

紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代的离体繁殖

傅旭阳^{1,2} 孙卫邦^{1,*}

¹中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204; ²中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要 当年8月份至次年3月份采集紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代优良单株的顶芽和侧芽, 置于H+0.25 mg·L⁻¹ 6-BA+0.125 mg·L⁻¹ NAA+0.10 mg·L⁻¹ KT+0.05 mg·L⁻¹ IAA上培养, 不定芽诱导率可达115%; 诱导的不定芽在H+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ KT培养基中增殖及生长较好。经过壮苗后的芽条在H+2.8 mg·L⁻¹ NAA上的生根率可达100%, 且单株根数多, 芽条生长健壮。间苯三酚(phloroglucinol)明显促进根的发生, 但对根的后期生长有一定的抑制效应。组培苗移栽至红土:腐殖土:珍珠岩=1:1:1的混合基质中, 60 d时成活率可达90%左右。

关键词 紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂); 杂种F₁代; 离体培养

In vitro Culture of Hybrid F₁ of *Michelia crassipes* Law (♀) × *Michelia calcicola* C. Y. Wu ex Law et Y. F. Wu (♂)

FU Xu-Yang^{1,2}, SUN Wei-Bang^{1,*}

¹Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; ²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract The top buds and axillary buds of the hybrid F₁ saplings of *Michelia crassipes* Law (♀) × *Michelia calcicola* C. Y. Wu ex Law et Y. F. Wu (♂) were collected from August to next March and cultured on the medium H+0.25 mg·L⁻¹ 6-BA+0.125 mg·L⁻¹ NAA+0.10 mg·L⁻¹ KT+0.05 mg·L⁻¹ IAA, and the rate of adventitious buds reached about 115%. The adventitious buds were cultured on the medium H+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ KT, the proliferation and growth were better. When the shoots were cultured on medium H+2.8 mg·L⁻¹ NAA, the rooting percentage was 100%. Phloroglucinol could greatly promote the shoot rooting, but it might restrain the root elongation. The well-rooted shoots were transplanted into composts (red soil, humus and perlite mixed with same volume) and the survival rate reached 90% after 60 days.

Key words *Michelia crassipes* Law (♀) × *Michelia calcicola* C. Y. Wu ex Law et Y. F. Wu (♂); hybrid F₁; *in vitro* culture

木兰科植物在我国自然分布的有11属, 130种, 占世界总属的73%, 总种的37% (黎明和马焕成2003)。紫花含笑(*Michelia crassipes* Law)和钙土含笑(*Michelia calcicola* C. Y. Wu ex Law et Y. F. Wu)均为观赏价值较高的常绿木兰科含笑属植物, 两者在形态上差异很大。前者的株型紧凑, 多呈灌木状, 叶片较小, 花紫色、小而芳香, 已被广泛栽培应用; 后者为小乔木, 叶片大, 花黄色、大而芳香。为了深入利用木兰科植物资源, 培养更具观赏价值的新品种, 我们于2001年以紫花含笑为母本与钙土含笑进行人工杂交, 获得了几粒杂交种子, 常规播种后获得杂种F₁代幼苗并进行露地栽培, 植株生长发育良好。木兰科植物的营养繁殖多以嫁接和压条为主, 扦插和组培生根甚为困难。目前, 有关木兰科植物的离体

培养仅有含笑属(紫花含笑和钙土含笑均未见报道)、木兰属、鹅掌楸属以及拟单性木兰属的一些种类有过报道(曾宋君等2000; 柳蔓琼和梁士观1985; 黎京度和余诗群1988; 张林1992; 刘贤旺等1997; 陈金慧等2002; 苏梦云和姜景民2004; 陈芳等2005)。为了尽快实现紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代的开发, 为其大量繁殖作技术准备, 并为其它木兰科植物的组织培养和快速繁殖提供参考, 两年多来我们选择紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代生长健壮的单株, 开展了其离体繁殖技术研究, 着重解决生根难的问

收稿 2005-11-15 修定 2006-04-20

资助 中国科学院知识创新工程西南基地创新基金(I-29)。

* 通讯作者(E-mail: wbsun@mail.kib.ac.cn, Tel: 0871-5223622)。

题,建立了完整的离体繁殖体系,现报道如下。

材料与方法

以紫花含笑(*Michelia crassipes* Law) (♀)×钙土含笑(*Michelia calcicola* C. Y. Wu ex Law et Y. F. Wu) (♂)杂种F₁代生长健壮的三年生单株为材料。于不同生长季节采集当年新生的顶芽或带腋芽的茎段为外植体,切成约2 cm长茎段,用自来水冲洗2~3 h后,先用75%酒精浸泡30 s,再用0.1%升汞灭菌2~5 min,无菌水冲洗5~6次,然后在无菌操作台上,去除芽的外层苞片并接种到不同培养基上进行诱导培养,比较不同培养基对外植体诱导的影响及不同采集季节外植体的污染情况。将诱导产生的不定芽转移到添加不同种类及浓度生长调节物质的H培养基(Bourgin和Nitsch 1967)上进行增殖培养,比较不同培养基组成对芽增殖的影响,以筛选适宜的增殖培养基。选取高3 cm左右的增殖培养芽条,在MS+6-BA 0.10 mg·L⁻¹(单位下同)+NAA 0.05培养基中壮苗培养30 d后,转移到以1/2MS、1/4MS和H为基本培养基添加不同生长调节物质及浓度的培养基中诱导生根。根长出2 cm左右,株高约3 cm时,生根苗连瓶置于阴凉处适应1 d,然后取出小苗用自来水洗净基部的培养基后,移栽至红土:腐质土:珍珠岩=1:1:1的混合基质中,浇透水后覆膜保湿并遮光,观察统计移栽成活情况。

不定芽诱导的每个处理20个芽条,继代培养和生根培养的每个处理10个芽条,所有处理均重复3次,取其平均值进行分析比较。培养基均用0.7%琼脂固化,pH 5.8,以蔗糖为碳源,含糖量为2%。培养条件为:温度(25±2)℃,光照12 h·d⁻¹,光强30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹。

实验结果

1 不定芽的诱导

图1和表1显示:

(1) 2、6、9、12月份选取当年新抽出的嫩枝,每次采集60个顶芽或带腋芽的茎段作为外植体,灭菌后接种于H+6-BA 0.25+NAA 0.125+KT 0.10+IAA 0.05上进行诱导培养,40 d后统计其污染率、死亡率、不定芽诱导率的结果表明,9月份和12月份采集的外植体的污染率低,不定芽

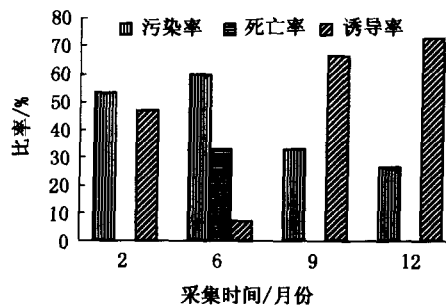


图1 采集季节对不定芽诱导的影响

Fig.1 Shoot inducement of the explants collected from different seasons

表1 附加生长调节物质对不定芽诱导的影响(H培养基)

Table 1 Effects of different growth regulator combinations on adventitious bud induction

生长调节物质浓度 / mg·L ⁻¹				不定芽 诱导率 / %	愈伤组织 诱导率 / %
6-BA	NAA	KT	IAA		
0	0	0	0	60	0
0.25	0.125	0.10	0.05	115	55

的诱导率在75%以上,6月份的死亡率和污染率都比较高,而2月份采集的外植体未见死亡,但其污染率在50%以上(图1)。在昆明地区温度和湿度较高的4月份至8月份,植物生长发育旺盛,小芽裸露在外,其表面附着有较多的病原体,消毒困难;9月份至次年3月份气候干燥凉爽,是休眠芽形成期,芽外包裹着数层苞片,病菌不易侵入到芽内,外植体容易灭菌。因此,我们认为在昆明地区以当年9月份至次年3月份采集外植体为宜,这样有利于不定芽的诱导。

(2)外植体接种到以H为基本培养基添加不同浓度6-BA、NAA、KT和IAA的培养基中培养约14 d,外植体基部开始出现愈伤组织,40 d后不定芽开始萌发生长,60 d时统计的结果(表1)表明,其不定芽诱导率比不加生长调节物质高出40%以上,愈伤组织诱导率达到55%,不加生长调节物质的未见愈伤组织的发生。据此认为,基本培养基H能诱导紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代不定芽的产生,添加一定浓度的生长调节物质后可提高其不定芽诱导率。

2 不定芽的继代培养

将初代培养得到的不定芽切割成单节后接种

表2 不同种类及浓度生长调节物质对不定芽继代培养的影响(H培养基)

Table 2 Effects of different growth regulators and their concentrations on subculture of adventitious buds

生长调节物质浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				增殖倍数	生长状况
6-BA	KT	GA	IBA		
0.30	0.30	0	0.20	5.60	叶黄绿色, 微卷
0.30	0	0.30	0.20	3.40	叶嫩绿色, 微卷
0.30	0.30	0	0	4.50	叶嫩绿色, 大而伸展
0.30	0	0.30	0	4.80	叶嫩绿色, 微卷
0.30	0	0	0.10	3.60	叶嫩绿色, 大而伸展
0.60	0	0	0.20	3.40	叶嫩绿色, 大而伸展
0.20	0	0	0.05	6.20	叶绿色, 茎叶脆化
0.20	0.20	0	0.10	3.00	叶黄绿色, 茎叶脆化
0.20	0.50	0	0.20	4.50	叶绿色 微卷
0.20	1.00	0	0.50	2.00	叶绿色 微卷
0.50	0	0	0.10	2.90	叶绿色, 微卷
0.50	0.20	0	0.05	2.50	叶绿色, 微卷
0.50	0.50	0	0.50	2.80	叶绿色, 微卷
0.50	1.00	0	0.20	2.40	叶绿色, 微卷

到含有不同种类及浓度生长调节物质配比的 H 培养基中; 共 14 个处理, 约 40 d 芽的增殖达到最高峰。统计(表 2)显示, 细胞分裂素类似物/生长素类似物的比例对不定芽增殖的影响最大, 比例大的会有较高的增殖率, 但易出现脆化的不定芽; 丛芽随着 6-BA 浓度的增加而增多, 但当 6-BA 浓度 $>0.30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 节间缩短明显, 腋芽减少, 实际增殖倍数减少; 添加 KT 能促进不定芽的增殖效果, 但当 6-BA $\geq 0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 这种作用变得不明显; KT 与 GA 均可促进不定芽增殖, 但有 IBA 时 KT 的效果更显著。由表 2 可知, H+6-BA 0.30+KT 0.30 是紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种 F_1 代较适宜的增殖培养基。

3 生根诱导培养

增殖的丛芽切割成单芽后接种到壮苗培养基 MS+6-BA 0.10+NAA 0.05 中培养 30 d 后, 选择生长健壮, 高约 2.5 cm 芽条转入以 1/4MS、1/2MS 或 H 为基本培养基并添加不同生长调节物质和间苯三酚(phloroglucinol, PG)的培养基中进行生根诱导培养, 共 24 个处理。约 18 d 芽条开始生根, 40 d 时统计生根的结果(表 3、4)表明, IAA 对根的诱导作用不显著, 而 NAA、IBA 及 PG 的作用则非常明显。较高浓度 NAA 中的生根率高, 且单株生根多, 但浓度过高的 NAA 对根生长不利;

在培养基中添加 PG 后能显著提高各种生长调节物质水平下的生根率, 且单株生根更多, 根径粗壮(表 3、4); NAA 和 IBA 对生根诱导培养的作用基本相当, 二者可相互取代(表 3)。比较 3 种培养基(H、1/2 MS 和 1/4MS)对根诱导的结果显示, H 培养基的生根诱导效果优于 1/2MS 和 1/4MS 培养基(表 4)。根据以上结果可以认为, 适宜紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种 F_1 代生根的培养基是 H+NAA 2.80。

表3 不同种类和浓度生长调节物质对比杂种 F_1 代生根诱导的影响(H培养基)Table 3 Effects of different growth regulators and their concentrations on rooting of the hybrid F_1

生长调节物质浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			生根率 / %	平均根数 / 条
NAA	IBA	IAA		
1.00	0	0	30	0.50
1.00	1.00	0	100	2.30
1.00	0	1.00	0	0
0.50	0.50	0.50	20	0.20
2.00	0	0	40	0.70
2.40	0	0	100	3.60
2.80	0	0	100	4.30
3.20	0	0	100	3.90
3.60	0	0	100	4.40
4.00	0	0	100	4.30

表4 培养基种类和间苯三酚对杂种F₁代生根的影响Table 4 Effects of different media and phloroglucinol on rooting of the hybrid F₁

培养基	生长调节物质浓度 /mg·L ⁻¹			生根率 /%	根数 / 条
	NAA	IBA	间苯三酚		
H	0.40	0.60	1.00	60	1.80
	0.60	0.40	1.00	100	3.30
	0.50	1.50	1.00	100	3.60
	1.50	0.50	1.00	100	3.40
1/4MS	0.40	0.60	1.00	70	2.10
	0.60	0.40	1.00	65	1.80
	0.50	1.50	1.00	100	3.20
	1.50	0.50	1.00	85	1.90
1/2MS	0.40	0.60	1.00	85	1.80
	0.60	0.40	1.00	60	1.90
	0.50	1.50	1.00	100	3.00
	1.50	0.50	1.00	65	2.10
	0.50	1.00	0	55	1.80
	1.00	0.50	0	85	2.50

4 试管苗移栽

将植株高度在4 cm左右、生根良好的瓶苗置于阴凉处适应1 d后, 轻轻取出小苗, 用自来水洗净基部的培养基, 移栽至红土:腐质土:珍珠岩=1:1:1的混合基质中, 浇透水后以塑料薄膜覆盖, 遮光约50%。14 d左右新叶开始萌发生长, 此时移去塑料薄膜和遮光材料后, 幼苗即逐渐生长。移栽60 d时的成活率可达90%左右, 株高达30 cm左右时即可盆栽(图未列出)。

讨 论

一般说来, 木本植物的组织培养生根都比较困难, 原始的木兰科植物的组织培养也存在褐化、玻璃化以及生根难等问题(刘玉壶2004)。近年来有关木兰科植物组织培养的研究报道逐渐增多, 其中有落叶木兰属植物(张林1992; 刘贤旺等1997; 黎明和马焕成2003)和鹅掌楸属植物(陈金慧等2002), 也有常绿类群(柳蔓琼和梁士观1985; Luo和Sun 1996; 曾宋君等2000; 苏梦云和姜景民2004; 陈芳等2005), 但迄今适宜木兰科植物规模化生产的组培快繁技术尚未见报道。我们在紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代离体培养研究中, 采用低盐的1/2MS、1/4MS和H培

养进行培养时发现, 当培养温度超过30℃时其褐化现象呈明显上升趋势, 而在20~25℃培养时其褐化现象较弱, 并不影响芽条的正常生长。在紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代的生根诱导培养中还发现, 其生根需要较高浓度的NAA (2.40~4.00 mg·L⁻¹), 在低浓度的NAA培养基中附加一定浓度的IBA也能较好的诱导生根。据报道辅助物间苯三酚可促进木本植物生根(李浚明2002), 本文结果显示, 间苯三酚对紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代不定根的诱导亦有明显的促进作用, 生根整齐, 根径粗壮, 但对根的后期生长有一定的抑制作用, 同时还会诱导愈伤组织的发生。一些研究还显示, 低盐环境有利于木兰属杂种的离体培养(Biedermann 1987), 本文结果表明, 低盐的H培养基比MS培养基更适合紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代离体培养, 基本解决了这组杂种F₁代离体培养中褐化和生根问题, 从而为其批量繁殖和开发利用建立了前提。

参考文献

- 陈芳, 陈强, 陈娟(2005). 云南拟单性木兰的组织培养. 植物生理学通讯, 41 (4): 494
- 陈金慧, 施季森, 诸葛强(2002). 杂交鹅掌楸的不定芽诱导及植株再生. 植物生理学通讯, 38 (5): 459
- 黎京度, 余诗群(1988). 二乔木兰茎段培养完整植株. 植物生理学通讯, (5): 49~50
- 黎明, 马焕成(2003). 木兰科植物无性繁殖研究概况. 西南林学院学报, 23 (2): 92~96
- 李浚明编译(2002). 植物组织培养教程. 第2版. 北京: 中国农业大学出版社, 270
- 刘贤旺, 杜勤, 赖学文, 罗光明, 徐志杰, 姚振生, 刘勇, 葛菲(1997). 凹叶厚朴组织培养的研究. 江西林业科技, (2): 1~4
- 刘玉壶(2004). 中国木兰. 北京: 科学出版社, 370~372
- 柳蔓琼, 梁士观(1985). 火力楠茎段组织培养. 植物生理学通讯, (1): 37
- 苏梦云, 姜景民(2004). 乐东拟单性木兰茎段愈伤组织诱导与褐变控制的研究. 林业科学研究, 17 (6): 757~762
- 曾宋君, 彭晓明, 曾庆文(2000). 深山含笑的组织培养与快速繁殖. 热带亚热带植物学报, 8 (3): 264~268
- 张林(1992). 广玉兰组织培养和植株再生. 植物生理学通讯, 28 (4): 285
- Biedermann IEG (1987). Factors affecting establishment and development of magnolia hybrids *in vitro*. Acta Hort, 212: 625~627
- Bourgin JP, Nitsch JP (1967). Obtention de *Nicotiana* haploids à partir d'étamines cultivées *in vitro*. Ann Physiol Veg, 9: 377~382
- Luo GF, Sun WB (1996). A brief report on micropropagation of a rare ornamental shrub—the red form of *Magnolia delavayi*. Magnolia, 59 (1): 22~27