

紫玉兰的组织培养

陆秀君¹, 董 阳¹, 金亚荣², 徐 石³

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110164; 2. 凌源市林业局河东造林站 辽宁 凌源 122500; 3. 桓仁县林业局 辽宁 桓仁 117200)

摘 要:以成年紫玉兰带芽茎段为外植体, 采用不同种类的基本培养基和激素配比对紫玉兰组培技术进行了研究, 培育出了紫玉兰组培苗。适宜紫玉兰增殖的培养基为: MS+NAA 0.1 mg/L+BA 1 mg/L; 采用二步生根法, 将继代无菌苗接入 MS+NAA 2 mg/L+BA 0.1 mg/L 培养基暗培养 20 d 后, 转入不加任何激素的 1/2MS 培养基中, 15 d 左右可出根。

关键词:紫玉兰; 组织培养; 培养基

中图分类号:S 685.15 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)11-0189-03

紫玉兰(*Magnolia liliflora* Desr.)又名辛夷, 是木兰科落叶小乔木, 高 2~3 m, 多分布于云南西北部、四川和湖北, 承受的极低温度在-15℃左右。它是著名的木本药材, 因花、叶形美丽, 为我国两千多年来的传统花卉^[1], 是理想的绿化城市树木。沈阳地区属于温带气候, 年积温 1 600~3 400℃, 由于沈阳的地理位置及气候条件所限, 给木兰科植物的引种带来一定的局限性。目前, 引种的木兰科树种都有不同程度的冻害, 大约有 7 种可在沈阳地区小气候条件下安全越冬, 有 5 种完全不适应新的气候条件而死亡, 资料表明引入的紫玉兰不易存活^[2-3]。沈阳农业大学植物园于 1999 年引入该树种, 种植于庭院内, 成活 1 株, 期间虽然有极端温度的出现, 但未见该树种发生冻害和对极端气温有明显的不适反应, 而且引种至今亦无病害发生, 长势良好, 但无结实。为了使沈阳及类似气候地区能成功快速的引入该树种, 丰富物种资源, 可用无性繁殖技术来扩大繁殖数量。但受砧木、插条来源的限制, 无法大批量进行。组织培养技术应用于木兰科植物大多数处于初步探索阶段, 仅在木兰属^[4-7]、含笑属^[8-11]、鹅掌楸属^[12-14]、和拟单性木兰属^[15-16]的 10 余个种有报道。有关紫玉兰组织培养的成果鲜见报导, 该试验拟通过组织培养技术研究, 筛选出适合紫玉兰增殖和促进其组培苗生根的物质条件, 达到扩大紫玉兰在当地繁殖量的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以采自沈阳农业大学植物园内引种的成年紫玉兰(*Magnolia liliflora* Desr.)带芽茎段为外植体。

1.2 试验方法

第一作者简介: 陆秀君(1966-), 女, 博士, 教授, 现从事林木良种选育和苗木培育方面研究工作。

收稿日期: 2009-06-10

外植体的选择及灭菌在天气晴朗的上午 10~11 时, 剪取带芽茎段(0.5~1 cm)。将剪取的紫玉兰茎段分为 3 种类型: I: 紫玉兰顶芽以下 1~2 茎节; II: 当年生幼嫩带芽茎段(I 号以下 1~3 个茎节); III 1 a 生实生带芽茎段(II 号以下茎节)。具体做法是: 在每个无菌瓶中放置 10~20 个芽段, 加入 75% 的酒精浸泡 30 s, 用无菌水冲洗干净, 之后用 0.1% 升汞灭菌 3~15 min, 立即用无菌水冲洗 5~8 次, 接种在 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的启动培养基上, 每种处理接种 10 瓶, 重复 3 次, 10 d 后观察其污染情况和褐变情况。

基本培养基的筛选: 该试验分别选取 1/2MS、MS、B5 和 White 4 种基本培养基(含 7 g/L 琼脂, 30 g/L, pH 5.8)附加 BA 1 mg/L 和 NAA 0.05 mg/L。每种培养基接种 10 瓶, 重复 3 次, 30 d 后观察紫玉兰增殖和生长的情况。

激素种类和水平的筛选: 以 MS 为基本培养基(含 7 g/L 琼脂, 30 g/L, pH 5.8), 将 6-BA、KT、NAA 3 种激素作为参选的外源激素, 每个因素取 3 个水平, 设 3 次重复, 30 d 后观察统计紫玉兰增殖情况。采用三因素三水平正交设计表 L₉(3⁴)安排紫玉兰增殖试验方案(表 1)。

表 1 紫玉兰增殖培养激素水平正交试验

水平	因素		
	A: 6-BA/mg · L ⁻¹	B: KT/mg · L ⁻¹	C: NAA/mg · L ⁻¹
1	0.5	0	0.05
2	1	1	0.1
3	2	2	0.2

生根培养: 将生长良好的继代繁殖无菌苗接种在生根培养基中进行生根培养。培养条件: 培养温度(25±1)℃, 光照强度 3 000 lx, 光照时间 14 h/d。评价指标: 存活率(%)=(存活的外植体数/接种的外植体数)×100%; 污染率(%)=(污染的外植体数/接种的外植体数)×100%; 数据分析: 采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据统计。

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌

由表 2 可以看出, 外植体类型不同及幼嫩程度不同, 在一定的表面消毒时间的作用下其存活率不尽相

同。I 号紫玉兰外植体经表面消毒 5 min 存活率最高, 达 60%。II 号在 7 min 存活率或至高点 57%, II 号在 12 min 存活率能到达最高, 仅为 33%。

表 2 不同表面灭菌时间对紫玉兰外植体的影响

表面灭菌时间 min	3			5			7			10			12			15		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
接种芽数/个	30	30	—	30	30	30	30	30	30	30	30	30	—	30	30	—	—	30
污染数/个	18	26	—	9	25	25	7	16	27	12	12	22	—	12	14	—	—	15
褐化数/个	2	2	—	3	1	2	6	1	2	11	3	3	—	9	6	—	—	10
存活数/个	10	2	—	18	4	3	17	13	1	7	15	5	—	9	10	—	—	8
存活率/%	33	6.7	—	60	13	10	57	43	3.3	23	50	17	—	30	33	—	—	27

不同灭菌时间试验结果表明: 在进行外植体表面灭菌时, 要根据外植体的部位及表面的幼嫩程度选择适当的表面灭菌时间, 以提高诱导存活率。

试验结果还表明, 不同节间的诱导存活率是明显不同的, 存活率I 号外植体> II 号外植体> III号外植体。可见外植体在建立无菌体系过程中, 存活率与其取材位置存在正相关的关系, 即越靠近枝条顶端的新生芽的存活率大于远离顶端的腋芽, 而远远大于那些靠近基部的较老植物材料。这是由于新生组织内含有的病毒和细菌相比靠近基部植物材料少很多, 污染率相对低。同时由于木兰科含有的酚类物质较多, 而新生组织内积累的酚类物质较少, 所以褐化率也相对较低。与之相反, 远离枝条顶端的腋芽有着较高的污染率和褐化率。因此在建立无菌体系的过程中, 尽量选取当年生枝条靠近顶端的腋芽, 以顶芽以下 1~2 个茎节处最佳。

2.2 基本培养基的筛选

通过单因子随机区组试验筛选紫玉兰的最佳基本培养基, 30 d 后统计不同培养基上芽的增殖数量, 统计结果见表 3。

表 3 不同培养基对紫玉兰增殖的影响

基本培养基	增殖系数			和	平均值
	1	2	3		
MS	1.40	1.50	1.50	4.40	1.47
B5	1.10	1.30	1.20	3.60	1.20
1/2MS	0.70	0.60	0.70	2.00	0.67
White	0.90	0.90	0.70	2.50	0.83

试验结果明确表明, MS 培养基是最适于紫玉兰增殖培养的基本培养基, B₅培养基次之, 1/2MS 培养基对紫玉兰的增殖影响效果最差。MS 培养基、B₅培养基同属于高盐类的培养基, 紫玉兰在这 2 种培养基中可以生长的较好, 说明紫玉兰比较适应高盐的环境, 或者可能需要高盐条件维持细胞渗透压。

2.3 激素种类和水平的筛选

紫玉兰组培苗接入增殖培养基以后, 根据培养基中激素配比不同, 各组合有不同程度的增殖表现(见表 4)。从总体上看, 增殖率以 4、5、6 号最高, 达 100%以上。1、

2、3 号苗生长的速度比较慢, 芽小有效苗数量少。7、8、9 号大部分苗节间的长度相比其他苗短, 甚至有苗出现极短节间, 而不便于再次继代。增殖表现最好的是 4 号组合, 即 A₂B₁C₂。

表 4 不同激素种类及配比对紫玉兰增殖培养的影响

试验号	A 6-BA /mg·L ⁻¹	B KT /mg·L ⁻¹	C NAA /mg·L ⁻¹	平均增殖系数	生长及增殖表现
(1)	1(0.5)	1(0)	1(0.05)	0.6	芽小 苗伸长差
(2)	1(0.5)	2(1)	2(0.1)	0.63	芽小
(3)	1(0.5)	3(2)	3(0.2)	0.68	有玻璃化现象发生
(4)	2(1)	1(0)	2(0.1)	1.53	叶舒展嫩绿, 茎伸长较好
(5)	2(1)	2(1)	3(0.2)	1.07	增殖较好
(6)	2(1)	3(2)	1(0.05)	1.20	茎伸长较短 芽较大
(7)	3(2)	1(0)	3(0.2)	0.57	叶加厚变脆, 褐化严重
(8)	3(2)	2(1)	1(0.05)	0.43	叶厚 节间距短
(9)	3(2)	3(2)	2(0.1)	0.63	芽膨大 叶厚而脆

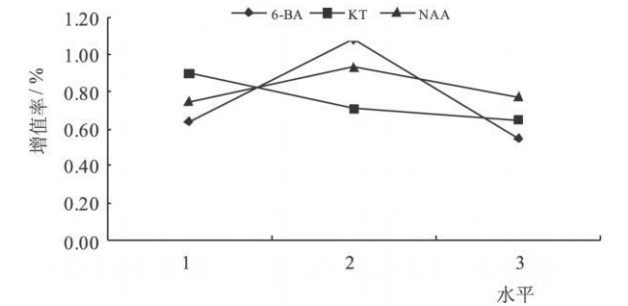


图 1 不同浓度各因素对增殖率的影响曲线图

从图 1 中可以看出, 随着 KT 含量的增大, 增殖率反而降低, 说明 KT 这种细胞分裂素不适合紫玉兰的增殖生长。6-BA 与 NAA 则不然, 在适当的浓度(6-BA 水平 1 mg/L, NAA 水平 0.1 mg/L), 紫玉兰增殖系数达到最高点, 而过高或过低的浓度并不能使紫玉兰的增殖率到达理想水平。

对正交表进行方差分析(表 5), 对紫玉兰增殖培养中的增殖系数影响 6-BA>NAA>KT, 与直观分析及观察得到的结论一致, 正交设计中所安排的 3 个因素 6-BA 的浓度对增殖系数的影响显著, NAA 的浓度和

KT 的浓度对增殖系数的影响不显著。进一步说明6-BA 对紫玉兰的增殖的影响是相当大的。

表 5 L₉ (3⁴) 试验结果的方差分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值
6 BA	2	0.927	0.464	44.696 *
KT	2	0.056	0.028	2.677
NAA	2	0.063	0.031	3.024
误差	2	0.021	0.010	
总变异	8			

注 F(0.05)= 19。

2.4 生根培养

当增殖达到一定数量后,将长势良好紫玉兰继代繁殖的无菌苗转入生根诱导培养基。木兰科植物扦插繁殖较难,组培过程中生根更困难。通过多次预备试验和综合考虑多个因子,该试验拟采用二步生根法进行发根研究:即将用于生根的继代组培苗放入 MS 附加不同质量浓度 NAA 和少量的 6-BA 生根诱导培养基中进暗培养,一段时间后转入不加任何激素的 1/2MS 培养基中培养。试验结果表明,将紫玉兰无菌苗放入 MS+NAA 2 mg/L+BA 0.1 mg/L 的根诱导培养基中暗培养 20 d 后,转入不加任何激素的 1/2MS 培养基中,15 d 左右可出根。生根率达 35%。

3 结论与讨论

取自不同部位的外植体因其幼嫩程度不尽相同,要采用不同的时间处理对其进行表面消毒,降低污染率。顶芽以下 1~2 个茎节需要 5 min 的消毒时间,小于其他类型外植体的表面消毒时间但诱导存活率却大于其它类型外植体。

MS 培养基是最适于紫玉兰增殖的基本培养基,在激素组合 NAA 0.1 mg/L+BA 1 mg/L 的作用下,增殖系数达到最大。

采用常规的生根方法,仅能使少数紫玉兰产生愈伤组织,而不能生根。二步生根法将紫玉兰在 MS+NAA 2 mg/L+BA 0.1 mg/L 培养基中暗培养 20 d 后,转入不

加任何激素的 1/2MS 培养基中,15 d 左右可出根。

利用组织培养技术可以扩繁紫玉兰,但其增殖率仍然与生产开发有一定距离。如何促进芽的增殖是当今研究的重点之一。紫玉兰的组培苗生根比较困难,如何调节培养条件,提高生根率也是今后要研究的重点。

参考文献

[1] 陈俊愉, 程绪珂. 中国花经[M]. 上海: 上海文化出版社, 1990: 186-191.

[2] 田伟, 王素 罗东明. 沈阳地区木兰科植物引种栽培试验[J]. 辽宁林业科技 2002(4): 8-10.

[3] 罗东明. 几种适于沈阳庭院栽植的木兰属植物引种[J]. 防护林科技 2002, 12(4): 73-74.

[4] 黎京度 余诗群. 二乔玉兰茎段培养成完整植株[J]. 植物生理学通讯, 1988(5): 49-50.

[5] 王琪, 王桔之, 李映丽. 荷花玉兰组织培养的研究[J]. 西北药学杂志, 2001, 16(1): 11-13.

[6] 周丽华 许冲勇, 曾雷, 等. 紫玉兰组织培养繁殖研究[J]. 经济林研究, 2002, 20(4): 37-38.

[7] 褚建民 周凌娟, 王 阳, 等. 白玉兰离体培养和快速繁殖[J]. 防护林科技 2002(4): 29-31.

[8] 孙雁露 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(2): 228-230.

[9] 刘敏, 景天. 白兰花和雪松的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1983, 18(6): 38.

[10] 柳蔓琼 梁士现. 火力楠茎段的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1985(1): 37.

[11] 曾宋君 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): 264-268.

[12] 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.

[13] 陈金慧 施季森, 诸葛强. 杂交鹅掌楸的不定芽诱导及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(5): 459.

[14] 蒋泽平 梁珍海, 李劲, 等. 杂交鹅掌楸的离体培养和植株再生研究[J]. 江苏林业科技 2004, 31(9): 5-7.

[15] 陈芳, 陈强 陈娟. 云南拟单性木兰的组织培养[J]. 植物生理学讯, 2005(8): 494.

[16] 邓小梅 奚如春, 符树根. 乐东拟单性木兰组培再生系统的建立[J]. 江西农业大学学报, 2007, 4(2): 198-202.

Tissue Culture of *Magnolia liliflora* Desr.

LU Xiu-jun¹, DONG Yang¹, JIN Ya-rong², XU Shi³

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang Liaoning 110161, China; 2. Forestry Bureau of Lingyuan Country in Liaoning Province, Lingyuan, Liaoning 122500, China; 3. Forestry Bureau of Huanren Country in Liaoning Province, Huanren, Liaoning 117200, China)

Abstract: An experiment was conducted to study the tissue culture technique using shoot stems with a lateral buds of the mature tree *Magnolia liliflora* Desr. as explants. Tissue cultured seedlings of *Magnolia liliflora* Desr. were obtained by means of medium and diferent concentrations of hormone. Result showed that the optimum medium of proliferation was MS+NAA 0.1 mg/L+BA 1 mg/L. Two steps used in rooting, the buds were planted into the medium; MS+NAA 2 mg/L+BA 0.1 mg/L, after 20 days under darkness, the buds were transferred into the medium; 1/2 MS without any hormone, rooting started at about 15 days.

Key words: *Magnolia liliflora* Desr.; Tissue culture; Culture media