

珍稀植物掌叶木繁育试验

杨婷婷, 兰洪波, 姚 芊, 柳华富, 姚雾清

贵州省茂兰国家级自然保护区管理局, 贵州 荔波

Email: 151764475@qq.com

收稿日期: 2020年11月26日; 录用日期: 2020年12月23日; 发布日期: 2021年1月18日

摘 要

采用离体培养法, 以掌叶木[*Handeliidendron bodinieri* (Levl.) Rehd.]种子为外植体, 在含有不同植物激素的培养基上诱导萌芽及丛芽。结果表明, 在适量的生长调节剂作用下, 掌叶木种子培养发芽率可达95%, 最佳诱导培养基为MS + 6-BA 1.0 mg/L + α -NAA 0.5 mg/L, 最佳增殖培养基为1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.25 mg/L。采用采用B5培养基代替MS培养基, 且将大量元素降为1/2, 能有效抑制愈伤组织的玻璃化。

关键词

掌叶木, 种子, 离体培养, 激素

Breeding Experiment of Rare Plant Palm Leaf Tree

Tingting Yang, Hongbo Lan, Qian Yao, Huafu Liu, Wuqing Yao

Maolan National Nature Reserve Administration, Guizhou Province, Libo Guizhou

Email: 151764475@qq.com

Received: Nov. 26th, 2020; accepted: Dec. 23rd, 2020; published: Jan. 18th, 2021

Abstract

In vitro culture was used to induce germination and cluster buds on the medium containing different plant hormones by using the seeds of *Handeliidendron bodinieri* (Levl.) Rehd. as explants. The results showed that: the optimum medium for seed germination is supplied with MS + 6-BA 1.0 mg/L + α -NAA 0.5 mg/L; the germination rate is 95%; the optimum medium for bud differentiation is supplied with 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.25 mg/L. And, the vitrification of callus could be effectively inhibited by using B5 medium instead of MS medium and reducing the amount of elements to 1/2.

文章引用: 杨婷婷, 兰洪波, 姚芊, 柳华富, 姚雾清. 珍稀植物掌叶木繁育试验[J]. 林业世界, 2021, 10(1): 15-20.

DOI: 10.12677/wjf.2021.101003

Keywords

Palm Leaf Wood, Seed, *In Vitro* Culture, Hormone

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

掌叶木[*Handeliidendron bodinieri* (Levl.) Rehd], 无患子科掌叶木属植物, 落叶乔木或灌木。因树叶酷似鸭掌, 当地村民俗称鸭脚板, 为第三纪孑遗古老植物, 喀斯特地区特有树种之一, 对研究植物区系和无患子科的系统发育具有科学价值[1] [2] [3]。1984年, 中国科学院植物研究所发布的《中国植物红皮书》中, 掌叶木被列为国家二级稀有濒危植物; 1996年, 在国务院发布的《中华人民共和国野生植物保护条例》中, 掌叶木被列为国家一级保护植物[4] [5]。掌叶木是优良的能源及绿化物种, 科研及经济利用价值大, 是绿化石灰岩山地的优良速生树种, 在茂兰保护区多分布在喀斯特山地地貌中下部或沿沟谷边海拔 500~900 m 之间的阔叶林中[6]。掌叶木种子因富含油脂, 在自然环境下易腐烂丧失发芽能力及受松鼠、鸟类等动物觅食, 再加上人为干扰破坏、生存环境特殊及自身特性的影响, 在自然状态下掌叶木种子有较高的败育率, 自然散播的种子萌发率极低, 天然更新困难, 呈现纺锤形结构, 现有种群无论是在径级、高度还是在分布上, 都呈衰退表型, 自然更新状况极差, 目前已濒临灭绝[7] [8] [9] [10]。目前, 国内外学者对掌叶木的研究多在形态特征、群落生态学特征、种子生殖特征、遗传多样性、分布区和个体生长等方面[11] [12] [13], 但对掌叶木的离体培养方面的研究甚少。因此, 本研究对掌叶木种子的组织培养及快速繁殖技术进行研究和探讨, 以掌叶木种子为外植体, 通过组织培养试验提高种子萌发率, 以期为无患子科植物的组织培养技术提供科学依据和理论指导, 为人工繁育及解决掌叶木种子难萌发的问题提供可靠技术依据。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料及消毒处理

掌叶木种子采自贵州茂兰国家级自然保护区。2018年8月底至10月初采集成熟果实, 果实采下后选出饱满蒴果, 阴干待果实裂开, 取出种子, 用少量洗衣粉水或肥皂水清洗油渍, 轻轻揉搓去除假种皮, 再用小毛刷充分刷洗干净, 用84消毒溶液浸泡5分钟, 用滤纸吸干表面水分, 将洗净种子置于无菌的烧杯中。消毒时在超净台上操作, 在超净工作台用75%酒精表面消毒5 min, 以无菌水冲洗3~5次, 再用次氯酸钠(10%)浸泡消毒了15~20 min, 消毒时要不断搅动, 使种子与消毒剂充分接触, 最后用无菌水清洗4~5次后去除掌叶木黑色假种皮, 剥开种子接到添加附加物的无菌培养基上。试验所用的试剂和植物激素均为分析纯[14]。

2.2. 试验方法

2.2.1. 培养基配制及培养条件

按照MS培养基配方计算用量配制培养基。在容器中加入2.0%蔗糖, 0.4%琼脂, 10%香蕉及适量蒸馏水加热搅拌均匀, 根据计算比例依次加入大量元素、微量元素、铁盐、不同种类、不同浓度的生长调节激素(植物生长素 α -NAA、IBA、2,4-D 及细胞分裂素 6-BA、KT), 加水定容。调节 pH 值, 使 PH 为

5.8~6.2。初代培养基配方见表 1，掌叶木愈伤组织诱导结果见图 1。各培养基进行 3 次以上重复试验，每次 50 个母瓶以上，培养温度 $26^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，光照强度 2000 lx，光照时间 12 h/d，每隔 7 d 进行观察记录，30 d 后统计分析培养情况[15]。

Table 1. Proportion of growth regulating hormones with different concentrations

表 1. 不同浓度的生长调节激素配比

培养基	激素种类及浓度 mg/L				
	2,4-D	α -NAA	IBA	KT	6-BA
1	1.0				1.0
2	0.2				0.5
3	0.5				1.0
4		1.0			1.0
5		0.2			0.5
6		0.5			1.0
7	1.0			1.0	
8	0.2			0.5	
9	0.5			1.0	
10		1.0		1.0	
11		0.2		0.5	
12		0.5		1.0	
13			1.0	1.0	
14			0.2	0.5	
15			0.5	1.0	
16			1.0		1.0
17			0.2		0.5
18			0.5		1.0

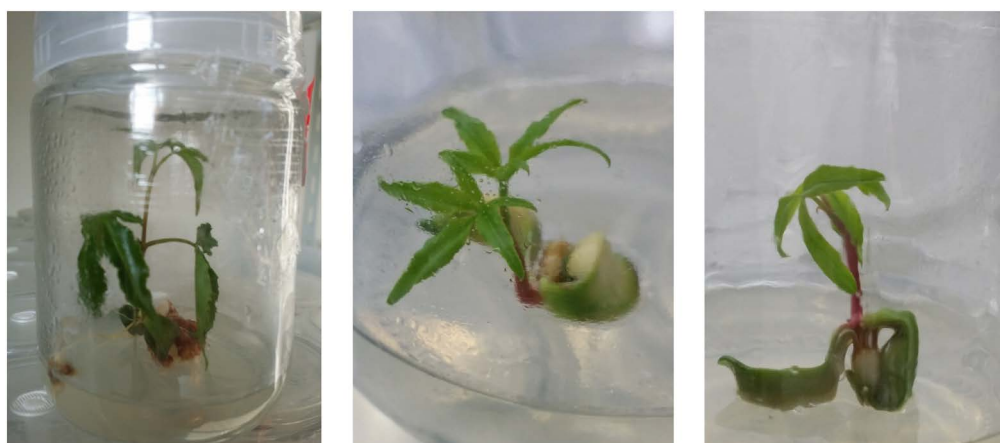


Figure 1. Induction of callus in palm-leaf wood

图 1. 掌叶木愈伤组织诱导结果

2.2.2. 污染率计算及从芽统计

接种后定期进行观察，统计污染、褐化及无菌活体母瓶数量，并计算百分比。其中无菌活体得率 = (接种数 - 污染数 - 褐化数)/接种数 $\times 100\%$ ，污染率 = 污染数/接种数 $\times 100\%$ 。30 d 后观察各培养基中

愈伤组织的数量、出愈天数以及诱导率,并观察其生长势。诱导率 = 出愈数/无菌活体数 × 100%。30 d 后对生长状态良好、个体差异小、高大于 4 cm、粗大于 0.3 cm 的苗进行丛芽诱导。将苗切成带有腋芽或顶芽的茎段,转入继代培养基中诱导丛芽,每个配方接种 50 个茎段,1 周为一个培养周期,观察记录丛芽诱导情况,统计丛芽增殖倍数[14]。

2.2.3. 玻璃化抑制处理

掌叶木种子经常规消毒后接种到培养基中后均能生长,但从芽增殖培养过程中易产生玻璃化现象。以诱导出的愈伤组织(丛芽)为实验材料,将 MS 培养基换为 B5 培养基,从培养基类型、生长调节剂、糖含量三方面进行调节。

3. 结果与分析

3.1. 无菌活体得率

掌叶木种子现采取培养用清洁剂及毛刷清洗油渍,超净工作台上用 75%酒精表面消毒 3~5 min,无菌水冲洗 3~5 次,再用次氯酸钠(10%)浸泡消毒了 15~20 min,无菌水清洗 4~5 次后去除假种皮接种,可以获得 85%左右的无菌活体。掌叶木外植体种子接种到添加诱导激素的培养基上培养 10 d 后,种子表面开始膨大形成肉眼可见的愈伤组织。

3.2. 愈伤组织诱导结果

在添加不同激素培养基的诱导处理下,愈伤组织的诱导结果具有明显差异性(表 2)。不同培养基诱导出愈伤组织的时间、颜色、生长情况、诱导率有明显不同。培养基中分别加入不同浓度的生长调节剂 2.4-D, IBA、 α -NAA,加入不同浓度细胞分裂素 6-BA,KT 对种子萌芽与生长有较大影响。从表 3 可看出, α -NAA 较 2.4-D 和 IBA 好,6-BA 较 KT 效果稍微好些。另外,通过实验发现,生长素含量均小于细胞分裂素含量有利于愈伤组织的诱导生长,总激素含量应在 1.5 mg/L 以下。通过筛选,6 号配方即 MS + 6-BA 1.0 mg/L + α -NAA 0.5 mg/L 较适合掌叶木愈伤组织的诱导。其诱导率为 92%,诱导期为 12 d。愈伤组织为黄绿色,生长状态最好。

Table 2. Effect of different hormone medium on callus induction

表 2. 不同激素培养基诱导愈伤组织结果

培养基	无菌活体数(块)	出愈数(块)	出愈时间	诱导率	颜色
1	50	40	12	80	黄绿
2	50	26	15	52	浅绿
3	50	45	13	90	绿
4	50	42	12	84	黄绿
5	50	28	15	56	浅绿
6	50	46	12	92	绿
7	50	29	15	58	黄绿
8	50	27	18	54	黄绿
9	50	30	14	60	黄绿
10	50	28	16	56	黄绿
11	50	26	20	52	黄绿
12	50	32	15	64	黄绿
13	50	20	18	40	黄绿

Continued

14	50	18	20	36	黄绿
15	50	28	17	56	黄绿
16	50	25	18	50	浅绿
17	50	22	18	44	浅绿
18	50	28	17	56	浅绿

3.3. 丛生芽诱导

将愈伤组织在无菌条件下剪切, 转接到不同激素配比的丛生芽诱导培养基中, 20 d 后愈伤组织上可见小芽点分化出来。30 d 后小芽点伸长成为丛生芽。掌叶木继代培养结果: 随着 6-BA 用量从 1~2.0 mg/L 逐渐增大, 丛芽生长情况逐渐变差, 甚至变黄, BA 用量应控制在 1.0 mg/L 以下。 α -NAA 用量从 1~2.0 mg/L 逐渐增大, 丛芽生长状态差, 故 NAA 用量宜在 1.0 mg/L 以下, 较适合丛芽增殖的培养基即: 1/2MS + 6-BA 0.5 mg/L + α -NAA 0.25 mg/L, 该配方可诱导产生生长状态良好、增值倍数为 3~4 的丛芽。

3.4. 玻璃化抑制的处理结果

丛芽继代培养产生易断、畸形、透明状、叶片易脱落等玻璃化苗, 严重影响了丛芽的质量和增值倍数。以 B5 培养基代替 MS 培养基, 将大量元素降为原用量的 1/2, 能有效地抑制愈伤组织的玻璃化, 生长可恢复正常。从表 3 可看出, 1.0 mg/L 2.4-D + 0.5 mg/L KT 利于愈伤组织玻璃化现象的改善。玻璃化逆转率与 KT 用量成负相关。各因素兼顾增值倍数与玻璃化逆转率的最佳水平组合为: 1/2 B5 + KT 0.5 mg/L + 2.4-D 1.0 mg/L。

Table 3. Effects of different KT concentrations on glassy treatment

表 3. 不同 KT 浓度抗玻璃化处理效果

培养基	玻璃化处理	玻璃化率	玻璃化等级
MS	KT 1 mg/L	60	+++
MS	KT 0.5 mg/L	55	+++
MS	KT 0.2 mg/L	70	++++
1/2 MS	KT 1 mg/L	70	++++
1/2 MS	KT 0.5 mg/L	80	++++
1/2 MS	KT 0.2 mg/L	75	++++
B5	KT 1 mg/L	22	++
B5	KT 0.5 mg/L	18	++
B5	KT 0.2 mg/L	20	++
1/2 B5	KT 1 mg/L	12	+
1/2 B5	KT 0.5 mg/L	8	+
1/2 B5	KT 0.2 mg/L	15	+

4. 结论

掌叶木作为国家一级保护植物, 目前已经成为濒危树种, 组织培养难度较大。通过大量试验, 结果表明, 6-BA 1.0 mg/L + α -NAA 0.5 mg/L 较适合掌叶木愈伤组织的诱导; 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.25 mg/L 较适合掌叶木愈伤组织的增值。KT 0.5 mg/L + 2.4-D 1.0 mg/L 利于愈伤组织玻璃化现象的改善。

基金项目

贵州省林业厅青年专项基金(黔林科合 J 字【2015】18 号)-掌叶木种子雨动态研究。

参考文献

- [1] 傅立国, 金鉴明. 中国植物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 590-591.
- [2] 贵州省林业厅. 贵州野生珍贵植物资源[M]. 北京: 中国林业科学出版社, 2000.
- [3] 熊志斌, 冉景丞, 谭成江. 濒危植物掌叶木种子生态特征[J]. 生态学报, 2003, 23(4): 820-825.
- [4] 张菁林, 林昌虎. 掌叶木异地引种保护研究[J]. 贵州科学, 2006, 24(4): 45-48.
- [5] 曹丽敏, 夏念和, 邓云飞. 掌叶木的花器官发生及其系统学意义[J]. 植物分类学报, 2006, 44(4): 393-400.
- [6] 常进雄, 杨龙, 黄威廉. 贵州南部掌叶木种群生态研究[J]. 贵州科学, 2002, 20(2): 1-15.
- [7] 李雪萍, 苗昌盛, 朱恩作, 等. 野生濒危掌叶木 SRAP-PCR 体系的建立与优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(9): 18-21.
- [8] 曹丽敏. 珍稀特有植物掌叶木的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(3): 1043-1045.
- [9] 黄仕训, 骆文华. 稀有植物掌叶木生物学习性及其保护[J]. 农村生态环境, 2001, 17(1): 21-23, 36.
- [10] 张著林, 邹天才, 何梅. 贵州掌叶木群落调查[J]. 贵州科学, 2000, 18(4): 288-293.
- [11] 谢川, 李晓雪, 郭松, 蒋玫帆, 李在留. 珍稀濒危植物掌叶木的研究动态[J]. 分子植物育种, 2020, 18(5): 355-360.
- [12] 李磊, 李雪萍, 郭松, 等. 掌叶木种子萌发过程中过氧化物酶和超氧化物歧化酶同工酶分析[J]. 北方园艺, 2014, 38(17): 102-105.
- [13] 邓伯龙, 石扬文, 陈波涛. 贵州生物质能源树种资源的开发利用[J]. 资源开发与市场, 2006, 22(3): 265-266.
- [14] 李在留, 郭松, 程晴, 等. 掌叶木种子的离体培养与玻璃化逆转研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 60-64.
- [15] 廖明, 朱忠荣, 韦小丽, 金天喜, 等. 珍稀树种伞花木组织培养技术研究[J]. 种子, 2005, 24(9): 9-11, 18.