

文章编号: 1001-9499 (2007) 02-001-03

单叶省藤萌蘖芽组培快繁技术及试管内开花*

李湘阳 曾炳山 裘珍飞 刘 英

(中国林科院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要: 以单叶省藤萌蘖芽为外植体进行组织培养, 在完善外植体采集技术、消毒技术及防褐变技术基础上, 用改良 MS+6-BA 8mg/L+IBA 1mg/L+2,4-D 0.75mg/L+抗坏血酸 10mg/L+半胱氨酸 2mg/L 培养基诱导芽分化, MS+NAA 1mg/L+IBA 2mg/L 培养基诱导根分化, 改良 MS+6-BA 4mg/L+IBA 0.5mg/L+2,4-D 0.4mg/L+活性炭 0.2g/L 培养基诱导花芽分化, 实现了单叶省藤萌蘖芽的组培快繁, 并在试管内开花。本研究不仅为单叶省藤的良种快繁奠定了基础, 也为深入研究外界条件对单叶省藤性别分化的调控提供了一个简便的实验体系。

关键词: 单叶省藤; 萌蘖芽; 外植体; 组培快繁; 试管开花

中图分类号: S 792.91, S 722.3*7

文献标识码: A

单叶省藤 (*Calamus simplicifolius*) 属棕榈科省藤亚科省藤族省藤属, 是我国特有的棕榈藤种之一, 其藤茎具有良好的工艺特性, 是藤编家具及工艺品的优良材料, 有很高的经济价值和开发应用前景, 也是目前华南地区推广栽培的优良藤种之一。然而, 我国天然藤资源由于长期的过度采收而日趋枯竭。因此, 自 1990 年代开始, 国内开展了单叶省藤的快速繁殖技术研究^[1,2], 但所用外植体都是种胚。由于单叶省藤雌雄异株, 是高度异花传粉的植物, 利用种胚培养出来的植株并不能完全代表母株的遗传特性, 故以种胚为外植体进行组培快繁还无法做到真正意义上的良种繁育。本研究首次突破了以种胚为外植体的局限性, 以单叶省藤的营养器官——萌蘖芽为外植体进行组培快繁。

1 材料与方 法

1.1 材料采集

单叶省藤萌蘖芽采自广东省肇庆市金鸡坑林场。

外植体的采集: (1) 用锄头将萌蘖芽挖离母株; (2) 用刀将萌蘖芽从母株上砍下; (3) 用锯将萌蘖芽从母株上锯下。

采集的外植体根据高度分为 4 类: <15cm 的萌蘖芽为 I 级芽; 15~25cm 的萌蘖芽为 II 级芽;

25~40cm 的萌蘖芽为 III 级芽; >40cm 的萌蘖芽为 IV 级芽。在 6、7、8、9 及 10 月份分别采集。

1.2 消毒方法

用洗衣粉将萌蘖芽外植体清洗干净, 剥去 1~2 层叶鞘, 75% 酒精消毒 15~20 s, 0.1% 升汞消毒 8~10 min, 无菌水漂洗 1 次 (5 min), 剥去多余叶鞘并修剪至适于培养的大小 (约 3~4 cm 长), 0.1% 升汞消毒 1~2 min, 无菌水漂洗 3 次, 分别为 5、5 和 10 min。

1.3 培养条件

(1) 诱导芽分化培养基: 改良 MS+6-BA 8mg/L+IBA 1mg/L+2,4-D 0.75mg/L+抗坏血酸 10mg/L+半胱氨酸 2mg/L; (2) 诱导根分化培养基: MS+NAA 1mg/L+IBA 2mg/L; (3) 诱导开花培养基: 改良 MS+6-BA 4mg/L+IBA 0.5mg/L+2,4-D 0.4mg/L+活性炭 0.2g/L。各培养基所用卡拉胶均为 8.5g/L, pH 值为 5.8。培养温度 24±2℃, 光照强度 1 500~2 000 lx, 每天光照 12 h。

2 结 果

2.1 采集方法对萌蘖芽的影响

采集萌蘖芽外植体的关键在于防止芽体外伤

* 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2006AA100109); “十一五” 国家科技支撑项目 “棕榈藤无性快繁工艺研究”

和芽心震裂。如果芽体有伤口,泥土容易进入芽体内部,无法消毒成功。芽心震裂后,伤口处即迅速褐变,易导致芽心死亡。因而,用锯将萌蘖芽从母株上锯下来效果较好。萌蘖芽处于土壤之中,必须尽量避免在雨天及雨后 1~3 天内采集,否则,污染率将明显上升。

2.2 采集时间对消毒成功和萌发的影响

外植体的采集季节对消毒成功率、芽的生长和丛芽的诱导均有显著影响。试验表明:6~7 月份雨水较多,温度较高,雨后采集的外植体难以消毒成功,其成功率只有 4%~5%;8 月份雨水减少,采集外植体的消毒成功率可达 20% 左右;而 9~10 月份采集的外植体,因土壤干燥,消毒成功率可上升至 35% 左右。从丛芽的诱导情况看,6~8 月份生长旺季采集的外植体,其基部的次级萌蘖芽易萌发,增殖率高。

2.3 丛芽诱导

萌蘖芽在诱导丛芽分化培养基上培养 3 个月后,在基部的次级萌蘖芽萌发并形成第一轮增殖芽(图 1),第一轮增殖芽又在其基部产生下一轮增殖芽,从而达到不断增殖的目的。由表 1 可知,次级萌蘖芽的萌动率与外植体的高度有直接的关系,较高的萌蘖芽更有利于诱导萌蘖芽上的次级萌蘖芽原基萌发并增殖。但越高的萌蘖芽越容易因消毒不彻底而出现污染(表 2)。综合而言,以 25~40cm 高的萌蘖芽为最佳外植体。



图 1 次级萌蘖芽的发生

表 1 不同高度萌蘖芽的萌发

萌蘖芽高度 (cm)	接种数 (个)	萌发数 (个)	萌发率 (%)
<15	14	1	7.1
15~25	15	2	13.3
25~40	20	5	25
>40	22	5	22.7

表 2 不同高度萌蘖芽的污染

萌蘖芽高度 (cm)	接种数 (个)	污染数 (个)	污染率 (%)
<15	20	6	42.9
15~25	40	25	62.5
25~40	66	46	69.7
>40	82	60	73.2

2.4 根诱导

丛芽生长至 3 cm 高时开始展叶,此时可切分为单芽,转至生根培养基诱导生根,20 天可生根,一次生根率达 60% 左右。根据观察,主根长度和苗高都大于 4.0 cm 有利于移植成活,因此,应在生根培养基培养 60 天左右,使根长和苗高达到 4.0 cm 以上。

2.5 试管苗移栽

由于单叶省藤组培苗木木质化程度较高,可不必经过炼苗直接移栽。从培养瓶中取出达到规格的小苗,洗净根部的培养基,移栽至基质中,基质配比为 75% 的黄心土 + 25% 的珍珠岩。每周 1 次,采用 1/800 的多菌灵和 1/800 的百菌清轮流喷施,连续 6 周。移栽后第 2 周开始,每周采用 1/1 000 的复合肥液喷施 1 次,直至苗木出圃。相对湿度控制在 75% 左右,光照强度控制在 3 500~5 000 lx 之间较为合适,自然光 80% 强度遮阳,移栽成活率可达 80% 以上。

2.6 试管内开花

将丛芽诱导培养基上连续继代增殖 6~8 代的丛芽转移到诱导开花培养基上,培养 3 个月左右,可见穗状花序从芽基部产生,并可开花(图 2)。



图 2 单叶省藤试管内开花

3 讨 论

单叶省藤萌蘖芽组培技术的难点是消毒和防止褐变。若采用常规的种胚消毒方法进行消毒,其成功率几乎为零;而采用两次消毒法则可将消

毒成功率提高到40%~50%。由于单叶省藤的萌蘖芽处于土壤之中,存在一定的内生污染,难以消毒成功,所以除了进行消毒方法的改进,还必须严格把握采集季节、时间及萌蘖芽的高度。研究表明,单叶省藤萌蘖芽采集的最适季节是8~9月份,应在连续天晴1周后采集,萌蘖芽的高度应控制在20~40 cm。单叶省藤外植体消毒后也存在严重褐变问题,萌蘖芽外植体的褐变最为严重,不及时处理会导致外植体迅速死亡。经过系列研究发现,采用暗处理、附加活性碳等方法难以达到预期效果,使用聚乙烯吡咯烷酮则会导致外植体产生严重的白色分泌物,采用半胱氨酸和抗坏血酸可以有效地抑制芽外植体的褐变,二者结合效果更好。单叶省藤的种胚是异花授粉后形成的杂合胚,如果仅用种胚进行组培快繁显然无法达到完全的良好无性系快繁和推广,而在基本完善外植体采集技术、消毒技术及防褐变技术基础上,成功获得了以萌蘖芽为外植体的组培苗,为良种藤的快速繁殖奠定了坚实的基础。

迄今还未见单叶省藤乃至其它棕榈科植物试管内开花的报道。试管花的诱导可用于构建植物成花离体实验系统,为研究植物的性别分化机理提供了一个良好的实验体系和实验材料。单叶省藤及棕榈科的其它大部分植物都是雌雄异株植物,目前,其性别分化研究都是空白。由于高等植物性别分化离体实验系统能为植物性别分化机理研究提供一个简单而稳定的实验平台,具有独特优

越性,自1940年代就开始了植物花芽体外培养实验系统的建立,至今已有一些植物种类取得成功,但也有不少实验失败,其中的原因可能是:(1)外植体的生理年龄不适宜,只有处于一定发育阶段的外植体才能在体外培养成功;(2)植物生长调节剂的种类及比例是否恰当;(3)花芽发育中的一些特性是细胞自主性决定的,可扩散因子的作用难以进行调节^[3,4]。我们早期以单叶省藤的种胚为外植体进行组培快繁研究,在所培养的80多个无性系中没有出现一个出现试管内开花的现象,而在以单叶省藤的萌蘖芽为外植体的研究中,13个无性系中就有2个无性系出现试管内开花现象,这为进一步开展单叶省藤性别分化机理研究提供了有利条件。

参 考 文 献

- [1] 曾炳山,许煌灿,刘英等.大量元素对棕榈藤组培增殖的影响[J].中南林学院学报,1999,19(1):24-28.
- [2] 刘英,曾炳山,尹光天.两种省藤组培成苗芽的选择[J].林业科学研究,2000,13(6):679-683.
- [3] 汪俏梅,曾广文.雌雄同株植物性别分化离体试验研究进展[J].植物生理学通讯,1996,32(5):385-389.
- [4] 谢寅峰,张春霞,丁雨龙.竹子开花人工诱导与逆转研究现状及前景[J].浙江林学院学报,2000,17(4):436-440.

第1作者简介:李湘阳(1970-),助理研究员,博士,研究方向为林木组培和转基因研究。

收稿日期:2006-06-13

Rapid Propagation and Flowering of *Calamus simplicifolius* in Vitro

LI Xiangyang

(The Research Institute of Tropical Forestry, Guangzhou 510520)

Abstract This study deals with the tissue culture method of sucker explant from *Calamus simplicifolius*. The technique of collection, sterilization and anti-browning of sucker explant were perfected. Modified MS medium with 6-BA 8mg/L + IBA 1mg/L + 2, 4-D 0.75mg/L + vitamin C 10mg/L + cysteine 2mg/L induced multiple shoots. Roots were formed on modified MS medium containing NAA 1mg/L + IBA 2mg/L. And modified MS medium with 6-BA 4mg/L + IBA 0.5mg/L + 2, 4-D 0.4mg/L + active carbon 0.2g/L induced flowering. This research was very useful for clonal selection and propagation. The result also gave a clue for application of flowering of *Calamus simplicifolius*, in vitro and developed system for studying physiological mechanism of sex differentiation.

Key words *Calamus simplicifolius*; Sucker; Explant; Tissue culture; Tube flowering