

文章编号: 1001-1498(2003)04-0439-05

# 优良保健树大叶冬青组培扩繁的研究

刘根林, 李晓储, 梁珍海, 倪竞德, 李玉巧, 黄利斌

(江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153)

**摘要:** 以大叶冬青具节茎段芽体增殖产生试管苗, 适宜培养基为 MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA + 8.8  $\mu\text{mol}$  BA 或 MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA + 9.1  $\mu\text{mol}$  ZT; 幼叶外植体诱导的愈伤组织块转培于 WPM + 5.0  $\mu\text{mol}$  TDZ + 3.0  $\mu\text{mol}$  IAA 培养基上, 能产生较多不定芽苗(每一愈伤组织块平均产生 11.2 株); BA 对大叶冬青外植体不定芽的处理能产生较好的增殖系数与高生长; 试管苗适宜生根处理为 1/4MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA (或 + 1.0  $\mu\text{mol}$  IBA); 室外移栽成活率达 90%。

**关键词:** 大叶冬青; 组培扩繁; 具节茎段; 不定芽苗

**中图分类号:** S722.3<sup>+</sup>7      **文献标识码:** A

大叶冬青 (*Ilex latifolia* Thunb.) 属冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属 (*Ilex*) 常绿高大乔木, 是自然分布于我国长江以南地区的一种珍贵的观赏绿化树种。大叶冬青叶片含有多种药用成分, 具有很高的药理与保健作用, 是国内保健饮品——苦丁茶的主要原料。所以, 该树种具绿化、美化与保健等多种功能<sup>[1,2]</sup>。随着人民生活水平的提高, 人们对优质天然保健饮品——苦丁茶的需求量越来越大, 而该树种常规的播种育苗因种子深休眠, 一般发芽需 2 a 以上时间。扦插能生根, 但幼苗生长很慢。因此, 该树种传统育苗方法, 难以短期满足苗木市场的巨大需求。利用组织培养可以在短时期内获得大量的优良无性系植株。

有关冬青属植物的组织培养至今已有不少报道<sup>[3~10]</sup>, 但是, 由大叶冬青具节茎段诱导芽体发生、增殖和从叶外植体诱导愈伤组织继而产生不定芽苗以及大叶冬青试管苗扩繁、室外移栽等技术尚缺少较为完整的报道。本文特就大叶冬青组培扩繁技术研究进行了总结报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

材料来自浙江省金华市引进的大叶冬青幼树, 年龄 7 a, 树高 1 m, 胸径 2 cm。

### 1.2 培养条件与方法

1.2.1 大叶冬青具节茎段诱导芽体发生与增殖方法 接种培养基为 Andersson 的改良 MS 培养基<sup>[10]</sup>, 蔗糖 30 g·kg<sup>-1</sup>, 琼脂 6.5 g·kg<sup>-1</sup>, pH 值 5.4, 1.0 kg·cm<sup>-2</sup> 热压灭菌 18 min, 培养基中分别加入 1.6, 8.8, 11.0  $\mu\text{mol}$  BA; 0.8, 1.0, 1.3  $\mu\text{mol}$  NAA 和 4.5, 6.8, 9.1  $\mu\text{mol}$  ZT。外植体来自当

收稿日期: 2002-12-20

基金项目: 江苏省农业三项工程“优良观赏保健绿化树种大叶冬青资源引进扩繁与开发”项目 SX(2001-068) 及“国家天然林保育技术研究与示范”协作项目研究内容之一

作者简介: 刘根林(1963—), 男, 江苏姜堰人, 高级工程师。

年春发新枝具节茎段。每组接种 20 枚(每瓶 1 枚)。培养 40 d,观察并记录芽体发生、生长与增殖情况。培养室温度  $27 \pm 1$ ,光照强度 1 500 lx,每日光照时间 8 h。

1.2.2 不定芽苗再生方法 将腋芽外植体接种于 MS 培养基上培养 15 d 后长出的幼叶切成两半,接种于 WPM + TDZ + IAA 培养基上,激素浓度分别为 0.1,1.0,3.0 和 5.0  $\mu\text{mol}$ ,形成 16 种不同浓度配比的组合,暗处理 40 d,形成愈伤组织,再置于  $26 \pm 1$ ,4 000 lx 与日光照 16 h 条件下培养 40 d,诱导不定芽苗再生。观察、记录愈伤组织及不定芽苗的生长与增殖情况,并通过细胞分裂素 BA、TDZ、ZT、KT 与 2-ip(2-异戊烯基腺嘌呤),在 IAA 浓度为 5.0  $\mu\text{mol}$  时,了解不定芽苗的增殖与高生长。

1.2.3 试管苗生根处理方法 生根处理培养基为 1/4MS,在培养基中分别加入 0,0.25,0.50,0.75,1.0  $\mu\text{mol}$  NAA 或 0,0.25,0.50,0.75,1.0  $\mu\text{mol}$  IBA,在半透性膜袋式容器中培养诱导,观察并记录诱导生根情况。

1.2.4 室外移栽 将叶片舒展较好的具根小苗从瓶中取出,洗去根部粘着的琼脂后,移植至小型塑料杯(直径 5 cm)中,杯中培养基质分两层:下层(2/3)消毒处理过的松林土,上层(1/3)细河沙。培养温度  $25 \pm 1$ ,光照 1 500 lx,相对湿度 80%~85%。移栽后以 1/8MS 盐溶液每隔 3 d 喷浇 1 次。3 周后,将成活小苗移栽至瓦盆(直径 10 cm)内,炼苗 3 周后移入实验田地中。定期测定小苗生长情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 大叶冬青具节茎段芽体发生、生长及增殖

从表 1 可知,当接种培养基中加入 1.0  $\mu\text{mol}$  的 NAA 时,具节茎段上芽体发生率最高(89.3%);当培养基中另加入的 BA 浓度达 8.8  $\mu\text{mol}$  时,芽体发生率与芽体平均高度均表现得较好。如果培养基中另加入的为 9.1  $\mu\text{mol}$  ZT,芽体发生率最高,芽体平均高度较好,芽体增殖能力也最强。因此,MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA + 8.8  $\mu\text{mol}$  BA 或 MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA + 9.1  $\mu\text{mol}$  ZT 为比较适宜于大叶冬青具节茎段发生、生长与增殖的培养基。

### 2.2 不定芽苗的再生

形成的愈伤组织培养 40 d 后,不同处理培养物上分化出不定芽苗,这些芽苗没有根,因此可以断定它们属于器官发生而非体胚发生。由图 1 可知,TDZ 能促进不定芽苗的再生,5.0  $\mu\text{mol}$  的浓度比 3.0  $\mu\text{mol}$  的浓度更有效果。培养基为 WPM + 5.0  $\mu\text{mol}$  TDZ + 3.0  $\mu\text{mol}$  IAA 时,平均每一愈伤组织块再生芽苗的数量可达 11.2 株。在培养基 WPM + 5.0  $\mu\text{mol}$  TDZ + 5.0  $\mu\text{mol}$  IAA 中能再生芽苗的有效愈伤组织块占培养总数的百分比为最高,达 60%(见图 2)。上述结果与 1990 年 Al-Juboory<sup>[11]</sup>报道的培养在含 TDZ 与 NAA 培养基上的阿尔及利亚常春藤(*Hedera canariensis* L.)不定芽苗分化的情形大体相似。

表 1 不同激素浓度组合对大叶冬青具节茎段芽体发生、生长与增殖的影响

激素浓度/ $\mu\text{mol}$	芽体发生 率/ %	芽体平均 高度/ mm	丛生芽平均 数/ 个
NAA			
0.8	81.2a	—	—
1.0	89.3c	—	—
1.3	84.1b	—	—
NAA + BA			
1.0 + 1.6	90.4a	17.9a	4.1a
1.0 + 8.8	93.2b	21.1c	5.4b
1.0 + 11.0	93.1b	18.3b	6.2c
NAA + ZT			
1.0 + 4.5	91.1a	19.2a	5.1a
1.0 + 6.8	93.2b	21.3c	6.3b
1.0 + 9.1	95.5c	18.5b	7.9c

注:数据处理根据最小显著差数法进行,  $p = 0.05$ ;  $n = 20$ 。

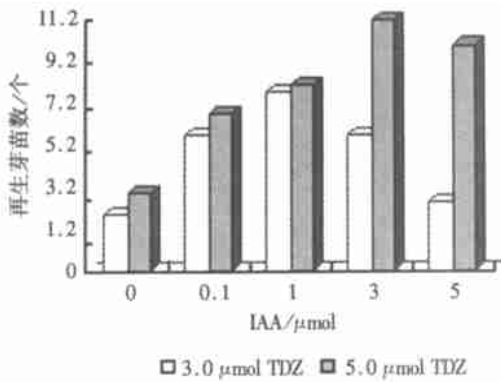


图 1 TDZ 与 IAA 对大叶冬青叶外植体愈伤组织再生不定芽苗数的影响

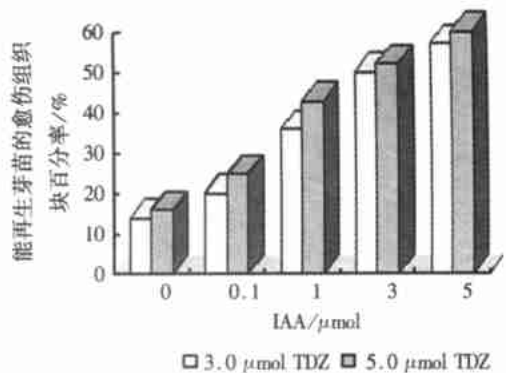


图 2 TDZ 与 IAA 对大叶冬青叶外植体有效愈伤组织块百分率的影响

细胞分裂素显著地影响着不定芽苗的增殖。如图 3 所示,BA、TDZ 和 ZT 比 KT 与 2-ip 更能提高不定芽苗的增殖系数,最大增殖系数都出现在 5 个激素浓度都为 15.0  $\mu\text{mol}$  时。而芽苗的高生长却随着 5 个相关激素浓度的增高而下降(图 4)。这说明细胞分裂素对芽苗的增殖与高生长作用存在着显著差异。BA、TDZ 与 ZT 处理的最大增殖系数分别为 3.7、6.0 和 7.4;在 BA 与 2-ip 浓度都为 3.0  $\mu\text{mol}$  时,芽苗高度为最大,分别为 34 mm 与 45 mm;而相同浓度下,KT、TDZ 和 ZT 处理的芽苗高度则仅为 19、13 和 10 mm。从图 3、4 中还可知,在 IAA 浓度一定(5.0  $\mu\text{mol}$ )时,高浓度的 BA(15.0  $\mu\text{mol}$ )处理,芽苗增殖系数高(3.7);低浓度的 BA(3.0  $\mu\text{mol}$ )处理,芽苗高生长较好(34 mm)。这表明,作为细胞分裂素的 BA 对大叶冬青叶外植体不定芽的处理,能够产生较好的增殖系数与高生长。

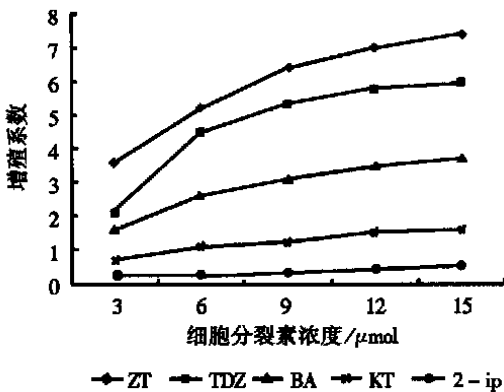


图 3 几种细胞分裂素对不定芽苗增殖的影响

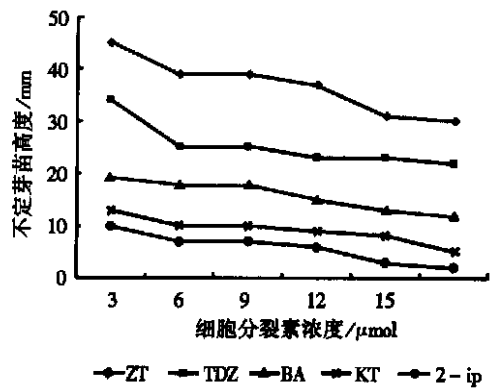


图 4 几种细胞分裂素对不定芽苗高生长的影响

### 2.3 试管苗生根处理

从表 2 可知,在大叶冬青试管苗诱导生根处理中,存在着显著差异。当 NAA 与 IBA 浓度最大(1.0  $\mu\text{mol}$ )时,出现了最多诱导根数、最短平均根长和最高生根率。此时最多诱导根数分别为每株 6.2 和 6.4 根,而对照未产生根系。

### 2.4 生根处理中袋培与瓶培培养基用量的比较

培养基的用量是工厂化育苗成本的一个重要组成部分,因此,减少培养基用量,提高培养基利用率,是降低生产成本的有效途径之一。

传统的生根诱导1次需装入近30 mL的培养基,我们改用半透性膜袋式容器,以培养沟的形式装入培养基,只需装10 mL就可达到瓶培装入30 mL所达到的高度,使培养基的利用率从22.85%提高到70.0%<sup>[12]</sup>。

表2 不同NAA或IBA浓度对试管苗生根的影响

项目	NAA/ $\mu\text{mol}$					IBA/ $\mu\text{mol}$				
	0	0.25	0.50	0.75	1.0	0	0.25	0.50	0.75	1.0
根数/(条株 <sup>-1</sup> )	0.0a	2.2b	3.7c	5.1d	6.2e	0.0a	2.9b	4.5c	5.3d	6.4e
平均根长/mm	0.0a	55d	50cd	45bc	37b	0.0a	47d	35cd	32bc	26b
生根率/%	0.0a	45b	70c	100d	100d	0.0a	50b	80c	100d	100d

注:表中数据处理根据最小显著差数法进行, $p = 0.05$ ;  $n = 20$ 。

## 2.5 室内组培扩繁

通过上述大叶冬青具节茎段新芽发生、生长与增殖法和以幼叶外植体诱导愈伤组织继而再生不定芽苗法,再进行继代培养,培养1个月,获得的继代培养平均增殖系数为6.0。通过1年多的组培及其扩繁,计生产出试管苗30 000株,为室外批量移栽提供了基础。

## 2.6 组培苗田间移栽效果

经移栽试验,室外移栽的10 000株试管苗有90%陆续木质化成活,生长良好。进入大田,其无性系苗性状稳定。6个月时,苗高生长达5.3 cm。

## 3 小结

(1) 以大叶冬青具节茎段芽体增殖产生试管苗,适宜培养基为MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA + 8.8  $\mu\text{mol}$  BA 或 MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA + 9.1  $\mu\text{mol}$  ZT,后者因玉米素(ZT)昂贵,难为生产应用。

(2) 幼叶外植体诱导的愈伤组织块转培于WPM + 5.0  $\mu\text{mol}$  TDZ + 3.0  $\mu\text{mol}$  IAA 培养基上,能产生较多不定芽苗(每一愈伤组织块平均产生11.2株);BA对大叶冬青外植体不定芽的处理能产生较好的增殖系数与高生长。

(3) 试管苗适宜生根处理为1/4MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA(或+1.0  $\mu\text{mol}$  IBA)。

(4) 半透性膜袋式容器内诱导生根比瓶装培养器提高了47.15%。

## 参考文献:

- [1] 刘勇,刘贤旺,胡小芬.红果冬青属药用植物资源及其利用[J].江西林业科技,1997(6):23~25
- [2] 文永新,陈秀珍,金静兰,等.苦丁茶化学成分的研究[J].广西植物,1990,10(4):364~367
- [3] Rey H Y, Burtnik O J, Sansberro P A, et al. Culture media for the *in vitro* establishment of explants of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) [J]. Turrialba, 1990, 41(3):306~310
- [4] Ferreira A G, Cunha G G, Silveira T S, et al. *In vitro* germination of immature embryos of *Ilex paraguariensis* St. Hill [J]. Phytom, 1991, 52(1):27~32
- [5] Morte M A, Olmos E S, Hellin E, et al. Micropropagation of holly (*Ilex aquifolium*) [J]. Acta Horticulturae, 1991, 289:139~140
- [6] Rey H Y, Mroginski L A. Regeneration of plants of mate (*Ilex paraguariensis*) by *in vitro* culture of shoot tips and nodal segments [J]. Phytom, 1998, 48(1-2):139~145
- [7] Hu C Y, Ochs J D, Mancini F M. Further observations on *Ilex* embryoid production [J]. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie, 1978, 89(1):41~49
- [8] Hu C Y. Advances in *Ilex* embryo culture [A]. In: Proceedings of the 54<sup>th</sup> meeting of the Holly Society of America [C]. 1977. 5~6

- [9] 王桂文,周兴,李海鹰,等.苦丁茶冬青茎段离体培养[J].植物生理学通讯,1995,31(5):358~359
- [10] 刘根林,蒋泽平,刘泽东,等.苦丁茶的组织培养研究[J].江苏林业科技,1991,26(1):40~42
- [11] Al - Juboory K H, Greenhouse laser radiation , *in vitro* culture studies on the growth and propagation of Algerian ivy ( *Hedera canariensis* L. ) [D]Univ of Illinois. Urbana. IL. USA. 179
- [12] 仲磊,梁珍海,朱军,等.红掌袋式与瓶式组织培养生产性指标比较试验[J].江苏林业科技,2002,29(3):25~27

## Techniques of Tissue Culture and *in vitro* Clonal Propagation of *Ilex latifolia*

LIU Gen-lin, LI Xiaochu, LIANG Zher-hai, NI Jing-de, LI Yur-qiao, HUANG Li-bin  
(Jiangsu Forestry Academy, Nanjing 211153, Jiangsu, China)

**Abstract :** The optimum medium for *in vitro* growth and multiplication of *Ilex latifolia* from nodal segments was MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA + 8.8  $\mu\text{mol}$  BA or MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA + 9.1  $\mu\text{mol}$  ZT. When calli resulted from cultured young leaves were transferred to WPM supplemented with 5.0  $\mu\text{mol}$  TDZ and 3.0  $\mu\text{mol}$  IAA, the most of adventitious shoots (11.2 per callus) formed. And BA was suitable for the multiplication and height growth of adventitious shoots. 1/4 MS + 1.0  $\mu\text{mol}$  NAA (or + 1.0  $\mu\text{mol}$  IBA) optimized the rooting of shoots. And the plantlets got acclimatized well, with the survival up to 90%.

**Keywords :** *Ilex latifolia*; clonal propagation; nodal segment; adventitious shoot

---

### 本刊加入“万方数据(China Info)数字化期刊群”的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,我刊现已入网“万方数据(China Info)——数字化期刊群”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入“万方数据(China Info)——数字化期刊群”,提供信息服务。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。作者著作权使用费与本刊稿费一次性给付,不再另付。

《林业科学研究》编辑部  
2003年6月