

# 日本厚朴愈伤组织诱导的研究

付晓云<sup>1</sup>, 李 慧<sup>2</sup>, 于光艳<sup>3</sup>, 周广柱<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学林学院, 辽宁 沈阳, 110161; 2. 北京林业大学 园林学院, 北京 100083; 3. 辽宁省电力勘探设计院, 辽宁 沈阳 110141)

**摘 要:**本试验以 B5 培养基为基本培养基, 采用正交试验比较了不同外植体和激素配比对日本厚朴愈伤组织的诱导影响, 同时研究了光培养和暗培养对愈伤组织诱导的影响, 结果表明: 日本厚朴愈伤组织诱导的最佳外植体是顶芽、最佳愈伤组织诱导培养基为 B5+2,4-D 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L, 最佳的培养方式为暗培养。

**关键词:**日本厚朴; 愈伤组织; 诱导

中图分类号: S722.37      文献标识码: A      文章编号: 1001-7461(2009)01-0071-03

## Callus Induction of *Magnolia obovata*

FU Xiao-yun<sup>1</sup>, LI Hui<sup>2</sup>, YU Guang-yan<sup>3</sup>, ZHOU Guang-zhu<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161;

2. College of Landscape, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

3. Liaoning Provincial Institute of Electric Power Exploration and Design, Shenyang, Liaoning 110141, China)

**Abstract:** Using B5 as a basic medium, orthogonal design was adopted to compare the effects of different explants on callus with different hormones Single-factor method was adopted to compare light or dark culturing. The results indicated that the best culturing conditions were: explant terminal bud, midiu 2,4-D 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L in the dark.

**Key words:** *Magnolia obovata*; callus; induction

日本厚朴(*Magnolia obovata*)木兰科木兰属落叶乔木, 高达 30 m, 小枝紫色, 无毛, 叶倒卵形, 叶柄紫色, 花白色, 芳香, 花径 14~20 cm, 花被 6~12 片, 倒卵形, 外轮 3 片红褐色, 内轮乳黄色。花期在 6~7 月, 果期 9~10 月。原产日本北海道, 我国的青岛、大连、丹东、熊岳、沈阳有栽培。该树种适应性强, 树干通直, 树形优美多姿, 花艳丽芳香, 叶形奇特, 既是珍贵的园林绿化观赏树种, 又是优良的用材树种<sup>[1]</sup>。目前日本厚朴的繁殖以播种、扦插为主。播种繁殖由于气候等原因种子结实差, 繁殖率低, 扦插繁殖生根困难, 而采用组织培养快速繁殖产生试管苗, 在凹叶厚朴<sup>[2]</sup>、厚朴<sup>[3]</sup>、川厚朴<sup>[4]</sup>见报道, 未见日本厚朴的报道。本文以日本厚朴一年生幼苗的顶芽、叶柄、幼叶为外植体, 进行日本厚朴愈伤组织的

诱导, 旨在为日本厚朴的再生体系的建立提供试验材料。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

日本厚朴 1 年生幼苗的顶芽、叶柄、幼叶作为外植体。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体的灭菌 将采回的外植体经过流水反复长时间冲洗, 并用软毛刷刷洗, 后用洗衣粉进行浸泡, 浸泡后在自来水下冲洗 1~2 h。在无菌条件下, 将冲洗干净的外植体放入 70%乙醇溶液中浸 30 s, 再用 0.1%升汞溶液消毒 7 min。

1.2.2 愈伤组织诱导 采用三因素三水平正交设

收稿日期: 2008-04-21 修回日期: 2008-09-08  
基金项目: 沈阳农业大学青年教师基金项目(2006228)  
作者简介: 付晓云, 女, 硕士, 研究方向: 园林植物生理生态与栽培。

计 L<sub>9</sub>, 基本培养基为 B<sub>5</sub>, 蔗糖 30 g, 琼脂 7 g, pH 5.8, 因子水平及正交表见表 1、表 2, 每种培养基接种外植体 20 个, 试验重复 3 次, 接种后密切观察愈伤组织生长情况。

表 1 L<sub>9</sub> 正交设计因子及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design I g · L<sup>-1</sup>

因子	因子 1	因子 2	因子 3
	外植体	2,4-D	NAA
1	叶柄	2.0	0.5
2	顶芽	3.0	1.0
3	叶片	4.0	2.0

表 2 愈伤组织诱导正交设计表

Table 2 Orthogonal design I of elementary culture mg · L<sup>-1</sup>

培养基编号	外植体	2,4-D	NAA
A1	叶柄	2.0	2.0
A2	叶柄	3.0	1.0
A3	叶柄	4.0	0.5
A4	顶芽	2.0	0.5
A5	顶芽	3.0	2.0
A6	顶芽	4.0	1.0
A7	叶片	2.0	1.0
A8	叶片	3.0	0.5
A9	叶片	4.0	2.0

1.2.3 基本培养条件 培养温度为 (24±2)℃, 空气湿度为 60% 左右, 光照强度为 2 000 lx, 光周期为 12 h/d。

1.2.4 光培养和暗培养的对比试验 正交试验完成后, 选择出最佳的启动培养基和最佳外植体, 接种 40 瓶, 接种后取 20 瓶进行暗培养, 剩余 20 瓶进

行正常光培养。试验重复 3 次, 30 d 后统计愈伤组织增长量。

愈伤组织的生长量的测定: 接种前先称取带培养基的空瓶重, 记录数据, 接种后再称取重量, 两次重量之差便是初始接种物的初重量。经过一段时间的培养, 取出培养物转接到已称量好瓶重的新鲜培养基上, 再称量, 记录数据, 初末重量之差, 即为培养物的生长量。

2 结果与分析

2.1 培养基不同激素及浓度对外植体愈伤组织诱导情况

将愈伤组织生长情况列于表 3, 具体情况为: 接种 9 d 后, 观察发现部分外植体的切口处开始膨大。13~16 d 时, 接种在 A4、A5、A6 培养基的顶芽最先诱导出愈伤组织, 其切口膨大处裂开, 并长出一些白色、颗粒状的愈伤组织。之后愈伤组织数量逐渐增多, 体积也逐渐增大, 颜色由白色逐渐变为淡黄绿色, 颗粒增大, 质地变坚硬, 细胞连接致密。17~19 d 时, A1、A2、A3 培养基的叶柄基部的叶脉处也诱导出小颗粒的愈伤组织, 颜色黄白色, 细胞致密, 但其个体比顶芽诱导出小得多。20~22 d, A7、A8、A9 号培养基的少数叶片基部诱导出了小颗粒的愈伤组织, 颜色淡黄白色, 质地、大小与叶柄诱导出的愈伤组织相似, 但没有顶芽诱导出的愈伤组织坚硬。30 d 时对愈伤组织的成愈率情况进行统计, 将分析数据见表 4。

表 3 正交设计愈伤组织生长情况统计表

Table 3 Growth vigour of callus with orthogonal design

培养基编号	外植体	激素种类及浓度/(mg · L <sup>-1</sup> )		愈伤组织形态和生长状态
		2,4-D	NAA	
A1	叶柄	2.0	2.0	较疏松, 半透明, 颗粒极小
A2	叶柄	3.0	1.0	疏松, 淡黄色或半透明, 颗粒小
A3	叶柄	4.0	0.5	稍紧密, 淡黄绿色, 颗粒小
A4	顶芽	2.0	0.5	略疏松, 淡黄绿色, 块稍大
A5	顶芽	3.0	2.0	略紧密, 淡绿色, 块大
A6	顶芽	4.0	1.0	较紧密, 坚硬, 绿色, 块大
A7	叶片	2.0	1.0	较疏松, 半透明, 颗粒极小
A8	叶片	3.0	0.5	疏松, 半透明或淡褐色, 颗粒很小
A9	叶片	4.0	2.0	略疏松, 黄白色, 颗粒小

从表 4 的外植体成愈率可以看到, A6 号培养基的外植体成愈率为 66.7, 数值最高。K 值, 如 K<sub>1</sub> 表示 A1 参加 3 次试验的指标之和。根据 k 值大小可以比较得出每个因素的最佳水平, k 值最大即为最佳水平。从表 4 可以看出, 外植体因素最佳水平为 K<sub>2</sub>, 2,4-D 因素最佳水平为 K<sub>3</sub>, NAA 因素最佳水平为 K<sub>2</sub>, 因此最佳组合为外植体顶芽、2,4-D4.0 mg/

L, NAA1.0 mg/L, 为 A6 培养基。通过外植体成愈率的直观观察与统计分析的验证结果两者吻合。

极差 R 的大小反映了该因素对指标的影响是否显著。极差 R 愈大, 说明该因素对指标的影响愈显著<sup>[3]</sup>。从极差分析的结果来看, 外植体的极差最大, 激素 2,4-D 次之, NAA 最小。由此可见, 外植体是影响日本厚朴愈伤组织诱导率的主导因子; 2,

4-D 是影响显著的因子、NAA 的影响较小。

表 4 2,4-D 和 NAA 组合不同浓度对外植体成愈率的影响

Table 4 Effects of different proportions and hormones on percentage of callus					
培养基 编号	外植体	2,4-D/ (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	外植体成 愈率 (P)/%	数值转换 $X=\sin^{-1}$ $P^{1/2}$
A1	叶柄	2.0	2.0	18.3	25.33
A2	叶柄	3.0	1.0	35.0	36.27
A3	叶柄	4.0	0.5	33.3	33.86
A4	顶芽	2.0	0.5	40.0	39.24
A5	顶芽	3.0	2.0	53.3	46.90
A6	顶芽	4.0	1.0	66.7	54.76
A7	叶片	2.0	1.0	6.7	15.00
A8	叶片	3.0	0.5	11.7	20.01
A9	叶片	4.0	2.0	15.0	22.79
K <sub>1</sub>	95.46	79.57	93.11	$T=294.16$	
K <sub>2</sub>	140.9	103.18	106.03		
K <sub>3</sub>	57.8	111.41	95.02		
k <sub>1</sub>	31.82	26.52	31.04		
k <sub>2</sub>	46.97	34.39	35.35		
k <sub>3</sub>	19.27	37.14	31.67		
极差 R	27.7	10.62	4.31		

表 5 L<sub>9</sub> 方差分析

Table 5 Variance analysis of L <sub>9</sub>				
	离差平方和	均方	F 值	伴性概率
外植体	2 693.929	1 346.964	14.424	0.005
2,4-D	438.889	219.444	0.468	0.648
NAA	113.929	56.964	0.109	0.899

用 SPSS 软件对试验结果进行方差分析,从表 5 中可看出,外植体、2,4-D、NAA 三者对应的 *F* 值和伴性概率分别为:外植体 14.424 和 0.005;2,4-D 为 0.468 和 0.648;NAA 为 0.109 和 0.899。从 *F* 值可以看出,外植体对于其成愈率影响显著,2,4-D、NAA 没有影响。

3.2 光培养和暗培养对顶芽愈伤组织生长的影响

观察发现,接种 9 d 后,暗培养的部分接种的顶芽下部切口处有不同程度的膨大现象,13 d 时切口膨大处裂开,并长出白色颗粒状的愈伤组织。光培养的情况为:接种 12 d 后部分顶芽切口处出现膨大,15~16 d 顶芽膨大处陆续长出白色颗粒状的愈伤组织,以后愈伤组织数量逐渐增多并变大。由此看见,接种的顶芽在暗培养条件下比光培养条件下先形成愈伤组织。30 d 后计算愈伤组织鲜重增长量,统计结果见表 6。

从表 6 中可清晰看到,光培养的愈伤组织增长

量最小值和最大值分别为 0.106 g 和 1.054 g,平均值为 0.407 g;而暗培养分别为 0.229 g 和 1.169 g,平均值为 0.698 g。以上结果说明,暗培养对愈伤组织的生长更加有利。

因此,在对日本厚朴的外植体进行愈伤组织诱导时,暗培养加快愈伤组织形成的速度,同时也更有利于其愈伤组织的生长。

表 6 光培养和暗培养的愈伤组织鲜重增长量对比

Table 6 The growth of the callus under light and dark culture					
培养方式	愈伤组织增长量/g				20 瓶平均值/g
光培养	0.106	0.121	0.186	0.209	0.407
	0.235	0.253	0.267	0.287	
	0.311	0.335	0.359	0.435	
	0.478	0.491	0.502	0.522	
	0.587	0.593	0.818	1.054	
暗培养	0.229	0.344	0.356	0.451	0.698
	0.482	0.576	0.591	0.610	
	0.668	0.724	0.751	0.773	
	0.782	0.790	0.822	0.883	
	0.906	1.009	1.039	1.169	

3 结论与讨论

将外植体和 2,4-D、NAA3 个因素进行正交试验,结果表明,顶芽作为外植体,最易诱导出愈伤组织,且愈伤组织生长状态最佳,黄绿色,质地致密,更利于下一步的操作,不易破碎;最佳愈伤组织诱导培养基为。

将接种后的外植体分别进行光培养和暗培养,试验结果表明,暗培养下的外植体比光培养先诱导出愈伤组织,且在相同时间内,愈伤组织鲜重增长量大于光培养,暗培养比光培养更有利于愈伤组织的形成和生长。

参考文献:

[1] 王碧琴,余发新,刘腾云,等. 木兰科 7 种植物的组织培养技术研究[J]. 江西农业大学学报,2006,28(2):268-273.  
[2] 刘贤旺,杜勤,赖学文,等. 凹叶厚朴组织培养的研究[J]. 江西林业科技,1997(2):1-4.  
[3] 童再康,朱玉球,王章荣. 厚朴组织培养与高产细胞系建立的研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2002,26(4):23-26.  
[4] 孙雁霞,林桂芸,王跃华,等. 川厚朴愈伤组织培养的初步研究[J]. 西南农业学报,2004,17(4):228-230.