

日本厚朴组织培养技术的研究

张秀峰

(辽宁省林业调查规划院,辽宁沈阳,110122)

摘 要:以播种后得到的日本厚朴幼苗为试材对日本厚朴的组织培养技术进行了研究,采用正交试验比较了不同外植体和激素对比对愈伤组织诱导的影响,光培养和暗培养两种培养方式以及不同激素种类和对比对增殖和生根培养的影响。试验结果表明,日本厚朴组织培养的最佳外植体是顶芽,最佳培养方式为暗培养,最佳启动培养基为 B₅+2,4-D 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L,最佳增殖培养基为 B₅+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L。
关键词:日本厚朴;组织培养;光培养;愈伤组织诱导
中图分类号:S792 **文献标识码:**A

日本厚朴(Magnolia obovata)是木兰科木兰属落叶乔木,原产日本北海道,20 世纪 20 年代引入青岛,现我国山东的崂山、青岛及东北的大连、丹东、熊岳、沈阳有栽培。日本厚朴干形端直,叶大荫浓,是名贵的园林绿化观赏树种,开发利用前景十分广阔。日本厚朴育苗目前生产上主要依靠种子培育实生苗,组织培养尚处于试验阶段。但从长远来看,要使日本厚朴实现“高效、可控、稳定”的质量标准,满足其在中草药市场的需求,同时又满足其在园林绿化当中的需求,必须借助组织培养技术以生产遗传品质优良、一致的日本厚朴幼苗。

1 材料的选择

选择 2006 年 11 月采收于丹东的日本厚朴种子播种后得到的日本厚朴幼苗的顶芽、叶柄、叶片作为组织培养试验的外植体。将消毒后的外植体接种到启动培养基上,待外植体诱导出愈伤组织后,将愈伤组织切下转接入继代培养基中。

2 研究方法

2.1 试验设计方法

培养温度为(24±2)℃,空气湿度为 60%左右,光照强度为 2 000 lx,光周期为 12 h/d。培养基选用 B₅ 培养基。采用单因子试验因素对照,每个试验设置 3 次重复。培养方式:光培养和暗培养的对比。继代培养基激素:2,4-D,NAA,BA。生根培养基激素:NAA,IBA。

- 初代培养正交试验因素对照,试验设置 3 次重复:
- 因子 1:外植体;水平:顶芽、叶柄、叶片
 - 因子 2:2,4-D;6-BA;水平(mg/L):2.0,3.0,4.0;0.5,1.0,2.0
 - 因子 3:NAA;水平(mg/L):0.5,1.0,2.0

2.2 初代培养

初代培养采用两个 3 因素 3 水平正交设计 L₉,基本培养基为 B₅,蔗糖 30 g,琼脂 7 g,pH 5.8,每种培养基接种外植体 20 个,试验重复 3 次,接种后密切观察愈伤组织生长情况。

2.3 光培养和暗培养的对比试验

正交试验完成后,选择出最佳的启动培养基和最佳外植体,接种 40 瓶,接种后取 20 瓶进行暗培养,剩余 20 瓶进行正常光培养。试验重复 3 次,30 天后统计愈伤组织增长量,由此进行光培养和暗培养效果的对比。

2.4 继代培养

基本培养基 B₅,使用激素 2,4-D 和 NAA 组合、6-BA 和 NAA 组合,蔗糖 30 g,琼脂 7 g,pH 5.8。将初代培养得到的愈伤组织转接到 12 种继代培养基上,每种继代培养基上至少接 10 个,45 天后统计诱导外植体分化及生长情况,将得到的芽苗切下进行继代增殖培养,35 天后统计增殖系数。

3 结果与分析

(1)培养基不同激素及浓度对外植体愈伤组织诱导情况。接种 9 天后,观察发现部分外植体的切口处开始膨大,13~16 天时开始陆续有愈伤组织被诱导出来,最先诱导出愈伤组织的是 A4,A5,A6,17~19 天时为 A4,A5,A6,20~22 天为 A7,A8,A9,在 30 天后进行的转接到增殖培养基的试验中发现,叶柄和叶片诱导出的愈伤组织由于质地疏松的原因,在操作时易发生破碎现象(见表 1 和表 2)。用 SPSS 软件对试验结果进行方差分析,可得表 3。

表 1 2,4-D 和 NAA 组合不同浓度对外植体成愈率的影响

培养基编号	外植体	$\rho(2,4-D)$ /(mg/L)	$\rho(NAA)$ /(mg/L)	外植体成愈率(P)/%	数值转换 $X=\sin^{-1}P^{1/2}$
A1	叶柄	2.0	2.0	18.3	25.33
A2	叶柄	3.0	1.0	35.0	36.27
A3	叶柄	4.0	0.5	33.3	33.86
A4	顶芽	2.0	0.5	40.0	39.24
A5	顶芽	3.0	2.0	53.3	46.90
A6	顶芽	4.0	1.0	66.7	54.76
A7	叶片	2.0	1.0	6.7	15.00
A8	叶片	3.0	0.5	11.7	20.01
A9	叶片	4.0	2.0	15.0	22.79
K1	95.46	79.57	93.11	—	T=294.16
K2	140.9	103.18	106.03		
K3	57.8	111.41	95.02		
k1	31.82	26.52	31.04		
k2	46.97	34.39	35.35	—	—
k3	19.27	37.14	31.67	—	—
极差 R	27.7	10.62	4.31	—	—

表 2 6-BA 和 NAA 组合不同激素浓度对外植体成愈率的影响

培养基编号	外植体	$\rho(6-BA)$ /(mg/L)	$\rho(NAA)$ /(mg/L)	外植体成愈率(P)/%
a1	叶柄	0.5	2.0	5.3
a2	叶柄	1.0	1.0	11.3
a3	叶柄	2.0	0.5	8.3
a4	顶芽	0.5	0.5	17.7
a5	顶芽	1.0	2.0	23.3
a6	顶芽	2.0	1.0	38.0
a7	叶片	0.5	1.0	5.7
a8	叶片	1.0	0.5	10.7
a9	叶片	2.0	2.0	9.3

表 3 L9 方差分析

项目	离差平方和	均方	F 值	伴性概率
外植体	2 693.929	1 346.964	14.424	0.005
2,4-D	438.889	219.444	0.468	0.648
NAA	113.929	56.964	0.109	0.899

从结果可以看出,在这三者中,在基本培养基为 B₅ 的情况下,外植体的选取对于愈伤组织的诱导率有最大的影响,顶芽作外植体是最明智的选择。培养基中的激素 2,4-D 对外植体成愈率的影响更加显著,由此可见 2,4-D 是愈伤组织诱导过程中不可缺少的激素。

(2) 光培养和暗培养对顶芽愈伤组织生长的影响。接种的顶芽在暗培养条件下总是比光培养条件下先形成愈伤组织,而且从愈伤组织生长情况来看,暗培养的外植体出现的愈伤组织比光培养的体量要大些。30 天后计算愈伤组织鲜重增长量(见图 1)。

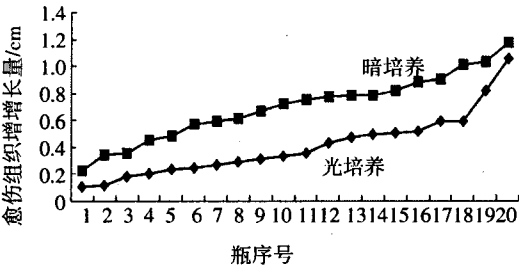


图 1 光培养和暗培养的愈伤组织鲜重增长量曲线图

(3) 不同继代培养基对外植体分化、生长及增殖情况的影响见表 4 和表 5。通过观察可以看出,日本厚朴的外植体诱导分化有两种途径:顶芽和侧芽发育方式与不定芽发育方式。

表 4 继代培养基 I 对外植体分化及生长的影响 (mg/L)

培养基编号	培养基激素类别		外植体分化及生长状况
	2, 4-D	NAA	
B1	2.0	0.1	愈伤组织增大,节间见少量侧芽,无不定芽产生
B2	2.0	0.5	无不定芽分化,茎干矮小,无侧芽
B3	3.0	0.1	无不定芽分化,苗健壮,节间有部分侧芽生长
B4	3.0	0.5	未见不定芽分化,茎干明显,可见部分侧芽
B5	4.0	0.1	愈伤组织生长明显,无不定芽分化,茎干明显,未见侧芽萌动
B6	4.0	0.5	愈伤组织明显增大,但无芽苗分化,侧芽未萌动

将愈伤组织上分化的长至 2 cm 左右的芽,切下转接到各个继代培养基上,使其继续增殖,增殖系数见表 6 和表 7。

4 结 语

日本厚朴组织培养的最佳外植体是顶芽,最适宜的初代培养基是 B₅+2,4-D 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L。暗培养是最佳的培养方式。6-BA 与比 2,4-D 更有利于愈伤组织的分化和增殖。激素浓度影响成苗方式,最佳的继代增殖培养基为 B₅+6-BA 2.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L。

表 5 继代培养基 II 对外植体分化及生长的影响 (mg/L)

培养基编号	培养基激素类别		外植体分化及生长状况
	6-BA	NAA	
C1	1.0	0.5	有少量不定芽分化,茎干明显,顶芽和侧芽为主要成苗途径
C2	1.0	1.0	愈伤组织分化不定芽,苗生长健壮,苗节间侧芽较多,属混合成苗
C3	2.0	0.5	有不定芽分化,苗健壮,主要途径是顶芽和侧芽成苗
C4	2.0	1.0	愈伤组织有不定芽分化,定芽及不定芽混合成苗,苗生长较健壮
C5	3.0	0.5	愈伤组织生长缓慢,无不定芽分化
C6	3.0	1.0	愈伤组织颜色变深,几乎不生长,未见不定芽分化

表 6 继代培养基 I 对定芽和不定芽增殖情况的影响 (mg/L)

培养基编号	培养基激素类别		继代前无根苗数/棵	继代后无根苗数/棵	增殖系数
	2, 4-D	NAA			
B1	2.0	0.1	14	22	1.4
B2	2.0	0.5	16	18	1.1
B3	3.0	0.1	15	34	2.3
B4	3.0	0.5	15	30	2.0
B5	4.0	0.1	14	19	1.4
B6	4.0	0.5	15	19	1.3

表 7 继代培养基 II 对定芽和不定芽增殖情况的影响 (mg/L)

培养基编号	培养基激素类别		继代前无根苗数/棵	继代后无根苗数/棵	增殖系数
	6-BA	NAA			
C1	1.0	0.5	15	36	2.4
C2	1.0	1.0	15	49	3.3
C3	2.0	0.5	14	37	2.6
C4	2.0	1.0	16	57	3.6
C5	3.0	0.5	15	17	1.1
C6	3.0	1.0	14	18	1.3

参考文献

[1] 刘贤旺,杜勤.凹叶厚朴组织培养的研究[J].江西林业科技,1997(2):1-4.
[2] 童再康,朱玉球,王章荣.厚朴组织培养与高产细胞系建立的研究[J].南京林业大学学报:自然科学版,2002,26(4):23-26.
[3] 孙雁霞,林桂芸,王跃华,等.川厚朴愈伤组织培养的初步研究[J].西南农业学报,2004,17(4):228-230.
[4] 斯金平,童再康.厚朴[M].北京:中国农业出版社,2001.
[5] 刘贤旺,杜勤.凹叶厚朴愈伤组织的超低温保存[J].植物资源与环境,1996,5(1):9-13. (责任编辑:王永胜)

第一作者简介:张秀峰,男,1981 年 12 月生,2002 年毕业于沈阳农业大学林学专业,助理工程师,辽宁省林业调查规划院,辽宁省沈阳市虎石台,110122.

Study on Tissue Culture of Magnolia Obovata

ZHANG Xiu-feng

ABSTRACT: This paper studies the tissue culture of Magnolia obovata taking the seedlings of Magnolia obovata obtained after planting as as experimental material, and by using the orthogonal test, compares the influences of different explants and hormone mixture ratios on callus induction, and the influences of two kinds of culture modes, light culture and dark culture, and different kinds and mixture ratios of hormone on the proliferation and rootage culture. The results indicate that the best explant of Magnolia obovata is terminal bud, the best culture mode is dark culture, the best starting medium is B₅+2,4-D4.0 mg/L+NAA1.0 mg/L, and the best proliferation culture medium is B₅+6-BA2.0mg/L+NAA1.0mg/L.

KEY WORDS: Magnolia obovata; tissue culture; light culture; callus induction