

古蜡梅的组织培养和试管苗的移栽及栽培技术

张慧¹,肖敏¹,单丽丽^{2,3},何婷^{2,3},王亦菲^{2,3},陆瑞菊^{2,3},黄剑华^{2,3},褚云霞⁴,刘忠⁵
(¹上海新冈蜡梅花种植有限公司,上海 201823;²上海市农业科学院生物技术研究所,上海 201106;
³上海市农业遗传育种重点实验室,上海 201106;⁴上海市农业科学研究院园艺研究所,上海 201106;
⁵上海交通大学药学院,上海 200240)

摘要: 以提高古蜡梅的组织培养和试管苗移栽及栽培效果为目的,用嘉定钱门塘的古蜡梅为起始材料,进行了无菌苗诱导、快速繁殖、生根和移栽试验。结果表明,1/2MS 作为基本培养基明显优于 Read、WPM、N6;诱导培养基中添加 2.0mg/L 2iP、0.2mg/L IAA、0.5 mg/L GA₃ 和 1.5~5.0mg/L PVP 可提高古蜡梅的繁殖系数和抑制外植体褐化;适当降低快繁培养基中的激素浓度可以防止玻璃苗的发生;添加 0.5mg/L IBA 和 0.05mg/L NAA 可使古蜡梅组培苗的生根率在 75%左右。试管苗移栽前进行 1~2d 的炼苗和移栽后 2 周内保湿防晒可以提高成活率;抑制杂草可以促进试管苗健壮生长;控制地下水水位可以提高试管苗的根系活力。

关键词: 古蜡梅;组织培养;移栽;栽培要点

中图分类号: S625.5+7 **文献标识码:** B

Tissue Culture of Hundred Year Old-*Chimonanthus praecox* and Transplanting and Cultivating of Tube-plants

Zhang Hui¹, Xiao Min¹, Shan Lili^{2,3}, He Ting^{2,3}, Wang Yifei^{2,3}, Lu Ruiju^{2,3},
Huang Jianhua^{2,3}, Chu Yunxia⁴, Liu Zhong⁵

(¹Shanghai Xingang Chimonanthus Praecox Growth Limited Liability Company, Shanghai 201823;

²Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106;

³Shanghai Key Lab of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106;

⁴Horticulture Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106;

⁵School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract: For the purposes of enhancing the effects of tissue culturing, tube-plantlets transplanting and cultivating, the annual branches of hundred-years-old *Chimonanthus praecox* were used as donor materials. Shoot induction, rapid propagation, root induction and cultivation were investigated, and the results showed that the 1/2MS (1/2 of macroelements) as basic media was superior to Read、WPM and N6, the propagation coefficient was increased and the frequency of explants browning was decreased by supplementing with 2.0mg/L 2iP, 0.2mg/L IAA, 0.5 mg/L GA₃ and 1.5~5.0mg/L PVP to the inducing media, the number of vitreous buds were decreased by reducing hormone concentrations of the propagation media, the frequency of rooting was 75% in media contained 0.5mg/L IBA and 0.05mg/L NAA. The transplanting survival rate of tube-plantlets was improved by hardening the plantlets for 1~2 days and maintaining humidity for 14 days. The growth of tube-plantlets was promoted by holding weeds, and root-vigor was increased by controlling the level of groundwater.

Key words: hundred year old- *Chimonanthus praecox*, tissue culture, transplanting, cultivation outline

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目“蜡梅种质资源收集、评价与利用研究”(沪农科攻字(2005)第1-3号)。

第一作者简介:张慧,女,1967年出生,上海人,大专,主要从事林木的繁殖与推广研究。通信地址:201823 上海市嘉定区外钱公路 868 号上海新冈蜡梅花种植有限公司, Tel: 021-59937215, E-mail: wzh69937937@yahoo.com.cn。

通讯作者:陆瑞菊,女,1962年出生,上海人,硕士,长期从事植物组织/细胞培养研究。通信地址:201106 上海市北翟路 2901 号上海市农业科学院生物技术研究所, Tel: 021-62208660-3201, E-mail: cs7@saas.sh.cn。

收稿日期:2008-07-17,修回日期:2008-07-29。

蜡梅科植物起源古老,演化的历史悠久,具有很高的观赏价值,近年来蜡梅不仅作为重要的园林绿化植物被世界各地广泛地引种栽培,而且还被用于开发芳香油生产^[1]。国内外蜡梅科植物的研究集中在生物学特性^[2],野生群落的结构、分布的调查^[3,4],种属的分类^[5-8],繁殖^[9-11]以及花叶生物化学^[12-15]等方面许多重要问题,为研究保护和利用这一珍贵物种打下了良好基础。但是,相对于其他著名花卉,蜡梅的研究、利用还存在较大差距。蜡梅在上海的栽培历史悠久,至今还存有百年以上的古蜡梅名贵良种,以太平天国时期留下的嘉定钱门塘的古蜡梅较为闻名,蜡梅是上海的乡土花木。因此,研究蜡梅组织培养及移栽技术对于保存蜡梅种质资源、扩大蜡梅的栽培范围,充分发挥蜡梅在园林植物中的特殊作用等方面都有重要的理论和实践意义,为此笔者在这一方面做了一些探索。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

研究田间试验于2005年至2008年在上海新冈蜡梅花种植有限公司进行,室内试验在上海市农业科学院生物技术研究所进行。

1.2 供试材料

1.2.1 材料 供试材料为嘉定钱门塘的古蜡梅(*Chimonanthus praecox*),由上海新冈蜡梅花种植有限公司提供。

1.2.2 取材与消毒 从古蜡梅树上选择无病虫害的生长健壮的当年生株条,切取其带芽的茎段作为外植体。经表面修整,剪成1~2cm左右,先用洗洁精洗去表面污垢,再用0.1%HgCl₂浸泡5~8min,然后用无菌水冲洗5~6次。在超净台上将外植体接种到培养基上。

1.3 培养条件

外植体诱导试验的基本培养基为1/2MS(大量元素减半)、Anderson、Read、WPM、N₆等5种,添加2iP1.0mg/L、IAA 0.1mg/L、GA₃ 0.5mg/L;增殖培养基以1/2MS为基本培养基,添加GA₃0.5mg/L和不同种类及浓度的生长素和细胞分裂素;生根培养基添加IBA 0.5mg/L和NAA 0.1mg/L。所有培养基中均添加蔗糖3%,琼脂0.6%,pH 5.6,高温高压121℃、20min灭菌。在(25±1)℃、光强1800lx、每天光照12h/黑暗12h的光周期下培养。

2 结果与讨论

2.1 基本培养基对外植体存活率的影响

用5种不同的基本培养基,接种3~4周后观察古蜡梅在5种培养基上的存活率(表1)。MS培养基表现最为出色,在MS培养基上外植体的存活率为95%,显

著高于其余4种基本培养基,外植体的切口处有少量愈伤组织出现,并在其上直接长出丛生芽;WPM和Anderson次之,外植体存活率为83%和75%,二者之间差异不显著;在Read和N₆培养基上的诱导效果均不理想,明显差于MS、WPM和Anderson,外植体接种后渐渐褐化死亡,存活下来的外植体也长势不佳。选择合适的基本培养基对获得古蜡梅无菌苗的成败至关重要。

表1 基本培养基对外植体存活率的影响

基本培养基	存活率/%	差异显著性	
		0.05	0.01
MS	95	a	A
WPM	83	b	B
Anderson	75	b	B
Read	61	C	C
N ₆	42	D	D

表2 培养基中激素浓度对外植体繁殖的影响

激素种类及浓度/(mg·L ⁻¹)	繁殖系数	差异显著性	
		0.05	0.01
2.0 2iP+0.2 IAA+0.5 GA ₃	2.5	a	A
2.0 BA+0.2 NAA+0.5 GA ₃	2.3	a	A
2.0 2iP+0.5 IAA+0.5 GA ₃	1.9	b	B
1.0 2iP+0.2 IAA+0.5 GA ₃	1.8	b	B
1.0 2iP+0.5 IAA+0.5 GA ₃	1.5	bc	BC
2.0 BA+0.5 NAA+0.5 GA ₃	1.4	bc	BC
1.0 BA+0.2 NAA+0.5 GA ₃	1.2	bc	BC
1.0 BA+0.5 NAA+0.5 GA ₃	1.0	c	C

2.2 培养基中激素浓度对外植体繁殖的影响

培养基中激素的种类及浓度对繁殖系数有较大的影响,从表2可以看出,生长素浓度过高培养基中激素浓度过高或过低对茎尖的生长都不利,如激素浓度过低,外植体生长缓慢;如激素浓度过高,在外植体基部易产生愈伤组织,愈伤组织的过度生长又影响到丛生芽的生长(图1),另外,高浓度的激素刺激外植体在基部产生大量褐色物质,使生长受到抑制。只有在适宜激素浓度的培养基上,接种的外植体在培养一周后逐渐变绿,基部逐渐增大,形成少量愈伤组织,培养一个月左右,可见明显的丛生芽(图2)。为了筛选最适合供试材料生长、繁殖的培养基配方,选择2.0mg/L 2iP、0.2mg/L IAA、0.5 mg/L GA₃作为古蜡梅的快繁培养基,30d继代一次,繁殖系数为2~3。在快繁3代后,从表型看快繁苗与原种苗没有差异,茎秆粗壮,叶色浓绿,长势良好。

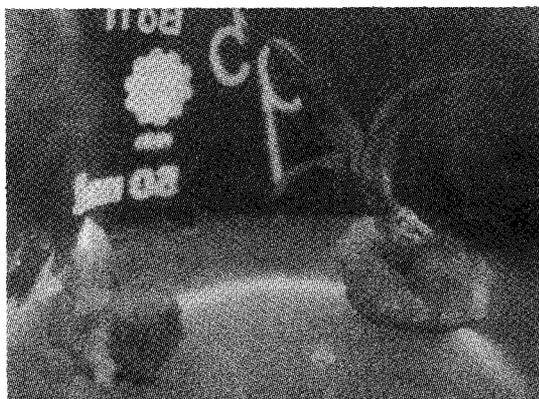


图1 外殖体基部产生的大量愈伤

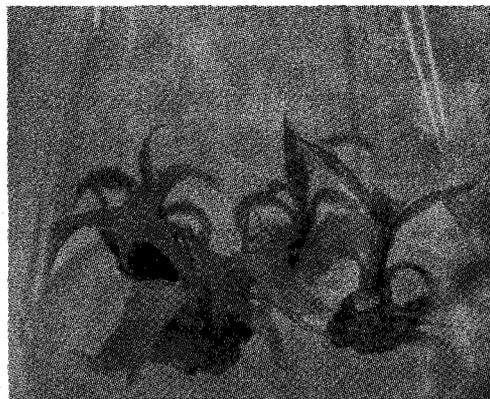


图2 生长健壮的快繁苗



图3 古蜡梅组培苗的大田种植

2.3 培养过程中褐化及玻璃苗的抑制

在古蜡梅的快繁过程中,切口部分受伤氧化,酚类物质外渗,极易出现褐化现象,使快繁无法进行下去,因此抗褐化是个急需解决的问题,褐化抑制剂的筛选显得尤为重要。在繁殖培养基中添加PVP(聚乙烯吡咯烷酮)能较为有效地阻止褐化的发生,使用量在1.5~5.0mg/L。另外,在古蜡梅的快繁过程中,玻璃苗现象也较为严重,严重影响了繁殖系数,在培养基中添加MET、AC效果不理想。如增加光照强度则会加剧褐化程度,后来尝试0.5mg/L 2iP、0.05mg/L IAA、0.1 mg/L GA₃和2.0mg/L 2iP、0.2mg/L IAA、0.5 mg/L GA₃二种浓度的培养基交替使用可以十分有效地控制快繁苗的玻璃化。

2.4 组培苗的生根

选择3~4cm高的健壮组培苗,切掉基部愈伤,接于添加IBA 0.5mg/L和NAA 0.1mg/L的生根培养基中,2周左右基部有白色突起出现,3周左右开始生根,生根率在75%左右。古蜡梅生根NAA浓度范围为0.05~0.1的1/2MS,在只添加IBA的1/2MS里生根率较低。NAA浓度降低,生根慢,生根率低;NAA浓度增大,植株基部易产生愈伤组织,因而适宜的NAA浓度对古蜡梅生根至关重要。

2.5 组培苗移栽管理要点

古蜡梅组培苗在四月中旬萌芽前或秋末休眠后进行移栽,移栽前进行1~2d的炼苗,移栽后2周内要遮荫。组培苗成活后抗逆性强(图3),对环境条件要求不严格,人工驯化成活率高,田间管理上较粗放,与嫁接苗、籽播苗相似。

松土除草:蜡梅发生杂草危害有三个高峰期,一个是幼苗期,幼苗期杂草发生严重,第二是春季,第三是梅雨季节,雨热同期,杂草发生迅猛,与蜡梅植株争肥、争光,严重影响蜡梅生长。因此整个生育期要进行3次除草,结合除草疏松土壤,减少病虫害发生。

肥料:一般春早施氮肥,以利于苗粗壮,每亩施肥20~30kg,7~8月份间为蜡梅花芽形成期,施肥每隔1月施一次,磷、钾肥有助于花芽分化,秋后再施一次干饼肥,以供开花时对养分的需要。

水分管理:蜡梅怕涝,地下水位过高会导致根系厌氧呼吸加剧,因而根部积水会导致蜡梅烂根而死亡,蜡梅平时一般不浇水,只有天气干旱时可适当浇水,浇水时间应选择在早晨气温较低时进行。冬季组织人员深挖沟系,确保田间沟系排水通畅,减轻渍害。

病虫害防治:(1)病害:蜡梅在常规栽培过程中,南方雨水较多,随着温度上升病较多,常发生褐斑病、叶

斑病等细菌病害,防治可用多菌灵 500 倍喷洒或甲基托布津 1000 倍液。(2)虫害:侵害蜡梅的有早春蚜虫、盲蝽、叶蝉等为主及蛀干类害虫,用吡虫啉 1000 倍液或歼灭 4000 倍液交替打,对于蛀干类害虫可用综合防治方法,7 月初孵幼虫抗药力差,可在树干蛀孔处注射 90%敌百虫 20 倍液,毒杀幼虫或用毒签塞虫孔,并用湿土封堵洞口中。

参考文献

- [1] 刘力,竺叶青.蜡梅科 7 树种的叶精油成分及其分类意义.植物分类学报,1995,33(2):171-174.
- [2] 鲁涤非,陈龙清.蜡梅科研究进展.北京林业大学学报,1999,21(2):124-128.
- [3] 陈龙清,陈俊愉.蜡梅属植物的形态、分布、分类及其应用.中国园林,1999,15(61):76-77.
- [4] 赵冰,张启翔.中国蜡梅属种质资源的分布及其特点.广西植物,2007,27(5):730-735.
- [5] 李焯,李秉滔.蜡梅科植物的分支分析.热带亚热带植物学报,2000,8(4):275-281.
- [6] 赵冰,维新艳,张启翔.蜡梅品种的数量分类研究.园艺学报,2007,34(4):947-954.
- [7] 陈龙清,陈俊愉,郑用琏,等.利用 RAPD 分析蜡梅自然居群的遗传变异.北京林业大学学报,1999,21(2):86-90.
- [8] Kai-Ge Zhao, Ming-Qin Zhou, Long-Qing Chen, et al. Genetic Diversity and Discrimination of *Chimonanthus praecox* (L.) Link Germplasm Using ISSR and RAPD Markers. HORTSCIENCE, 2007, 42(5):1144-1148.
- [9] 周俊国,扈惠灵,马远,等.蜡梅的继代培养研究初报.河南职业技术学院学报,2001,29(1):19-20.
- [10] 张林,田兴范,张经芬.蜡梅组织培养和植株再生.植物生理学通讯,1990,(3):42.
- [11] 曾静,睦顺照,余国武,等.蜡梅的离体培养与植株再生.西南大学学报(自然科学版),2007,29(4):120-123.
- [12] 李焯,李秉滔.蜡梅科植物的叶表皮特征及其在分类上的意义.热带亚热带植物学报,1999,7(3):202-206.
- [13] 黄坚钦,张若蕙.蜡梅科 9 种叶的比较解剖.浙江林学院学报,1995,12(3):237-241.
- [14] 吴昌陆,胡南珍.蜡梅花部形态和开花习性研究.园艺学报,1995,22(3):277-282.
- [15] 周莉花,郝日明,吴建忠,等.亮叶蜡梅的传粉生物学初步研究.园艺学报,2003,30(6):690-694.