

# 连香树再生体系的建立

张先云, 袁秀云, 马 杰, 袁丽洁

(郑州师范高等专科学校 生物技术研究所 河南 郑州 450044)

**摘 要:** 对连香树进行无菌苗萌发和植株再生进行了研究。结果表明: 以 5~6 月为最取材季节; 最佳外植体为当年生枝条顶芽下第 3~4 腋芽; 腋芽诱导的适宜培养基为 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L; 适宜无菌播种的培养基为 1/2MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 适宜增殖培养基为 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 适宜诱导愈伤的培养基为 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L; 诱导分化的适宜培养基为 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; 生根培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L。

**关键词:** 连香树; 再生; 快繁

**中图分类号:** S 792.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)09-0077-03

连香树(*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et zucc.)为单科单属稀有种<sup>[1]</sup>, 是第三纪孑遗植物之一, 为我国二级保护植物, 有十分重要的科研价值; 连香树树干通直, 寿命长, 树姿雄伟, 叶型奇特美观, 又是观赏价值很高的园林绿化树种; 果与叶可作药用, 药用价值也很高。但是连香树雌雄异株, 多为单株分布, 结实量少, 种子极小, 出苗纤细, 难以成苗, 天然更新能力较差, 目前已濒临灭绝。该研究试图建立连香树的再生体系, 通过组培技术, 在短期内实现工厂化育苗快速大量繁殖, 为珍稀濒危树种种质资源的保存开辟一条新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

济源黄楸树林场的连香树 1 a 生枝条和种子。

### 1.2 方法

**1.2.1 无菌苗的获得** 利用 1 a 生枝条获得无菌苗: 分别把 5、6、8 月采来的 1 a 生枝条剪成长段, 放在洗洁精水中浸泡 15 min, 同时用柔毛刷轻轻刷洗干净, 再用自来水冲洗 5 次, 剪成合适的小段后置超净工作台上, 用 70% 的酒精消毒 10 s, 无菌水冲洗 3 次, 再在 0.1% 的升汞中浸泡 7~8 min, 无菌水冲洗 5 次, 剪成 1.5 cm 小段, 每段带 1 芽, 把两端消毒时受伤变色的部分剪去, 上端平齐, 下端切成斜面, 插入 6-BA 和 NAA 不同浓度的组合的 MS 培养基中<sup>[2]</sup> (表 1 A1~A4), 接种 15 d 后进行观察统计, 筛选出适宜诱导无菌丛芽的培养基; 对效果比较好培养基中的外植体进行统计, 筛选出适宜诱导无

菌丛芽的外植体。利用种子获得无菌苗: 8 月底采取果实, 连枝条一起带回。果实放在洗洁精水中刷去表面的污物, 再用自来水冲洗干净, 然后在超净工作台上用 70% 酒精浸润 30 s, 0.1% 升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 6 次。将果实切除两端, 然后沿腹缝线剖开, 将种子取出, 接种在添加 6-BA 0.5 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 的培养基中, 筛选出较适宜种子萌发的基本培养基 (表 3)。然后在筛选出的 1/2MS 培养基中添加不同浓度的 6-BA 和 NAA (表 4 A8~A13), 再次播种, 30 d 后进行统计, 筛选出适宜幼苗生长的激素组合。

**1.2.2 不同浓度的激素组合对丛生芽增殖、成愈率及分化率的影响** 将获得的健壮无菌丛生芽分割成 1.5 cm 的段, 叶片切成直径为 0.4 左右大小的块, 接种到以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA 和 NAA 的培养基中 (表 5 B1~B6), 观察增殖、产生愈伤情况。将产生的愈伤切块接种到 B1~B6 培养基中 (表 5), 观察分化情况, 接种 20 d 后进行统计, 筛选出适合丛生芽增殖、愈伤诱导和分化的激素组合。

**1.2.3 生根与移栽** 将 2.0 cm 左右的丛生芽自基部切下, 移至生根培养基中, 当瓶苗培养 30~50 d, 小苗长至 5~8 cm 左右时出瓶。转移至自然光下练苗 2~5 d, 然后将其从玻璃瓶中取出, 洗净根部粘连的培养基后, 移入温棚蛭石和草炭为基质的营养钵中, 70% 遮荫。经常喷水, 保持温度 18~25℃, 空气湿度 70%~90%, 光照强度 3 000~6 000 lx, 1 个月后统计移栽成活率。

**1.2.4 结果统计** 污染率=污染数/接种总数×100%; 死亡率=死亡数/未污染总数×100%; 诱导率=诱导出丛生芽的外植体数/培养的外植体数×100%; 萌发率=种子萌发数/接种总数×100%; 增殖倍数=丛生芽继代数/接种数; 成愈率=产生愈伤数/接种总数×100%; 分

第一作者简介: 张先云(1957-), 女, 本科, 副教授, 现从事植物生物技术方面研究工作。E-mail: zszxianyun@126.com。

基金项目: 河南省科技攻关资助项目 (0524050005)。

收稿日期: 2009-04-05

化率=已分化的愈伤数/接种的总愈伤数×100%;生根率=生根苗数/培养苗数×100%。

1.3 培养条件

基本培养基为MS,所有培养基均附加蔗糖30 g/L、琼脂8 g/L, pH 5.8~5.9, 120℃灭菌25 min,所有的培养温度均为(24±2)℃,光照2 500~3 000 lx,光照时间12 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同激素的浓度组合对腋芽诱导的影响

处理后的枝条接种7 d左右,原来的叶柄脱落,腋芽开始膨大、伸长,长出新叶,11 d叶片展开。随着NAA浓度的增加,新芽的颜色逐渐加深,枝条逐渐加粗并且

表 1 不同浓度 BA 和 NAA 组合对腋芽诱导的影响

处理号	BA/mg·L <sup>-1</sup>	NAA/mg·L <sup>-1</sup>	诱导率/%	长势
A1	1.0	0.1	78.4	芽黄绿色 比较壮 高 1.5 cm
A2	0.5	0.2	98.6	芽绿色, 高 2~4 cm, 较弱 长度均匀, 丛芽较多
A3	1.5	0.2	70	芽绿色, 高 1.5~3 cm, 较壮, 芽外的那片叶子比较大
A4	1.0	1.0	90	芽深绿色 高 3~4 cm, 粗壮, 长度均匀

表 2 不同外植体对无菌芽诱导的影响

月份	顶芽		顶芽下第 1~2 芽		顶芽下第 3~4 芽		顶芽下第 5 芽	
	死亡率/%	污染率/%	死亡率/%	污染率/%	死亡率/%	污染率/%	死亡率/%	污染率/%
5	39.4	22	10.5	45	3.0	34	22	52
6	42	24	12.4	50	3.1	39	30.5	52.4
8	46.2	30	15.8	55	5.0	41	45	62

2.3 不同培养基对种子萌发和幼苗长势的影响

连香树种子播种15 d后萌发,以A6培养基即1/2MS最适宜,培养25 d时萌发率高达62%,其次为A5,以A7培养基萌发率最低(表3)。幼苗的长势以A11最好,培养30 d苗高1.0~2.5 cm,根长、粗、根毛多,颜色深绿(表4),可见A11培养基即1/2MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L为无菌播种的最佳培养基。

表 3 不同浓度的 MS 培养基对种子萌发的影响

处理号	MS 浓度	播种天数和萌发率/%		
		15 d	20 d	25 d
A5	MS	21	32	39
A6	1/2MS	34	56	62
A7	1/3MS	19	31	34

表 5 不同激素的浓度组合对丛生芽增殖分化的影响

处理号	BA / mg·L <sup>-1</sup>	NAA / mg·L <sup>-1</sup>	芽增殖倍数	叶片		茎	
				成愈率/%	分化率/%	成愈率/%	分化率/%
B1	0.5	0.2	5.1	30.8	4.5	82.4	2.7
B2	0.5	0.5	4.3	45.5	3.7	95.4	2.8
B3	0.5	1.0	4.1	61.4	4.8	83.3	4.7
B4	1.0	0.2	3.6	40.4	2.1	66.7	2.5
B5	1.0	0.5	3.4	50.5	5.4	62.2	5.1
B6	1.0	1.0	2.9	60.6	3.1	65	3.4

芽的增殖倍数最低,仅2.9当BA浓度一定时,丛生芽增殖随着NAA浓度的增加成下降趋势。在诱导愈伤试验中,愈伤的颜色有黄绿、淡绿、淡黄、黄白、黄褐色,以黄绿色分化率高;茎的成愈率高于叶片的成愈率,在B2培养

生长健壮,以1.0 mg/L NAA 最适宜;随着6-BA浓度的增加,诱导率呈下降趋势,以0.5 mg/L 6-BA的诱导率最高,但丛芽长势相对较弱。腋芽诱导以A4培养基即MS+BA1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L为适宜,无菌丛芽生长健壮,长度均匀,适宜继代(表1)。

2.2 不同外植体对无菌芽诱导的影响

对A4培养基中的外植体进行统计分析(表2),所有月份的顶芽死亡率比较高,接种后2~3 d变为黑褐色,死亡,但污染率最低;顶芽下第5芽容易在不萌动的状态下死亡,污染率最高;5、6月份的顶芽下第3~4芽外植体的死亡率和污染率相对较低,因此最佳的取材季节是5~6月份,最佳外植体为顶芽下第3~4芽。

表 4 不同激素浓度组合对幼苗生长的影响

处理号	BA/mg·L <sup>-1</sup>	NAA/mg·L <sup>-1</sup>	高度/cm	根	颜色
A8	0.5	0.05	0.5~1.0	较长、粗、无根毛	深绿
A9	1.0	0.1	0.5~1.5	短、粗、根毛少	绿
A10	1.5	0.5	0.5~0.7	较长、细、根毛多	绿
A11	0.5	0.1	1.0~2.5	长、粗、根毛多	深绿
A12	1.0	0.5	0.5~1.5	短、粗、无根毛	黄绿
A13	1.5	0.05	0.5~0.7	短、粗、无根毛	鲜绿

2.4 不同激素的浓度组合对丛生芽增殖和成愈率及分化率的影响

丛生芽的增殖结果表明(表5),以B1即MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基最适宜,增殖倍数达5.1,得到的丛生芽生长健壮(图1),以B6培养基中丛生

基中,茎的成愈率高达95.4%,且形成的愈伤体积最大,较致密,颜色绿,故以B2培养基即MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L为适宜愈伤诱导培养基。在分化试验中(图2),B5培养基无论是叶片还是茎形成的愈伤分化

率都高, 分别为 5.4、5.1, B4 培养基的分化率最低, 叶和茎的分化率分别是 2.1 和 2.5, 综合分析 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 为最适宜分化的培养基。

2.5 生根及移栽

把高 2 cm 左右的丛生芽切下, 插入生根培养基

1/2MS+NAA 0.5 mg/L 中, 9 d 开始生根, 15 d 生根率达 95%以上, 根数为 4~9 条, 根长可达 1.5~2.5 cm (图 3), 待小苗长至高 5~8 cm 时出瓶移栽, 成活率高达 90%以上。

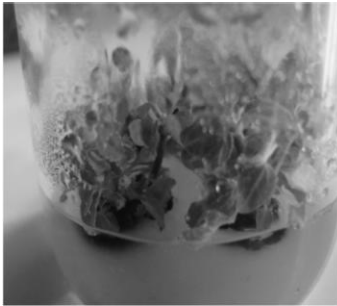


图 1 丛生芽增殖

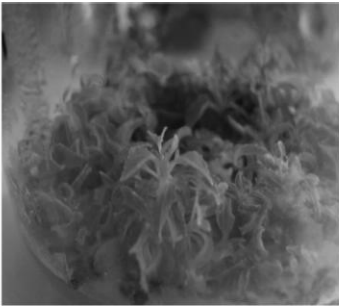


图 2 丛生芽分化



图 3 丛生芽生根

3 结论

以无菌播种方法获得无菌苗播种污染率较低, 发芽率高, 可获得大量的无菌芽, 而以 1 a 生枝条获得无菌苗, 外植体容易污染, 效果较差。无论那种方法获得的无菌苗继代和愈伤诱导、分化上没有什么差别。无菌丛芽由腋芽萌发增殖和愈伤分化 2 种方式获得, 2 种方式获得的丛生芽增殖都受 NAA 浓度影响, 在浓度 0.2~1.0 mg/L 之间, 随着 NAA 浓度的增加呈下降趋势。用

茎作为外植体诱导愈伤比较适宜, 但该试验愈伤分化率不高, 需要进一步研究。

参考文献

[ 1 ] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[ M ]. 27 卷. 北京: 科学出版社, 1979: 23-24.  
[ 2 ] 谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[ J ]. 植物学通报, 1999, 16(3): 238-244.

Research on Tissue Culture and Regeneration of *Cercidiphyllum japonicum*

ZHANG Xian-yun, YUAN Xiu-yun, MA Jie, YUAN Li-jie

(Institute of Biology Technology, Zhengzhou Teacher's College, Zhengzhou Henan 450044, China)

**Abstract:** In this paper the germination of seed and plant regeneration of *Cercidiphyllum japonicum* was researched. The results showed that it's optimum for sampling was in May and June; Third or forth bud in annual shoot were optimum explant; MS+BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L was optimum to induce axillary bud; 1/2MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L was suit to asepsis sowing; MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L was the optimum medium for reduplication; MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L was optimum to induce callus; MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L was optimum for differentiation; 1/2MS+NAA 0.5 mg/L was the optimum medium for growing root.

**Key words:** *Cercidiphyllum japonicum*; Plant regeneration; Intermediate propagation