

文章编号: 1001-9499 (2008) 01-0010-03

濒危植物峨眉拟单性木兰茎段腋芽及愈伤组织诱导*

陈 英¹ 马明东^{1,2,*}

(1. 四川农业大学林学院园艺学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学都江堰分校, 四川 都江堰 611830)

摘要: 以峨眉拟单性木兰带芽茎段为外植体, MS、WPM、B5 为基本培养基, 添加不同浓度的细胞分裂素 (6-BA) 和生长素 (IBA、NAA、2, 4-D), 以不同浓度组合进行腋芽和愈伤组织的诱导。结果表明, 基本培养基的类型是腋芽诱导的主要影响因素, 以高盐浓度的培养基 B5 效果较好, MS 次之, 细胞分裂素的浓度与生长素的比值为 15:1 时较适合腋芽的诱导, 比值调整为 5:1 时有利于茎的伸长生长; 愈伤组织的诱导中 6-BA 起主导作用, 其次是 2, 4-D, 再者是基本培养基和 NAA, 其中 2, 4-D 浓度过高不利于愈伤组织的诱导。

关键词: 峨眉拟单性木兰; 组织培养; 腋芽; 愈伤组织

中图分类号: Q 949.747.1, S 722.3*7

文献标识码: A

峨眉拟单性木兰 (*Parakmeria omeiensis*) 是木兰科拟单性木兰属植物, 为该属模式种^[1-4], 我国特有种。雄花与两性花异株, 分布于四川峨眉山海拔 1 200m 的常绿阔叶林中。目前, 峨眉拟单性木兰野外植株仅存二十几株, 结实率低甚至不能结实, 被列为国家一级濒危保护植物, 列入中国物种红色名录^[6]。因此, 对峨眉拟单性木兰进行组织培养研究具有极其重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为 4 年生峨眉拟单性木兰嫁接苗的当年生枝条带芽茎段, 取自四川农业大学都江堰分校树木园。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基

以峨眉拟单性木兰带芽茎段为外植体, MS、WPM、B5 为基本培养基, 添加不同浓度的细胞分裂素 (6-BA) 和生长素 (IBA、NAA、2, 4-D), 采用四因素三水平正交设计。培养基中含琼脂 0.75%, 蔗糖 3%, Vc10mg/L, pH 值在灭菌前为 5.8~6.0, 以口径为 2.0cm、长为 20cm 的平底试管为培养容器, 每管 15mL 培养基。

腋芽诱导因素及水平为: 基本培养基、6-BA (0.5、1.0、1.5mg/L)、IBA (0.05、0.1、

0.5mg/L)、NAA (0、0.1、0.2mg/L); 愈伤组织诱导因素及水平为: 基本培养基 6-BA (1.0、1.5、2mg/L)、NAA (0、0.2、0.5mg/L)、2, 4-D (0、1.0、2.0mg/L)。

1.2.2 外植体的处理方法

将试验材料用自来水冲洗干净, 除去叶片, 保留少许叶柄, 再用洗衣粉溶液浸泡 30min, 并用软毛刷轻轻刷洗叶柄基部, 将刷洗后的外植体用流水冲洗 4~5h; 然后在超净工作台上用 75% 的酒精浸泡 30s, 无菌水冲洗 2 次, 之后往 0.1% 的 HgCl₂ 中加入三滴土温-80, 消毒 15min, 再用无菌水清洗 5~6 次。将消毒后的茎段切成 2cm 和 1cm 左右的小段, 前者竖插于腋芽诱导培养基中, 后者横放于愈伤组织诱导培养基中, 每瓶接种 1 个外植体, 每处理 30 瓶。

1.2.3 培养条件

将接种好的材料置于全自动光照培养箱, 培养温度为 (25±1)℃, 光照时间 12h/d, 光照强度为 1 500lx, 诱导愈伤组织采用黑暗培养。30d 后统计褐化率、腋芽诱导率、出愈率。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基与激素组合对腋芽诱导的影响

为筛选出最适基本培养基和生长调节剂的组合, 按正交试验设计, 将外植体接种在 9 种培养

* 世界自然基金会物种保护项目“峨眉拟单性木兰的保护”(1413)

基上，30d 后统计茎段腋芽诱导率，60d 后统计其分化及生长情况（表 1~2）。

表 1 腋芽诱导正交试验及极差分析

编号	基本培养基	6-BA /mg·L ⁻¹	IBA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	腋芽诱导率 X/%	反正弦转换 X' = sin ⁻¹ √X
1	1 (MS)	1 (0.5)	1 (0.05)	1 (0)	87.3	69.12
2	1	2 (1.0)	2 (0.1)	2 (0.1)	73.4	58.95
3	1	3 (1.5)	3 (0.5)	3 (0.2)	81.3	64.38
4	2 (WPM)	1	2	3	62.5	52.24
5	2	2	3	1	68.6	55.92
6	2	3	1	2	61.5	51.65
7	3 (B5)	1	3	2	85.7	67.78
8	3	2	1	3	75	60.00
9	3	3	2	1	92.9	74.55
K ₁	192.45	189.14	180.77	199.59		
K ₂	159.81	174.87	185.74	178.38		
K ₃	202.33	190.58	188.08	176.62		
X ₁	64.15	63.05	60.26	66.53		
X ₂	53.27	58.29	61.91	61.50		
X ₃	67.44	63.53	62.69	58.87		
R _x	14.17	5.24	2.43	7.66		

表 2 不同处理腋芽生长情况

编号	腋芽生长情况	
	30/d	60/d
1	芽小，较短，部分颜色偏黄	芽色鲜绿，叶片舒展，茎伸长约 1cm，较粗壮
2	芽小，颜色嫩绿	芽色鲜绿，叶片舒展，茎伸长约 1.5cm，长势较好
3	芽小，较弱	芽色鲜绿，叶片舒展，但有部分茎微泛黄，基部褐化较重
4	芽弱小，偏黄	芽长势柔弱，茎细，泛黄
5	芽细小，部分较长，颜色嫩绿	芽体泛黄，茎纤细，长势较弱
6	芽小，较弱	芽体微泛黄，茎短，长势柔弱
7	芽细长，颜色嫩绿	大部分芽色正常，小部分微泛黄，长势一般
8	芽较壮，颜色嫩绿	芽色鲜绿，茎伸长 1~1.5cm，较细
9	芽壮、长，颜色嫩绿	芽色鲜绿，茎伸长，部分叶片展开后有脱落现象

由表 1 和表 2 可知，基本培养基极差最大，其次是 6-BA 和 NAA，说明基本培养基在腋芽诱导过程中起主导作用，以高盐的 B5 培养基较合

适，MS 次之，而低盐的 WPM 培养基相对较差，而且诱导出的腋芽在 WPM 培养基中长势也较弱。细胞分裂素与生长素的比值在 15:1 时较适合腋芽的诱导，诱导率达到了 92.9%，适当降低细胞分裂素的浓度，同时使细胞分裂素与生长素的比值调整为 5:1 左右时有利于腋芽茎的伸长生长。

2.2 不同基本培养基与激素组合对愈伤组织诱导的影响

按四因素三水平试验设计方案进行愈伤组织的诱导，30d 后统计出愈情况（表 3）。

表 3 愈伤组织诱导正交实验及极差分析

编号	培养基	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	2, 4-D /mg·L ⁻¹	褐化率 /%	出愈率 Y/%	反正弦转换 Y' = sin ⁻¹ √Y
1	1 (MS)	1 (1.0)	1 (0)	1 (0)	38.4	36.4	37.11
2	1	2 (1.5)	2 (0.2)	2 (1.0)	27.2	60	50.77
3	1	3 (2.0)	3 (0.5)	3 (2.0)	45.5	36.4	37.11
4	2 (B5)	1	2	3	52.4	42.9	40.92
5	2	2	3	1	31.6	73.7	59.15
6	2	3	1	2	33.3	52.38	46.36
7	3 (WPM)	1	3	2	32	42.1	40.45
8	3	2	1	3	36.9	47.4	43.51
9	3	3	2	1	26.3	68.4	55.80
K _{Y1}	124.99	118.48	126.98	152.06			
K _{Y2}	146.43	153.43	147.49	137.58			
K _{Y3}	139.76	139.27	136.71	121.54			
Y ₁	41.66	39.49	42.33	50.69			
Y ₂	48.81	51.14	49.16	45.86			
Y ₃	45.59	46.42	45.57	40.51			
R _Y	7.15	11.65	6.83	10.18			

由表 3 可知，6-BA 的极差最大，其次是 2, 4-D，最后是基本培养基和 NAA，说明 6-BA 对愈伤组织的诱导影响最大，其次是 2, 4-D。6-BA 浓度在 1.5 或 2.0 mg/L 时出愈率较高，但随着 2, 4-D 浓度的升高，出愈率逐渐降低，褐化率升高，当 4-D 浓度达到 2mg/L 时，平均出愈率只有 42.2%，且愈伤量较少。

以上 9 个处理中，除 5 号、9 号以外虽都诱导愈伤组织，但出愈率低且愈伤量少，1 个月后基本全部褐化。5 号处理较适合愈伤组织的诱导，出愈率达到了 73.7%，愈伤组织致密、紧实、量多、呈白色，见光后转绿；9 号处理愈伤组织微

泛黄、致密、紧实，见光后转绿，但是 40d 后逐渐褐化，这可能与细胞分裂素浓度的高低有关。

另外，在对茎段进行愈伤组织诱导的同时，用顶芽、无菌苗叶片进行对比试验，发现顶芽诱导出的是疏松湿润的绿色愈伤，且很快褐化，为无效愈伤，而叶片未能诱导出愈伤组织。

3 结论与讨论

3.1 基本培养基的类型对峨眉拟单性木兰带芽茎段腋芽的诱导起主导作用，高盐培养基 B5 较适合腋芽的诱导，其次是 MS，而低盐的 WPM 最差。培养基 B5 配合使用相对较高浓度的细胞分裂素，且细胞分裂素与生长素的比值为 15:1 时有利于腋芽的诱导，而要使诱导出的腋芽更好地分化，促进茎的伸长生长，应适当降低细胞分裂素的浓度，调整细胞分裂素与生长素的比值到 5:1。

3.2 6-BA 对愈伤组织的诱导影响较大，其次是 2, 4-D^[7]。适量的细胞分裂素与生长素配合使用有利于峨眉拟单性木兰愈伤组织的诱导，但是随着 2, 4-D 浓度的增加，愈伤组织诱导率降低，褐化率升高，说明 2, 4-D 浓度过高不利于愈伤组织的诱导。经过不同外植体类型对比发现，茎

段是较适合诱导愈伤组织的外植体。

参 考 文 献

- [1] 胡先骕, 郑万钧. 拟克林树木, 中国西南部木兰科一新属 [J]. 植物分类学报, 1954, 1 (1): 1-3.
- [2] 刘玉壶, 夏念和, 杨惠秋. 木兰科的起源、进化和地理分布 [J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3 (4): 1-12.
- [3] 应叶青, 劳勤, 吴勇, 等. 拟单性木兰属种子形态、化学鉴别的研究 [J]. 浙江林业科技, 2005, 25 (1): 5-8.
- [4] 刘玉壶. 木兰科分类系统的初步研究 [J]. 植物分类学报, 1984, 22 (2): 100-101.
- [5] 庄平, 刘仁英, 梁开和. 峨眉拟单性木兰群落特征的初步研究 [J]. 广西植物, 1993, 13 (1): 61-69.
- [6] 中国环境与发展国际合作委员会生物多样性工作组. 中国物种红色名录 (第一卷) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [7] 苏梦云, 姜景民. 乐东拟单性木兰茎段愈伤组织诱导与褐变控制的研究 [J]. 林业科学研究, 2004, 17 (6): 757-762.

第 1 作者简介: 陈英 (1982-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为林木生物技术。

责任作者简介: 马明东 (1958-), 男, 副教授, 硕士生导师, 从事森林培育的教学和研究工作, 发表论文 40 余篇。

收稿日期: 2007-05-06

Axillary Bud and Callus Induction of Stem Segment Endangered Plant of *Parakmeria omeiensis*

CHEN Ying

(Sichuan Agricultural University, Sichuan Ya'an 625014)

Abstract Take the stem segment of *Parakmeria omeiensis* as explant, MS、WPM、B5 as culture medium with different density of 6-BA、IBA、NAA、2, 4-D for axillary bud and callus induction. The results show that the type of the basic mediums are the main factor, medium of high salt concentration favored development of bud, B5 is the best, and then MS. The ratio of the cytokinin to auxins was adapted to the axillary bud induction 15:1 and 5:1 was adapted to the elongation growth of stem. 6-BA is the leading role in callus induction, the second is 2, 4-D, then the basic mediums and NAA, but in the higher concentration of 2, 4-D could inhibit callus induction.

Key words *Parakmeria omeiensis*; Tissue culture; Axillary bud; Callus