

## 深山含笑的组织培养和快速繁殖

曾宋君, 彭晓明, 曾庆文

(中国科学院华南植物研究所华南植物园, 广东 广州 510520)

**摘要:** 组织培养深山含笑的实验结果表明: 利用休眠芽和种子萌发时实生苗的上胚轴及下胚轴为外植体均能诱导出愈伤组织和不定芽, 其中无菌实生苗的上胚轴最易诱导出不定芽, 无菌实生苗的下胚轴最易诱导出愈伤组织。外植体在 MS+1.0-2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 培养基上只产生愈伤组织; 在 MS+3.0 mg L<sup>-1</sup> BA+0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA 培养基上产生较多的不定芽和较多的愈伤组织; 在 MS+2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D+3.0 mg L<sup>-1</sup> BA+0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA 培养基上易产生愈伤组织和大量的不定芽。愈伤组织在 MS+2.0 mg L<sup>-1</sup> BA+0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA 培养基上能产生大量的不定芽, 不定芽在此培养基上增殖速度快, 增殖速度可达 6.30 倍。试管内小苗在 1/2MS+0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA 培养基上生根壮苗效果较好。试管苗移栽成活率为 92%。

**关键词:** 深山含笑; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2000)03-0264-05

## TISSUE CULTURE AND RAPID PROPAGATION OF *MICHELIA MAUDIAE*

ZENG Song-jun, PENG Xiao-ming, ZENG Qing-wen

(Botanical Garden, South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510520, China)

**Abstract:** Explants from dormant bud segments and from epicotyls and hypocotyl of the seedlings of *Michelia maudiae* Dunn were cultured on MS medium supplemented with various concentrations of NAA, 2,4-D, BA alone or in combination. Medium with 2,4-D could only produce calluses. A large number of adventitious buds and some calluses were observed on medium containing BA (3.0 mg L<sup>-1</sup>) and NAA (0.2 mg L<sup>-1</sup>). Calluses from original explants generated a maximum number of shoots in subculture on MS medium supplemented with BA (2.0 mg L<sup>-1</sup>) and NAA (0.2 mg L<sup>-1</sup>). Plantlets rooted well on 1/2MS medium containing 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA with 1.0% active carbon. The plantlets were transferred to pots containing a perlite/coconut fibre/sand (2:2:1) mixture which grew normally with a survival rate of 92%.

**Key words:** *Michelia maudiae*; Tissue culture; Rapid propagation

收稿日期: 1999-06-14

基金项目: 广东省环保局; 中国科学院华南植物园科学基金资助

本文得到华南植物研究所凌定厚研究员的指导与审阅, 特此致谢。

木兰科 (Magnoliaceae) 全世界有 15 属 250 余种, 是现有被子植物中比较原始的类群, 中国有 11 个属 150 多种, 其中许多种类是国家级珍稀濒危植物, 不少种类是优良的木材、药材和园林绿化树种。常规繁殖方法 (扦插、嫁接、播种、圈枝等) 繁殖难度大, 繁殖系数低, 且难成功, 更无法对一些珍稀品种进行保育和满足市场需要。有关木兰科植物的离体培养也仅在火力楠 (*Michelia macclurei*)<sup>[1]</sup>、二乔玉兰 (*Magnolia soulangeana*)<sup>[2]</sup>、白玉兰 (*Michelia alba*)<sup>[3]</sup>、广玉兰 (*Magnolia grandiflora*)<sup>[4]</sup>、北美鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera*)<sup>[5-7]</sup> 等几个种有报道, 而且有些还未能诱导生根, 繁殖数量也很少。深山含笑 (*Michelia maudiae*) 是一种优良的园林观赏树种, 也是一种优良的家具、建筑、细木工用材; 其花有香果味, 可提取芳香油, 是高级化妆品原料, 也可提制浸膏供药用, 有清热解毒、止咳之功能, 具有较大的经济价值<sup>[8]</sup>。然而常规繁殖速度慢, 市场上一直供不应求, 为此我们选用这一材料作组织培养研究, 旨在解决这一物种和其它木兰科濒危物种的保育方法和快速繁殖提供参考。

## 1 材料与方 法

实验所用材料以华南植物园木兰园深山含笑 (*Michelia maudiae* Dunn) 成苗的休眠芽以及种子萌发后实生苗的上胚轴与下胚轴为外植体。

在以休眠芽为外植体时选取主枝或分枝的茎尖、带腋芽的切段, 用自来水冲洗 30 min 后, 切成 1 cm 左右的切段, 每个切段带一个休眠芽, 先用 75% 的酒精浸泡 5 s 后, 再用 10% 的次氯酸钠消毒 10 min, 无菌水冲洗 5-6 次后在无菌条件下接种到附加各种激素的 MS<sup>[9]</sup> 培养基上。

将种子用上述方法进行表面消毒, 然后在无激素的 MS 培养基上播种, 1 个月左右种子萌发并长成 2-3 cm 高时, 取 0.5 cm 左右长的上胚轴或下胚轴为外植体接种到与休眠芽相同的培养基上。培养基用 0.8% 琼脂固化, pH5.4-5.6, 培养温度 25±2℃, 每日光照 12 h, 光照强度 1500-2000 Lx。

继代培养和不定芽生根诱导以 MS 或 1/2MS 为基本培养基并附加多种激素及其组合。其它培养条件与外植体的初代培养相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织与不定芽的诱导

深山含笑休眠芽或实生苗的上胚轴与下胚轴在含不同浓度的 2,4-D、BA、NAA 及其组合的 MS 培养基上培养 10 d 左右休眠芽萌动, 培养 25 d 左右在一些培养基上外植体切口处有愈伤组织形成, 培养 40 d 左右大多数培养基上有不定芽生成。在各种培养基上产生愈伤组织和不定芽的时间相差 5-10 d。50 d 时统计产生新芽的数量和愈伤形成情况见表 1。

**不同激素及浓度的比较** 当培养基中不含任何激素或只有 NAA 时, 以休眠芽为外植体时, 不出芽也不形成愈伤组织。然而实生苗上胚轴的外植体能形成少量不定芽 (图版 I:1); 当培养基中只含有 2,4-D 时, 大多数外植体切口处有愈伤组织形成, 无芽生成 (图版 I:2); 当培养基中只含有 BA 时, 产生愈伤组织的外植体数量较多, 同时能产生较多的不定芽 (图版 I:3)。在 MS+2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D+3.0 mg L<sup>-1</sup> BA 培养基上, 外植体产生愈伤组织的能力最

强, 但产生不定芽的能力较差; 在 MS + 3.0 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA 培养基上, 产生愈伤组织的能力较差, 但产生不定芽数量最多。在 MS + 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 3.0 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA 培养基产生愈伤组织和不定芽的能力均较强。对各种激素浓度进行分析, BA 浓度以 3.0 mg L<sup>-1</sup> 最佳。

**不同外植体的比较** 以实生苗的上胚轴或下胚轴为外植体时, 产生愈伤组织与不定芽的能力明显比休眠芽好。实生苗下胚轴产生愈伤组织的能力最强, 而上胚轴则产生不定芽的能力最强。

在休眠芽及实生苗的上胚轴与下胚轴接种到培养基上时, 会有少量褐变, 在培养基上加入活性炭能抑制褐变, 浓度以 0.5% 较佳。

表 1 不同激素对外植体培养的影响

Table 1 Effects of auxins on callus and adventitious bud formations

激素 Auxin (mg L <sup>-1</sup> )	上胚轴 Epicotyl		下胚轴 Hypocotyl		休眠芽 Dormant bud	
	愈伤组织	不定芽	愈伤组织	不定芽	愈伤组织	不定芽
	Callus* (%)	Budding ratio**	Callus* (%)	Budding ratio**	Callus* (%)	Budding ratio**
1 无激素 Auxin free						
2 NAA 1.0		1.00 ± 0.56				
3 NAA 2.0		2.05 ± 0.51				
4 2,4-D 1.0	90		95		80	
5 2,4-D 2.0	95		100		85	
6 BA 2.0	75	3.20 ± 0.41	85	2.40 ± 0.50	80	1.30 ± 0.47
7 BA 3.0	80	5.70 ± 1.03	90	4.35 ± 0.49	65	3.40 ± 0.50
8 BA 4.0	95	4.50 ± 0.76	95	3.15 ± 0.37	70	2.40 ± 0.50
9 2,4-D 2.0+BA 3.0	100	3.60 ± 0.31	100	3.25 ± 0.44	85	1.10 ± 0.31
10 BA 3.0+NAA 0.2	70	7.50 ± 0.51	85	6.30 ± 0.47	50	5.25 ± 0.44
11 2,4-D 2.0+BA 3.0+NAA 0.2	95	6.35 ± 0.49	95	4.90 ± 0.60	85	3.15 ± 0.37

外植体统计个数为 20 个, \*愈伤组织的形成率是指形成愈伤组织的外植体数占总外植体数的百分比; \*\*不定芽增殖系数是指外植体产生不定芽个数与外植体数之比。20 explants were used.

\*Percentage of explants with calluses in all explants examined. \*\*Ratio of the adventitious bud number to explant number.

## 2.2 愈伤组织和不定芽的继代培养

**愈伤组织的继代增殖** 将初代培养所得的愈伤组织切成 0.3 cm 左右的方块接种到含有不同激素的 MS 继代培养基中, 50 d 时统计实验结果(表 2)。当培养基中只含有 2,4-D 时, 没有不定芽形成, 但愈伤组织繁殖速度快。BA 有利于愈伤组织形成芽, 其浓度以 2.0 mg L<sup>-1</sup> 最佳, 产生不定芽的系数可达 5.9, 并有 80% 的外植体产生新愈伤组织。培养基中只有 NAA 时, 愈伤组织不增殖, 只有少量的不定芽形成。当 BA 和 NAA 组合使用时, 能明显地促进芽的形成。在 MS + 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA 时, 芽的增殖系数可达 7.10, 同时有 60% 的愈伤组织产生新的愈伤组织(图版 I:4)。

**不定芽的继代增殖** 将初代培养所得的不定芽切割成单芽后接种到含有各种激素的 MS 培养基上, 45 d 统计实验结果(表 2)。当培养基中只有 2,4-D 时, 所有材料切口处均产生愈伤组

织。当培养基中只有 BA 时, 能产生较多的不定芽, 浓度以  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  时较佳, 不定芽的增殖系数可达 5.5, 同时有 50% 的材料产生愈伤组织; 但 BA 浓度为  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  时, 有 90% 的材料会产生愈伤组织。当培养基中只有 NAA 时, 产生少量的根和少量新芽, 但无愈伤组织形成。在  $\text{MS} + 2.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA} + 0.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$  的激素组合中, 芽的增殖倍数可达 6.30 倍, 同时有少量根形成, 15% 的材料产生愈伤组织。将芽切成多段后再继代到此种培养基上能产生相同倍数的不定芽、愈伤组织和少量根。

表 2 不同激素对继代培养的影响

Table 2 Effects of auxins on callus and adventitious bud formation in subculture by calluses after 50 days and by adventitious buds after 45 days

激素 Auxin ( $\text{mg L}^{-1}$ )	愈伤组织 Callus		不定芽 Adventitious bud	
	愈伤组织 Callus (%)	不定芽 Budding ratio	愈伤组织 Callus (%)	不定芽 Budding ratio
1 无激素 Auxin free		$1.10 \pm 0.64$		$0.70 \pm 0.47$
2 NAA 0.2		$1.75 \pm 0.44$		$0.95 \pm 0.60$
3 NAA 0.5		$2.25 \pm 0.44$		$1.25 \pm 0.44$
4 NAA 1.0		$2.90 \pm 0.72$		$2.30 \pm 0.47$
5 2,4-D 1.0	100		100	
6 2,4-D 2.0	100		100	
7 BA 1.0	50	$4.05 \pm 0.76$	20	$4.40 \pm 0.50$
8 BA 2.0	80	$5.90 \pm 0.64$	50	$5.50 \pm 0.51$
9 BA 3.0	100	$3.40 \pm 0.50$	90	$3.20 \pm 0.41$
10 BA 2.0+NAA 0.2	60	$7.10 \pm 0.72$	15	$6.30 \pm 0.47$

Explanations are as in Table 1.

表 3 不同培养基及激素对根诱导的影响

Table 3 Effects of 1/2MS and MS with different auxins on rooting of adventitious buds from subculture calculated after 30 days

激素 Auxin ( $\text{mg L}^{-1}$ )	生根数 No. of root	
	1/2MS	MS
1 无激素 Auxin free	$1.90 \pm 0.45$	$1.05 \pm 0.51$
2 NAA 0.2	$4.00 \pm 0.56$	$3.25 \pm 0.44$
3 NAA 0.5	$7.50 \pm 0.51$	$4.80 \pm 0.62$
4 NAA 1.0	$5.40 \pm 0.50$	$4.05 \pm 0.60$
5 IBA 0.2	$3.85 \pm 0.49$	$3.40 \pm 0.50$
6 IBA 0.5	$5.00 \pm 0.46$	$4.35 \pm 0.49$
7 IBA 1.0	$4.60 \pm 0.52$	$4.15 \pm 0.59$
8 NAA 0.2+IBA 0.2	$4.90 \pm 0.64$	$3.95 \pm 0.60$
9 NAA 0.5+IBA 0.2	$6.15 \pm 0.81$	$4.40 \pm 0.50$
10 NAA 0.5+IBA 0.5	$6.60 \pm 0.50$	$5.50 \pm 0.51$
11 NAA 0.5+1.0% AC	$7.20 \pm 0.41$	$5.85 \pm 0.59$

AC: 活性炭 Active carbon

### 2.3 生根诱导培养

将继代培养中所得到的 1—2 cm 高的不定芽接种到 MS 或 1/2MS 并附加激素 NAA、IBA 的培养基中, 10 d 左右可生根, 30 d 时统计结果(表 3)。添加激素比不添加激素的生根效果好, 1/2MS 培养基的生根效果比 MS 好。NAA 的生根效果比 IBA 好。在  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 最佳浓度时补充 IBA 并不能增加生根效果, 反而对产生根的数量起抑制作用, 但对壮苗有一定的促进作用。1.0% 的活性炭能加速根的形成与生长。

### 2.4 试管苗移栽

当生根试管苗长到 3—4 cm 高时, 将试管苗在室温下再培养一周, 打开瓶塞炼苗 2—3 d, 从瓶中取出试管苗, 洗去根部的培养基, 移入含 2 份塑料泡沫、2 份椰糠和 1 份洗净的河沙混和的基质中, 保持足够的湿度, 成活率较高, 在盆栽的 50 棵试管苗中, 有 46 棵成活, 成活率达 92%。

## 3 小结

多年生木本植物的组织培养较难, 特别是试管苗的出根困难<sup>[10]</sup>, 木兰科植物在愈伤组织诱导、不定芽产生、生根等方面均较难。本文通过对深山含笑的组织培养, 不但繁殖速度较快, 而且生根也较容易(图版 I:5)。这说明只要培养基适合, 一些木本植物能象草本植物一样

进行大规模生产, 并利用组培技术进行种质保存。

在植物的组织培养中, 从外植体产生愈伤组织, 再由愈伤组织产生不定芽后生根壮苗产生突变的可能性较大<sup>[11]</sup>。在以繁殖优良品种为目的时, 不经过愈伤组织阶段而由外植体直接出芽并进行试管内扦插能解决好这个问题, 深山含笑可采用试管内扦插这种方式进行快速繁殖。

### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 黎京度, 余诗群. 二乔木兰茎段培养成完整植株 [J]. 植物生理学通讯, 1988, (5):49-50.
- [3] 刘敏, 舒金生. 景天、白兰花和雪松的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1983, (6):38.
- [4] 张林. 广玉兰组织培养和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(4):285.
- [5] Merkle S A, Sommer H E. Somatic embryogenesis in tissue culture of *Liriodendron tulipifera* [J]. Can J For Res, 1986, 16:420-422.
- [6] Merkle S A, Wiecho A T. Somatic embryogenesis in three *Magnolia* species [J]. J Amer Hort Sci, 1990, 115(5): 858-860.
- [7] Merkle S A, Watson-Pauley B A. Regeneration of bigleaf *Magnolia* by somatic embryogenesis [J]. HortSci, 1993, 28 (6):473-479.
- [8] 叶桂艳. 中国木兰科树种 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996, 103-105.
- [9] Murashige T, Shoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. Physiol Plant, 1962, 15:473-497.
- [10] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1986, 24-74.
- [11] 曹改义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1993, 60.

### 图版说明

1. 上胚轴在 MS 附加 2.0 mg L<sup>-1</sup> NAA 培养基上诱导出芽, 无愈伤组织形成;
2. 下胚轴在 MS 附加 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 培养基上诱导出愈伤组织, 无芽形成;
3. 休眠芽在 MS 附加 3.0 mg L<sup>-1</sup> BA 和 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA 培养基上同时诱导出不定芽和愈伤组织;
4. 愈伤组织在 MS 附加 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 和 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA 培养基上继代培养诱导出不定芽并形成新的愈伤组织;
5. 有根试管苗。

### Explanation of plate

1. Shoot from epicotyl explant of seedlings cultured on MS medium containing only 2.0 mg L<sup>-1</sup> NAA. No callus was observed;
2. Calluses from hypocotyl explant of seedlings cultured on MS medium containing only 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. No shoot was observed;
3. Shoots and calluses from dormant bud explant cultured on MS medium containing 3.0 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA;
4. Shoots and new calluses subcultured from calluses on MS medium containing 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA;
5. Plantlet with roots.