

乐昌含笑组织培养过程中根的诱导

吴月燕^{*}, 刘秀莲, 汪财生

(浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100)

摘 要: 以乐昌含笑为材料, 采用 6-苄氨基嘌呤 (6-BA)、萘乙酸 (NAA)、吲哚丁酸 (BA) 三因素二次正交旋转组合设计, 对组织培养过程中根的诱导进行了 3 种生长调节剂不同配比的对比试验。结果表明: 在 23 个组合中, 较低 6-BA、NAA 和 BA 的浓度能促进乐昌含笑根的诱导和生长; 外植体在 $1/2MS + 6-BA\ 0.40\ mg \cdot L^{-1} + BA\ 0.60\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.80\ mg \cdot L^{-1}$ 培养基上出根率和生根数分别达到 50% 和 1.5 条以上, 高于其它处理, 而且根系生长良好。

关键词: 乐昌含笑; 根; 诱导; 生长调节剂

中图分类号: S 681 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-0991-04

Root Induction During Tissue Culture of *Michelia chapensis* Dandy

WU Yue-yan^{*}, LU Xiu-lian, and WANG Cai-sheng

(College of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

Abstract: Effects of 6-BA, NAA and BA alone or combination at various concentrations on the root induction of *Michelia chapensis* Dandy during tissue culture were investigated. The results showed that low concentrations of 6-BA, NAA and BA were suitable for the root induction and growth of *Michelia chapensis* Dandy. The root formation rate was more than 50%, while the root number of each plant was more than 1.5 with grown plantlets when the explants were transferred to the $1/2MS$ medium containing $0.40\ mg \cdot L^{-1}$ 6-BA and $0.60\ mg \cdot L^{-1}$ BA and $0.80\ mg \cdot L^{-1}$ NAA. Meanwhile, it was observed that the root developed well.

Key words: *Michelia chapensis* Dandy; Root; Inducement; Plant growth regulator

乐昌含笑是著名木本观赏花卉, 但其自然结实率低, 采种困难。近几年开展了无性繁殖的研究 (黎明和马焕成, 2003; 杜凤国等, 2006), 其中组织培养和快速繁殖为有效途径之一。作者在芽和愈伤组织诱导方面已有一些探索 (吴月燕和袁东明, 2001), 发现乐昌含笑组织培养过程中生根较为困难, 对其根诱导过程中培养基的选择、生长调节剂种类及浓度配比、添加物增加等方面进行了试验, 获得了生根培养的有效途径。本文主要阐述乐昌含笑根诱导过程中生长调节剂的配比, 以期为乐昌含笑组织培养和快速繁殖提供理论依据。

1 材料与方法

所用材料为浙江万里学院校园内 8 年生乐昌含笑 (*Michelia chapensis* Dandy) 带芽茎段。在秋季或春季天气晴朗时采 2~3 年生枝发生的新梢近梢尖的嫩茎带芽茎段, 放入 3~5℃ 冰箱, 4~6 d 后取出消毒。用自来水冲洗 4~5 h, 20% 洗洁精浸泡 30~40 min, 无菌水冲洗 3 次; 然后用 70% 酒精消毒 30~40 s, 无菌水冲洗 3 次; 最后用 0.1% 升汞消毒 5~10 min, 无菌水洗 6 次。

收稿日期: 2007-03-23; 修回日期: 2007-05-30

基金项目: 宁波市科技局资助项目 (2004A100015)

^{*} E-mail: wyy2000@zwu.edu.cn

浙江万里学院王国良教授、王忠华博士、王海丽老师在试验过程中给予了支持, 在此表示感谢。

将已消毒的芽接种于 $MS + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导培养基上，待不定芽萌发至 1~2 cm 长时转入增殖培养基，每隔 35 d 继代 1 次，连续转接 13 代后转入生根培养基。

生根基本培养基为 $1/2MS$ 。在预备试验的基础上，采用 6-苄氨基嘌呤（6-BA, X_1 ）、萘乙酸（NAA, X_2 ）、吲哚丁酸（BA, X_3 ）三因素二次正交旋转组合设计（唐启义和冯明光，2002），各因子设置 5 个水平，共 23 个处理（表 1），每处理 30 瓶，3 次重复。所有处理先进行暗培养 10 d。从不定芽转入生根培养基起，每隔 5 d 调查生根状况和植株的生长状况，至 60 d 时统计每个处理的平均出根率和平均根数。所获得的数据用 DPS 数据处理系统进行统计分析。

以上培养温度为 (23 ± 2) ，光照强度 $2\,000 \text{ lx}$ ；除生根暗培养阶段外，光照 $11 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 不同生长调节剂配比对乐昌含笑生根的影响

乐昌含笑生根较为困难，整个生根过程时间长，根的数量少。在 23 个组合中，A15~A23 组合的生长调节剂配比为 $6\text{-BA } 0.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，平均出根率和平均根数分别达 50% 和 1.5 根以上，高于其它处理，根系生长良好（表 1）。

表 1 不同生长调节剂及配比对乐昌含笑生根的影响
Table 1 Effect of different plant growth regulators and compositions on the root formation of *M. ichelia chapensis* Dandy

代号 Code	水平 Level			生长调节剂 Plant growth regulator concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			出根率 Rate of root- ing (%)	每株根数 Number of root per tree	基部开始膨 大天数 Days of backbone swelling (d)	根开始形成 天数 Days of rooting formation (d)
	X_1 (6-BA)	X_2 (NAA)	X_3 (BA)	6-BA	NAA	BA				
A1	1	1	1	0.65	1.30	1.00	0.00	0.00	40	-
A2	1	1	-1	0.65	1.30	0.20	8.90	0.40	39	45
A3	1	-1	1	0.65	0.30	1.00	30.90	1.00	37	50
A4	1	-1	-1	0.65	0.30	0.20	24.10	0.90	39	50
A5	-1	1	1	0.15	1.30	1.00	5.50	0.30	39	45
A6	-1	1	-1	0.15	1.30	0.20	18.20	0.70	39	45
A7	-1	-1	1	0.15	0.30	1.00	32.00	0.60	37	50
A8	-1	-1	-1	0.15	0.30	0.20	39.00	0.80	39	50
A9	-1.6820	0	0	0.00	0.80	0.60	32.80	0.70	37	50
A10	1.6820	0	0	0.80	0.80	0.60	7.00	0.30	35	50
A11	0	-1.6820	0	0.40	0.00	0.60	39.70	1.20	35	45
A12	0	1.6820	0	0.40	1.60	0.60	0.00	0.00	40	-
A13	0	0	-1.6820	0.40	0.80	0.00	39.60	1.30	36	50
A14	0	0	1.6820	0.40	0.80	1.20	0.00	0.00	38	-
A15	0	0	0	0.40	0.80	0.60	62.00	2.20	35	50
A16	0	0	0	0.40	0.80	0.60	57.60	2.00	36	51
A17	0	0	0	0.40	0.80	0.60	55.70	1.70	35	49
A18	0	0	0	0.40	0.80	0.60	61.00	2.00	34	48
A19	0	0	0	0.40	0.80	0.60	61.00	1.50	36	51
A20	0	0	0	0.40	0.80	0.60	64.00	2.10	34	49
A21	0	0	0	0.40	0.80	0.60	66.00	1.90	35	50
A22	0	0	0	0.40	0.80	0.60	52.70	2.00	36	50
A23	0	0	0	0.40	0.80	0.60	52.90	1.60	35	51

在 A1、A12、A14 生根诱导过程中虽然植株基部 35 d 后有膨大现象，但最后植株全部死亡。A2、A5、A6 和 A10 中也出现部分或大部分植株死亡现象；7 种组合中，或者 6-BA 达到 $0.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，

或者 NAA 达到 $1.3 \sim 1.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，或者 BA 达到 $1.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，或者同时达到以上水平，这表明根的诱导过程中这 3 种生长调节剂的浓度都不宜偏高。A9、A11 和 A13 组合中 6-BA、NAA 和 BA 浓度比较适中，但都只有两种生长调节剂配比，平均出根率和平均根数低于 A15 ~ A23，根的质量比 A15 ~ A23 差。A3、A4、A7 和 A8 根的质量也不如 A15 ~ A23，组合虽然有 3 种生长调节剂配比，但浓度偏低或偏高。

用三因素二次正交旋转组合设计的结构矩阵，以 X_1 、 X_2 和 X_3 为决策变量，乐昌含笑的出根率和生根数为目标函数，求出出根率的回归方程为： $Y_{w1} = 59.675 - 5.2507X_1 - 11.719X_2 - 6.873X_3 - 14.008X_1^2 - 13.230X_2^2 - 13.460X_3^2 - 0.075X_1X_2 + 2.725X_1X_3 - 2.800X_2X_3$ ，其中 $F_1 = 1.470 > F_{0.05}$ ， $F_2 = 22.826 < F_{0.05}$ ；生根数的回归方程为： $Y_{w2} = 1.887 - 0.133X_1 - 0.272X_2 - 0.197X_3 - 0.460X_1^2 - 0.442X_2^2 - 0.424X_3^2 - 0.088X_1X_2 + 0.013X_1X_3 - 0.113X_2X_3$ ，其中 $F_1 = 2.378 > F_{0.05}$ ， $F_2 = 14.422 < F_{0.05}$ 。

以上两个方程失拟项 F 检验结果 F_1 不显著，统计量 F_2 对回归方程 F 检验显著，说明回归方程在水准上显著，可以用来预测。

2.2 不同生长调节剂浓度对乐昌含笑生根的影响

6-BA、NAA 和 BA 对乐昌含笑根的诱导存在差异，通过微机模拟分析，获得 3 种生长调节剂的单因子效应（其他因子为零水平）。表 2 表明，6-BA 在 0.000 水平时出根率和生根数达到最高（59.675% 和 1.887 根）；在 -1.682 水平（不添加 6-BA）时都很低，但在 -1.341 水平时就大幅度提高，表明乐昌含笑根的诱导对低浓度的 6-BA 比较敏感；-1.341 ~ 1.000 水平范围内出根率和生根数基本保持稳定，表明在此范围内 6-BA 浓度增加对根的诱导作用不大；当水平达到 1.341 时出根率和生根数急剧下降，表明 6-BA 浓度偏高对生根有抑制作用。NAA 在 -0.500 水平出根率和生根数达到最高（62.227% 和 1.913 根）；在 -1.682 水平（不添加 NAA）时较高；当 NAA 水平提高后增加的幅度不大，而当水平达到 1.341 时急剧下降。BA 对出根率和生根数的影响趋势同 NAA，表明在培养基中添加 NAA 和 BA 中的一种，对根系就有促进作用，但浓度偏高都会抑制生根。故 6-BA、NAA 和 BA 对根的诱导既互相制约，又相对独立；在低浓度水平下，6-BA 对乐昌含笑生根的效应大于 NAA 和 BA。图版，1 为转入生根培养基前的胚状苗，图版，2 为外植体转入 $1/2\text{MS} + 6\text{-BA } 0.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上培养 60 d 后的生根状况。

表 2 6-BA、NAA 和 BA 不同水平对乐昌含笑出根率和生根数的影响

Table 2 Effect of various level of 6-BA, NAA and BA on the rates and the number of rooting of *Michelia chapensis* Dandy

水平 Level	出根率 Rate of rooting (%)			每株根数 Number of root per tree		
	X_1 (6-BA)	X_2 (NAA)	X_3 (BA)	X_1 (6-BA)	X_2 (NAA)	X_3 (BA)
-1.682	28.883	41.962	33.162	0.587	1.095	1.018
-1.341	41.528	51.600	44.689	1.061	1.458	1.388
-1.000	50.917	58.163	53.087	1.428	1.718	1.660
-0.500	58.798	62.227	59.746	1.773	1.913	1.880
0.000	59.675	59.675	59.675	1.887	1.887	1.887
0.500	53.548	50.508	52.873	1.773	1.641	1.683
1.000	40.416	34.725	39.342	1.428	1.173	1.266
1.341	27.448	20.172	26.258	1.061	0.728	0.861
1.682	11.224	2.545	10.045	0.587	0.179	0.356

3 结论与讨论

乐昌含笑组织培养过程中，器官分化和形态发生都有一定的难度，尤其不易生根。其根诱导困难

的原因很多,包括植物体内可能含有较多芳香物质和植物精油等。乐昌含笑不定根的发生虽然受多种内外因素的影响,但生长调节剂在根原基形成与生长中起关键作用,尤其内源IAA含量变化关系密切。有研究(李明等,2000; Hidehiro et al., 2005)表明,在一定的BA浓度范围内,BA浓度增加,内源IAA含量也随之增加;外源NAA能促进内源IAA的合成,有利于根的形成;6-BA能加强IAA的极性运输,有利于增强IAA的作用;但BA和NAA只在一定的浓度范围内可促进植物内源IAA含量的增高,有利于根的形成,一旦超过这个浓度,内源IAA的含量反而降低,不利于根的形成,高浓度的6-BA也抑制生长素的促进作用(Hidehiro et al., 2005)。本试验的研究结果也证实了这点,生长调节剂BA、IAA和6-BA在较低的浓度范围内,均能促进根的诱导和生长,而较高的浓度均有抑制作用。在本试验中,6-BA对乐昌含笑生根的效应大于NAA和BA,可能是乐昌含笑组织培养过程中生根困难与IAA的极性运输有关。因此,乐昌含笑在生根培养过程中添加适当配比的BA、NAA和6-BA,既能促进内源IAA的合成,又能加强IAA的极性运输,有利于根系形成。

References

- Du Feng-guo, Diao Shao-qi, Wang Huan, Yang De-mao, Sun Shu-guang, Wang Zi-ming, Liu Chun-qiang 2006. Tissue culture of *Magnolia sieboldii* K. Koch. Journal of Northeast Forestry University, 34 (2): 42 - 43. (in Chinese)
- 杜凤国,刁绍起,王欢,杨德冒,孙曙光,王子明,刘春强. 2006. 天女木兰的组织培养. 东北林业大学学报, 34 (2): 42 - 43.
- Hidehiro F K, Yoko O S, Masso T K 2005. Regulation of lateral root formation by auxin signaling in *Arabidopsis*. Plant Biotechnology, 22 (5): 393 - 399.
- Li Ming, Huang Zhuo-lie, Tan Shao-man, Mo Xiao-yong, Lin Hai-qiu, Long Teng 2000. Comparison on the activities and isoenzymes of polyphenol oxidase and indoleacetic acid oxidase of difficult and easy to root eucalyptus species. Forest Research, 13 (5): 493 - 500. (in Chinese)
- 李明,黄卓烈,谭绍满,莫晓勇,林海球,龙腾. 2000. 难易生根桉树多酚氧化酶、吲哚乙酸氧化酶活性及其同工酶的比较研究. 林业科学研究, 13 (5): 493 - 500.
- Li Ming, Ma Huan-cheng 2003. The review of the asexual propagation on Magnoliaceae. Journal of Southwest Forestry College, 23 (2): 92 - 95. (in Chinese)
- 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 - 95.
- Tang Qi-ryi, Feng Ming-guang 2002. DPS[®] data processing system for practical statistics. Beijing: Science Press: 159 - 163. (in Chinese)
- 唐启义,冯明光. 2002. 实用统计分析及其DPS数据处理系统. 北京: 科学出版社: 159 - 163.
- Wu Yue-yan, Yuan Dong-ming 2001. A study conditions of induction and differentiation of buds and callus in tissue culture of *M. icheliachapensis* Dandy. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 13 (Supplement): 14 - 17. (in Chinese)
- 吴月燕,袁东明. 2001. 乐昌含笑离体培养中芽和愈伤组织诱导与分化条件的研究. 浙江农业学报, 13 (增刊): 14 - 17.



图版说明: 1. 胚状苗; 2. 生根状况。

Explanation of plates: 1. Plantlet; 2. Rooting