古特瑞香当年生较肥厚的嫩叶,用清水冲去表面灰尘后装入保鲜袋备用。

1.2 方 法

1.2.1 外植体表面消毒 唐古特瑞香叶片表面较

为光滑,初夏采摘的肥厚嫩叶较为洁净,取其叶片放入培养皿中,盖上过滤网罩,流水冲洗 2~3 h 后,置于超净工作台上,放入 70% 的酒精中 30 s 后,无菌水冲洗 3 遍,转入 0.1% 的升汞溶液中加入 2 滴吐温-80 不断摇晃消毒 3 min,无菌水冲洗 5~6 次,取出后放在铺有滤纸的接种盘中。

1.2.2 培养条件 培养基中均加入 3% 的蔗糖(生根培养为 2%)^[12]和 6 g·L⁻¹琼脂,调节 pH 值为 5.8,愈伤诱导阶段 pH=5.6^[13];培养温度为(20±2)℃,光周期 12 h/12 h(光/暗);光照强度:愈伤诱导时约 30 μmol·m⁻²·s⁻¹^[14],其他各阶段为 50 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.2.3 除褐培养 除褐培养以 MS+细胞分裂素 6-BA 1.0 mg·L⁻¹为基本培养基,添加不同浓度的维生素 C(VC)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)^[15],共 9 个处理,1 个对照,每个处理 10 瓶,每瓶接种 1 个外植体,重复 3 次。每隔 24 h 转瓶 1 次^[12],连续转移直至褐变减轻。继续培养 10 d 后观察并统计褐变率,褐变率=褐化(死亡的)外植体数/接种外植体数×100%。

1.2.4 愈伤组织培养 将除褐培养所得的材料转接到愈伤诱导培养基中,遮光培养,愈伤组织诱导以 MS+水解酪蛋白(CH) 500 mg·L⁻¹为基本培养基,采用细胞分裂素 6-BA 与生长素 2,4-D^[16]的两因素三水平随机设计,共 9 个处理,每个处理 10 瓶,每瓶接种 1 个外植体,重复 3 次。暗培养 2 周后转入正常光照条件,40 d 后观察并统计愈伤组织诱导率,愈伤组织诱导率=形成细胞团的外植体数/接种外植体数×100%。

1.2.5 不定芽分化培养 培养 40 d 后将外植体产生的新鲜致密的愈伤组织块,切割成底面积约 1.0 cm² 的小块,转接到不定芽分化培养基上。分化培养以 MS+生长素萘乙酸 NAA 0.5 mg·L⁻¹为基本培养基,加入不同浓度的细胞分裂素 ZT 与细胞分裂素 TDZ^[17-18],共 9 个处理,每个处理 10 瓶,每瓶接种 1 块愈伤组织,重复 3 次。培养 40 d 后观察并统计分化率和平均芽数,不定芽分化率=萌芽的愈伤组织块/接种的愈伤组织块×100%;平均芽数=萌芽总数/接种块数。

1.2.6 嫩茎的增殖培养 将分化培养所得的簇生芽切下,较长嫩茎切成 0.5~1.0 cm 的小段,转入增

殖培养基上培养。增殖培养以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的细胞分裂素 6-BA 与生长素吲哚丁酸 IBA, 共 9 个处理, 每个处理 10 瓶, 每瓶接种 3 块幼茎, 重复 3 次。培养 40 d 后观察并统计增殖倍数与平均苗高, 增殖倍数 = 培养增长节位数(或芽苗数)/接种时节位数(或芽苗数); 平均苗高 = 苗高总和/总苗数。

1.2.7 试管苗生根 当不定芽长到 2~3 cm 时, 切下芽苗转接到生根培养基上培养。生根培养以 1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度的生长素 NAA 和 IBA, 共 6 个处理, 每个处理 10 瓶, 每瓶接种 1~2 块幼苗, 重复 3 次。培养 30 d 后观察并统计生根率与平均根数, 生根率 = 生根茎段数/接种茎段数 \times 100%; 平均根数 = 每处理生根总数/诱导生根的总苗数。

1.2.8 移栽 将生根的瓶苗不开盖在炼苗室放置 2~3 d, 然后打开盖再放置 2~3 d, 取出苗, 洗净根部培养基, 移栽到纯净珍珠岩的基质上, 保持环境温度约 20℃, 相对湿度 90%~100%, 适当遮荫, 每天早晚通风, 浇灌适量营养液, 逐渐增加光照。计算移栽成活率 = 移栽成活数/总移栽数 \times 100%。

1.2.9 数据的统计分析 采用 Excel 统计试验数据, 通过方差分析在 $F_{0.05}$ 水平上进行显著性测验, 用新复极差法(SSR)法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同抗褐化剂对外植体褐变的影响

在超净工作台上将灭过菌的肥厚嫩叶剪切成 0.5 cm \times 1.0 cm 的小块, 接种到除褐培养基中进行培养, 培养基以 MS+6-BA 1.0 mg \cdot L⁻¹ 附加不同浓度配比的 VC 和 PVP(表 1), 从试验结果可知: MS+6-BA 1.0 mg \cdot L⁻¹ + PVP 200 mg \cdot L⁻¹ 是较理想的除褐培养基, 在此培养基上每隔 24 h 转瓶 1

次, 连续转移 3 次后发现褐变逐渐消失。

2.2 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导的影响

选择除褐培养所得的长势较好的材料转接到愈伤诱导培养基中, 遮光培养, 1 周后叶切块变肥大, 两端切口处有膨大的愈伤现象, 40 d 后观察, 各处理愈伤组织块明显增大, 但不匀一, 部分愈伤块致密、淡绿色、且表面有小疣突(图 1-D)。6-BA 和 2,4-D 对愈伤组织诱导的效果显著, 诱导率及平均直径随细胞分裂素 6-BA 和生长素 2,4-D 浓度的升高而增大, 但当两者浓度分别 >3.0 mg \cdot L⁻¹ 和 2.0 mg \cdot L⁻¹ 时, 诱导率开始下降, 愈伤组织松散透明, 失去了不定芽分化能力(表 2)。综合分析表明: 较为理想的愈伤组织诱导培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg \cdot L⁻¹ + 6-BA 3.0 mg \cdot L⁻¹ + CH 500 mg \cdot L⁻¹, 诱导率为 95.5%, 此培养基下愈伤组织块大、致密, 表面有小疣突, 不定芽分化能力强。

表 1 VC 和 PVP 对初代培养中褐变的影响

Table 1 Effects of VC and PVP on browning in primary culture

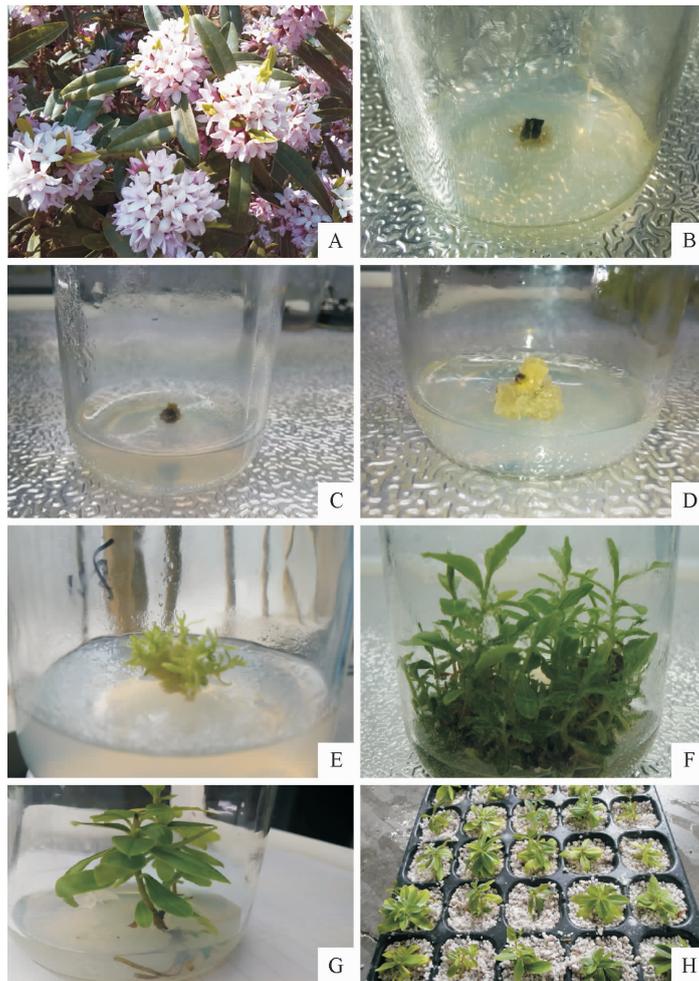
| 处理号 | 添加剂/(mg \cdot L ⁻¹) | | 褐变率/% |
|-----|-----------------------------------|-----|-------------------------------|
| | VC | PVP | |
| CK | 0 | 0 | 100.0 \pm 0 ^c |
| 1 | 100 | 0 | 80.4 \pm 1.82 ^d |
| 2 | 200 | 0 | 43.8 \pm 0.84 ^{bc} |
| 3 | 300 | 0 | 54.2 \pm 1.64 ^c |
| 4 | 0 | 100 | 21.0 \pm 1.58 ^b |
| 5 | 0 | 200 | 0.0 \pm 0 ^a |
| 6 | 0 | 300 | 30.4 \pm 1.14 ^b |
| 7 | 50 | 50 | 64.2 \pm 1.64 ^{cd} |
| 8 | 100 | 100 | 47.8 \pm 1.48 ^{bc} |
| 9 | 200 | 200 | 61.0 \pm 1.58 ^c |

注: 数据为平均值 \pm 标准差, 同列数字旁不同小写字母, 表示有显著差异 ($P < 0.05$)。表 2~表 5 同。

表 2 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different combinations of plant growth regulators on callus induction

| 处理号 | 植物生长调节剂/(mg \cdot L ⁻¹) | | 愈伤组织诱导率/% | 愈伤组织形态 |
|-----|---------------------------------------|-------|--------------------------------|-------------------|
| | 6-BA | 2,4-D | | |
| 1 | 2.0 | 1.0 | 18.2 \pm 2.11 ^c | 致密 |
| 2 | 2.0 | 2.0 | 33.0 \pm 1.51 ^c | 致密 |
| 3 | 2.0 | 3.0 | 41.5 \pm 1.83 ^c | 较松散 |
| 4 | 3.0 | 1.0 | 60.7 \pm 1.56 ^{bc} | 致密 |
| 5 | 3.0 | 2.0 | 95.5 \pm 1.15 ^a | 致密, 表面有小疣突 |
| 6 | 3.0 | 3.0 | 77.2 \pm 1.39 ^{ab} | 较致密, 表面有小疣突, 略显透明 |
| 7 | 4.0 | 1.0 | 52.12 \pm 1.41 ^{bc} | 松散透明 |
| 8 | 4.0 | 2.0 | 67.7 \pm 1.81 ^b | 松散透明, 淡褐色 |
| 9 | 4.0 | 3.0 | 73.6 \pm 2.10 ^{ab} | 褐色玻璃状 |



注: A:取材母株;B:叶切块外植体;C:除褐后的小叶切块愈伤化;D:分化 40 天的愈伤组织块;E:不定芽分化 40 天;F:继代培养 40 d;G:生根培养 30 d;H:移栽成活的试管苗。

图 1 唐古特瑞香愈伤组织诱导与植株再生

Fig. 1 Callus induction and plantlets regeneration of *D. tangutica*

2.3 不同植物生长调节剂组合对不定芽分化的影响

将淡绿色较致密的愈伤组织转接于分化培养基上,20 d后有少量不定芽产生,40 d长出密集的绿色不定芽(图 1-E)。由表 3 可见,ZT、TDZ、NAA 对芽苗分化有显著影响,不同植物生长调节剂组合对

不定芽的分化影响不同,以添加 ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、TDZ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基较适合不定芽的分化,分化率为 93.2%,平均芽数 8.66 个,芽苗生长健壮。

表 3 不同植物生长调节剂组合对不定芽分化的影响

Table 3 Effects of different combinations of plant growth regulators on adventitious shoot differentiation

| 处理号 | 植物生长调节剂/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | | | 分化率/% | 平均芽数 |
|-----|---|------|-----|----------------------|----------------------|
| | ZT | TDZ | NAA | | |
| 1 | 1 | 0.05 | 0.5 | 29.5 ± 1.72^c | 2.02 ± 0.43^c |
| 2 | 1 | 0.10 | 0.5 | 59.0 ± 1.10^b | 3.83 ± 0.33^{bc} |
| 3 | 1 | 0.15 | 0.5 | 43.8 ± 2.70^{bc} | 2.67 ± 0.31^c |
| 4 | 2 | 0.05 | 0.5 | 61.2 ± 1.3^b | 3.6 ± 0.44^{bc} |
| 5 | 2 | 0.10 | 0.5 | 93.2 ± 1.02^a | 8.66 ± 0.33^a |
| 6 | 2 | 0.15 | 0.5 | 71.6 ± 1.32^{ab} | 4.56 ± 0.53^b |
| 7 | 3 | 0.05 | 0.5 | 48.0 ± 1.58^{bc} | 2.8 ± 0.42^c |
| 8 | 3 | 0.10 | 0.5 | 63.6 ± 1.14^b | 4.76 ± 0.52^b |
| 9 | 3 | 0.15 | 0.5 | 50.5 ± 2.11^{bc} | 3.5 ± 0.46^{bc} |

2.4 不同植物生长调节剂组合对嫩茎增殖的影响

表 4 显示,6-BA 与 IBA 对芽苗增殖的影响显著,增殖倍数随生长调节剂浓度的升高而增加,但当 6-BA 和 IBA 浓度分别 $>2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,增殖倍数下降,且产生一定数目的玻璃苗,

基部有较多愈伤组织。综合以上试验结果,唐古特瑞香芽苗增殖培养较适宜的培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,芽苗生长健壮,叶色深绿,增殖倍数为 12.21,平均苗高 4.81 cm(图 1-F)。

表 4 不同植物生长调节剂组合对丛生芽增殖的影响

Table 4 Effects of different combinations of plant growth regulators on multiple shoot proliferation

| 处理号 | 植物生长调节剂/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | | 增殖倍数 | 平均苗高/cm | 丛生芽生长情况 |
|-----|---|-----|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| | 6-BA | IBA | | | |
| 1 | 1.0 | 0.1 | 2.16 ± 0.33^d | 2.01 ± 0.53^{bc} | 苗茎较细弱,叶色浅绿,无愈伤组织和玻璃苗 |
| 2 | 1.0 | 0.3 | 4.98 ± 0.21^{cd} | 5.02 ± 0.21^{ab} | 苗茎较细弱,叶色浅绿,无愈伤组织和玻璃苗 |
| 3 | 1.0 | 0.5 | 3.22 ± 0.77^d | 2.81 ± 0.46^b | 苗茎细弱,叶色淡绿,无玻璃苗,有少量愈伤组织 |
| 4 | 2.0 | 0.1 | 6.69 ± 0.26^{bc} | 2.28 ± 0.20^{bc} | 苗茎较粗壮,叶色正常,无愈伤组织和玻璃苗 |
| 5 | 2.0 | 0.3 | 12.21 ± 0.23^a | 4.81 ± 0.51^a | 苗茎健壮,叶色深绿,无愈伤组织和玻璃苗 |
| 6 | 2.0 | 0.5 | 8.33 ± 0.25^b | 3.65 ± 0.43^{ab} | 苗茎健壮,叶色深绿,无玻璃苗,有少量愈伤组织 |
| 7 | 3.0 | 0.1 | 3.40 ± 0.66^{cd} | 1.33 ± 0.23^{bc} | 苗茎粗短,叶色深绿,有 20% 玻璃苗,无愈伤组织 |
| 8 | 3.0 | 0.3 | 6.06 ± 0.53^c | 1.69 ± 0.34^{bc} | 苗茎粗短,叶色深绿,有 25% 玻璃苗和较多愈伤组织 |
| 9 | 3.0 | 0.5 | 3.02 ± 0.71^d | 1.16 ± 0.52^c | 芽苗矮小,叶深绿皱缩,有 30% 玻璃苗和较多愈伤组织 |

2.5 试管苗生根与移栽

丛生芽苗增殖培养几代后,转入生根培养基中培养,30 d 后的培养结果显示:NAA 和 IBA 均影响芽苗生根,NAA 的促进生根能力大于 IBA,其中,在

添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 1/2MS 培养基上,生根率为 88.72%,平均生根数 3.83 条左右(图 1-G,图 1-H),均明显高于其他处理(表 5)。将生根的试管苗移栽,20 d 后成活率达 90%。

表 5 不同植物生长调节剂组合对生根的影响

Table 5 Effects of different combinations of plant growth regulators on rooting

| 处理号 | 植物生长调节剂/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | | 生根率/% | 平均生根数 | 根的形态 |
|-----|---|-----|-----------------------|----------------------|-------------|
| | NAA | IBA | | | |
| 1 | 0.3 | 0 | 39.86 ± 1.23^b | 1.67 ± 0.41^b | 细长,淡绿色 |
| 2 | 0.5 | 0 | 88.72 ± 0.80^a | 3.83 ± 0.15^a | 粗长,淡绿色 |
| 3 | 1.0 | 0 | 61.89 ± 2.36^{ab} | 2.68 ± 0.72^{ab} | 粗短,基部较多愈伤组织 |
| 4 | 0 | 0.3 | 24.66 ± 2.11^b | 0.83 ± 0.37^b | 细短,幼根淡绿色 |
| 5 | 0 | 0.5 | 41.14 ± 1.78^b | 2.28 ± 0.23^b | 粗短,淡绿色 |
| 6 | 0 | 1.0 | 32.01 ± 2.32^b | 1.55 ± 0.58^b | 粗短,基部较多愈伤组织 |

3 结论与讨论

通常获得再生芽都需要切口造伤^[19-20],并且不定芽往往产生于愈伤组织暴露于空气中的部分,唐古特瑞香叶片内酚类物质含量较高,切割外植体时,切口附近细胞受到伤害,酚类化合物外溢氧化成橙黄色的醌类物质和水,醌类物质会在酶的作用下与外植体组织蛋白聚合,从而导致组织代谢紊乱,生长停滞^[21-22]。因此,在愈伤组织诱导及芽苗分化培养前必须降低褐变的危害。不同植物对抗褐化剂的要求不同,本试验添加的 VC 和 PVP 对唐古特瑞香组织培养中的褐变现象具有显著影响,PVP200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是降低褐变较好的浓度配比,并配合 3 次连续转接,减少了褐化对愈伤分化培养的影响。试验中还可以通过以下措施防止褐化:选择旺盛生长状态

的幼嫩的外植体;叶片剪切时不能过大最好是 $0.5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$,剪口不能太多,要迅速接种以缩短在空气中氧化的时间;选择合适的激素和激素浓度。

激素种类和浓度对唐古特瑞香叶片愈伤组织诱导与植株再生具有重要作用,细胞分裂素 6-BA 与生长素 2,4-D 对愈伤组织的诱导具有显著影响,但细胞分裂素 6-BA 作用明显大于生长素 2,4-D,综合分析显示, $\text{MS}+2,4\text{-D } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+6\text{-BA } 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+\text{CH500 } \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较适合愈伤组织诱导;植株再生的关键在于愈伤组织是否能分化出不定芽,本试验采用了具有较强活性的细胞分裂素 ZT 和 TDZ,有效促进了不定芽的分化,结果表明, $\text{MS}+\text{ZT } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+\text{TDZ } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是不定芽分化较为理想的培养基组合。

增殖培养阶段,细胞分裂素 6-BA 与生长素

IBA对芽苗的增殖都有较显著的影响,生长素 IBA 较高时基部会出现愈伤组织而不利于增殖。MS+6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是芽苗增殖较适合的培养基组合,且当细胞分裂素 6-BA 浓度较高时会出现玻璃化现象,该现象在金丝桃组培中也存在^[23]。除此之外还有其他一些因素与玻璃化苗的出现有一定关系;外植体部位、大小、培养基不同激素和不同激素浓度、铵根硝酸根浓度、琼脂浓度等。可以适当在保证组织培养的基础上降低激素浓度;用细胞分裂素 KT 代替细胞分裂素 BA 用于唐古特瑞香的组培苗增殖;增加琼脂用量等措施来降低玻璃苗的产生。增加生产的稳定性,降低无效苗的消耗。

物理结构较好,保水通透性能好的基质是移栽成活的基本条件,生根过程中, $1/2\text{MS}+\text{NAA}0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{蔗糖}20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,有利于根原基的形成,唐古特瑞香存在移栽困难的问题,移栽时采用纯净珍珠岩、蛭石基质,适量浇灌营养液可提高试管苗的移栽成活率。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴:第二册[M]. 北京:科学出版社,1972:953.
- [2] 李书慧,吴立军,殷红英,等. 祖师麻化学和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2002,27(6):401-403.
LI S H, WU L J, YIN H Y, *et al.* Chemical and pharmacological advances of the study on *Zushima*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2002, 27(6): 401-403. (in Chinese)
- [3] 张薇,苏娟,扈晓佳,等. 中药祖师麻的三种基源植物化学及药理活性[J]. 中国医药工业杂志,2007,38(3):233-238.
ZHANG W, SU J, HU X J, *et al.* Chemical constituents and pharmacological activities of three origin plants of traditional Chinese *Zushima* [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2007, 38(3): 233-238. (in Chinese)
- [4] 杨航宇. 甘肃瑞香对菜青虫杀虫活性及对常见植物病原菌的抑菌作用研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2009.
- [5] 张振刚. 甘肃瑞香提取物对8种常见植物病原菌抑菌作用的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2011,46(2):80-82.
ZHANG Z G. Inhibitions of extracts from *Daphne tangutica* against eight plant fungal pathogens[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2011, 46(2): 80-82. (in Chinese)
- [6] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京:农业出版社,1987:45.
- [7] 竹内正幸. 植物组织培养[J]. 广西蚕业,1994(2):84.
- [8] 周楠,洪军孟. 金边瑞香组织培养和快速繁殖技术[J]. 农业科技通讯,2000(12):55-58.
- [9] 洪军孟. 金边瑞香玻璃苗和生根问题探讨[J]. 浙江万里学院学报,2001,14(1):40-41.
- [10] 赵琦,周冬法,周能辉,等. 金边瑞香离体培养中芽和愈伤组织诱导初步研究[J]. 浙江林业科技,2003(11):20-22,25.
ZHAO Q, ZHOU D F, ZHOU N H, *et al.* Study on bud and wound callus inducement of isolated culture of *Daphne odora* vat. *marginata*[J]. *Jour. of Zhejiang For. Sci. & Tech.*, 2003 (11): 20-22, 25. (in Chinese)
- [11] 雷颖. 甘肃瑞香组织培养技术研究[J]. 生物学通报,2014,49(12):46-48.
- [12] 刘敏. 花卉组织培养与工厂化生产[M]. 北京:地质出版社,2002:60,94.
- [13] 邹秀宏,李中林,陈正明,等. 茶树组织培养中外植体褐化控制的研究[J]. 西南农业学报,2012,25(3):1065-1068.
WU X H, LI Z L, CHEN Z M, *et al.* Control browning of explants in tissue culture of tea plant [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 25(3): 1065-1068. (in Chinese)
- [14] 王苑,谢凝子. 植物组织培养中褐变现象及抗褐变研究进展[J]. 黔西南民族师范高等专科学校学报,2007(3):109-113.
- [15] 张俊琦,罗晓芳. 牡丹组织培养中褐变发生的原因与防治方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报,2006,37(5):720-724.
ZHANG J Q, LUO X F. Occurrence and prevention method of brown turning in tissue culture of *Peonia suffruticosa* Andr [J]. *Journal Shenyang Agricultural University*, 2006, 37 (5): 720-724. (in Chinese)
- [16] 周正君,田晶,李周岐. 花椒愈伤组织诱导及细胞悬浮培养研究[J]. 西北林学院学报,2016,31(4):153-156,181.
ZHOU Z J, TIAN J, LI Z Q. Studies on the callus induction and cell suspension culture of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2016, 31(4): 153-156, 181. (in Chinese)
- [17] 王港,李周岐,刘晓敏,等. 花椒组织培养再生体系的建立[J]. 西北林学院学报,2008,23(3):117-119.
WANG G, LI Z Q, LIU X M, *et al.* Establishment of tissue culture regeneration system of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2008, 23(3): 117-119. (in Chinese)
- [18] 刘森,曹后男,宗成文,等. TDZ对牛皮杜鹃叶片分化及继代增殖的影响[J]. 西北农业学报,2012,21(12):158-162.
LIU M, CAO H N, ZONG C W, *et al.* Effect of TDZ on leaf differentiation and subculture multiplication of *Rhododendron chrysanthum* Pall. [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2012, 21(12): 158-162. (in Chinese)
- [19] YEPES L M, ALDWINCKLE H S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis[J]. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 1994, 37: 257-269.
- [20] M LAIMER, A DA CAMARA MCCHADO, V HANZER. Regeneration of shoots from leaf discs and stem microcuttings of fruit trees as a tool for transformation [J]. *Acta Hort*, 1998, 235: 85-92.
- [21] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 修订版. 兰州:甘肃科学技术出版社,1999:48.
- [22] 陈正华. 木本植物组织培养及其运用[M]. 北京:高等教育出版社,1986:34.
- [23] 任继文,雷颖. 金丝桃组织培养再生体系的建立[J]. 西北林学院学报,2010,25(3):90-92.
REN J W, LEI Y. Establishment of tissue culture regeneration system of *Hypericum monogynum* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2010, 25(3): 90-92. (in Chinese)