DOI:10.19789/j.1004-9398.2016.01.010

不同激素对蜡梅 *Chimonanthus praecox* 愈伤组织诱导的影响*

耿雨蕙 董梦琦 唐京燕 周佳星 李学东**
(首都师范大学生命科学学院,北京 100048)

摘 要

本实验研究了6-BA、2,4-D、IAA、NAA、IBA、KT对蜡梅 *Chimonanthus praecox* 愈伤组织诱导的影响,以及探索愈伤组织诱导的最适培养基配方. 激素筛选实验结果表明2,4-D能诱导蜡梅分化出愈伤组织. 在2,4-D浓度梯度实验中,设计了0、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 7个浓度,结果表明浓度为0.25~1.0 mg/L的2,4-D诱导愈伤组织的效果最好. 在6-BA浓度梯度实验中,也设计了0、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 7个浓度,均未诱导出愈伤组织,表明6-BA不能单独诱导出蜡梅愈伤组织. 以葡萄糖、6-BA和2,4-D三因素组合正交实验共设置了25个组合,得到诱导蜡梅愈伤组织的最适培养基配方为:1%葡萄糖+0.25 mg/L2,4-D+1.5 mg/L6-BA.

关键词: MS培养基,植物激素,愈伤组织,蜡梅 *Chimonanthus praecox*.
中图分类号: Q949.747.2, Q946.885

0 引 言

蜡梅 *Chimonanthus praecox* 是一种名贵的花卉,具有很高的观赏价值. 蜡梅花于寒月早春盛开,花黄如蜡清香四溢,是冬季的观赏佳品是我国特有的珍贵观赏花卉之一. 对于北京地区来说,早花的"十月黄"于12月初开放,其他品种大部分在2月开放,适地发展种植规模,可以实现北京四季有花的景观目标. 除了独特的观赏价值以外,蜡梅也是很好的食材,能够起到解热生津的功效. 此外,蜡梅花还具有一定的药用价值,在医学上认为蜡梅花有解暑生津,开胃散郁,解毒生肌,止咳的作用[1,2].

许多优良品种花卉能通过组织培养技术实现快繁和脱毒,进而筛选出高质高量的株系,进行工业化生产,这是一条行之有效的途径.[3,4] 然而蜡梅的繁殖,目前主要是播种、扦插法和嫁接法[5,6]. 国内外关于蜡梅组织培养技术的研究甚少,国内尚未有过大量诱导出蜡梅愈伤组织并培育出蜡梅植株的成功案例. 本工作旨在这方面进行探索性研究.

收稿日期:2015-04-21
* 首都师范大学实验室开放基金资助项目
** 通讯作者

1 材料与方法

1.1 材 料

本实验的实验材料蜡梅于首都师范大学校园内采集,培养基选用MS固体培养基. 试剂药品为:激素(6-BA、2,4-D、IAA、IBA、NAA、KT)、MS粉、酒精、升汞、Vc液、叶酸、蒸馏水、琼脂、葡萄糖等. 实验器材主要有:美国Percival I-36VL光照生物培养箱(biological incubator)、LRH-250-G型光照培养箱、SONY DSC-F828照相机、Canon 600D单反照相机、PHB-3型便携式酸度计、MA110电子分析天平、微波炉、高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、移液枪、容量瓶等.

1.2 方 法

1.2.1 植物材料表面消毒

将蜡梅外植体用清水洗净. 然后置于75%酒精中浸泡1 min,用蒸馏水洗3次. 将外植体分成5份,再用0.1%升汞分别浸泡6、8、10、12、14 min,每次处理之后用蒸馏水洗5次(表1).

1.2.2 蜡梅愈伤组织的培养

(1)不同激素对蜡梅愈伤组织诱导的影响

将蜡梅外植体分别接种在添加浓度均为1 mg/L的6-BA、2,4-D、IAA、IBA、NAA、KT的含有4%葡萄糖的MS培养基上(表2),置于18 ℃光照培养箱中培养. 同时,做不含葡萄糖的对照实验.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 植物材料表面消毒组合

序号	消毒时间/min	
	75% 酒精	0.1% 升汞
1	1	6
2	1	8
3	1	10
4	1	12
5	1	14

表 2 诱导愈伤组织的培养基成分

	6-BA	2,4-D	IAA	IBA	NAA	KT
MS	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
MS +4% 葡萄糖	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L

(2) 不同浓度的 6-BA 和 2,4-D 分别对蜡梅愈伤组织诱导的影响

将蜡梅外植体分别接种于添加 6-BA(浓度梯度为 0、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/L) 以及 2,4-D(浓度梯度为 0 、0.1、0.25 、0.5 、1.0 、1.5 和 2.0 mg/L) 的含有 4% 葡萄糖的 MS 培养基上(表 3),置于 18 ℃光照培养箱中培养.

表 3 诱导愈伤组织的培养基成分

	MS +4% 葡萄糖	MS +4% 葡萄糖	MS +4% 葡萄糖	MS +4% 葡萄糖	MS +4% 葡萄糖	MS +4% 葡萄糖	MS +4% 葡萄糖
6-BA (mg/L)	0	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2
2,4-D (mg/L)	0	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2

(3) 葡萄糖,6-BA 和 2,4-D 三因素组合对蜡梅愈伤组织诱导的影响

将蜡梅外植体分别接种于添加 6-BA、2,4-D、葡萄糖不同浓度组合的 MS 培养基上,共 25 个组合(表 4),置于 18 ℃光照培养箱中培养.

2 结果分析

2.1 不同消毒时间对外植体消毒效果的影响

实验结果表明蜡梅外植体用 75% 酒精浸泡 1 min、0.1% 升汞浸泡 10 min 的消毒方法最有效.

2.2 不同激素对愈伤组织诱导的影响

将蜡梅叶柄分别接种于不同培养基上 [图 1(3)],实验进行两周后,所有外植体均出现膨大现象,含 2,4-D 激素的外植体膨大最明显 [图 1(4)]. 第六周时,含 2,4-D 的蜡梅叶柄出现少量愈伤组织 [图 1(5)]. 该实验结果表明在 6 种激素中只有 2,4-D 能诱导出蜡梅愈伤组织,且葡萄糖有利于愈伤组织的诱导和生长.

表 4 不同激素配比培养基

序号	葡萄糖(%)	2,4-D(mg/L)	6-BA(mg/L)
1	0	0	0
2	0	0.25	0.5
3	0	0.5	1.0
4	0	1.0	1.5
5	0	1.5	2.0
6	0.5	0	0.5
7	0.5	0.25	1.0
8	0.5	0.5	1.5
9	0.5	1.0	2.0
10	0.5	1.5	0
11	1.0	0	1.0
12	1.0	0.25	1.5
13	1.0	0.5	2.0
14	1.0	1.0	0
15	1.0	1.5	0.5
16	2.0	0	1.5
17	2.0	0.25	2.0
18	2.0	0.5	0
19	2.0	1.0	0.5
20	2.0	1.5	1.0
21	4.0	0	2.0
22	4.0	0.25	0
23	4.0	0.5	0.5
24	4.0	1.0	1.0
25	4.0	1.5	1.5

2.3 不同浓度的 6-BA 和 2,4-D 分别对蜡梅愈伤组织诱导的影响

从各种激素对蜡梅愈伤组织诱导实验中看出只有 2,4-D 诱导出了愈伤组织. 而相关文献表明 6-BA 对植物愈伤组织诱导有重要作用[7-12],因此,同时选取了激素 2,4-D 与 6-BA,观察不同激素浓度对愈伤组织诱导的影响.

2.3.1 2,4-D 不同浓度对蜡梅愈伤组织诱导的影响

实验两周后,含 2,4-D 的外植体均出现膨大现象,第六周时,含 0.25 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L2,4-D 的蜡梅叶柄诱导出愈伤组织 [图 1(6)-(9)]. 据统计,各浓度诱导的愈伤组织个数如表 5.

表 5 2,4-D 和 6-BA 浓度梯度诱导愈伤组织个数

2,4-D 和 6-BA 的浓度/mg·L^{-1}	不同激素中诱导出的蜡梅愈伤组织个数/个	
	2,4-D + 4% 葡萄糖	6-BA + 4% 葡萄糖
0	0	0
0.1	1	0
0.25	9	0
0.5	9	0
1.0	8	0
1.5	5	0
2.0	0	0

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

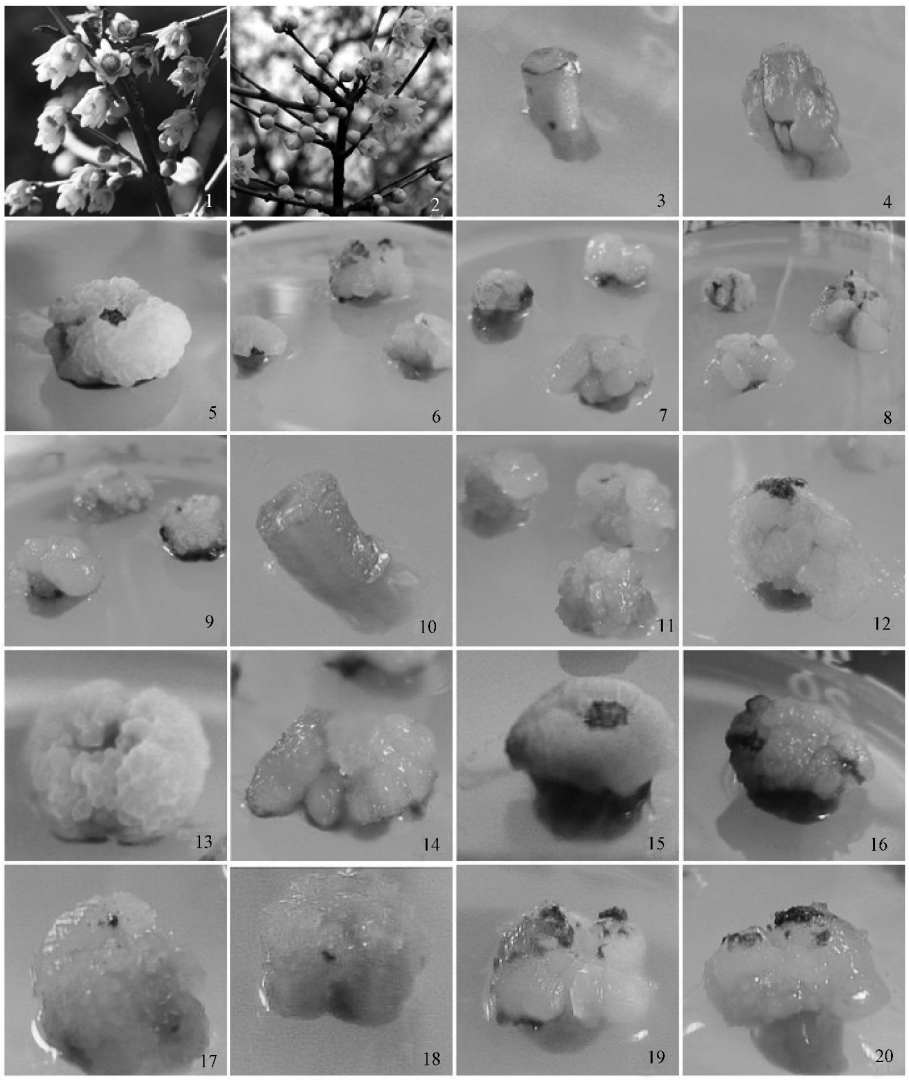


图 1　不同激素和培养基对蜡梅愈伤组织诱导的影响

(1) (2) 蜡梅花; (3) 蜡梅叶柄; (4) 接种于含 1 mg/L2,4-D 培养基上的膨大的蜡梅叶柄; (5) 含 1 mg/L2,4-D 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (6) 含 0.25 mg/L 2,4-D 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (7) 含 0.5 mg/L2,4-D 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (8) 含 1 mg/L2,4-D 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (9) 含 1.5 mg/L2,4-D 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (10) 接种于含 1 mg/L6-BA 培养基上的未诱导出愈伤组织的蜡梅叶柄; (11) 含 1% 葡萄糖 + 0.25 mg/L2,4-D + 1.5 mg/L6-BA 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (12) 含0.5% 葡萄糖 + 0.25 mg/L2,4-D + 1 mg/L6-BA 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (13) 含 0.5% 葡萄糖 + 0.5 mg/L2,4-D + 1.5 mg/L6-BA 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (14) 含0.5% 葡萄糖 + 1 mg/L2,4-D + 2 mg/L6-BA 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (15) 含 2% 葡萄糖 + 0.25 mg/L2,4-D + 2 mg/L6-BA 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (16) 含 2% 葡萄糖 + 0.5 mg/L2,4-D 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (17) 含 4% 葡萄糖 + 0.25 mg/L2,4-D 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (18) 含 4% 葡萄糖 + 0.5 mg/L2,4-D + 0.5 mg/L6-BA 培养基上诱导出的蜡梅愈伤组织; (19) (20) 褐化的蜡梅愈伤组织

2.3.2　6-BA 不同浓度对蜡梅愈伤组织诱导的影响

实验两周后,含 6-BA 的外植体均开始出现膨大现象,但均未诱导出愈伤组织 [图 1(10)].

2.3.3　数据统计

对表 5 数据进行处理分析,结果如图 2.2,4-D 浓度梯度实验结果表明,浓度 0.25 ~ 1.0 mg/L 范围为诱导蜡梅愈伤组织的最适浓度. 各浓度的 6-BA 均不能诱导出蜡梅愈伤组织.

2.4　葡萄糖,6-BA 和 2,4-D 三因素组合对蜡梅愈伤组织诱导的影响

愈伤组织是否能够诱导成功往往受到很多种因素的影响,不同的激素组合可能产生协同作用. 在不同浓度的 6-BA 和 2,4-D 分别对蜡梅愈伤组织的诱导实验中,6-BA 并未成功诱导出蜡梅愈伤组织. 但众多资料表明,6-BA 能够诱导出多种木本植物的愈伤组织,因此选用葡萄糖,6-BA 和 2,4-D 三因素组

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

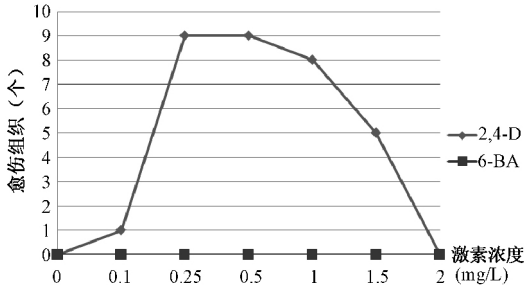


图 2 2,4-D、6-BA 梯度浓度诱导的愈伤组织个数

合来观察对诱导愈伤组织的影响,从而筛选出最优培养基.

实验两周后,2,4-D 和 6-BA 所有浓度梯度的蜡梅叶柄全部出现膨大现象. 序号 12 的组合最先诱导出黄绿色愈伤组织,其余组合无明显变化 [图 1(11)]. 第五周时序号为 7、8、9、17、18、22、23 的组合叶柄诱导出少量黄色愈伤组织 [图 1(12)-(18)]. 序号为 12 的组合愈伤组织体积最大. 各组合诱导的愈伤组织个数如表 7.

表 7 葡萄糖,6-BA 和 2,4-D 三因素不同组合诱导的愈伤组织

序号	葡萄糖浓度/%	2,4-D 浓度/mg·L^{-1}	6-BA 浓度/mg·L^{-1}	愈伤个数
1	0	0	0	0
2	0	0.25	0.5	0
3	0	0.5	1.0	0
4	0	1.0	1.5	0
5	0	1.5	2.0	0
6	0.5	0	0.5	0
7	0.5	0.25	1.0	6
8	0.5	0.5	1.5	5
9	0.5	1.0	2.0	6
10	0.5	1.5	0	0
11	1.0	0	1.0	0
12	1.0	0.25	1.5	9
13	1.0	0.5	2.0	0
14	1.0	1.0	0	0
15	1.0	1.5	0.5	0
16	2.0	0	1.5	0
17	2.0	0.25	2.0	7
18	2.0	0.5	0	5
19	2.0	1.0	0.5	0
20	2.0	1.5	1.0	0
21	4.0	0	2.0	0
22	4.0	0.25	0	8
23	4.0	0.5	0.5	4
24	4.0	1.0	1.0	0
25	4.0	1.5	1.5	0

对表 7 的数据进行处理分析,结果如图 3.

实验说明诱导蜡梅愈伤组织的最适培养基为 12 号组合,即: 1% 葡萄糖 + 0.25 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L 6-BA.

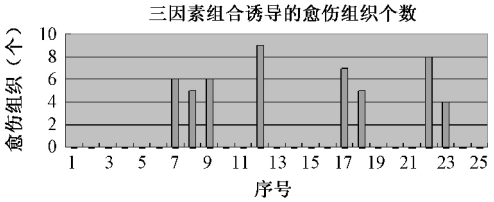


图 3 葡萄糖、6-BA 和 2,4-D 三因素不同组合诱导的愈伤组织个数

3 结论与讨论

3.1 结 论

(1) 蜡梅外植体的最适消毒方法为: 75% 酒精浸泡 1 min、0.1% 升汞浸泡 10 min.

(2) 在培养基中加入葡萄糖,能促进愈伤组织的诱导和生长.

(3) 在 6-BA、2,4-D、IAA、NAA、IBA、KT 共六种激素中,只有 2,4-D 能单独诱导出蜡梅愈伤组织.

(4) 2,4-D 诱导蜡梅愈伤组织的最适浓度范围为: 0.25 mg/L 至 1.0 mg/L.

(5) 最适合蜡梅愈伤组织诱导和生长的培养组合为: 1% 葡萄糖 + 0.25 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L 6-BA.

3.2 讨 论

木本植物在诱导愈伤组织过程中极易出现褐化现象 [图 1(19)、(20)],防止褐化现象的方法主要有三种,分别是在培养基中加入活性炭、叶酸、Vc 液[14-16]. 固体活性炭在培养基中不能溶解,会对愈伤组织的诱导和生长产生很大影响. 因此,本实验选用了 Vc 液和叶酸两种防褐化剂. 但实验证明,Vc 液和叶酸两种防褐化剂均不能有效地减弱蜡梅愈伤组织的褐化现象. 外植体的选择和处理对褐化现象也有较大影响. 幼龄的材料酚类化合物含量少,而成龄材料含量多. 冬春季取材,褐化死亡率最低,其他季节取材则不同程度加重. 外植体组织受伤害程度直接影响褐化程度,在切取外植体时,伤口面积越少,表面消毒剂对外植体伤害越少,褐化程度越轻. 此外,继代周期的长短也会对褐化现象有一定影响. 在愈伤组织诱导过程中,缩短继代周期,及时转移培养材料,可以在一定程度上减轻褐化现象,但不能彻底根除. 但继代次数也不可过多,继代过于频繁易导致玻璃化频率提高. 本实验初期每四周继代一次,出现褐化现象. 后改为每三周继代一次,褐化现象稍有缓解.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蜡梅具有很高的观赏价值、药用价值,并且在农业、工业等众多领域上都有所应用. 因此,蜡梅组织培养技术的研究具有重大意义. 但国内对蜡梅组织培养技术的研究甚少,并且成功率很低. 其原因有两方面,一是蜡梅作为木本植物结构相对苔藓植物来说要更复杂,因此诱导出愈伤组织的难度也相对较大且时间较长. 二是木本植物尤其是蜡梅诱导出的愈伤组织褐化现象很严重,甚至会导致组织死亡. 希望能够通过实验探究出针对蜡梅植物的更加有效可行的方案,抑制蜡梅愈伤组织的褐化,使诱导出的蜡梅愈伤组织能够正常生长,从而完善蜡梅组织培养的技术,实现蜡梅植株的大量培育.

参 考 文 献

[1] 马雪梅, 吴朝峰, 彭仁海. 蜡梅的研究进展 [J]. 中国湿地植被, 2010, 38(34): 19279 – 19280, 19283.
[2] 刘茂春. 蜡梅属的研究 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 1984(2).
[3] 周宜君,周生闯,刘玉,等. 植物生长调节剂对植物愈伤组织的诱导与分化的影响 [J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2007, 16(1).
[4] 李浚明. 植物组织培养教程(第 2 版) [M]. 北京: 中国农业大学出版社. 2002 年.
[5] 曾申军. 蜡梅快速繁殖技术 [J]. 安徽农学通报,2006(7).
[6] 汪洪霞. 快速繁育蜡梅新技术 [J]. 安徽林业科技. 2000(2).
[7] 周俊国,马远,刘弘. 蜡梅的继代培养研究初报 [J]. 河南职技师院学报,2001,20(1).
[8] 平吉成. 用组织培养方法快速繁殖植物材料综述 [J]. 宁夏农学院学报. 1997(2).
[9] 郑均宝,张玉满,王雪蕊,等. 蜡梅的组织培养 [J]. 北京林业大学学报,1995,17 卷增刊 1.
[10] 崔凯荣,邢更生,周功克. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节 [J]. 2002,22(5):349 – 354.
[11] 顾福根,万志刚,宋卫平. 夏蜡梅的组织培养与植株再生 [J]. 植物生理学通讯,2006,42(5).
[12] 胡选萍. 我国植物组织培养研究进展 [J]. 安徽农业科学,2008,36(10):4095 – 4097.
[13] 王利民,周毅,陈龙友,等. 植物组织培养中消毒剂的运用 [J]. 贵州师范大学学报(自然科学版),2002(1).
[14] 潘娟,李先源,李名杨. 植物组织培养过程中常见问题及解决方法 [J]. 安徽农业科学,2009, 37(6):2392 – 2394.
[15] 高明波,李兴泰,阮成江. 东北红豆杉的愈伤组织诱导 [J]. 大连民族学院学报,2011,13(3).
[16] 李青林,邹永田,刘广林,等. 木本观赏植物组织培养技术 [J]. 河北农业科学,2010(6).

Callus Induction of *Chimonanthus praecox* in Different Hormone

Geng Yuhui　Dong Mengqi　Tang Jingyan　Zhou Jiaxing　Li Xuedong**

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing　100048)

Abstract

The purpose of this experiment was to study the effect on callus of moss *Chimonanthus praecox* made by 6-BA, 2,4-D, IAA, NAA, IBA, KT and the most suitable ratio of culture medium. The results of the experiment showed: 2,4-D can induce callus of *Chimonanthus praecox*. In the 2,4-D concentration gradient experiments, 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L, a total of seven experimental concentration were set up. The results showed that the concentration of 0.25 ~ 1.0 mg / L of 2,4-D induced the largest callus with the largest area. In the 6-BA concentration gradient experiments, 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg / L, a total of seven experimental concentration were set up, the results showed that 6-BA cannot induce callus of *Chimonanthus praecox*. Then, Glucose, 6-BA and 2,4-D combined ratio for the three orthogonal factors. In these experiments, twenty-five experimental concentration were set up. The results showed that the combination (1% Glucose +0.25 mg/L2,4-D +1.5 mg / L6-BA) can induce the best callus.

Key words: MS medium, plant hormones, callus, *Chimonanthus praecox*.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net