

云南山茶花茎尖组织培养的初步试验

陈丽华¹, 李云海¹, 姚建伟¹, 胡春洪¹, 官如俊²

(1. 云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650092;

2. 昆明润瑞霖环境工程有限公司, 云南 昆明 650000)

山茶花为山茶科山茶属常绿灌木或乔木, 乔木类树高可达 12 m, 别名茶花、耐冬、晚山茶、川茶, 产地有中国、朝鲜、日本等, 但大多数产于中国。山茶花朵大, 花色丰富艳丽, 在国际花卉界享有盛名, 与著名的观赏花卉如月季、菊花等同属世界级名花, 深受各国人民的喜爱。山茶花的一些种类还是重要的用材树种、油料植物和饮料植物。近年来, 一些山茶属植物的药用保健功能得到越来越深入广泛的开发利用。山茶花传统的繁殖方法主要有播种、嫁接、扦插及压条等方式, 但因其生根较困难和繁殖率低等原因, 很难满足山茶属植物苗木市场的需要。特别是一些名贵或珍稀的品种类型, 由于其育性差, 一般不结种子, 扦插繁殖生根率很低, 严重制约了山茶花的发展。因此, 山茶花种苗的组织培养快速繁殖被认为是一种可以大大提高繁殖系数和加速山茶花种植发展的技术方法, 且对一些优良品种和珍稀品种的保护具有重要意义。

根据相关资料报道, kato 和 kim 等均以山茶属植物的茎为外植体成功获得了再生植株。但成功的品种类型多为华东山茶等。本试验以云南红花油茶的嫩芽及带芽嫩茎段为外植体材料, 研究探索其茎尖组织培养的外植体处理方法和丛芽诱导培养基等, 为云南山茶花名贵珍稀品种的快速繁育提供参考。现将试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

选择云南红花油茶 4~5 年生母树上的春季嫩梢作为试验材料。

1.2 外植体处理

把试验材料切成长 2~3 cm 的带芽或茎尖的嫩茎段, 用洗衣粉水刷洗材料表面的污垢后, 流水冲洗干净备用。

1.3 试验方法

外植体灭菌方法的对比试验: 材料经 70% 乙醇浸 30 秒后转入无菌水中清洗 5 分钟, 然后分别转入饱和次氯酸钙、2% 次氯酸钠和 0.1% 升汞灭菌液中。在饱和次氯酸钙、2% 次氯酸钠灭菌液中分别设置消毒处理 5 分钟、15 分钟、25 分钟的对比试验; 在 0.1% 升汞灭菌液中设置处理 1 分钟、2 分钟和 3 分钟的对比试验。最后用无菌水浸洗 5 次, 每次 5 分钟。所有处理过的材料均转入相同的 1/2MS 培养基中培养, 观察其灭菌效果和被损伤的情况。

丛芽诱导培养试验: 采用庄承纪、Samautin 和蔡汉权等成功获得再生小植株的培养基, 分别培养经上述灭菌处理和初代培养后不污染的材料, 以不加激素的 MS 培养基为对照, 形成一组培养基的对比筛选试验。培养条件为: 白天 25~27℃, 晚上 18~20℃; 每天光照 16 小时, 光照强度 1 500 lux 左右。培养基配方如下: (1) MS+BA 3 mg/L+NAA 1 mg/L+0.7% 琼脂+3% 蔗糖; (2) MS+BA 1 mg/L+IAA 0.1 mg/L+ 泛酸钙 1 mg/L+VB 1mg/L+VC 1 mg/L+ADE 20 mg/L +0.7% 琼脂+3% 蔗糖; (3) MS+BA 2.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+0.7% 琼脂+3% 蔗糖; (4) MS+0.7% 琼脂+3% 蔗糖 (对照组培养基)。

2 结果与分析

2.1 灭菌液与灭菌时间的对比试验结果

表 1 为不同灭菌液在不同灭菌时间上对外植体材料的灭菌效果统计。从表 1 可看出, 在相同接种条数的情况下, 2% 次氯酸钠处理 5 分钟的材料污染率最高, 达到了 91.67%; 其次是 2% 次氯酸钠灭菌处理 15 分钟的材料, 污染率为 66.67%。用 0.1% 升汞处理 1 分钟、2 分钟的材料, 污染率也较高, 分别为 58.33% 和 41.67%。污染率较低的处理是 0.1% 升汞处理 3 分

2007 年第 6 期

钟 (16.67%) 和饱和次氯酸钙处理 5 分钟 (仅 8.33%)。污染率为零的处理是饱和次氯酸钙处理 15 分钟、25 分钟和 2%次氯酸钠处理 25 分钟。经方差分析, 上述污染率除 2%次氯酸钠处理 15 分钟与 0.1%升汞处理 1 分钟之间的差异不显著; 0.1%升汞处理 3 分钟与 2%次氯酸钠处理 25 分钟、饱和次氯酸钙处理 5 分钟、15 分钟和 25 分钟 5 者之间的差异不显著外, 其余之间的差异均达到了显著或极显著水平。总之, 饱和次氯酸钙在此次试验中的灭菌效果是最佳的; 就灭菌时间而言, 用饱和次氯酸钙灭菌处理 15 分钟即可达到零污染的效果。虽然用饱和次氯酸钙处理 25 分钟和用 2%次氯酸钠处理 25 分钟的材料污染率也为 0, 但因耗时较长, 建议不宜采用。

表 2 为不同灭菌剂及不同灭菌时间对云南山茶花组织培养中外植体褐变的影响。从表 2 可看出, 外植

表 1 不同灭菌液在云南山茶花组培外植体灭菌处理中的效果

消毒液	消毒时间 (分钟)	接种数 (条)	污染数 (条)	污染率 (%)	差异 显著性
2%次氯酸钠	5	12	11	91.67	a
2%次氯酸钠	15	12	8	66.67	b
0.1%升汞	1	12	7	58.33	b
0.1%升汞	2	12	5	41.67	c
0.1%升汞	3	12	2	16.67	d
饱和次氯酸钙	5	12	1	8.33	d
2%次氯酸钠	25	12	0	0	d
饱和次氯酸钙	15	12	0	0	d
饱和次氯酸钙	25	12	0	0	d

注: 差异显著性分析采用生物统计学中多重比较法 (最小显著极差法 LSR 法)。

体在 3 种灭菌剂和不同灭菌时间上褐变的趋势。即由于不易去除, 升汞的毒性最大, 仅灭菌处理 1 分钟和 2 分钟, 其使材料的褐变率就分别达到了 83.33% 和 91.67%; 随着灭菌时间的延长, 褐变率逐渐增加, 灭菌 3 分钟时, 褐变率即可达到 100%。其次是 2%次氯酸钠, 灭菌处理 5 分钟、15 分钟和 25 分钟的褐变率分别为 8.33%、16.67% 和 58.33%; 不褐变的情况比升汞处理的要好一些, 但还是有相当一部分材料被损伤, 特别是灭菌处理时间较长的。而饱和次氯酸钙的情况是最好的, 在 3 个不同灭菌处理的时间段上, 其外植体材料的褐变均较少; 处理时间较短时, 褐变率为零。

综合表 1 和表 2 的结果可以得出: 本试验的茎尖外植体材料, 在饱和次氯酸钙处理 15 分钟情况下,

表 2 不同灭菌液及灭菌时间诱发外植体材料褐变的情况

消毒液	消毒时间 (分钟)	接种数 (条)	褐变数 (条)	褐变率 (%)
0.1%升汞	3	12	12	100
0.1%升汞	2	12	11	91.67
0.1%升汞	1	12	10	83.33
2%次氯酸钠	25	12	7	58.33
2%次氯酸钠	15	12	2	16.67
2%次氯酸钠	5	12	1	8.33
饱和次氯酸钙	25	12	1	8.33
饱和次氯酸钙	15	12	0	0
饱和次氯酸钙	5	12	0	0

即可达到较好的灭菌效果 (污染率为零), 且外植体的褐变极少 (即受损伤的程度极小)。虽然饱和次氯酸钙处理 5 分钟的褐变率为零, 但有部分材料受到污染; 而用升汞灭菌处理的材料, 虽然污染率较低但外植体的褐变损伤明显偏高。

2.2 不同激素对云南山茶花茎尖多芽体形成的影响

在本试验中, 云南山茶花茎尖外植体在添加不同激素及浓度组合的培养基中培养 2 周后, 部分外植体茎尖开始膨大或侧芽开始生长伸长; 至 5~6 周时, 部分外植体侧芽部位长出芽条。最终的统计结果如图 1 所示, MS+BA 3 mg/L+NAA 1 mg/L+0.7% 琼脂+3% 蔗糖培养基的外植体数出芽率最高, 达到了 60%; 其次为 MS+BA 1 mg/L+ IAA 0.1 mg/L+泛酸钙 1 mg/L+VB 1mg/L+VC 1 mg/L+ADE 20 mg/L+0.7%琼脂+3% 蔗糖培养基, 出芽率为 42.6%; 而添加 BA 2.5 mg/L 和 NAA 0.05 mg/L 的 MS 培养基的材料出芽率最低, 只有 20%。在对照组 (不加激素的 MS 培养基) 上的材料, 仍无萌动的迹象 (无芽的膨大或生长)。

3 小结及讨论

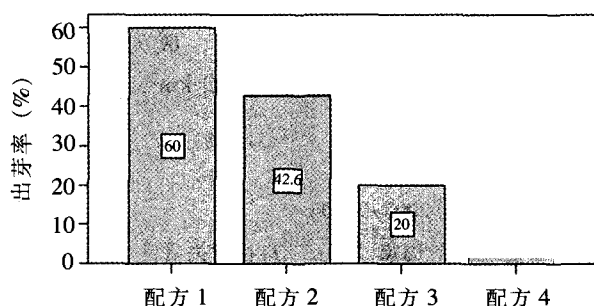


图 1 云南山茶茎尖在不同激素浓度组合 MS 基养上的出芽率
(下转第 30 页)

业提供了必要的技术保障。

3 云南省农科院在发展冬季马铃薯科技成果转化中的实践

3.1 合理布局,有目的地进行免费引种试种新品种

通过认真研究,对云南省冬季马铃薯进行了区划,合理布局,面对不同的目标市场发展不同类型的品种。在冬季马铃薯产业基础较好的地区通常以县为单位,产业发展潜力较好的地区以州(市)为单位,每年在这些地区免费发放不同类型的品种小面积试种,让冬季马铃薯种植者和市场对新品种有初步认识。每年将试种结果收集整理,根据各地的需求制定新品种循序渐进的开发战略。

3.2 加强新品种示范,引导冬作区农民选用新品种

对上年引种试种结果较好、符合当地市场需求的新品种,通常在下一年就进一步扩大面积示范种植。采取种薯补助的方式,通常在重点区域布置安排 0.33~0.67 hm² 示范,非重点区域布置安排 0.13~0.2 hm² 的示范面积。收获时组织专家现场评价验收,并组织农民骨干召开现场会,介绍新品种的优缺点,引导广大农民主动选用新品种。

3.3 抓好种薯的生产和供应,带动冬季马铃薯产业的发展

冬季马铃薯种薯退化较快,收获后的马铃薯又很难长时间储存,不适宜再作下年生产上的种薯,加之冬季马铃薯种植区不适宜生产种薯,冬季马铃薯生产种薯依靠正季繁育基地调运,因此冬季马铃薯产业需要专门的良种繁育基地每年供应生产良种。现有的种

薯供应体系不能完全满足冬季马铃薯生产的需求,新品种的种薯就更加供应不足了。对示范种植表现较好的专用新品种,我们以原原种生产为龙头,扶持带动一批大春季良种繁育基地生产这些品种的良种,最终实现新品种有优良种薯的供应,冬季马铃薯产区能用上合格种薯,通过种薯的供应从而达到带动产业发展的目的。

3.4 建立科技型企业,加快科技成果转化速度

云南省农科院马铃薯研究开发中心,依托从事马铃薯工作的科技人员成立了科技型种薯企业“昆明云薯农业科技有限公司”,拟通过企业对新品种种薯的经营和开发,最大限度地将新品种的种薯繁育和销售结合起来,最终完成对自有科技成果的转化,最大程度地发挥种子对冬季马铃薯生产的贡献。由云南省农科院科技人员成立的种薯企业最大的优势就在于对自身科研所获得的新品种熟悉程度最高,能提供更好的优质种薯和技术服务,同时由于其新品种和服务不易被其它种薯企业所替代,在市场竞争中处于有利地位,能加快新品种的科技成果转化速度。

3.5 做好各级科技培训,建立完善的科技服务体系

在开展新品种示范的同时,云南省农科院马铃薯研发中心应各级基层农业推广部门的邀请,对冬季马铃薯生产地区,针对不同发展水平开展不同层次的科技培训工作。通过培训,云南省农科院马铃薯研发中心与发展冬季马铃薯的州(市)农技推广部门建立起良好的合作关系,同时还通过对基层的培训,建立了冬季马铃薯新品种科技成果转化服务体系。

(上接第25页)

植物组织培养中茎尖外植体在初代培养时的褐变与灭菌剂及其处理时间过长对材料的损伤有关。因不同的灭菌剂在外植体中的残留程度不同(即被清洗干净的难易程度不同),从而对外植体的伤害或毒性也不一样。灭菌剂的毒性大小是外植体材料在初代培养时褐变或死亡的重要因素之一。材料的褐变率从另一个方面可以反映出灭菌剂及其处理时间对外植体材料毒害的程度。一般来说,灭菌效果越好的杀菌剂,其对植物材料的毒性也就越大,如清除不干净则外植体的褐变情况也越严重。植物组织培养最初的步骤就是要使选定的带菌的幼嫩植物体外材,在无菌条件下安全地变成试管内无菌的可连续培养的外植体,直至健壮生长的试管苗。在这一过程中,最大限度地杀灭材

料内外所带的真菌和细菌而又不损伤外植体材料显得相当重要。

本文通过上述对比试验,初步筛选出了云南山茶花带芽嫩茎段较好的灭菌剂及其适宜消毒时间:即云南山茶花带芽嫩茎段在饱和次氯酸钙消毒液处理 15 分钟至 25 分钟情况下,可以较好地杀灭外植体材料所带的污染菌而又不使材料损伤褐变。同时,通过在 MS 培养基上附加不同激素及其浓度组合的进一步试验,筛选出了云南红花油茶较适宜的丛芽诱导的培养基,即 MS 附加 6-BA 3 mg/L 和 NAA 1 mg/L。此试验结果可为下一步工作和云南山茶花名贵珍稀品种等的组培快繁研究提供参考依据。