

木兰科 7 种植物的组织培养技术研究

王碧琴, 余发新, 刘腾云

(江西省科学院 生物资源研究所, 江西 南昌 330029)

摘要:金叶含笑、长蕊含笑、阔瓣含笑、峨眉含笑、乐东拟单性木兰的茎尖、茎段腋芽在诱导分化培养基 MS + 6BA(0.5~2) mg/L + NAA(0.1~0.2) mg/L 中培养能直接从幼芽基部分化出不定芽。不定芽继代培养增殖新生芽平均数分别为 3.0, 3.5, 2.8, 3.8, 2.5 棵; 杂种鹅掌楸和鹅掌楸的幼芽在诱导分化培养基中培养, 脱分化后产生不定芽, 不定芽继代培养增殖新生芽平均数 5 棵, 但幼芽体较小, 茎秆短, 茎尖生长慢。诱导分化外植体的最适温度在 20~23 ℃, 过高过低都不利于产生不定芽。当幼苗生长至 1.0~2.5 cm 高时即可作生根诱导。

关键词:木兰科植物; 外植体培养; 不定芽诱导; 继代培养; 生根诱导

中图分类号: S682.31 **文献标识码:** A

Tissue Culture of Seven Species of Magnoliaceae

WANG Bi-qin, YU Fa-xin, LIU Teng-yun

(Institute of Biological Resources, JAS, Nanchang 330029, China)

Abstract: The shoot apices and axillary buds of *Micheliafoveolata* Merr. dt Dandy, *Michelialongistamina*, *M. platypetala* Hand-Mazz, *Michelia wilsonii* and *Parakmeria lotungensis* (Chun et C. Tsoong) Law were cultured in the medium of MS + 6-BA 0.5~2 mg/L + NAA 0.1~0.2 mg/L, and adventitious buds could be induced from the bases of these shoot apices. The rate of bud propagation was 3.0, 3.5, 2.8, 3.8 and 2.5 respectively when the buds were subcultured. The mean number of bud propagation was five when the buds of *Liriodendron chinense* × *L. tulipifera* and *Liriodendron chinense* Hemsl. & Sarg were cultured in the differentiation medium, but the adventitious buds were short and the growth was slow. The suitable temperature for the induction of differentiation was 20~23 ℃ and too high or too low temperature was unfavourable for the induction of adventitious buds. The buds could be used for inducing roots when they grew to 1.0~2.5 cm of length.

Key words: magnoliaceae plant; explant culture; induction of adventitious bud; subculture; induction of root

木兰科的属种资源非常丰富。全世界共有 15 属 250 种, 其中我国自然分部有 11 属 130 种, 占世界总属的 37%, 总种的 52%, 居世界各国的首位^[1]。兰科植物多数品种不仅是优良的绿化、观赏树种, 也是近年来推广造林的用材林树种, 其艳丽郁香, 优美花朵还是医药、化妆品不可缺少的原料来源。长期以来木兰科植物一般以有性繁殖为主, 但由于植物多为雌雄异株或两性花及雌雄花花期不同等原因, 使得其自然结实差, 种子繁殖率低, 而且个别树种因受地域局限, 致使种源稀少或不易采到种子等。用无性繁殖扦插, 嫁接虽能有效增加树种资源存量, 为经营和利用打下物质基础, 对这些树种的物种保护和永续利用具有重要作用, 但在生产实践中, 对种源稀少的濒危植物以及珍贵植物或不易生根的树种,

收稿日期: 2005-08-02

基金项目: 科技部国际合作重点项目(2005DFA30460)

作者简介: 王碧琴(1957-), 女, 副研究员, 主要从事植物生理、遗传育种研究。

采用组织培养繁殖技术,不仅能有效克服种源欠缺,解决生产应用过程中繁殖速率低的矛盾,而且还能保留母树的优良性状,快速繁育良种,建立优良的无性系,对保存优良树种的种质资源具有重要的现实意义。

当前有关木兰科植物的组织培养的报道不多,大部分处于初步的探索阶段^[2]。据资料记载,由组织培养诱导不定芽成功的也仅在火力楠(*Michelia macclurei*)、二乔玉兰(*Magnolia soulangeana*)、白玉兰(*Michelia alba*)、广玉兰(*Magnolia grandiflora*)、深山含笑(*Michelia maudiae*)、凹叶厚朴(*M. officinalis* Var. *Pubescens*)、北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)^[3]、鹅掌楸(*Liriodendron chinense* Hemsl. & Sarg)杂种鹅掌楸(*Liriodendron chinense* × *L. tulipifera*)^[4]等几十个种有报道。有关木兰科中的金叶含笑(*Michelia foveolata* Merr. et Dandy)、长蕊含笑(*Michelia longistamina*)、阔瓣含笑(*M. platypetala* Hand - Mazz)、峨眉含笑(*Michelia wilsonii*)、乐东拟单性木兰[*Parakmeria lotungensis* (Chun et C. Tsoong) Law]、(杂种)鹅掌楸等是我省的优良园林绿化、观赏树种,木材和花朵都具很高的经济价值。由于其扦插繁殖生根困难,种子又难于采集,目前市场需求量大,采用茎尖、茎段腋芽组织培养快速繁殖产生试管苗,未见报道。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2003年10月,金叶含笑、长蕊含笑、阔瓣含笑、峨眉含笑、乐东拟单性木兰、(杂种)鹅掌楸枝条取自江西省科学院优质种苗繁育基地2~3年生木兰科苗圃园。

1.2 培养基

采用MS基本培养基,附加不同种类和浓度的激素。诱导分化培养基MS+6BA(0.25~2)mg/L+NAA或IBA(0.1~0.2)mg/L;生根培养基1/2MS₀,1/2MS+NAA或IAA(0.05~0.2)mg/L。

以上培养基均含45g/L食用糖,琼脂6g/L,pH5.7,实验的培养温度为(23±2)℃,光照强度1000~1500lx,光照时间10h/d。

1.3 外植体培养

1.3.1 外植体获取 分别在不同日期的上午剪取金叶含笑、长蕊含笑、阔瓣含笑、峨眉含笑、乐东拟单性木兰、(杂种)鹅掌楸当年生枝条,先在自然水下冲洗,然后用洗衣粉液洗刷冲洗数次后,在无菌超净台上切割成顶芽和茎段(带腋芽)置于φ=70%酒精中浸泡20s,接着在0.1%HgCl溶液中消毒10~12min,后用无菌水冲洗数遍备用。

1.3.2 不定芽诱导 取嫩顶芽剥离外2~3层叶片,切割成2cm左右(芽体大、芽叶长);嫩叶片切为0.5cm×0.5cm小块,茎段带腋芽2cm段;分别接种在诱导分化培养基上。嫩叶片每瓶8块,顶芽每瓶4个,茎段每瓶2段,每样重复4次。培养20d后更换1次同样培养基,培养40d后观察不同外植体在不同激素浓度的培养基中的变化。

1.3.3 不定芽的继代培养 经初代培养产生的不定芽,选择生长基本一致的单芽体:(1)接种到同一种浓度的培养基中培养,每瓶6棵,重复3次,继代2次后统计不定芽的增殖数及苗株高,以及不定芽的综合评述。(2)接种到不同浓度的培养基中培养,每瓶5棵,重复3次,继代2次后统计不定芽增殖数及分化率。

1.3.4 不定芽的生根培养 当不定芽幼株生长至1.5~2cm时,即从基部切割置MS₀中培养壮苗。植株健壮形成完全叶后,转继于生根培养基中诱导生根。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对外植体诱导分化的影响

外植体(叶、芽、茎段)分别接种在诱导分化培养基中培养20d后,幼叶片隆起增大,切口边缘形成不规则少量的愈伤组织;顶芽基部膨大,切口处形成少量愈伤组织,芽苞最外层叶片增厚,变脆,叶柄基部愈伤,整个芽体弯曲成镰刀状,切开可见内芽萎缩,芽尖小,内空现象。继代培养时可切开剥离外层叶片或可自行脱离。茎段切口无愈伤组织,0.2cm处褐化,叶柄节处形成愈伤组织,茎段腋芽最外层叶片张开,顶芽生长。外植体培养40d后,幼叶片切口处愈伤或全叶片愈伤,较早形成的愈伤组织开始变褐,顶芽生长缓慢,基部节处有小芽萌生;茎段腋芽生长,节间处分化小芽。

表 1 外植体诱导分化培养 40 d 统计数

Tab. 1 Statistical figures of induction of explant culture in 40 days

品种	外植体接种数			愈伤/愈伤率/%			分化/分化率/%		
	叶片/块	顶芽/棵	茎段/块	叶片/块	顶芽/棵	茎段/块	叶片/块	顶芽/棵	茎段/块
金叶含笑	56	17	8	50/91	12/70	6/75	0/0	12/80	5/60
长蕊含笑	32	16	8	29/90	13/81	6/75	0/0	10/62	4/50
峨眉含笑	36	20	8	31/86	18/90	5/62	0/0	15/75	6/75

试验表明,在诱导分化培养基中的幼叶片不能诱导分化出不定芽。茎尖或茎段腋芽能从基部直接诱导分化出不定芽。

2.2 激素浓度对不同品种不定芽的增殖影响

将初代培养获得的不定芽,切割为单个芽后,转接到 MS + 6BA0.5 mg/L + NAA0.1 mg/L 诱导分化培养基中,每瓶 6 棵,重复 3 次。每 20 d 继代 1 次,40 d 左右分别统计不定芽增殖数,并作不定芽的形态描述,估测高度及综合评价幼苗生长状况(图 1 ~ 图 7)。

金叶含笑:不定芽叶片长条形,稍黄,弯曲,叶面稍有皱缩,叶质脆。新生不定芽节处产生侧芽,幼苗生长 2 cm 左右可切割移入诱导生根培养基中。

长蕊含笑:不定芽叶片长椭圆形,色绿质薄,叶缘皱卷。幼苗基部产生不定芽 3 ~ 5 个,茎段粗短,伸长慢,继代 2 次后达 2 cm 以上的幼苗,可直接接入诱导生根培养基中。

阔瓣含笑(云山白兰):不定芽外层叶片大,色绿光泽,茎节短,稍粗,叶柄基部易形成愈伤,变黄脱落,分化小芽 2 ~ 3 个。

峨眉含笑:不定芽叶长椭圆形,色深绿,叶柄长,基部 1 ~ 2 层叶易黄凋落,不定芽在基部丛生,茎稍粗。

乐东拟单性木兰:叶长匙形,叶大,色绿,幼苗基部切口处无愈伤形成。叶片少黄,少落,不定芽主要由侧芽形成,苗粗壮。

鹅掌楸:不定芽基部愈伤多,芽短缩基生叶无叶柄或少有叶柄,叶生长速度大于茎尖。最外层叶易黄凋落,不定芽部愈伤块处能产生新的不定芽数个,株高 1.5 cm 以上苗极少。

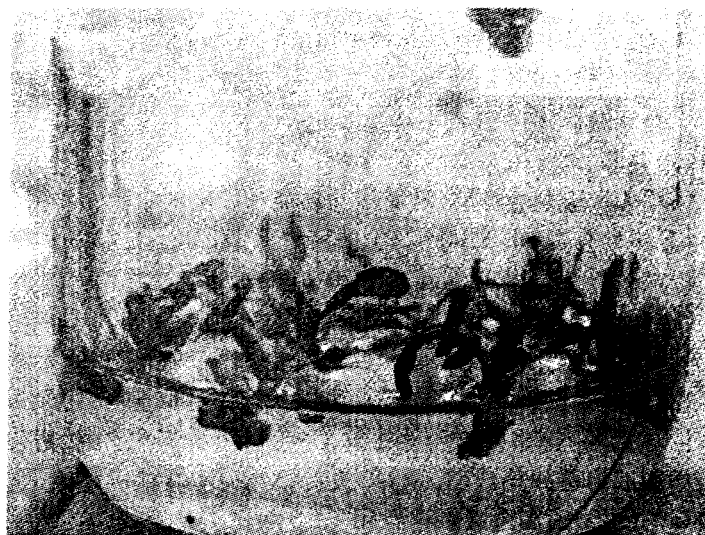


图 1 金叶含笑不定芽

Fig. 1 Adventitious bud of *Michelia foveolata* Merr. et Dandy

图 2 长蕊含笑不定芽

Fig. 2 Adventitious bud of *Michelia longistamina*

表2 继代培养40 d统计不定芽增殖数

Tab.2 Statistical figures of proliferation of adventitious bud that subcultured in 40 days

品种	接种 /棵	每芽平均		综合评价
		新生芽/棵	新生芽高/cm	
金叶含笑	18	3.0	2.0	幼芽体瘦、叶稍黄、生长稍差
长蕊含笑	18	3.5	2.0	幼芽体中粗、叶色绿、生长稍好
阔瓣含笑	18	2.8	1.5	幼芽体中粗、叶色绿、生长稍好
峨眉含笑	18	3.8	1.5	幼芽体粗壮、叶色绿、丛生芽多
乐东拟单性木兰	18	2.5	2.5	幼芽体粗壮、叶色深绿、生长健壮
鹅掌楸	18	5.0	1.0	幼芽体短缩、叶色绿、生长缓慢

综上所述,在同一种激素浓度下不同品种诱导、分化不定芽的数值不同,生长效果也不同。但有一个共同之处:越是幼嫩的组织部分,越容易形成愈伤组织,而且愈伤化程度严重。所以在取材培养时要根据植物个体性状,对苗质组织较疏松的外植体,稍微取成熟部位并要多留茎节及生长点。否则太嫩,易产生愈伤组织,很难分化出不定芽。

2.3 不同激素浓度对继代培养中不定芽的增殖影响

将初代培养获得的不定芽,切取单个芽分别接于不同激素浓度的培养基中,设6个处理,每处理3瓶,每瓶5棵不定单芽,继代2次后观察增殖系数及生长变化。计算分

$$\text{化率}(\%) = \frac{\text{分化不定芽(棵)}}{\text{供试不定芽(棵)}} \times 100\%$$

小芽接种在MS不同激素浓度的诱导分化培养基中培养,15 d左右,幼芽体基部形成愈伤组织。愈伤组织不断增大,表面疏松,内质变硬、转绿。随后,30 d左右分化芽点,不定芽叶片生长快,茎秆生长缓慢,并在芽体周边再次产生不定芽。在高激素浓度下培养的幼芽体经脱分化后,产生不定芽的增殖数最高达7~8倍,但产生的不定芽个体较小。低细胞分裂素和生长素下的幼芽体脱分化后不定芽增殖数急度下



图3 阔瓣含笑不定芽

Fig.3 Adventitious bud of *M. platypetala* Hand - Mazz

图4 峨眉含笑不定芽

Fig.4 Adventitious bud of *Michelia wilsonii*

降,仅有 2.0 倍左右,但产生的不定芽个体稍大。实验结果表明,杂种鹅掌楸幼芽体继代增殖培养过程中,不同的激素浓度组合对不定芽的增殖影响,以细胞分裂素浓度 1 mg/L、生长素浓度 0.1 ~ 0.2 mg/L 效果最好,其增殖数较多,芽体也粗壮。生长素以添加 NAA 效果最好,此实验结果与蒋祥娥^[5]的分析观点基本一致。由于杂种鹅掌楸诱导分化的不定芽较小,其茎秆不高,茎尖不易生长,在诱导生根培养前需将不定芽分成单个芽接于壮苗培养基中,进行壮苗培养,待其长高至 2 cm 后再转接于诱导生根培养基中进行生根诱导。

2.4 温度对继代培养中不定芽诱导及生长的影响

温度对继代培养中不定芽的诱导及生长有着至关重要的影响。实验结果表明,温度 20 ~ 23 ℃ 之间为诱导不定芽最佳培养温度,其增殖数最多,芽体生长健壮,生命力旺,叶色绿。平均 20 d 左右更换 1 次培养基,30 ~ 40 d 扩繁 1 代。当温度超过 25 ℃ 或低于 20 ℃ 时,芽体生长缓慢或停止生长,叶片萎蔫光质,最外层叶片黄,愈伤组织变褐,芽体不分化或分化很少。随着培养时间的延继,芽体逐渐枯黄褐死,以致影响不定芽的次代繁殖。

2.5 培养基对不定芽诱导生根的影响

不定芽生长达到 1.5 ~ 2 cm 左右,即可切割分离成单株接于生根培养基上诱导生根。但由于此试验的材料幼苗茎秆组织较疏松,容易形成愈伤组织基部很难形成不定根。金叶含笑、长蕊含笑、阔瓣含笑、峨眉含笑、乐东拟单性木兰、鹅掌楸等材料分别在 1/2MS₀, 1/2MS + NAA(0.1 ~ 0.5)mg/L 或 IBA(0.05



图 5 乐东拟单性木兰不定芽

Fig. 5 Adventitious bud of *Parakmeria lotungensis* (Chun et C. Tsoong) Law

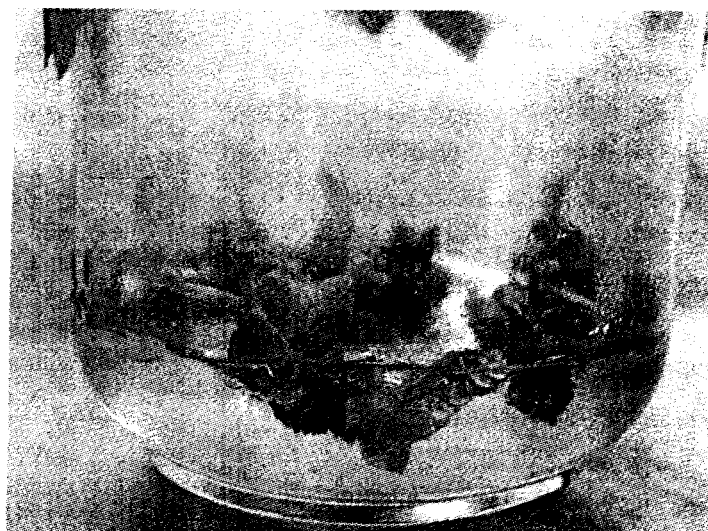


图 6 杂种鹅掌楸不定芽

Fig. 6 Adventitious bud of *Liriodendron chinense* × *L. tulipifera*

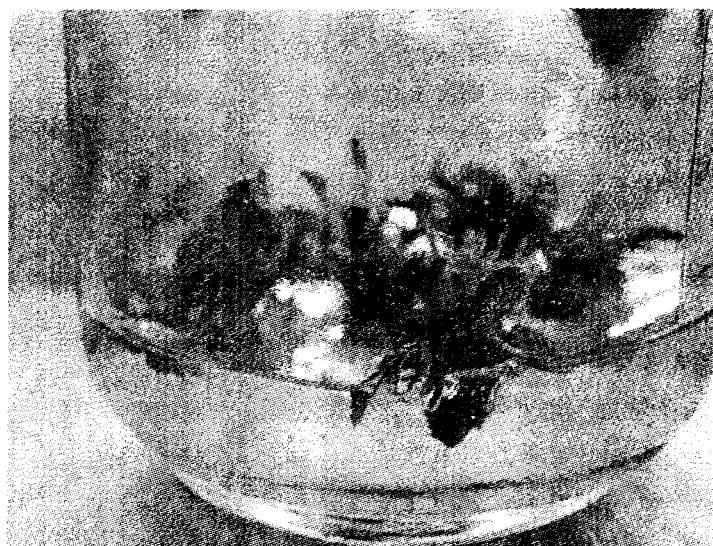


图 7 鹅掌楸不定芽

Fig. 7 Adventitious bud of *Liriodendron chinense* Hemsl.

~0.8) mg/L 等诱导生根试验,幼苗生长旺盛,并有腋芽萌发,但培养1~2个月也不产生不定根。借鉴前人在鹅掌楸和杂种鹅掌楸上生根的方法,但仍无不定根形成迹象。因此,不同产地的树种,

不同季节部位取材,培养条件等都视可难于诱导生根的因素。为此,有待进一步探索不定芽的生根难题。

3 小 结

(1)金叶含笑等植物体内含有一种多酚氧化物,当切割材料时,激活了组织中的多酚氧化物或破坏了组织中酚与底物的区域化使组织中的酚类化合物被氧化,产生带棕色的醌类物质,这种醌类物质能毒害整个外植体组织以致培养基褐化,外植体褐死。为此,对外植体的诱导以及不定芽的继代培养,在培养20 d左右必须转换1次培养基。

(2)外植体的取材,以当年生嫩茎段或顶芽最好。

(3)金叶含笑等顶芽或茎段腋芽在诱导分化培养基上直接从幼芽基部分化不定等。杂种鹅掌楸和鹅掌楸顶芽在诱导分化培养基上脱分化后产生不定芽,其繁殖系数高于其它树种。

(4)不定芽生长至1.5~2 cm时可切下作生根培养。但此步试验还需进一步探索,以尽早解决生根难题。

(5)继续完善组织培养中的快速繁殖技术及工厂化育苗技术,提高生产应用能力。

(6)种苗工厂化生产是产业领域中吸引现代化生物技术工程科技成果和高新技术应用最具活力的领域之一。为此,木兰科树种的组织培养快繁技术为种苗工厂化生产提供科学依据,具有重要的经济意义和生态意义。

参考文献:

- [1]黎明,马焕成.木兰科植物无性繁殖研究概况[J].西南林学院学报,2003,23(2):92-95.
- [2]陈金慧,施季森.鹅掌楸组织培养生根及移栽技术[J].林业科技开发,2002,16(5):24-26.
- [3]曾乐君,彭晓明,曾庆文.深山含笑的组织培养和快速繁殖[J].热带亚热带植物学报,2000,8(3):246-248.
- [4]刘根林.杂交鹅掌楸组织培养技术研究初报[J].江苏林业科技,2000,27(6):24-26.
- [5]蒋祥娥,蔡桁,汪建亚,等.鹅掌楸组织培养技术初探[J].江西林业科技,2004(4):24-26.

表3 杂种鹅掌楸不定芽40 d统计数

Tab.3 Statistical figures of adventitious bud of *Liriodendron chinease* × *L. rulipifera*

品种	激素/mg · L ⁻¹			接种/棵	平均增殖	分化率/%
	BA	NAA	IBA			
杂种鹅掌楸	2	0.2	0	15	5.3	87
	1	0	0	15	4.6	93.3
	1	0.1	0	15	4.2	86.6
	1	0	0.1	15	2.8	67
	0.5	0.1	0	15	2.3	60
	0.5	0	0.1	15	1.8	46