

## 流苏树的组织培养和快速繁殖

王鑫, 孔祥生\*

河南科技大学农学院, 河南洛阳471003

**摘要:** 以流苏树种胚为试材, 研究不同种类及浓度的植物生长调节剂对其无菌体系建立, 带顶、侧芽茎段伸长以及生根的影响。结果表明, 种胚生根最适培养基为WPM+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+3.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 生根率为94.2%; 带顶、侧芽茎段最适培养基为WPM+1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ; 生根最适培养基为WPM+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA。

**关键词:** 流苏树; 种胚; 无菌体系

## Tissue Culture and Rapid Propagation of *Chionanthus retusus*

WANG Xin, KONG Xiang-Sheng\*

College of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China

**Abstract:** Using the embryo of *Chionanthus retusus* as the material, the effects of different concentrations and combinations of plant growth regulators on asepsis system establishment, stem segment elongation of terminal bud and lateral bud, and rooting were discussed. The results showed that the best embryo rooting medium was WPM+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA+3.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, the rooting rate was 94.2%, the best medium for terminal and lateral bud was WPM+1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ, and the best rooting medium was WPM+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA.

**Key words:** *Chionanthus retusus*; embryo; tissue culture

流苏树又名萝卜丝花、茶叶树、四月雪等, 木犀科(*Oleaceae*)流苏树属(*Chionanthus*)落叶乔木, 国家二级保护植物, 主要分布于我国甘肃、陕西、山西、河北、河南以南至云南、四川、广东、福建、台湾等。流苏树的花含有多种黄酮、三萜类化合物(张创峰等2012), 可代茶叶, 并具有一定的药用价值, 其材质较好, 可制器具和供细木工用, 果实含油率高, 是一种重要的能源植物(时军霞2011); 流苏树枝叶繁茂, 花大而美丽, 是优良的造林和观赏树种。目前国内外对流苏树仅在栽培方面有所研究, 对其快速繁殖未见报道。马红(2007)对流苏树的种苗特性进行研究时曾指出, 流苏树种子播种后长期不出土, 1~2年才发芽, 而且一年生苗一般高仅3~15 cm。时军霞(2011)对流苏树扦插繁殖研究中提出, 使用一定浓度NAA和IBA处理流苏树茎段, 扦插生根率能达87.32%, 但是生长周期较长, 生长60 d平均根长达4.26 cm。综上所述, 传统流苏树繁育方式繁殖周期太长, 繁殖系数低, 建立流苏树快速繁殖体系十分必要。本文通过研究流苏树快速繁殖体系的建立, 缩短流苏树繁殖周期, 为生产上提供大量优良苗木奠定理论及实践基础。

## 材料与方法

### 1 实验材料

流苏树(*Chionanthus retusus* Lindl. et Paxt.)种子于2012年9月取自洛阳市栾川县狮子庙乡。

### 2 实验方法

#### 2.1 外植体处理

从流苏树上采集种子, 放入保鲜袋中带回实验室, 室内阴干后剥去果皮和种皮, 取出种胚, 用75%酒精表面处理30 s, 无菌水冲洗3次, 然后用0.1% HgCl<sub>2</sub>溶液处理2、3、5和10 min, 在超净工作台上无菌水振荡冲洗5次, 无菌滤纸吸干表面水分, 比较不同消毒时间的灭菌效果, 统计污染率和成活率。污染率=污染个数/接种个数×100%; 成活率=成活个数/(接种个数-污染个数)×100%。

#### 2.2 无菌体系的建立

以WPM为基本培养基, 添加30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖、6

收稿 2014-04-11 修定 2014-09-17

资助 河南省科技攻关计划项目(090080021023)。

\* 通讯作者(E-mail: kxsh55@163.com; Tel: 13333870210)。

g·L<sup>-1</sup>琼脂, 分别用0、0.05和0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 1.0、2.0和3.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 1.0、2.0和3.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>设计正交试验, 将灭菌种胚接种于以上培养基上, 暗培养4 d, 然后转入光培养。15 d后统计生根率, 并筛选出最适植物生长调节剂配比。将生根的外植体转接于含有1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>和1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA的WPM培养基上, 生成无菌苗。

### 2.3 茎段培养

将流苏树无菌苗切成一节一叶的短枝(顶芽带1~2片展开叶), 接种于添加了0、0.5和1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, 0.5、1.0和1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 0.5、1.0和1.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ的WPM培养基上, 30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖, 6 g·L<sup>-1</sup>琼脂, 光照培养。20 d后比较不同浓度的生长调节剂对无菌苗顶芽和腋芽生长的影响, 其中生长高度为接种当天至20 d中增长高度。

### 2.4 生根培养

选取增殖培养过程中生长健壮的组培苗, 剪取长度3 cm左右的新梢, 接种在含有0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA、0.5和1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA、0.5和1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA

的WPM培养基, 25 g·L<sup>-1</sup>蔗糖, 6.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂, 光照培养。30 d后统计生根率。

以上光培养条件均为(25±2) °C, 光照14 h·d<sup>-1</sup>, 光照强度20~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

## 实验结果

### 1 消毒时间对外植体灭菌效果的影响

由表1可以看出, 0.1% HgCl<sub>2</sub>溶液消毒时间为2 min时, 灭菌效果最好, 污染率为2.0%, 成活率达94.0%。随着消毒时间的延长, 污染率均为0, 但成活率依次下降。当消毒时间为10 min时, 外植体全部死亡。

### 2 不同植物生长调节剂对无菌体系建立的影响

由表2看出, 植物生长调节剂诱导流苏树生根率在22.0%~94.2%之间, 培养基2号生根率最低; 培养基9号生根率最高, 其生根率是2号的4.1倍。

从方差分析的结果(表2)来看, 第一因素第三水平, 第二因素第三水平, 第三因素第二水平最高, 综合以上因素, 此组合即WPM+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+

表1 消毒时间对外植体灭菌效果的影响

Table 1 Effects of sterilizing time on explants sterilization

消毒时间/min	接种数/个	污染数/个	污染率/%	成活数/个	成活率/%
2	50	1	2.0	46	94
3	50	0	0	31	62
5	50	0	0	16	32
10	50	0	0	0	0

表2 不同植物生长调节剂对种胚生根的影响

Table 2 Effects of with different plant growth regulators on embryo rooting

培养基编号	NAA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	GA <sub>3</sub> 浓度/mg·L <sup>-1</sup>	6-BA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	生根率/%
1	0	1.0	1.0	59.3 <sup>CDcd</sup>
2	0	2.0	2.0	22.0 <sup>Ef</sup>
3	0	3.0	3.0	62.7 <sup>Cc</sup>
4	0.05	1.0	2.0	54.0 <sup>Dd</sup>
5	0.05	2.0	3.0	72.7 <sup>Bb</sup>
6	0.05	3.0	1.0	34.7 <sup>Ee</sup>
7	0.10	1.0	3.0	28.7 <sup>EFF</sup>
8	0.10	2.0	1.0	75.0 <sup>Bb</sup>
9	0.10	3.0	2.0	94.2 <sup>Aa</sup>
K1	48.0	47.3	56.3	
K2	53.8	56.6	56.7	
K3	65.9	62.8	54.7	
R	17.9	16.5	2.0	

不同大、小写字母表示在1%和5%水平差异显著。下表同此。

3.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 恰好为培养基9号。方差分析结果显示, 此组合与其他组合差异性极显著, 表明植物生长调节剂的种类和浓度对流苏树种胚生根率影响很大。

外植体接种后暗培养4 d, 转入光培养1 d后, 子叶逐渐展开(图1-A); 光培养4~5 d, 展开子叶逐渐变绿(图1-B); 光培养8 d左右, 萌发出变绿子叶的外植体开始长出根原基; 继续光培养至15 d时, 长出5 cm左右直根, 根毛较少(图1-C、D); 此时转接至含有1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>和1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA的WPM培养基上, 继续培养15 d左右, 生成完整无菌苗(图1-E)。

### 3 不同植物生长调节剂对茎段培养的影响

由表3可知, 在不添加GA<sub>3</sub>的培养基中, 茎段不伸长生长。在添加0.5 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>时, 添加低浓度的细胞分裂素能促进茎段增殖, 高浓度的则抑制其增殖, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>处理的也是如此(图2)。添加1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>的茎段平均增长3.7~5.2 cm, 新展叶片数4.6~7.5片。在培养基4~9号中, 培养基6号中茎段生长高度最低, 为(1.63±0.5) cm, 没有新展叶片; 培养基8号中茎段生长高度最高, 为(5.20±0.5) cm, 是培养基6号的3.2倍; 新展叶片数最多, 为7.5片。

从方差分析的结果(表3)看, 第一因素第三水

表3 不同植物生长调节剂对茎段培养的影响

Table 3 Effects of different plant growth regulators on the culture of stems

培养基编号	GA <sub>3</sub> 浓度/mg·L <sup>-1</sup>	6-BA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	TDZ浓度/mg·L <sup>-1</sup>	生长高度/cm	新展叶数/片
1	0	0.5	0.5	0±0.5 <sup>Fg</sup>	0
2	0	1.0	1.0	0±0.5 <sup>Fg</sup>	0
3	0	1.5	1.5	0±0.5 <sup>Fg</sup>	0
4	0.5	0.5	1.0	2.70±0.5 <sup>De</sup>	1.2
5	0.5	1.0	1.5	3.10±0.5 <sup>Cd</sup>	2.8
6	0.5	1.5	0.5	1.63±0.5 <sup>Ef</sup>	0
7	1.0	0.5	1.5	3.70±0.5 <sup>Bc</sup>	4.6
8	1.0	1.0	0.5	5.20±0.5 <sup>Aa</sup>	7.5
9	1.0	1.5	1.0	3.87±0.5 <sup>Bb</sup>	5.6
K1	0	2.1	2.3		
K2	2.5	2.8	2.2		
K3	4.3	1.8	2.3		
R	4.3	0.9	0.1		

平, 第二因素第二水平, 第三因素第一水平最高, 综合以上因素, 此组合即为WPM+1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ, 为培养基8号。方差分析结果显示, 此组合与其他组合差异性极显著, 表明植物生长调节剂种类和浓度对流苏树带顶、侧芽的茎段培养影响很大。

### 4 生根培养

生根培养以WPM为基本培养基, 不添加任何植物生长调节剂和只添加0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA的均不生根。添加0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA、0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA和0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA的培养基中, 在整个培养过程中无愈伤组织形成, 培养10 d左右时根原基开始形成, 培养30 d时根长达(5±0.5) cm (图3), 无须根, 生根率达46.1%。

## 讨 论

本试验是首次进行流苏树快速繁殖体系的建立, 因此在各方面的研究深度有限。整个试验中, 各种途径选取的基本培养基均为WPM培养基, 流苏树的种胚、愈伤组织和离体茎段均不能在MS培养基上生长。WPM (woody plant medium)培养基是Lioyp和McCown在MS基础上, 针对木本植物的特点创出的一种专门用于木本植物的培养基, 其中许多成份较之MS都有一定的改变(朱大保1990)。与MS培养基相比, WPM培养基的大量、微量元素种类有所减少, 所用分量大为降低。在这种低盐培养基上, 流苏树的组培苗生长较好。在种胚萌发阶段, 不添加任何激素或只使用生长

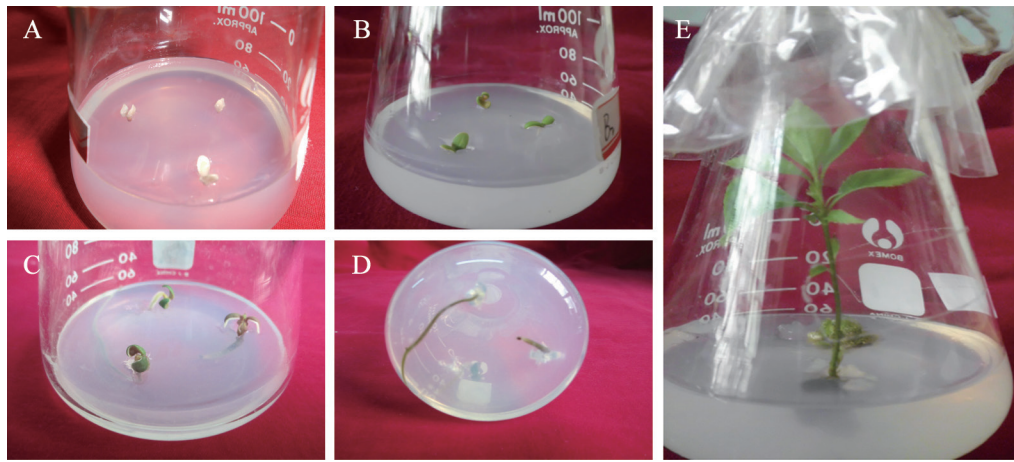


图1 流苏树无菌体系的建立

Fig.1 The asepsis system establishment of *C. retusus*

A: 光培养1 d, 子叶展开; B: 光培养4~5 d, 子叶变绿; C、D: 培养15 d, 萌发生根; E: 生根外植体转接后, 培养15 d, 长成完整无菌苗。

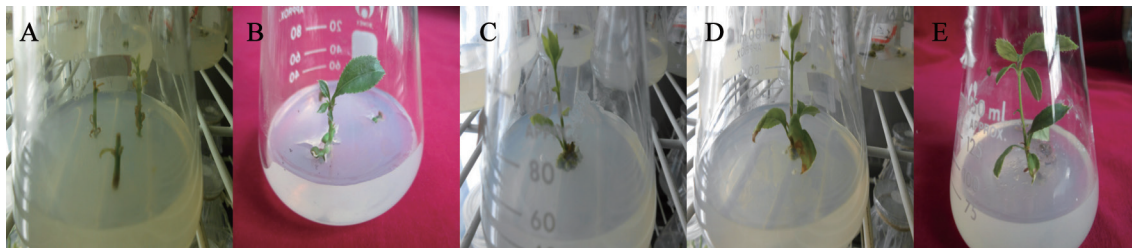


图2 流苏树茎段的生长

Fig.2 The growth of stems of *C. retusus*

A: 培养基1~3号的茎段; B: 培养基4号的茎段; C: 培养基7号, 茎段增长4 cm左右, 新展3~4片叶; D: 培养基9号, 茎段增长4 cm左右, 新展5片叶; E: 培养基8号, 茎段增高5 cm左右, 新展7片叶。

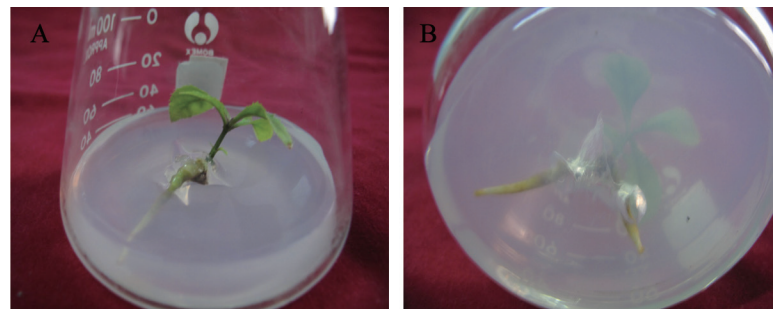


图3 流苏树的生根

Fig.3 The rooting of *C. retusus*

素, 种胚都不能萌发, 这和袁王俊(2005)对桂花组织培养的研究中得出的结论一致, 与张丽杰等(2007)对水曲柳腋芽离体快繁研究中使用的培养基和王彩云等(1999)对节白蜡茎段芽的诱导、生长和增殖中使用的培养基一致。流苏树种胚生根

后, 必须再次转接后才能生芽, 推测流苏树种子和其同属的北美流苏树、同科的白蜡树属等植物一样, 种胚具有双重休眠的特性(李望1997; 张鹏和沈海龙2006)。

流苏树无菌苗可以通过培养带有顶、侧芽的

茎段的方法进行繁殖,这与甘薯的繁殖方式一致(孔祥生等1998)。在带顶、侧芽的茎段培养过程中,GA<sub>3</sub>起到了决定性的作用(Hammatt 1996),在无GA<sub>3</sub>的培养基中,茎段不进行任何生长。TDZ是一种作用强度大的细胞分裂素,其作用强度约为BA的10倍以上,国内外关于TDZ的作用机制、理化性质及生理活性都有很详细的报道(王关林等1997),但是培养效果并不总是随着TDZ的浓度增加而提高,本试验中,在GA<sub>3</sub>定量时,细胞分裂素量越多,生长状况越差,这与1996年Hammatt的研究结果一致(谭燕双2003)。6-BA和TDZ配合使用对茎段增殖起到了促进作用。

生根培养中,单独使用NAA和IBA时,均不能成功诱导生根。二者组合使用0.5 mg·L<sup>-1</sup>浓度时成功诱导生根,这与花叶连翘的研究结果一致(胡海波等2009)。

#### 参考文献

- 胡海波, 黄丹, 许岳香(2009). 木犀科植物组织培养研究综述. 林业科技开发, 23 (3): 5~8
- 孔祥生, 张妙霞, 郭秀璞, 陈明灿, 李友军(1998). 甘薯茎尖分生组织培养及快速繁殖技术研究. 河南农业大学学报, 32 (2): 133~137
- 李望(1997). 种子休眠的机理及其破除方法. 中国农学通报, 13 (3): 49
- 马红(2007). 流苏树开花及种苗特性的研究[学位论文]. 泰安: 山东农业大学
- 时军霞(2011). 不同浓度 IBA和NAA处理流苏树茎段对扦插生根的影响. 山东农业科学, 9: 55~56
- 谭燕双(2003). 水曲柳组织培养外植体的筛选及植株再生的途径[学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学
- 王彩云, 白吉刚, 杨玉萍, 赵路明, 季华(1999). 对节白蜡的组织培养及植株再生. 植物生理学通讯, 35 (4): 299~300
- 王关林, 方宏药, 那杰(1997). 高活性细胞激动素TDZ在植物组织培养中的应用. 植物学通报, 14 (3): 47~53
- 袁王俊(2005). 桂花(*Osmanthus fragrans* Lour.)组织培养的研究[学位论文]. 开封: 河南大学
- 张创峰, 尹卫平, 刘普, 李亮(2012). 流苏花化学成分的提取分离研究. 河南省化学学会2012年学术年会论文摘要集, 开封
- 张丽杰, 张丽玮, 冯丹丹, 赵霞, 沈海龙(2007). 水曲柳腋芽离体快繁研究初报. 植物研究, 27 (3): 319~324
- 张鹏, 沈海龙(2006). 白蜡树属树种种子休眠及其萌发的调控. 植物生理学通讯, 42 (2): 354~360
- 朱大保(1990). 国外杨树组培微繁技术的进展. 北京林业大学学报, 12 (1): 84~91
- Hammatt N (1996). *Fraxinus excelsior* L. (Common Ash). In: Bajaj YPS (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees IV. New York: Springer Berlin Heidelberg, 172~173