

八角组织培养试验初报

邓茂林

(西南林学院环境科学与工程系, 云南 昆明 650224)

摘要:以八角顶芽为材料, 试验了几种基本培养基对茎段组织培养的影响, 并研究了八角茎段组织培养技术。结果表明: 0.1% HgCl_2 消毒 12 min 效果较好; 春季外植体比秋季外植体更适离体培养; MS 比 1/2 MS、White、 MS_α 培养基适于茎段的萌芽培养, 萌动率达 27.6%。最适的初代培养基为: $\text{MS} + \text{IBA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 6 - \text{BA} 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 萌芽率达 76.7%。

关键词:八角; 组织培养

中图分类号: S723.132

文献标识码: A

文章编号: 1003-5508(2008)06-0072-02

八角 (*Illicium verum* Hook. f.) 是八角科八角属常绿乔木或灌木, 别名八角茴香、大茴香。树冠塔形, 叶革质倒卵状椭圆形、倒披针形或椭圆形; 花红色, 腋生或近顶生; 聚合蓇葖果, 种子棕褐色; 分布于海拔 200 m ~ 2 100 m 的山地湿润常绿阔叶林中, 我国的云南、湖南、贵州、广东、安徽、江西、福建等省区有栽培, 尽在云南、广西和越南北部有野生。果俗称大料, 调味香料, 可供药用, 鲜果、种子、叶含茴香油, 又名八角油, 可作化妆品工业香料^[1]。

八角自然条件下一般采用种子繁殖。由于种子含油、种皮甚薄、易丧失发芽力, 同时实生苗后代变异极大, 很难保证后代一定优良^[2]。因此, 利用无性繁殖的方法来加快八角种苗的生产, 对扩大八角的栽培利用具有很大意义。利用组织培养不仅可以进行组培快繁和优良品种筛选, 还可扩大种质资源, 并加以保护和利用^[3]。所以建立一个快速高效的离体再生系统显得日益重要, 而八角组织培养鲜见报道, 这一研究对极具经济价值的八角的快繁和进一步育种具有实用价值。通过使离体材料产生脱毒组织再诱导丛生芽能进行大规模的快速繁殖, 还可以利用产生的变异, 为选育新品种提供基础材料, 以期今后八角的组培快繁、品种选育、综合利用及其他研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 with 处理

选用西南林学院教学区内八角树春季萌发的新

梢和秋季时分当年生枝条作为外植体。选取生长茁壮的八角树, 剪取健壮枝梢, 用自来水冲洗 10 min, 剪切成带顶芽的小茎段, 用脱脂棉蘸低浓度的洗洁精溶液擦去表面污物, 并用低浓度的洗洁精溶液清洗 2 遍 ~ 3 遍, 再在流水下冲洗 15 min。

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基选择试验

分别选用 MS、1/2 MS、改良 MS、White 等 4 种基本培养基, 附加 $\text{IBA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 6 - \text{BA} 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 5.8 ~ 6.4。

1.2.2 启动培养

启动培养以 MS 为基本培养基, 采用正交设计, 因素组合分别为 IBA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、6-BA ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、活性炭 ($0, 1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 5.8 ~ 6.4。研究激素活性炭对顶芽诱导的影响。30 d 后统计腋芽诱导率。

1.2.3 培养条件

培养室温度为培养温度 (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 采用日光灯培养, 光照强度 1500 ~ 2000 lx, 光照时数 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒

外植体清洗干净以后, 在无菌条件下于超净工

作台上先用 75% 的酒精浸泡 40 s,再用 0.1% 的升汞(HgCl_2)消毒 8 min、10 min、12 min,再用无菌水冲洗 5 次~6 次,然后切取 1.5 cm 左右带顶芽茎段,无菌滤纸吸干表面水分,接种到不加任何激素的 MS 培养基上,15 d~20 d 后观察不同消毒时间获得无菌外植体的情况(见表 1)。表 1 结果表明,0.1% 升汞消毒 12 min 效果最好,无菌外植体获得率为 26.6%。

表 1 不同消毒时间对获得无菌外植体的影响

消毒时间 (min)	污染芽数 (个)	死亡芽数 (个)	污染率 (%)	死亡率 (%)	无菌外植体 获得率(%)
8	21	7	70	23.3	6.7
10	17	10	56.7	33.3	10
12	11	11	36.7	36.7	26.6

注:接种的芽均为 30 个,培养时间均为 30 d

2.2 基本培养基筛选

将获得无菌外植体接种到 4 种基本培养基,进行净芽诱导,经过 25 d~30 d 的诱导培养,调查各培养基上的分化芽数、叶色、茎高。表 2 结果表明,MS 基本培养基比较适合八角的生长,而以 MS 为基本培养基的启动培养中,芽的分化个数最多,叶片明显大,叶色深绿,启动率高达 26.7%。其他的培养基叶片极小,启动率较低。

表 2 不同基本培养基对芽启动的影响

序号	培养基成分	转接芽 (个)	分化芽数 (个)	叶色	启动率 (%)
①	MS + IBA1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	30	8	深绿	26.7
②	1/2 MS + IBA1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	30	4	鲜绿	13.3
③	MS _改 + IBA1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	30	2	绿色	6.7
④	White + IBA1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	30	2	黄绿	6.7

注: * MS_改 培养基为大量元素中磷含量减少 2/3,钙含量减少 1/3,其它均不变

2.3 不同外植体培养效应

试验使用的春季茎段、秋季茎段培养,30 d 后统计茎段顶芽组织诱导率、褐化率结果(见图 1)。可见:①秋季材料,顶芽组织诱导率为 13.3% 极低,

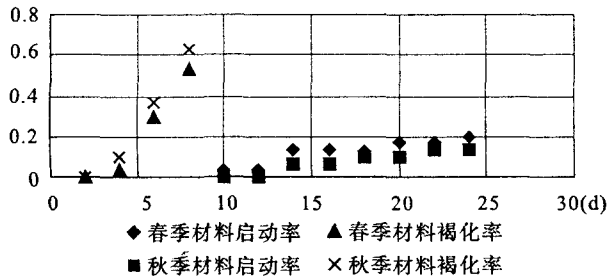


图 1 不同外植体的培养效应

第 8 天的褐化率为 63.3% 最高。②春季材料,顶芽组织诱导率显著提高到 20%,第 8 天的褐化率低至 53.3%。同时春季材料长势好,芽生长饱满,数天后叶色深绿。所以培养宜采用春季萌发的新枝作为外植体。

2.3 启动培养

顶芽培养 7 d 左右,芽体开始上翘或拱起、膨大,约 30 d 后形成脱毒植物组织。从表 3 可以看出,植物激素的不同配比对顶芽组织的诱导率、颜色和叶展大小有着明显影响。

表 3 激素和活性炭对芽体诱导形成的影响

序 列	植物激素		活性炭 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	诱导率 (%)	褐化率 (%)	颜色	叶展大小 (cm)
	IBA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)					
1	0.1	1.0	0	0	73.3	—	—
2	0.1	3.5	1.5	40.0	43.3	绿色	1.0~1.5
3	0.1	5.0	3.0	26.7	16.7	鲜绿	0.5~1.0
4	0.5	1.0	3.0	23.3	6.7	黄绿	0.5 <
5	0.5	3.5	1.5	36.7	20.0	鲜绿	1.0~1.5
6	0.5	5.0	0	60.0	73.3	黄绿	2.0~2.5
7	1.0	1.0	1.5	43.3	33.3	绿色	1.5~2.0
8	1.0	3.5	3.0	76.7	20.0	深绿	2.5~3
9	1.0	5.0	0	53.3	46.7	绿色	2.0~2.5

在 6-BA 和 IBA 组合的 9 组处理试验中,诱导率、叶展大小和颜色受激素浓度处理的影响。经筛选,最适合启动诱导培养基为 (MS + IBA1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA3.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + C3.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),启动诱导率为 76.7%;叶展大小为 2.5 cm~3 cm,整个植株颜色深绿,生长茁壮;同时植株褐变的控制较好。

3 讨论

(1)培养使用的顶芽较腋芽粗大,周围挤满簇生于茎端的叶片,细小的腋芽着生叶腋,导致八角灭菌困难。顶端优势使过多的生长素向下输送,生长素浓度在侧芽部位聚集,过高,抑制着侧芽的生长,表现出顶芽易萌动生长,腋芽不易萌发。同时伤口引起外植体抗逆代谢导致更多茴香油分泌和八角植株通体含油引起严重褐化,致使植物体死亡。

(2)春季是植物生长期,细胞分化生长能力旺盛,此时新梢外植体含有的茴香油比秋季材料含油少。因此,在培养中,春季材料的诱导率和褐变的防止都比秋季材料好。

(3)基本培养基进行的筛选,MS 培养基营养成分对八角生长影响显著,其含有的养份为八角培养

(下转第 87 页)

熟期 10 月 ~ 12 月。果实含油量最高可达 34.6%, 油质较好。

2.2 排水灌溉

西昌地区属干湿季分明的季风气候,在雨季(6 月 ~ 10 月)降雨集中,对地势较平坦、低洼的油橄榄园,为防止积水造成油橄榄根腐病,要注意挖排水沟,排除多余的积水。在旱季(11 月至翌年 5 月),降雨稀少,该时期是油橄榄花芽分化和授粉季节,干旱不利于花芽分化,所以灌溉显得十分重要,须采用人工引水灌溉。

2.3 病虫害防治

目前西昌市危害油橄榄树的主要病虫害有:金龟子(老母虫的成虫)、白蚧、煤烟病、青枯病和缺素病。

防治金龟子可采用:①灯光诱杀。②药剂毒杀。成虫活动期间,用敌百虫 500 倍液、25% DDT 乳剂 250 倍液喷洒毒杀。③人工捕杀。④幼虫活动期间,用 1000 倍敌百液灌苗窝。还可用敌百虫粉剂(每株树按 25 ~ 50 g)撒于树盘内,结合中耕翻入土内毒杀幼虫。

病害防治方法:①加强肥水管理,增施有机肥有利于改良土壤的物理结构,雨季做好排水工作,促进根系发育。②化学防治多用 1% 浓度的等量式波尔多液连喷 2 次 ~ 3 次,每隔 15 d ~ 20 d 喷一次,或用 75% 百菌清 600 倍液或 50% 多菌灵 500 倍液防治效果显著。③涂干:每年应在秋末冬初雨季后进行涂杆,以防治各种害虫和病菌、预防冻害,同时能补充钙元素。

针对缺硼性病害(称丛枝丛芽病)普遍发生现

象,增施硼肥或施用有机肥。

2.4 整形修剪

主要考虑调整植株的营养生长和生殖生长。剪除树冠内部生长差、妨碍通风透光的枝条;剪除弯曲下垂的下部分枝条,让新梢抽出更替;病枯枝、交错扰乱树形枝应剪除;重叠、挤压枝要疏剪;徒长枝按着生位置进行选留或短剪;对在空秃部位抽出的徒长枝进行摘心或短截,培养成结果枝。

2.5 施肥

根据“重施基肥,适当追肥。以有机肥、菌肥为主,化肥为辅,N、P、K 肥综合平衡,微量元素和微生物肥结合施用”的原则,加强肥水管理,增施有机肥以利于改良土壤的物理结构,每年施肥 3 次 ~ 4 次。施肥量根据树龄大小和树势决定,其用量幅度:厩肥 $150 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1}$,过磷酸钙和钙镁磷肥 $1 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1} \sim 2 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1}$,磷肥 $0.5 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1} \sim 2 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1}$,骨粉 $0.5 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1} \sim 5 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1}$,尿素 $0.5 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1} \sim 1.5 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1}$,石灰 $0.1 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1} \sim 2.0 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1}$ 。

根外追肥:在果树开花前、坐果后,选择温度低、湿度大的早、晚或阴天,用喷雾器均匀地将 0.1% ~ 0.2% 的尿素,0.5% ~ 1% 的过磷酸钙或 0.1% 的硼砂溶液喷洒于油橄榄叶片上。

参考文献:

- [1] 徐维英,王贺春. 油橄榄及其栽培[M]. 中国林业出版社, 2004.
- [2] 徐维英. 中国油橄榄[M]. 长春出版社, 2001.
- [3] 周立江. 四川省油橄榄引种栽培及发展的调研与思考[J]. 四川林勘设计, 2004, (1).

(上接第 73 页)

生长所需。同时 IBA 与 6-BA 使用范围为 6-BA ($3.5 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + IBA ($0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。生长素和细胞分裂素诱导芽生长,完成初代诱导发芽。IBA 促细胞的伸长,细胞壁新物质的合成,原生质量增加;6-BA 与生长素配合,调节核酸的作用,影响酶的活性,调控细胞器的发生,促进细胞分裂、增大与伸长,诱导组织形成层的分化和芽器官的分化,叶片扩大和茎长高^[4,5]。

参考文献:

- [1] 中科院昆明植物研究所[CD]. 云南植物志电子版,第十一卷. <http://db.kib.ac.cn>.
- [2] 钟 祥. 八角の利用与栽培[J]. 云南林业, 1996, (6): 20.
- [3] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社, 1991: 1 ~ 300.
- [4] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养教程[M]. 甘肃:甘肃科技出版社, 1996: 25 ~ 180.
- [5] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 中国农业大学出版社, 2002: 233 ~ 251.