

乐东拟单性木兰组培再生系统的建立

邓小梅^{1,2}, 奚如春^{1,2}, 符树根²

(1. 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642; 2. 江西省林业科学院 生物技术研究所, 江西 南昌 330032)

摘要:以成年树嫩枝为外植体建立了乐东拟单性木兰的组培再生系统。试验筛选 MS 为基本培养基, 较好增殖培养基为: MS + 6BA 0.2 mg/L + IBA 0.05 mg/L; 光照强度控制在 1 000 lx 左右; 继代周期以 4 周为宜, 继代 8 次以后可进入快速、稳定增殖阶段, 增殖系数可达 3.5 以上。1.5 ~ 2 cm 不定芽放入 MS + IBA 1 ~ 3 mg/L 的根诱导培养基中培养 15 d 后, 转入不加任何激素的 1/2 MS 根形成培养基中, 12 d 左右可出根。

关键词:乐东拟单性木兰; 组织培养

中图分类号: S723.1 文献标识码: A

Establishment of Highly Efficient Regeneration System of *Parakmeria lotungensis*. Chun et C. Tsoong Law

DENG Xiao - mei^{1,2}, XI Ru - Chun^{1,2}, FU Shu - gen²

(1. College of Forestry, SCAU, Guangzhou 510642, China; 2. Biotechnology Research Institute, Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, China)

Abstract: For the first time, the regeneration system of tissue culture of *Parakmeria lotungensis* (Chun et C. Tsoong) Law was established by utilizing its twigs from the mature tree as explants. MS was more effective than other materials as basic medium in the whole experiment. The best medium of proliferation was MS + 6 - BA 0.2 mg/L + IBA 0.05 mg/L, illumination intensity 1 000 lx, subcultures interval was 4 weeks. After sub cultured for 8 times, the proliferation was fast and stable, multiplication rate was 3.5. The buds 1.5 - 2 cm long were planted into the root - induced medium (MS + IBA 1 ~ 3.0 mg/L), after 15 d under darkness, the buds were transferred into the root - formation medium (1/2 MS) without any hormone, rooting started at about 12 days.

Key words: *Parakmeria lotungensis* (Chun et C. Tsoong) Law; tissue culture

乐东拟单性木兰 [*Parakmeria lotungensis* (Chun et C. Tsoong) Law], 属木兰科单属种, 为现行推广的十大优良园林树种之一。常绿乔木, 高达 30 m, 胸径可达 1 m 以上, 树干通直圆满, 枝叶浓密, 树形优美。其叶厚常年浓绿, 倒卵状椭圆形, 阳光下油光发亮; 春天, 深红嫩叶矗立于老叶丛中, 十分醒目; 初夏, 白花盛开, 布满枝头, 清香宜人; 秋天, 红色浆果直立于小枝顶梢, 似一只只火炬点缀在绿叶丛中。它是集观叶、观花、观果于一体的珍贵绿化树种, 具有极高的园林观赏价值。其木材坚重, 纹理致密, 材质优良, 又是优良的速生用材树种。乐东拟单性木兰与同科木兰属中的黄山木兰、紫玉兰相似, 具有良好的药用价值^[1]。现乐东拟单性木兰的苗木需求量大。本研究利用植物组织培养技术, 以成年大树嫩枝为外植体, 建立乐东拟单性木兰的高效、稳定离体繁殖体系, 解决乐东拟单性木兰种质资源保护与苗木市场供需矛盾, 为乐东拟单性木兰的可持续利用提供技术支持。

收稿日期: 2006 - 06 - 15 修回日期: 2006 - 12 - 25

基金项目: 江西省重点科技攻关项目 (200110100801) 与宁波市重点科技计划项目 (2003C10025)

作者简介: 邓小梅 (1966 -) 女, 博士, 研究员, 主要从事植物生物技术与植物资源开发利用研究, E - mail: dxmei1966@126.com.

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究以乐东拟单性木兰(*P. lotungensis*)成年树带芽茎段为外植体。

1.2 方 法

为筛选合适的取材时间及适宜的灭菌时间,分别于10月上旬、1月下旬、4月中旬、7月中旬取芽,用 $\varphi = 75\%$ 的酒精浸泡30~60 s,之后用(质量分数,%)0.1%升汞灭菌3~15 min后接种于诱导培养基上,每瓶接种一个外植体^[2]。接种好的试验材料置于温度为23~27℃,光照强度1 000~1 500 lx,光照时间12 h/d的条件下进行培养。

1.3 丛芽增殖

在诱导培养基上接种外植体,待萌发的不定芽长至1~2 cm时,将其切下转移到增殖培养基上,重复继代,进行丛芽的增殖培养。通过基本培养基的筛选、激素种类及质量浓度的配比、光照强度等的调控,提高增殖系数及有效芽率。考虑到木兰科植物酚性物质比较多,为降低因为褐化导致的影响,同时兼顾增殖效果和苗的生长,增殖培养基上的材料分别2周、3周、4周、5周、6周继代1次,以筛选出合适的继代周期^[3]。

1.4 生根培养

在继代过程中选择芽丛中发育完整、长度大于1.2 cm的不定芽进行生根培养。

2 结果与分析

2.1 不同取材时间对进瓶诱导的影响

从表1的试验结果分析可以看出:不同的取材时间对外植体的接种效果有一定的影响。在4个取材时间中,10月上旬取材的外植体接种污染率、褐化/死亡率均为最低,接种成活率最高,达63%;1月份取材的外植体接种成活率明显下降,仅为

表1 不同取材时间对乐东拟单性木兰外植体接种效果的影响

Tab.1 Effect of explants in different period on inoculating results of *P. lotungensis*

外植体取材时间	10月上旬	1月中旬	3月下旬~4月上旬	7月中旬
接种芽数/个	100	100	150	150
污染芽数/个	22	32	58	78
污染率/%	22	32	38.67	52
褐化/死亡芽数/个	15	29	21	28
褐化/死亡率/%	15	29	14	18.67
存活芽数/个	63	39	84	44
存活率/%	63	39	47.33	29.33

39%。这可能是因为乐东拟单性木兰的芽正处于越冬休眠时期,生长势弱,外植体老,诱导期长,褐化/死亡率及污染率高;4月份,芽开始萌动展叶,体内汁液开始流动,各种内生菌也开始活动,外植体表面灭菌时易伤害芽,给表面灭菌带来困难,但此时生长迅速,接种成活率较1月中旬取材有所提高,达47.33%;7月份,由于南方气温高、湿度大,各种菌也进入活动旺盛期,接种污染率高达52%,褐化/死亡率达18.67%,接种成活率最低,仅为29.33%。

2.2 不同基本培养基对芽分化的影响

试验结果如图1所示,乐东拟单性木兰在不同的基本培养基的增殖效果不一样,MS培养基增殖系数最大,芽生长快,嫩绿,有效芽多,明显优于其他处理好号。MB、M_{*}号

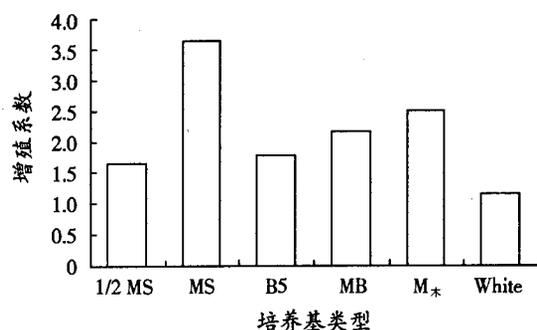


图1 不同基本培养基种类对乐东拟单性木兰分化的影响

Fig.1 Effect of various basic medium on propagation culture of *P. lotungensis*

培养基上芽生长正常,但增殖系数低于 MS;1/2 MS、B5、White 号培养基上增殖系数小,尤其 White 号培养基几乎无增殖,并出现褐化、芽枯黄死亡现象。

2.3 几种激素对比对芽分化的影响

表 2 的试验结果表明,乐东拟单性木兰在含有低浓度的激素水平的培养基上,芽生长快,叶片舒展嫩绿,茎伸长较好,增殖系数高,有效芽也多。而在高浓度激素的培养基上,苗生长表现出叶片肥大脆化、有些玻化,基部褐化严重,影响芽的生长,有的甚至出现畸形,有效芽少。如分裂素在只添加 6-BA 的 1、5、9、13 号培养基上,其 6-BA 的质量浓度从 0.2 mg/L 上升至 1.0 mg/L 时,增殖系数则 1 号培养基上的从 3.52 下降为 9 号培养基上的 1.65,有效芽从 2.01 个减少至 0.60 个。当 6-BA 的质量浓度从 9 号的 1.0 mg/L 上升至 13 号的 2.0 mg/L 时,增殖系数和有效芽变化不大,但当 6-BA 的质量浓度继续升高到 5.0 mg/L,则几乎无增殖,且出现芽枯黄。

表 2 不同激素种类对乐东拟单性木兰增殖培养的影响

Tab.2 Effect of various hormones and levels on Propagation culture of *P. lotungensis*

处理	6-BA	KT	IBA	增殖系数	有效芽数	苗生长情况
1	0.2	0.0	0.05	3.52	2.01	叶片舒展嫩绿,茎伸长较好
2	0.2	0.2	0.1	2.28	1.65	叶片肥大脆化,有些玻化;褐化严重
3	0.2	0.5	0.2	1.76	1.45	叶片有些黄化、肥大,基部有褐化
4	0.2	1.0	0.5	1.60	1.43	胞叶较脆、大量脱落
5	0.5	0.0	0.1	2.53	1.92	长势较好
6	0.5	0.2	0.05	1.78	1.17	叶片有些脆化
7	0.5	0.5	0.5	1.62	1.00	芽小,苗伸长差,有效苗少
8	0.5	1.0	0.2	1.51	1.00	芽小,苗伸长差,有效苗少
9	1.0	0.0	0.2	1.65	0.60	芽伸展不好,有畸形,叶片肥大,水渍化
10	1.0	0.2	0.5	1.56	0.50	芽膨大,叶脆
11	1.0	0.5	0.05	1.62	0.57	叶片肥厚,水渍化带皱缩
12	1.0	1.0	0.1	1.52	0.63	芽玻化严重
13	2.0	0.0	0.5	1.60	0.63	芽肥大,叶卷展开少
14	2.0	0.2	0.2	1.52	0.40	芽肥大,叶卷展开少
15	2.0	0.5	0.1	1.12	0.50	叶厚、脆,几乎无增殖,褐化严重
16	2.0	1.0	0.05	1.22	0.40	芽膨大,叶厚而脆

注:激素质量浓度单位为:mg/L;有效芽为:芽高>0.5 cm。

表 2 结果还表明,分裂素 6-BA 比 KT 有利于增殖培养,在含有分裂素 6-BA 的培养基上添加 KT 非但没有起到促进增殖的作用,而是加重了褐化和玻化的发生,增殖系数明显降低,有效芽减少。如添加有 0.2 mg/L 6-BA 的 1-4 号培养基,KT 质量浓度由 0 上升为 1.0 mg/L,其增殖系数则从 3.50 下降为 1.64,有效芽从 2.01 个减少至 1.43 个。

2.4 不同糖质量浓度对乐东拟单性木兰增殖培养的影响

表 3 不同糖浓度对乐东拟单性木兰增殖培养的影响

Tab.3 Effect of various levels of sugar on Propagation of *P. lotungensis*

处理	糖质量浓度/g·L ⁻¹	增殖系数	有效芽数(高>0.5cm)	苗生长情况
1	10	1.25	0.2	芽伸长慢,叶肥大卷曲叶色淡
2	20	1.75	0.9	叶色稍转绿,但叶脉色深
3	30	3.50	1.95	苗生长嫩绿、伸长快有效芽增多
4	40	2.35	1.80	芽粗大,茎杆淡紫红色,苗较老
5	50	2.0	1.90	芽大、高,茎杆深紫

糖作为组培过程中的碳源和能量物质,同时糖对保持培养基的渗透压也有重要的作用,从而影响组培苗的增殖及生长。表 3 的结果表明,在低浓度即处理 1、2 号培养基上,乐东拟单性木兰表现为增殖系数小,叶色淡,芽伸长慢,有效芽少;而在高浓度即处理 4、5 号培养增殖培养,增殖系数较 1、2 号大,芽大,粗壮,茎干淡紫红色,芽老;处理 3 芽生长嫩绿率、伸长快,增殖系数大,有效芽多。

2.5 光照强度对增殖率的影响

试验过程发现,光照强度在 500 ~ 1 000 lx 范围内,乐东拟单性木兰增殖系数随着光照强度的增大而提高,由 1.82 增致 3.08;高于 1 000 lx 则相反,增殖系数随着光照强度的增大而降低,由 1 000 lx 时的 3.08 降致 2 500 lx 时的 1.29,褐化也愈加严重,增殖苗伸长减少;若光照强度低于 750 lx,芽伸长加大,纤细,增殖系数降低,有效芽少。说明光照强度在 750 ~ 1 000 lx 适宜乐东拟单性木兰瓶苗增殖培养。

2.6 继代周期、继代次数对增殖培养的影响

试验结果表明,乐东拟单性木兰诱导培养速度较快,但进入增殖阶段所需时间很长。表现在第 1 ~ 5 次继代培养,芽生长很慢,叶腋处有时有单个腋芽发生,增殖系数在 1 ~ 1.5 之间;第 7 次继代开始,叶腋处开始有多个腋芽产生,增殖系数明显提高;9 次继代以后进入稳定增殖阶段,增殖系数可达 3.5 以上,此时,芽嫩绿,生长健壮,有效芽提高。

不同的继代周期对乐东拟单性木兰的增殖和生长也有较大的影响。继代周期为 4 ~ 5 周比较合适,瓶苗表现嫩绿,生长健壮,增殖系数大;若继代周期为 2 ~ 3 周,工作量大,也不利于芽的增殖生长。超过 5 周,则芽生长势逐渐减弱,细长,包叶大量脱落,基部褐化严重。

表 4 继代周期和继代次数对乐东拟单性木兰增殖培养的影响

Tab. 4 Effect of different subcultural intervals and times on Propagation culture of *P. lotungensis*

继代周期	继代次数							平均
	1	3	5	7	8	9	10	
2	1.03*	1.17	1.25	1.32	1.38	1.37	1.40	1.27
3	1.13	1.48	1.52	1.73	2.03	2.12	2.10	1.73
4	1.22	1.55	1.58	2.28	2.87	3.43	3.42	2.34
5	1.20	1.52	1.48	2.03	2.83	3.33	3.25	2.23
6	1.07	1.30	1.33	1.63	1.72	1.90	1.88	1.55
平均值	1.13	1.40	1.43	1.80	2.17	2.43	2.41	1.83

注: * 为增殖系数。

2.7 生根培养

当增殖达到一定数量后,将长度大于 1.5 cm 的健壮芽转入生根诱导培养基。根据文献资料已知,木兰科植物扦插繁殖较难^[3],组培过程中生根更困难。在乐东拟单性木兰的增殖培养发现,光照强度、激素浓度、培养周期均会不同程度导致材料的褐化,并影响瓶苗的生长。综合考虑多个因子,本试验采用二步生根法进行发根研究:即将用于生根的不定芽放入 MS 附加不同质量浓度 IBA 的根诱导培养基中进行诱导培养,一段时间后转入不加任何激素的 1/2 MS 根形成培养基中培养。试验结果表明 1.5 ~ 2 cm 不定芽放入 MS + IBA 1 ~ 3 g/L 的根诱导培养基中培养 15 d 后,转入不加任何激素的 1/2 MS 根形成培养基中,12 d 左右可出根。生根率最高可达 70%。

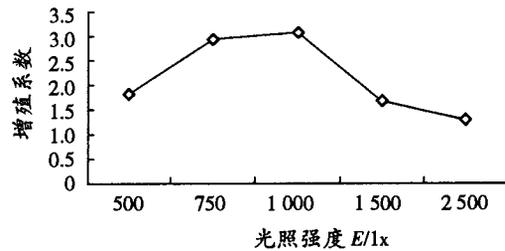


图 2 光照强度对乐东拟单性木兰增殖培养的影响

Fig. 2 Effect of various illuminance on Propagation culture of *P. lotungensis*

3 结论与讨论

(1) 10 月上旬采取嫩枝作外植体, 采取合适的灭菌时间有利于降低褐化和污染率, 提高诱导率。

(2) 试验筛选 MS 为基本培养基, 最优增殖培养基为: MS + 6BA 0.2 g/L + IB 0.05 g/L; 光照强度控制在 1 000 lx 左右; 继代周期以 4 周为宜。增殖系数可达 3.5 以上。

(3) 分化出的不定芽放入 MS + IBA 1 ~ 3 g/L 根诱导培养基中培养 15 d 后, 转入不加任何激素的 1/2 MS 根形成培养基中, 12 d 左右可出根。

(4) 乐东拟单性木兰瓶苗进入稳定增殖阶段, 其增殖系数可达 3.5 以上, 但增殖芽伸长生长慢, 能用于生根的有效芽相对较少, 离组织生产开发还有距离。如何优化培养条件促进增殖芽的迅速伸长, 将是今后研究的重点之一。

乐东拟单性木兰试管苗生根比较困难, 调整培养条件, 提高出根率也是今后研究的重点。

参考文献:

- [1] 唐永强. 乐东拟单性木兰育苗技术[J]. 江苏林业科技, 2001: 37 - 38.
 [2] 邓小梅, 王明麻, 黄敏仁, 香花槐组织培养及工厂化快繁技术研究[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(1): 69 - 72.
 [3] 袁巧平, 董茂山. 离体条件下核桃的器官发生和体细胞胚胎发生[J]. 林业科学, 1990, 26(6): 495 - 499.

(上接第 193 页)

- [2] 梁光红, 陈家骅, 杨建全, 等. 国内橘小实蝇研究概况[J]. 华东昆虫学报, 2004, 12(2): 90 - 98.
 [3] 梁光红, 黄居昌, 陈家骅. 切割潜蝇茧蜂对桔小实蝇幼虫的功能反应[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(2): 200 - 203.
 [4] Clausen C P, Clancy D W, Chock Q C. Biological control of the oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii[M]. USDA - ARS, Washington D C, 1965: 1 322.
 [5] 梁光红, 陈家骅. 切割潜蝇茧蜂成蜂空间分布型及应用[J]. 中南林学院学报, 2006, 26(2): 47 - 50.
 [6] 袁盛勇, 肖春, 李正跃, 等. 桔小实蝇实验室饲养技术研究[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(4): 577 - 580.
 [7] Spencer J P, Mochizuki N. Procedural manual for mass rearing six species of tephritid fruit fly parasitoids[M]. USDA - ARS, PWA, PBARC Honolulu, 1998.
 [8] 施祖华, 刘树生. 温度对菜蛾绒茧蜂生长发育、存活和繁殖的影响[J]. 植物保护学报, 1999, 26(2): 142 - 146.
 [9] 蒋杰贤, 唐昌林, 王奎武, 等. 温度对斜纹夜蛾侧沟茧蜂功能反应的影响[J]. 上海交通大学学报, 2002, 20(1): 69 - 72.
 [10] 吴兴富, 李天飞, 魏佳宁, 等. 温度对烟蚜茧蜂发育、生殖的影响[J]. 动物学研究, 2000, 21(3): 192 - 198.
 [11] 屈振刚, 王金耀, 祝丽英. 管侧沟茧蜂发育历期、发育起点温度及有效积温研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(4): 100 - 101.
 [12] 施祖华, 刘树生. 温度对菜蛾绒茧蜂功能反应的影响[J]. 应用生态学报, 1999, 10(3): 332 - 334.
 [13] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1 - 648.
 [14] 路虹, 石宝才. 烟蚜茧蜂、菜蚜茧蜂各个虫态及世代发育起点和有效积温的研究[J]. 华北农学报, 1994, 9(3): 72 - 75.