

橄榄胚组织培养的初步研究

Study of the Tissue Culture of *Canarium album* Raeusch

蔡汉权

Cai Hanquan

(韩山师范学院生物系 广东潮州 521041)

(Biology Dept., Hanshan Teacher's College, Chaozhou, Guangdong, 521041, China)

摘要 用橄榄胚作为橄榄组织培养的外植体,诱导胚长成无菌苗,截取成熟芽苗用于诱导侧芽及生根,筛选出MS+6-BA_{0.5}+IBA_{0.5}和MS+NAA₁为侧芽诱导和生根培养的有效培养基,取得90%的侧芽诱导率和80%的生根率,为利用植物无性系快速繁殖技术繁育橄榄苗奠定基础。

关键词 橄榄 胚 组织培养 诱导侧芽 生根

中图法分类号 Q813.1

Abstract The embryo of olive is used as explant in the tissue culture of olive, induced the embryo to grow up to be aseptis shoots, then cut the mature shoots for the inducement of lateral bud and radication, screened out MS+6-BA_{0.5} and MS+NAA₁ as the effective substrate of lateral bud abduction and radication cultivating, and acquired lateral bud abduction rate which was up to 90% and radication rate 80%. This established the base of using plant clone to propagate technic-breeding olive seedling rapidly. This kind of method is useful for some kind of woody plant which is difficult to be cultivated and some economic plants that contain higher alkaloids. It is a tissue culture example of this kind of plant.

Key words olive, embryo, tissue culture, sprouting of lateral bud, rooting

橄榄 (*Canarium album* Raeusch.) 属于橄榄科橄榄属, 是产于亚热带的一种果树, 分布于我国东南沿海一带。可鲜食, 也可加工制成各种风味佳美的蜜饯, 而且还有较高的药用价值和保健功效, 具清热解毒, 利咽喉等功效^[1]。由于橄榄树体高大, 幼龄期长, 且具有很强的顶端优势, 侧芽长期受到抑制, 侧芽萌发较慢, 在不修剪的自然情况下, 34a 生树只有 23 级分枝, 67a 生树只有 34 级分枝^[2], 且缺乏遗传背景研究资料, 常规育种周期长且复杂, 常遇到很大困难^[3]。橄榄芽的生物碱含量很高, 多年来我们尝试通过顶芽、侧芽或幼叶来进行组织培养, 但在无菌培养物建立的过程中极易被氧化引起褐变, 该方法的成功率几乎等于零。本研究将离体橄榄胚在无菌条件下培养成无菌幼苗, 以无菌幼苗为材料, 摘除顶芽, 剪成约 1cm 长的带节茎段, 接种于含有不同浓度的细胞分裂素(6-BA)及生长素(IBA)的MS 固体培养基中进行培养, 得到诱导侧芽, 再将侧芽用于生根实验, 培育出完整的试管苗。本研究集离体胚培养和组织培养于一

体, 是目前国内首次报道的成功培育橄榄试管苗新方法。

1 材料与方法

1.1 无菌材料的获得

取橄榄树上花后 7080d 的新鲜橄榄, 剥去果肉取果核(果肉一定要去除干净), 用洗衣粉水刷洗果核, 再用自来水冲洗干净, 然后在超净工作台上用 10% 的次氯酸钙上清液消毒 810 min, 用无菌水冲洗 35 次, 转入 0.1% 的升汞溶液中消毒 35 min, 然后用无菌水冲洗 58 次。经上述消毒后, 在超净工作台上用无菌石臼将果核敲破, 取其胚, 将离体胚接种于 6-BA_{0.5} mg/L+IBA_{1.0} mg/L 的 MS 培养基上, 培养 1 周后子叶开始变绿, 4 周后长成 34cm 高, 带有 46 片叶片的无菌橄榄幼苗。以此幼苗作为本实验的无菌材料。

1.2 侧芽的诱导方法

在无菌条件下, 将橄榄幼苗摘除顶芽, 剪成约 1cm 长的带节茎段(与根相连的下胚轴也作为外植体)分别接种于培养基(1)MS+6-BA_{0.5}+IBA_{1.0}; (2)

MS+6-BA_{0.5}+IBA_{0.5}; (3)MS+6-BA_{1.0}+IBA_{0.1}中进行培养。上述培养基的蔗糖浓度为30g/L,琼脂浓度为9.5g/L,pH值为5.66.0。培养条件:温度2325℃,每天光照12h,光照强度为2000Lx。

1.3 芽的继代培养方法

将生长到34cm长,带56个芽节的侧芽摘除顶芽,剪取带34个芽节的茎段接种到培养基(2)MS+6-BA_{0.5}+IBA_{0.5}上进行继代培养。剩下的12个芽节仍留于原株上,并将原株转入同一培养基上继续培养,以获得更多的丛生芽。培养条件同上。

1.4 生根培养方法

切取12cm高的健壮芽苗,分别接种于(4)MS+NAA_{0.1}; (5)MS+NAA_{0.5}; (6)MS+NAA₁; (7)MS+NAA₂; (8)MS+IBA_{0.1}; (9)MS+IBA_{0.5}; (10)MS+IBA₁培养基上,培养条件同上。以期比较NAA、IBA单因子对生根培养的作用。

2 结果与分析

2.1 侧芽的诱导

橄榄带节茎段在培养69d后,侧芽萌动,4周后侧芽生长到0.53cm高,此时,侧芽诱导及生长情况见表1。

从表1可知,在培养基(1)中培养侧芽萌发个数少,芽殖率低,芽萌发后极少生长;在培养基(2)中,侧芽的萌发率达90%,芽殖率较高,虽然部分侧芽较慢萌发,但侧芽萌发后生长较快,80%的侧芽长出新叶片;在培养基(3)中侧芽诱导率高,芽殖率高,萌发后侧芽为0.52cm,30%的侧芽长出新叶片。由于橄榄具有很强的顶端优势,侧芽不易萌发,细胞分裂素(6-BA)是侧芽萌发的诱导因子,生长素(IBA)是侧芽生

Table 1 Inducing sprouting and growing condition of lateral bud of *Canarium album* Raeusch

培养基编号 No. of substrate	激素 Homone(mg/L)		接种个数 Number of inoculation	侧芽萌发个数 Number of sprouting of lateral bud	芽殖率 Proliferation times	侧芽生长情况 Growing condition of lateral bud
	6-BA	IBA				
(1)	0.5	1.0	20	8	2	在接种79d后侧芽萌动,但只有一个侧芽生长至3cm,其余的侧芽只萌动不生长。 After 79 days the lateral buds are sprouting, but only one has grown 3 cm, the others sprout but don't grow.
(2)	0.5	0.5	20	16	24	在接种69d后侧芽萌动,4周后侧芽生长为约0.63cm,芽萌发需要的时间较长,但萌发后芽体生长较快,80%的侧芽长出新叶片。 After 69 days the lateral buds are sprouting, and growing up 0.63 cm after 4 weeks. They need long time to sprout, but the buds grow quick, and 80% of them grow new leaves.
(3)	1.0	0.1	20	18	24	在接种67d后侧芽萌动,4周后芽生长为0.52cm,30%的侧芽长出新叶片。 After 67 days the lateral buds are sprouting, and growing up 0.52 cm after 4 weeks, and 30% of them grow new leaves.

的效果好,在不同的浓度范围内生根诱导率都较低,

长的促进因子。适当浓度的细胞分裂素和生长素有效地诱导了侧芽萌发。侧芽的生长情况见图1。

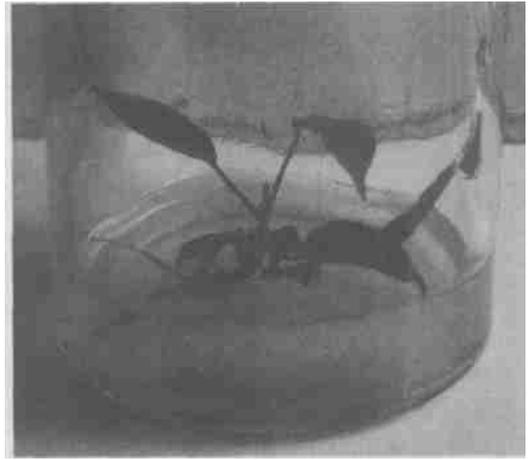


图1 橄榄侧芽生长情况

Fig. 1 Developing condition of lateral bud of olive

2.2 继代培养结果

带34个芽节的茎段继代培养约1周后可见芽节处长出芽点,34周后各芽点萌发为新的侧芽,芽殖率为24倍,侧芽生长良好。而原株上带有多个芽节,有的可达到6倍的芽殖率,但侧芽生长则相对较弱。芽殖率不稳定,以23倍较为多见。

2.3 生根培养结果

芽苗在生根培养基上接种56d后基端开始膨大,切口愈合,9d后个别苗开始有根长出,再培养7d的生根情况见表2。

从表2可以看出,单因子中NAA对橄榄茎段的生根诱导影响较为明显,其浓度范围为0.5mg/L,太低或太高浓度的NAA对橄榄芽苗生根的作用不是很理想;培养16d后根系生长健壮,部分根长出根毛和侧根。IBA对橄榄芽苗的生根作用不如NAA

根系的生长也不理想。芽苗的生根情况见图2。

表 2 生根培养结果

Table 2 Result of rooting

培养基编号 No. of substrate	接种茎数 Numbers of inoculate bottles	生根茎数 Numbers of rooting	根的平均长度 Average length of roots (cm)	平均根数 Average Numbers of roots	生根率 Rates of rooting (%)
(4)	23	2	0.7	2	10
(5)	25	12	0.8	3	48
(6)	25	20	3.8	5	80
(7)	25	3	0.8	3	12
(8)	10	0	0	0	0
(9)	10	0	0	0	0
(10)	10	1	0.3	2	10



图 2 橄榄芽苗生根情况

Fig. 2 Radication condition of olive

3 小结

3.1 侧芽的诱导与继代培养

实验结果表明,对橄榄侧芽诱导和芽继代培养的有效培养基是 MS + 6-BA_{0.5} + IBA_{0.5}。实验中摘除顶

芽有助于去除橄榄的顶端优势,利于诱导侧芽萌发。另外,取材期橄榄胚的发育情况与芽诱导的关系有待进一步研究。

继代培养中芽殖率不稳定,为 25 倍。这与所采用茎段的生理状态有关,从胚苗上直接切下的茎段,保留了胚苗上较多的内源激素,芽殖率较低。而经过 34 次继代培养,茎段中含较高的细胞分裂素,其芽殖率则较高。多次继代后芽殖率是否减腿,尚未证实。

3.2 生根培养

本次实验的结果表明,生根培养的有效培养基是 MS + NAA₁,但生根率只有 80%,能否通过调节 MS 培养基的无机盐浓度以及 NAA、IBA 复合因子来提高生根率,有待进一步研究。

3.3 应用前景

橄榄常规繁殖的育苗过程复杂,繁殖系数低,速度慢,周期长^[2]。本次试验的橄榄组织培养快速繁殖新方法,可应用于快速繁殖苗木,对橄榄优良品种在短期内迅速推广有一定的应用意义。

橄榄为多年生乔木,树体高,树冠大,果实难于采摘。应用本次试验的橄榄组织培养快速繁殖的新方法,可以通过诱导侧芽来培育多分枝的苗木,为矮化橄榄品种提供可行途径。

参考文献

- 徐国钧主编. 中草药彩色图谱. 福州: 福建科学技术出版社, 1990. 428.
- 许长同, 余德生, 赖澄清编著. 橄榄栽培. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- 韦晓霞, 宋瑞琳. 橄榄胚性愈伤组织的诱导初探. 福建果树, 2000, (4): 911.

(责任编辑: 邓大玉 韦廷宗)

我国完成 SARS 灭活疫苗 I 期临床试验

科技部、卫生部、国家食品药品监督管理局联合宣布:我国自主研发的 SARS 灭活疫苗 I 期临床试验已经顺利完成,取得了阶段性重大进展,标志着 SARS 疫苗研究的难关已基本攻克,不仅为进一步研究创造了条件,而且具备了在紧急状态下用来保护高危人群的潜力。这是我国 SARS 科技攻关取得的一项标志性重大成果,也是世界上第一个完成 I 期临床试验的 SARS 疫苗。

据项目负责人尹卫东介绍,我国 SARS 病毒灭活疫苗是世界上首个进入临床试验的,试验完全按照国际规范程序进行,严格做到了知情同意、伦理审查、随机双盲等规范化要求。I 期临床试验的主要目的是评价疫苗的安全性,并得出初步免疫原性。同时,建立疫苗生产工艺和质量控制方法,完成疫苗中试生产研究,具备疫苗小批量生产的技术能力。

据了解,SARS 灭活疫苗 I 期临床试验完成,并经科学评估后,将确定进一步研究方案,对其有效性、安全性以及使用剂量等进行深入研究。原则上,该疫苗只有全部完成了 I 期、II 期、III 期临床试验后才能商业化应用,但在发生 SARS 疫情的情况下,经有关部门批准,现在的疫苗也可用于对高危人群进行免疫保护。

据《科学时报》