

白玉兰花药愈伤组织以及胚状体诱导的研究

李桂荣, 刘玉博, 刘婉君

(河南科技学院 园艺园林学院, 河南 新乡 453003)

摘 要:以白玉兰花药为试材,研究了不同培养基以及不同浓度的 6-BA 和 NAA 生长调节剂组合对白玉兰花药愈伤组织和胚状体诱导及生长状况的影响。结果表明:诱导白玉兰花药生成愈伤组织和胚状体的最佳培养基组合均为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 3.0 mg/L。

关键词:白玉兰;花药;组织培养

中图分类号:S 685.15 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0099-03

白玉兰(*Magnolia denudata*)属木兰科木兰属落叶乔木,又称玉兰。原产于中国中南部山区,主要分布在中国的中部及川滇,现在世界各地均已引种栽培。一般树高 2~5 m 以上,最高可达 15~25 m,是北方早春的重要观花乔木,适于庭院、工厂、公园中孤植、列植、散植,或以松柏等常绿树做背景丛植于草坪,纯朴清雅。花可插瓶观赏,树皮、花蕾可以入药,还可提炼香精,花瓣可裹面油煎或糖渍食用,材质细致适做精美木制品。其对二氧化硫、氯气和氟化氢等有毒气体有一定的吸附能力,故可做工矿区的绿化树种,起到环保作用,具有很高的观赏和经济价值。白玉兰有诸多优点,深受人们喜爱,一直以来,白玉兰的繁殖以嫁接为主,亦可用播种、扦插、压条进行繁殖,但是成活率都很低,另外,白玉兰的种子不宜贮藏,需随采随播,播种苗 5 a 以后才能开花,花形也小于母本,花的品质明显下降,尤其在北部,白玉兰开花而不实,即不能获得种子。白玉兰若嫁接繁殖,需以紫玉兰做砧木,不仅其成活率极低,且远远满足不了市场的需求^[1-2]。

组织培养作为一门新兴的繁殖技术,不但繁殖系数大,而且能保持品种的优良性状,也是高等植物细胞工

程、基因工程和品种进一步改良的重要基础之一。但木本植物由于其生长发育条件、器官、部位、遗传背景等与草本植物相比存在较大差异,同时在离体培养过程中容易产生较多的多酚类物质,抑制细胞分裂,引起外植体褐化,再加上其外植体暴露时间较长,感染各种杂菌机率也就较多,还有内生菌的存在,因此,其离体培养难度较大^[3-4]。白玉兰在这方面的表现尤为突出,另外其外植体切面褐化速度极快,影响试验的正常进行。利用花药组织培养可以从根本上解除常规繁殖的缺点以及用茎尖、芽、叶等外植体进行组织培养快速繁殖中易褐变的难点。国内外对白玉兰的研究报道很少^[4-5]。仅有二乔玉兰^[6]以及有关同科的荷花玉兰^[7]和紫玉兰组织培养快繁技术的研究^[8],而白玉兰组织培养方面的研究报道仅局限于其组织快繁技术的研究,且研究得不够深入^[9-10],对于白玉兰花药组织培养方面的研究尚鲜见报道^[2,4]。

该试验以白玉兰花药为试材,通过不同的培养基配方及不同浓度不同生长调节剂组合,研究最适合白玉兰花药愈伤组织诱导的培养基组合和最适合胚状体诱导的培养基组合,从而为用白玉兰花药组织培养获得单倍体和再生体系的建立提供参考,同时也为用生物技术提高白玉兰花的品质、培育新品种提供参考依据。

第一作者简介:李桂荣(1974-),女,回族,河南淮阳人,硕士,副教授,现主要从事园艺植物育种与生物技术的教学与科研工作。

收稿日期:2012-10-18

Abstract: Taking *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hed. l lateral stem segments with bud as test materials, the symptoms of N, P, K elements deficiency in the culture medium formulations were studied, in order to provide a theoretical basis for choose media formulations suitable for plant growth. The results showed that the earliest symptoms of nutrient deficiency was the lack of the N training, followed by the lack of K training and lack of P training; the root activity, photosynthetic rate, chlorophyll content and dry weight of lacking N training of *Sorbus pohuashanensis* were the lowest, followed by lack of K, lack the P performance was relatively high, but significantly lower than the control.

Key words: tissue culture; nutrient deficiency test; *Sorbus pohuashanensis*; the lack of N culture; the lack of P culture; the lack of K culture

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料白玉兰花药取自河南科技学院,取顶端含苞的几朵花,以处于单核靠边期的花药为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的处理 用于组织培养的花药并未成熟,其外面有花萼、花瓣保护,基本上处于无菌状态,故只需将整个花蕾消毒即可。采回的花蕾先用流水冲去表面灰尘,再用无菌水冲洗数遍,然后放在 4℃ 的冰箱中预冷 3 d。接种前,整个花蕾用 75% 的酒精浸泡 30 s,然后用无菌水冲洗 3 次,再用升汞灭菌 9 min,之后再用无菌水冲洗 3 遍。冲洗后,将花萼、花瓣用镊子剥去,露出花蕊,再用镊子将雄蕊取出放在培养皿中,小心的切下花药或将花丝切段接到培养基上。

1.2.2 培养基的设置以及培养条件 试验设 MS 和 N6 2 种培养基,使用不同浓度的 6-BA 和 NAA 2 种生长调节剂,共组成 16 种培养基配方组合,添加 10 g/L 琼脂, pH 5.8,生长调节剂组合及浓度见表 1。培养温度(24±2)℃,光照强度 3 000 lx,光照时间 14~16 h/d。观察并计算愈伤组织诱导率和胚状体诱导率。愈伤组织诱导率=诱导出的愈伤组织个数/接种个数×100%,胚状体诱导率=诱导出的胚状体个数/接种个数×100%。

表 1 生长调节剂组合及浓度

Table 1 The combinations and concentrations of the growth regulator mg/L

处理 Treatments	6-BA	NAA
1	0	0.5
2	0	1.0
3	0	2.0
4	0	3.0
5	1	0.5
6	1	1.0
7	1	2.0
8	1	3.0

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂组合和不同培养基对愈伤组织诱导的影响

2.1.1 不同生长调节剂组合对花药培养中愈伤组织诱导的效果比较 由表 2 可以看出,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L、NAA 浓度为 3.0 mg/L 时,愈伤组织诱导率最高,可以达到 35.2%,长势也最好;6-BA 浓度为 1.0 mg/L、NAA 的浓度为 2.0 mg/L 时表现次之,此时形成的愈伤组织总体来说比较好。当 6-BA 浓度为 0 mg/L 时,NAA 的浓度为 0.5 mg/L 时的愈伤组织诱导率最低,仅有 8.0%,当 NAA 的浓度为 2.0 和 3.0 mg/L 时,愈伤组织诱导率也不高,但是较前面的低 NAA 浓度的组合来说有所提高,愈伤组织长势稍好。表明不添加 6-BA 的生长调节剂组合不利于花药培养中愈伤组织的诱导,NAA

的浓度低时也不利于愈伤组织的诱导。在白玉兰花药离体培养中诱导愈伤组织的最适生长调节剂组合为 6-BA 1.0 mg/L+NAA 3.0 mg/L。

表 2 不同浓度的 6-BA 与 NAA 组合对愈伤组织诱导的影响

Table 2 The effect of different concentrations of 6-BA and NAA on callus induction

处理 Treatments	接种个数 Inoculation number/个	愈伤组织诱导个数 Callus number/个	愈伤组织诱导率 Callus rate/%	愈伤组织生长状况 The growth situation of callus
1	100	8	8.0	+
2	98	12	12.2	+
3	103	19	18.4	+
4	100	23	23.0	++
5	108	27	25.0	++
6	110	32	29.1	++
7	100	33	33.0	+++
8	105	37	35.2	+++

注: * 愈伤组织生长状况: +, 有; ++, 较多; +++, 多。下同。

2.1.2 不同培养基诱导愈伤组织的效果比较 由表 3 可知,该试验中 MS 培养基在白玉兰花药离体培养中诱导愈伤组织的效果最好,愈伤组织诱导率可达 39.5%, N6 培养基诱导愈伤组织的效果不好,诱导率仅为 6.2%,并且长出的愈伤组织少,长势也不好。综合表 2、3 可知,诱导白玉兰花药产生愈伤组织的最佳培养基组合为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 3.0 mg/L,长势见图 1。

表 3 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 3 The effect of different medias on callus induction

培养基类型 Medium	接种个数 Inoculation number/个	愈伤组织诱导个数 Callus number /个	愈伤组织诱导率 Callus rate /%	愈伤组织生长状况 The growth situation of callus
MS	420	166	39.5	+++
N6	404	25	6.2	+

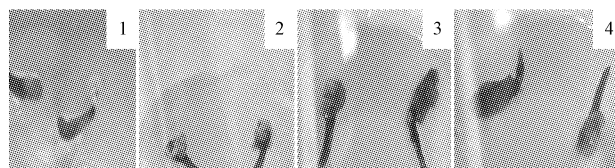


图 1 愈伤组织以及胚状体形成

注: 1~2: 处理 8 中的愈伤组织形成; 3~4: 处理 8 中胚状体的形成。

Fig. 1 Growth of the callus and embryo

Note: 1~2: Callus formed in the 8th treatment; 3~4 embryo formed in the 8th treatment.

2.2 不同植物生长调节剂组合和不同培养基对胚状体诱导的影响

2.2.1 不同生长调节剂组合对胚状体诱导的效果比较

由表 4 可以看出,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L, 0.5~0.3 mg/L 的 NAA 诱导率比较高,以 NAA 浓度为 3.0 mg/L 时表现最好,诱导率高达 37.1%,胚状体长

势也好。当 6-BA 浓度为 0 mg/L 时, NAA 的浓度为 0.5 mg/L 时胚状体的诱导率最低; NAA 的浓度为 1.0~3.0 mg/L 时, 愈伤组织诱导率也不高, 但随 NAA 浓度的升高, 胚状体诱导率也呈上升趋势。

表 4 不同浓度的 6-BA 与 NAA 组合对胚状体诱导的影响

Table 4 The effect of different concentrations of 6-BA and NAA on embryoid induction

处理代号 Treatments	接种个数 Inoculation number/个	胚状体诱导个数 Embryoid number/个	胚状体诱导率 Embryoid rate /%	胚状体生长状况 The growth situation of embryoid
1	100	5	5.0	浅黄色, 稍露出
2	98	15	15.3	黄色, 长势纤弱
3	100	17	17.0	黄色, 微泛绿色
4	103	20	19.4	黄色, 长势稍好
5	108	21	19.4	黄色, 稍显健壮
6	110	30	27.3	黄色泛绿
7	100	31	31.0	黄绿色, 长势正常
8	105	39	37.1	浅绿色, 长势正常

2.2.2 不同培养基诱导胚状体的效果比较 由表 5 可以看出, MS 培养基在白玉兰花药离体培养中诱导胚状体的效果最好, 诱导率高可 39.2%, N6 培养基诱导胚状体的效果极差, 只有 3.2%, 且胚状体长势不好。综合表 4、5 可以看出, 诱导白玉兰花药产生胚状体的最佳培养基组合为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 3.0 mg/L, 而培养基组合 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L 的效果次之。

表 5 不同培养基对胚状体诱导率的影响

Table 5 The effect of different medias on the embryoid induction rate

培养基类型 Treatment	接种个数 Inoculation number/个	胚状体诱导个数 Embryoid number/个	胚状体诱导率 Embryoid rate /%	胚状体生长状况 The growth situation of embryoid
MS	420	165	39.2	长势一般, 不统一
N6	404	13	3.2	长势弱, 泛黄色

3 讨论与结论

适宜的生长调节剂组合配比是植物花药愈伤组织和胚状体诱导分化的关键之一^[4-5]。褚云霞等^[11]对百合花药培养研究结果表明, 对百合花药愈伤组织诱导的最佳生长调节剂组合为 2,4-D 3.0 mg/L+KT 3.0 mg/L,

一般用 2,4-D 诱导外植体产生愈伤组织和胚状体的效果比较好, 但有资料表明, 2,4-D 趋向于抑制植物的形态发生^[12], 韩佩来等^[13]对石刁柏的花药培养与植株再生的研究表明, 在石刁柏愈花药愈伤组织诱导中以 NAA:6-BA 为 1:1 的组合对分化的效果最佳, 从中可以看出, 不同的培养基、不同的生长调节剂组合直接影响着愈伤组织和胚状体的诱导, 培养基的选择、生长素和细胞分裂素配比是决定愈伤组织、胚状体诱导的关键。该试验选用不同浓度的 6-BA 与 NAA 组合来探索最适合白玉兰花药愈伤组织诱导的培养基组合和最适合胚状体诱导的培养基组合, 结果表明, 最适合白玉兰花药离体培养的培养基组合是 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 3.0 mg/L, 从试验结果还可以看出, 6-BA 和 NAA 的相对浓度高, 愈伤组织和胚状体的诱导率就高, 反之则低。这同王洪等^[7]在荷花玉兰组织培养研究上的结果基本一致。

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, 1991.
- [2] 熊济华. 观赏树木学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 164-165.
- [3] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [4] 谭文登. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 147-171.
- [5] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 3 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2005.
- [6] 黎百度, 于诗群. 二乔玉兰茎段培养再生植株的研究初报[J]. 西农科技, 1987, 16(4): 359-360.
- [7] 王洪, 王喆之, 李映丽. 荷花玉兰组织培养的研究[J]. 西北药杂志, 2001, 16(1): 11-13.
- [8] 周丽华, 曾雷, 王振师, 等. 紫玉兰组织培养繁殖研究[J]. 经济林研究, 2002, 20(4): 37-38.
- [9] 毕艳娟, 高书国, 乔亚科, 等. 植物生长调节剂对白玉兰组织培养的影响[J]. 河北职业技术师范学院报, 2002, 16(3): 14-15, 48.
- [10] 孟雪. 白玉兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 339.
- [11] 褚云霞, 黄燕文, 陈龙清, 等. 百合的花药培养研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(5): 472-474.
- [12] 查夫拉(EP) H S. 植物生物技术导论[M]. 原著第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [13] 韩佩来, 陈利明, 沈革志, 等. 石刁柏的花药培养与植株再生[J]. 上海农业学报, 1994, 10(2): 85-88.

Study on the Callus and Embryoid Induction of Anther of *Magnolia denudata*

LI Gui-rong, LIU Yu-bo, LIU Wan-jun

(Department of Horticulture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract: Taking the anther of *Magnolia denudata* as explants, the effect of different mediums and hormones on the callus and embryoid inducement of anther were studied. The results showed that the best medium for callus and embryoid inducement medium of anther was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 3.0 mg/L.

Key words: *Magnolia denudata*; anther; tissue culture