

# 连香树离体快繁初步研究

麦苗苗 石大兴 王米力 廖静 韩珊

(四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014)

**摘要:** 连香树为我国珍稀濒危树种, 具有较高的经济价值和观赏价值。本文研究了3年生连香树 (*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc.) 带芽茎段的离体培养。筛选出最佳培养基: (1) 腋芽诱导培养基: MS + NAA 0.01 mg · L<sup>-1</sup>; (2) 丛生芽诱导培养基: MS + BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>; (3) 丛生芽增殖培养基: MS + BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.01 mg · L<sup>-1</sup>; (4) 生根培养基: 1/2MS + IBA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>。

**关键词:** 连香树; 离体培养

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 01-0186-04

## A Preliminary Study on the in Vitro Culture of *Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc.

Mai Miaomiao, Shi Daxing, Wang Mili, Liao Jing, and Han Shan

(College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** *Cercidiphyllum japonicum* is an endangered plant in China, possesses the high economic and appreciatory value. This paper mainly dealt with the study on shoot organogenesis culture in vitro culture from sprout explants of *Cercidiphyllum japonicum*. The results showed that the best media for various stages were as follows: (1) Axially bud induction medium: MS + NAA 0.01 mg · L<sup>-1</sup>; (2) Clump shoot induction medium: MS + BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>; (3) Clump shoot regeneration medium: MS + BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.01 mg · L<sup>-1</sup>; (4) Rooting medium: 1/2MS + IBA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Cercidiphyllum japonicum*; In vitro culture

### 1 目的、材料与方法

连香树 (*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc.) 为连香树科连香树属原始木本植物, 除在药材、医药和化工等领域具有较高利用价值外, 还作为彩叶树种被世界各国广泛引种栽培<sup>[1]</sup>。连香树雌雄异株, 现多为单株分布, 结实量少, 种子极小, 出苗纤细, 难以成苗, 天然更新能力较差<sup>[2,3]</sup>, 目前已濒临灭绝。通过组培快繁技术, 可获得基因型一致的优质苗木, 并在短期内快速大量繁殖, 大大加快育苗进程, 为珍稀濒危树种种质资源的保存开辟一条新的途径。组织培养繁殖连香树, 目前国内外尚未见报道。

试验材料采自四川农业大学林木育种实验苗圃3年生连香树幼苗。剪取幼嫩带芽茎段和顶芽, 在加有1%洗衣粉的洗涤液中漂洗5 min, 用毛刷轻刷以除去杂质, 再在流水下冲洗2~3 h, 剪去展开的叶片, 用70%酒精浸泡消毒15 s, 转入0.1%升汞溶液中灭菌5 min, 最后用无菌水冲洗5~6次, 并用纱布吸干表面水分。

将已灭菌的外植体接种于启动培养基上, 暗培养7 d后转入光培养, 培养30 d统计诱导率。待腋芽萌发后进行丛生芽的诱导和增殖培养, 最后移入生根培养基中诱导生根。根长至1.5~2 cm时炼苗移栽。以MS为基本培养基, 添加不同的植物生长调节剂, 琼脂0.8%, 蔗糖3%, pH 5.8~6.0; 培

收稿日期: 2005-06-20; 修回日期: 2005-07-21

基金项目: 四川省重点学科建设项目 (SZD0419)

养温度  $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ ; 光照  $12 \sim 14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 光照强度  $1\ 500 \sim 2\ 000 \text{ lx}$ 。每处理接种 30 个外植体, 3 次重复。采用新复极差法 (SSR 检测) 对平均数进行多重比较。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 不同植物生长调节剂对比对腋芽诱导的影响

采用 NAA ( $0.01$ 、 $0.05$ 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与 BA ( $0$ 、 $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行组合试验, 外植体在接种 6 d 后腋芽开始萌动, 抽生新梢明显, 8 d 后可见两片细小鲜绿的嫩叶, 10 d 后叶片展开, 长约 2 cm, 宽约 1 cm, 茎段基部膨大, 有愈伤组织产生。当低浓度 NAA ( $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与不同浓度 BA 搭配时, 腋芽萌发率较高, 小苗叶色浓绿, 叶片舒展, 生长健壮 (图版, 1)。其中, 单独使用 NAA  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基诱导腋芽高达 100%, 但随着 BA 浓度的增加, 诱导率呈下降趋势; 当 NAA 浓度处于较高水平 ( $0.05$ 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时, 几乎没有腋芽萌动, 外植体褐化较为严重, 很快褐变死亡, 不能获得再生植株。虽然 BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的组合也有腋芽萌发, 但诱导率相对较低 (46.7%), 且芽苗长势较差, 甚至有些只单芽萌发。

采用附加 2, 4-D ( $0.01$ 、 $0.05$ 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 BA ( $0$ 、 $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的启动培养基进行试验, 发现约 12 d 后茎段基部开始膨大, 色泽淡黄, 少数形成愈伤组织, 腋芽不萌发直至死亡, 但褐化较轻。

由此可见, 单独使用 NAA  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基腋芽诱导率高且芽苗长势好, 最适宜于连香树腋芽的诱导; 低浓度 NAA 配合 BA 使用也能较好地起到诱导作用, 而使用 2, 4-D 不能促进腋芽萌发。

### 2.2 不同植物生长调节剂对比对丛生芽诱导的影响

将腋芽已萌发的连香树茎段转入诱导培养基中, 经过 2~3 次继代后, 基部形成色泽较浅、结构较疏松的愈伤组织, 虽体积较大, 但出芽率低。通过诱导连香树获得的丛生芽多数是由腋芽直接萌发而形成的, 即腋芽发生型丛生芽<sup>[4,5]</sup> (图版, 2)。

如表 1 所示, 单独添加 BA 和不同浓度的 BA 与 NAA 组合的培养基均能够诱导出不定芽, 但诱导率有所差异。低浓度 BA ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时, NAA 的添加与否对芽的诱导影响明显, 表明低浓度时 BA 和 NAA 对芽诱导分化起着相互促进作用。较高浓度 BA ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时, 随着 NAA 浓度的升高, 丛生芽诱导率下降, 可能是因为在此阶段连香树体内的内源 NAA 含量较高, 仅需少量添加即可产生诱导作用, 浓度过高反而抑制了芽的分化。

由表 1 还可知, 连香树对 BA 的丛生芽诱导作用较为敏感, 单独使用细胞分裂素 BA 就能较好地诱导出丛生芽。经过方差分析, BA 浓度在  $1.0$  和  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  间差异不显著, 但分别与其在  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的差异达到极显著水平, 表明较高浓度 BA 都可以促进丛生芽的诱导。随着 BA 浓度增大, 丛生芽的诱导率增高, 当 BA 浓度达到  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  水平时, 诱导率稍高 (72.4%), 但丛生芽颜色较浅较黄 (图版, 3), 表明高浓度的 BA 开始对丛生芽的生长出现抑制现象。由此, 综合诱导率及芽的生长情况, A<sub>4</sub> 培养基 (MS + BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 为最佳诱导培养基配方, 诱导率较高 (70%), 且芽丛生长健壮, 叶色浓绿 (图版, 2)。

表 1 不同浓度 BA 与 NAA 对丛生芽诱导的影响

Table 1 Effects of different BA and NAA levels on clump shoots induction

代号 Code	BA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NAA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	诱导率 Induction rate (%)
A <sub>1</sub>	0.5	0	37.5 bB
A <sub>2</sub>	0.5	0.1	67.5 aAB
A <sub>3</sub>	0.5	0.5	53.6 abAB
A <sub>4</sub>	1.0	0	70.0 aA
A <sub>5</sub>	1.0	0.1	61.8 aAB
A <sub>6</sub>	1.0	0.5	56.0 aAB
A <sub>7</sub>	2.0	0	72.4 aA
A <sub>8</sub>	2.0	0.1	66.7 aAB
A <sub>9</sub>	2.0	0.5	53.3 aAB

注: 显著性测验, 不同大小写字母表示在 1% 或 5% 水平上差异显著。下同。

Note: Duncan's multiple range test, treatments with the same letter indicated no significant difference while different letter indicated significant difference at 5% (small letter) or 1% (capital letter) level. The same below.

### 2.3 丛生芽的增殖培养

继代培养时, 采用腋芽萌发的增殖方式, 增殖倍数比较适中, 得到健壮的试管苗较为健壮。40 d 后在原有的丛生芽基部又相继出现新芽, 平均可长至 1.5 ~ 2.0 cm。

从表 2 可以看出, 在供试的 8 个处理中, 增殖倍数均在 2.8 以上。从总体上来看, 芽的增殖用 BA 和 2,4-D 组合增殖倍数较高, 比用 BA 和 NAA 组合好。通常认为 2,4-D 对多数植物而言主要是促进愈伤组织的生长, 对芽的增殖作用效果不明显, 常采用 NAA、IBA 等诱导丛生芽的增殖, 这与本试验的结果有所出入, 其机理尚需进一步的研究。虽然在 BA 与 NAA 各浓度的配比下, 丛生芽均能增殖, 尤其是 B<sub>7</sub> 培养基, 增殖倍数达 4.2, 但添加 NAA 诱导形成的芽苗短小且伸长困难; 采用 BA 与 2,4-D 增殖得到的丛生芽密度适中, 小苗粗壮, 叶片较大, 有效苗多 (图版, 4), 可直接进行生根诱导培养。当 BA 浓度一定时, 随着 2,4-D 的浓度的升高, 对芽的增殖倍数降低, 表明低浓度 2,4-D 就可促进芽增殖, 比较适宜的增殖培养基为 MS + BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.01 mg · L<sup>-1</sup>。

表 2 不同种类生长调节剂对丛生芽增殖的影响

代号 Code	BA (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA (mg · L <sup>-1</sup> )	2,4-D (mg · L <sup>-1</sup> )	增殖倍数 Proliferation times
B <sub>1</sub>	1.0	0.01	0	3.1 deBC
B <sub>2</sub>	1.0	0.05	0	3.2 cdeBC
B <sub>3</sub>	2.0	0.01	0	4.0 abAB
B <sub>4</sub>	2.0	0.05	0	2.8 eC
B <sub>5</sub>	1.0	0	0.01	3.8 abcAB
B <sub>6</sub>	1.0	0	0.05	3.5 bedABC
B <sub>7</sub>	2.0	0	0.01	4.2 aA
B <sub>8</sub>	2.0	0	0.05	3.3 cdeABC

表 3 不同生长调节剂及浓度对试管苗生根的影响

代号 Code	IBA (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA (mg · L <sup>-1</sup> )	生根率 Rooting rate (%)	平均根数 Mean number of roots	平均根长 Mean length of roots (cm)
C <sub>1</sub>	0	0	10.3 dC	2.2 fE	1.3 dC
C <sub>2</sub>	0.5	0	73.3 aA	2.7 eD	2.1 eB
C <sub>3</sub>	1.0	0	78.4 aA	4.0 abAB	1.9 cBC
C <sub>4</sub>	2.0	0	76.7 aA	4.2 aA	3.4 abA
C <sub>5</sub>	3.0	0	75.3 aA	3.1 deCD	3.7 Aa
C <sub>6</sub>	0	0.5	48.4 cBC	3.6 beBC	1.7 edBC
C <sub>7</sub>	0	1.0	59.3 bB	3.2 cdCD	2.0 eB
C <sub>8</sub>	0	2.0	72.7 aA	2.8 deD	3.1 bA
C <sub>9</sub>	0	3.0	60.0 bB	3.1 deCD	3.5 abA

### 2.4 试管苗的生根培养及移栽

当丛生芽长到 3 ~ 5 cm 高时, 将其分离转接到生根培养基上进行诱导生根。培养基采用 1/2MS 附加不同浓度的 IBA 和 NAA, 在培养 30 ~ 40 d 后开始形成根系。从表 3 可以看出, IBA、NAA 对根的诱导均有明显的促进作用, 多数可诱导出红色根系 (图版, 5), 但采用不同浓度的 IBA 对生根的影响作用均强于 NAA。随着浓度的增加, IBA 和 NAA 对根的诱导率先上升后降低, 平均根长和数量也随之增加, 当达到高浓度 (3.0 mg · L<sup>-1</sup>) 时, 获得的根多生长于愈伤组织上部, 且植株长势也较弱, 可能是由于植物生长调节剂浓度过高所致。因此, 较好的培养基为 1/2MS + IBA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>。

待试管苗根长至 1.5 ~ 2 cm 时即可准备炼苗。选取苗高 3 ~ 4 cm、根系发达的生根苗植株, 在瓶内于温室散射光下培养 3 d, 再打开封口膜于温室大棚内预培养 2 d, 移出洗净培养基, 栽入以珍珠岩、蛭石、细沙 (1:1:1) 的混合基质中, 浇 1 次透水。注意遮荫保湿, 温度 20 ~ 30℃, 湿度 80% 以上。根系开始生长后, 每 7 d 喷 1 次营养液, 成活率约为 74% (图版, 6)。

### 参考文献:

- 1 Bob Gibbons. Tree of Britian and Europe. London: Chancer press, 1995. 43
- 2 黄绍辉. 几种珍稀树种的引种繁育及生态学研究: [硕士论文]. 南京: 南京林业大学, 2004. 59  
Huang S H. Studies on the introduction and ecology of a few rare species: [Thesis of Master]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2004. 59 (in Chinese)
- 3 汪传佳, 方 腾, 洛文坚, 裘丽珍, 陈超平编著. 珍稀濒危树种繁育技术. 北京: 中国农业出版社, 2001. 142 ~ 144  
Wang C J, Fang T, Luo W J, Qiu L Z, Chen C P. Propagation techniques for valuable and endangered timber species. Beijing: China Agriculture Press, 2001. 142 ~ 144 (in Chinese)

- 4 石大兴, 石铁松, 王米力, 曾平安, 刘霞英. 巨核芽器官离体培养与快繁体系建立的研究. 林业科学, 2003, 39 (1): 69-74  
Shi D X, Shi Y S, Wang M L, Zeng P A, Liu B Y. Rapid propagation from sprout culture in vitro of *Eucalyptus grandis*. Scientia Silvae Sinicae, 2003, 39 (1): 69-74 (in Chinese)
- 5 石大兴, 李云杰, 王米力, 邓小敏, 张健康. 山杜英离体培养植株再生的研究. 园艺学报, 2004, 31 (2): 245-248  
Shi D X, Gu Y J, Wang M L, Deng X M, Zhang J K. Plant regeneration from in vitro culture of *Elaeocarpus sylvestris* (Lour.) Poir. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (2): 245-248 (in Chinese)



图版说明: 1. 启动培养; 2. 丛生苗; 3.  $A_2$ 培养基诱导的丛生苗; 4. 有效苗; 5. 生根苗; 6. 移栽成活的试管苗; 7. 春季连香树; 8. 夏季连香树。

**Explanation of plates:** 1. Initial in vitro culture; 2. Clump shoots; 3. Clump shoots in  $A_2$  medium; 4. Efficiency seedlings; 5. Rooting seedlings; 6. In vitro plantlets in a flowerpot; 7. *Cericidphyllum japonicum* in spring; 8. *Cericidphyllum japonicum* in summer.

## CNKI 引文数据库《园艺学报》高被引频次论文排序

(截至 2006 年 1 月, 排名前 100 位)

序号	被引文献题名	被引文献作者	被引文献来源	被引频次
89	根据花粉形态探讨梨属植物的亲缘关系	邹乐敏, 张西民, 张志德, 宋保邦, 郭绍信	园艺学报/1986/04	36
90	弱光处理对黄瓜叶绿体超微结构的影响	沈文云, 马德华, 侯锋, 吕淑珍, 霍振荣	园艺学报/1995/04	36
91	NaCl 胁迫下石榴和桃植株 $Na^+$ 、 $K^+$ 含量与耐盐性的研究	汪良驹, 冯凯, 姜卫兵, 凌志奋, 王业遵	园艺学报/1995/04	36
92	$SO_2$ 对贮藏龙眼果皮促褐变的影响	吴振先, 韩冬梅, 季作梁, 陈维信	园艺学报/1999/02	36
93	几种适宜设施栽培果树需冷量的研究	高东升, 束怀敏, 李光利	园艺学报/2001/04	36
94	榨菜胞质雄性不育及其农艺性状的研究	陈竹君, 张明方, 汪炳良, 董伟敏, 黄素青	园艺学报/1995/01	36
95	非洲菊无糖组织培养技术的应用研究	肖玉兰, 张立方, 张光怡, 韩亚平, 赵家聪	园艺学报/1998/04	36
96	草莓主栽品种再生和转化的研究	张志宏, 吴禄平, 代红艳, 王园英, 赵天水, 毕晓辉, 杜国栋	园艺学报/2001/03	35
97	西瓜野生种耐冷性基因连锁的 RAPD 标记	许勇, 欧阳新景, 张海英, 康国斌, 王永健	园艺学报/1998/04	35
98	遮荫对生姜叶片显微结构及叶绿体超微结构的影响	张振贤, 郭延奎, 邹琦	园艺学报/1999/02	35
99	化学药剂对唐菖蒲切花衰老的影响	周毅, 尤忠胜, 俞越汉, 张惟杰	园艺学报/1994/02	35
100	根癌农杆菌介导红豆胰蛋白酶抑制剂基因转入苹果主栽品种	帅欣欣, 王斌, 杜国强, 翁曼丽, 高仪	园艺学报/2000/04	35