

Study on Shoot Induction and Tissue Culture Regeneration of *Parakmeria omeiensis*

Xiaobo Qin^{1,2,3*}, Guozhen Zhang^{1*}, Bei Niu^{2*}, Ying Xu³

¹Sichuan Natural Resource Institute, Chengdu Sichuan

²Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu Sichuan

³Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu Sichuan

Email: qxb_2003@163.com

Received: Feb. 4th, 2020; accepted: Mar. 4th, 2020; published: Mar. 11th, 2020

Abstract

Through the study of shoot induction culture, adventitious bud differentiation and plantlet regeneration, a tissue culture system was established, which was short culture cycle and high regeneration efficiency. The design and analysis of multivariate experiments showed, the best induction medium was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L KT + 0.02 mg/L IAA. By comparing plant growth hormone, we found that the most suitable medium for differentiation was MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA. Finally, MS medium with NAA 0.5 mg/L and IBA 2.5 mg/L can effectively produce roots of regenerated seedlings.

Keywords

Parakmeria omeiensis, Shoot, Regeneration, Plant Growth Hormone

峨眉拟单性木兰嫩茎诱导及再生培养研究

秦小波^{1,2,3*}, 张国珍^{1*}, 牛蓓^{2*}, 徐莺³

¹四川省自然资源科学研究院, 四川 成都

²成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川 成都

³四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都

Email: qxb_2003@163.com

收稿日期: 2020年2月4日; 录用日期: 2020年3月4日; 发布日期: 2020年3月11日

*共第一作者。

摘要

为奠定人工繁育和保护研究的基础,对峨眉拟单性木兰嫩茎诱导培养、不定芽的分化及组培苗再生进行了研究,建立起培养周期短、再生效率高的峨眉拟单性木兰组织培养体系。利用多因子正交实验设计及分析,筛选出最佳诱导培养基是MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L KT + 0.02 mg/L IAA。通过比较植物生长调节剂,发现最适的分化培养基为MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA。最后,生根培养基以MS培养基添加NAA 0.5 mg/L, IBA 2.5 mg/L能有效地使再生苗产生根系。

关键词

拟单性木兰, 嫩茎, 再生, 植物生长调节剂

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

峨眉拟单性木兰(*Parakmeria omeiensis* Cheng)属于木兰科(Magnoliaceae)、拟单性木兰属(*Parakmeria*)内的模式种[1] [2] [3],是被子植物的起源研究、系统的发育、性别的分化的稀有木兰植物材料;具有高度的科学意义及价值。拟单性木兰属作为木兰科这种古老类群的植物,一直存在许多争议[4] [5];且其分布仅限我国东南、西南地区,仅5个种,更具研究意义。而峨眉拟单性木兰因结实率极低甚至不结实,且在野外的野生植株仅有20余株;已被列为中国物种红色名录,以及中国一级濒危保护植物[6]。峨眉拟单性木兰,其特有两性花植株与雄花植株,主要分布于峨眉山的常绿阔叶林带里,峨眉山的二道桥-洪椿坪-茶棚子线路以下的黑龙江周围区域内,特别以海拔约1200~1450米的区域最为集中;具有园林观赏、道路绿化以及药用等经济价值[2] [3] [7]。

峨眉拟单性木兰,因其雄花植株和两性花植株共存,且两性花类型植株较少,有些地区仅发现雄花类型植株,而幼苗、幼树几乎不见;其独有的生物学特性,导致其在自然生殖上极为困难。同时,由于生态环境的不断恶化,人类对资源开发利用的深入等影响,更应加紧对峨眉拟单性木兰开展其植物繁育以及保护工作。

迄今未见峨眉单性木兰由嫩茎等以组织培养方式获得再生苗的报道。但峨眉拟单性木兰作为常绿乔木,其中植物组织中含有多种对组织培养不利的内含物,增加了其组织培养的难度。本研究利用激素配比设计,探索筛选的植物激素及其不同浓度组合对峨眉拟单性木兰嫩茎诱导、不定芽发生等的影响,筛选合适的培养条件,促进峨眉拟单性木兰的组织培养研究,为推进峨眉拟单性木兰人工繁育和保护研究奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 植物材料

试验中需要用到的植物材料采集于四川乐山地区,采自多年生峨眉拟单性木兰的当年生枝条带芽茎。

2.2. 材料清洗与处理

峨眉拟单性木兰嫩茎先使用清水冲洗干净,再浓度为 75%乙醇灭菌 1 min,然后无菌水清洗 3 次;而后置于含有 0.1%的 HgCl₂ 溶液中灭菌 5 min,最后灭菌水冲洗 5 次及以上。

2.3. 嫩枝的诱导及培养

洗净的峨眉拟单性木兰嫩枝切成长约 1 cm、有芽的嫩茎段后,接种到诱导培养基上进行培养。诱导培养基 pH5.8、含 3%蔗糖、0.6%琼脂粉。在此基础上,设置以下浓度范围配比:MS 培养基[8] + 1.0~3.0 mg/L 6-BA+0.02 mg/L IAA,或 MS +1.0~3.0 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L IAA + 0.5~1.5 mg/L KT。培养室温度为 26℃ ± 2℃。培养过程中 20 d 为一个继代培养周期,更换新的培养基。接入的茎段分为两组,一组置于光照强度 2000 Lx,光周期 12 h/12 h(光/暗)中;另一组暗培养,40 d 为一个培养周期。40 d 后,分出一组材料接入分化培养基诱导不定芽。诱导设计为 20 个茎段一个处理,设置 3 次重复。此外,通过继代培养基的更换,统计比较继代培养对诱导材料的影响情况。

2.4. 不定芽培养

将诱导的组织材料接入到以 MS 为基本培养基的分化培养基上,分化培养基在含有 3%蔗糖、0.6%琼脂粉基础上,设置不同浓度梯度的 NAA (表 3);同时 pH = 5.8,室温 26℃ ± 2℃,控制光照强度 2000 Lx,光周期为 12 h/12 h(光/暗),25 d 后统计培养基上不定芽的数量。一个处理设置 20 个材料,设置 3 次重复。

2.5. 生根研究

不定芽培养一段时间后,芽高长到 3~4 cm 时,将其切下转移至生根培养基上进行生根培养。生根培养基设置的激素浓度配比为 MS + 0.1~1.0 mg/L NAA + 1.0~4.0 mg/L IBA。通过比较,筛选出最佳生根培养基,然后添加质量体积比 0.1%的活性炭(AC),对比活性炭在生根培养中的影响;20 d 后统计对比情况。一个处理设置 20 个不定芽材料,设置 2 次重复。

2.6. 组培苗炼苗及移栽

生根培养后,将培养瓶放置于温度为 22℃至 30℃的室外,在自然光照的条件下,封口炼苗 10~15 d。取出生根苗,并洗净根部附着的培养基后,移栽到蛭石中,浇透水,用塑料膜保湿生长;其中蛭石需事先以 0.3%的高锰酸钾消毒。移栽后,控制移栽温室温度为 23~30℃。15 d 后,将温室移栽苗再次栽于营养钵中,并使用遮光度 50%遮阴棚中生长 30 d 进行常规管理。

2.7. 统计与计算

诱导率 = (组织材料块数/接种外植体数) × 100%

不定芽分化率 = (分化不定芽的组织块数/接种外植体数) × 100%

生根率 = (生根的不定芽数/接种的不定芽数) × 100%

对计算结果用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

3. 结果与分析

3.1. 嫩茎的诱导

3.1.1. 植物生长调节剂对嫩茎的诱导

把峨眉拟单性木兰无菌嫩茎段接种至以 MS 为基本培养基的诱导培养基上进行诱导培养。10 d 左右可见嫩茎的萌动,培养至 20 d 时观察统计。由表 1 可见,6-BA 对诱导峨眉拟单性木兰嫩茎段产生萌动

具有明显的促进作用。培养基中添加的 6-BA 的添加浓度由 1.0 mg/L 升高到 2.0 mg/L 时, 嫩茎诱导率随之升高, 但当 6-BA 的添加浓度由到 2.0 mg/L 时升高到 3.0 mg/L 时, 诱导率下降。添加浓度 2.0 mg/L 的 6-BA 能诱导 $74.27\% \pm 2.4\%$ 的嫩茎产生萌动。当添加 6-BA 升高至 3.0 mg/L 时, 虽然也能诱导嫩茎萌动, 但诱导率下降, 再生力也变差。试验还表明, 在培养基中添加 0.02 mg/L IAA 也能促进 6-BA 对材料再生能力的影响。在培养基添加不同浓度的 KT 发现, 浓度 1.5 mg/L 的 KT 对峨眉拟单性木兰嫩茎萌动的诱导有促进作用。上述结果表明: MS+2.0 mg/L 6-BA+0.02 mg/L IAA+1.5 mg/L KT 的组合是诱导峨眉拟单性木兰嫩茎萌动的理想培养基, 其培养的诱导率高为 $80.95\% \pm 2.5\%$ (表 1)。

Table 1. Effect of plant growth regulators (PGRs) on induction from shoot of *Parakmeria omeiensis*
表 1. 植物生长调节剂对峨眉拟单性木兰嫩茎诱导的影响

激素浓度/mg·L ⁻¹ Concentration of PGRs (mg·L ⁻¹)		诱导率/% Shoot induction rate (r/%)	嫩茎生长状态 Status of shoot
6-BA	KT		
1.0	0	46.15 ± 4.0 ^b	嫩梢生长较好
2.0	0	74.27 ± 2.4 ^a	嫩梢生长好
3.0	0	66.71 ± 4.2 ^a	嫩梢生长差
1.0	0.5	56.89 ± 1.4 ^b	嫩梢生长较好
2.0	1.0	75.58 ± 2.1 ^a	嫩梢生长好
3.0	1.5	69.42 ± 1.8 ^a	嫩梢生长差
1.0	1.0	50.64 ± 1.5 ^b	嫩梢生长差
2.0	1.5	80.95 ± 2.5 ^a	嫩梢生长好
3.0	0.5	66.87 ± 2.0 ^a	嫩梢生长差

The different letters in the same column mean the significant difference ($P \leq 0.05$) by Duncan's LSD Test. The same below.
表中不同字母表示邓肯氏最小显著差数测验差异显著($P \leq 0.05$)。下同

3.1.2. 光周期对嫩茎诱导的影响

将嫩茎组织置于诱导培养基上后, 分组进行光培养和暗培养 20 天, 观察发现光培养和暗培养都能诱导嫩茎的萌动。在暗培养条件下, 嫩茎出现的萌动时间缩短, 平均约 7 d 就能观察到变化; 但嫩梢生长较差, 如转移至光培养条件下, 10 d 后, 才能和光培养的状态相当。在光培养条件下, 至少需 10 d 才会有嫩茎产生萌动, 但嫩梢生长状态较好; 培养到 40 d 左右时转入分化培养基继续培养, 20 d 左右能够产生不定芽。

3.1.3. 继代次数对嫩茎诱导的影响

多次继代培养会使诱导材料发生可见的变化。表 2 显示, 随着继代次数的增加, 诱导组织生长能力逐渐下降, 嫩茎生长状态变差, 不定芽再生率也随之下落。试验发现, 从第 5 次继代作为节点, 之后的继代培养不定芽的形成率明显下降。

Table 2. Effect of subculture times on shoot induction and regeneration of *Parakmeria omeiensis***表 2.** 继代次数对嫩茎诱导再生的影响

继代次数 Subculture times	嫩茎状态 Status of shoot	不定芽再生率/% Frequency of adventitious shoot formation (r/%)
2	嫩梢生长力强	68.45 ± 9.2 ^a
3	嫩梢生长好	65.76 ± 5.5 ^a
4	嫩梢生长正常	53.55 ± 2.1 ^{ab}
5	嫩梢生长较好	37.10 ± 1.3 ^b
6	嫩梢生长较差	17.22 ± 6.1 ^c
7	嫩梢生长力弱	9.14 ± 3.8 ^c

3.2. 激素对不定芽的影响

诱导不定芽的试验统计表明, 植物细胞分裂素 6-BA 的最佳浓度为 0.5 mg/L 时, 不定芽再生率高达 51.36% ± 3.6%, 每个组织平均产生 3.65 个芽。通过分别添加生长素 IAA 和 NAA 后发现, NAA 与 6-BA 组合使用效果较好。MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA 是峨眉拟单性木兰的不定芽培养的最佳分化培养基; 不定芽再生率高达 70.85% ± 6.8%, 每个组织平均产生 4.30 个芽(表 3)。

Table 3. Effect of plant hormone on induction of adventitious shoots of *Parakmeria omeiensis***表 3.** 植物激素对分化不定芽的影响

植物激素/mg·L ⁻¹ Concentration			不定芽再生率/% Frequency of shoot formation (r/%)	平均芽数/个 Number of shoots
6-BA	IAA	NAA		
0.1	0	0	15.13 ± 3.1 ^d	1.21 ^d
0.5	0	0	51.36 ± 3.5 ^a	3.65 ^a
1.0	0	0	30.12 ± 4.2 ^b	3.48 ^{ab}
0	0.01	0	8.15 ± 2.8 ^d	0.85 ^d
0	0.02	0	10.31 ± 3.4 ^c	1.56 ^{bc}
0	0.1	0	12.56 ± 1.9 ^c	1.61 ^{bc}
0	0	0.01	8.74 ± 1.7 ^{bc}	1.22 ^d
0	0	0.02	12.42 ± 3.3 ^a	1.40 ^a
0	0	0.1	11.58 ± 2.4 ^{bc}	1.58 ^{bc}
0.5	0.02	0	58.57 ± 2.5 ^a	2.79 ^{bc}
0.5	0	0.02	70.85 ± 6.8 ^{bc}	4.30 ^a
0	0.1	0.1	19.47 ± 2.5 ^c	1.83 ^{cd}

3.3. 诱导生根及再生分析

生长素 IBA 和 NAA 是组培诱导生根的常用激素, 试验比较了不同浓度的 IBA 和 NAA 在对峨眉拟单性木兰组培苗生根率的影响(表 4)。通过比较试验表明, MS+2.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA 是峨眉拟单性木兰组培苗的理想培养基。培养生根率为 74%以上。此外, 试验结果观察还表明, 在生根培养基中添

加 0.1% 的活性炭对生根率的影响无显著差异, 但添加活性炭的培养基中生长的根较为粗壮。移栽试验显示, 生根苗在根系与茎的结合处, 若产生大量愈伤组织, 则该苗存活率极低。

Table 4. Effect of IBA or NAA on rooting of the regenerated shoots of *Parakmeria omeiensis*
表 4. IBA 和 NAA 对再生苗生根的影响

激素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of PGRs ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		生根率/% Rooting percentage (r/%)
IBA	NAA	
1.0	0	28.73 \pm 2.0 ^d
1.5	0	45.82 \pm 2.3 ^b
2.5	0	66.07 \pm 2.4 ^a
4.0	0	44.65 \pm 2.1 ^c
0	0.1	22.14 \pm 2.1 ^{bc}
0	0.2	30.86 \pm 1.9 ^a
0	0.5	48.51 \pm 2.0 ^a
0	1.0	40.12 \pm 2.2 ^{bc}
1.0	0.1	35.14 \pm 2.1 ^{bc}
1.5	0.2	52.33 \pm 1.9 ^a
2.5	0.5	74.85 \pm 2.0 ^a
4.0	1.0	30.16 \pm 2.2 ^{bc}

4. 讨论

本文开展了峨眉拟单性木兰嫩茎诱导及再生组织培养的研究, 结果表明, 峨眉拟单性木兰从嫩茎诱导到再生苗移栽整个过程的组织培养需约 100 天, 嫩茎诱导率达 80%。峨眉拟单性木兰嫩茎诱导培养的理想培养基是 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L KT + 0.02 mg/L IAA。不定芽培养的理想分化培养基是 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA。理想生根培养基为 MS + 2.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L NAA。不同浓度、不同种类的植物生长调节剂的配比是诱导调控植物组织或器官进行组织培养的主要手段, 其中很多报道揭示, 6-BA 是诱导外植体组织培养的最有效的外源植物生长调节剂之一[9]。试验结果证明: 峨眉拟单性木兰嫩茎的诱导必须添加植物生长调节剂, 6-BA 是诱导嫩茎的关键外源激素, 2.0 mg/L 6-BA 能够有效诱导嫩梢萌动。

本研究还发现, 峨眉拟单性木兰嫩茎的诱导还受到培养基更换及继代培养次数的影响, 过多的继代会明显降低诱导效率。同时, 光照及其光周期也是影响与调控组织诱导和生长的重要因素。有研究报道一些植物的叶片需要避光, 在暗培养条件下才能形成分化的组织[10]; 而另一些植物, 在光、暗条件下都可组织培养, 还有一些植物组织诱导和生长培养需要在光照进行[11]。本研究证明: 峨眉拟单性木兰嫩茎的诱导需在一定光培养下进行。这样不仅有利于嫩茎的高效再生培养, 而且能缩短生长、分化的培养周期。同时, 细胞分裂素作为刺激细胞分裂的植物生长调节剂, 将其添加到培养基中, 能有效的促进不定芽的形成[12]。本研究中也显示出在诱导峨眉拟单性木兰不定芽生长的培养中 6-BA 发挥了重要作用。此外, 本研究还表明, 在生根培养中添加活性炭有助于培养生长出壮根。

基金项目

农业农村部杂粮加工重点实验室开放基金资助(No.2018CC12)、四川省级公益性科研院所基本科研业务费项目、四川省科技计划项目(2018NZ0091、20ZDYF3370、20ZDYF3300)共同资助。

参考文献

- [1] 胡先骕, 郑万钧. 拟克林丽木. 中国西南部木兰科一新属[J]. 中国科学院大学学报, 1951, 1(1): 1-3.
- [2] 刘玉壶. 木兰科分类系统的初步研究[J]. 植物分类学报, 1984, 22(2): 88-107.
- [3] 刘玉壶, 夏念和, 杨惠秋. 木兰科的起源、进化和地理分布[J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(4): 1-12.
- [4] 徐凤霞, 吴七根. 木兰科种子内种皮合点区形态及其系统学意义[J]. 植物分类学报, 2002, 40(3): 260-270.
- [5] 林祁, 段林东, 袁琼, 李明红, 谢永红. 拟单性木兰属(木兰科)植物的分类学修订[J]. 植物研究, 2006, 26(5): 527-531.
- [6] 中国环境与发展国际合作委员会生物多样性工作组. 中国物种红色名录(第一卷) [M]. .北京: 高等教育出版社, 2004.
- [7] 庄平, 刘仁英, 梁开和. 峨眉拟单性木兰群落特征的初步研究[J]. 广西植物, 1993(1): 61-69.
- [8] Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [9] 马玲, 张鑫, 孟莹, 赵静, 张满让. 喷施 GA3 和 6-BA 对“富士”苹果顶芽内源激素及成花成枝的影响[J]. 西北植物学报, 2018, 38(5): 873-884.
- [10] Gu, X.F. and Zhang, J.R. (2005) An Efficient Adventitious Shoot Regeneration System for Zhanhua Winter Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) Using Leaf Explants. *Plant Cell Reports*, **23**, 775-779. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0920-5>
- [11] Zheng, X.B. (2003). Studies on Callus Induction and Plantlet Regeneration of Triploid *Citrullus lanatus* Seedlings. Henan Agricultural University, Zhengzhou.
- [12] Mithila, J., Hall, J.C., Victor, J.M.R. and Saxena, P.K. (2003) Thidiazuron Induces Shoot Organogenesis at Low Concentrations and Somatic Embryogenesis at High Concentrations on Leaf and Petiole Explants of African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Reports*, **21**, 408-414. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0544-y>