

夏蜡梅组织培养试验初报

邵果园^{1,2}, 蔡荣荣¹, 王力超², 梁国鲁^{2*}

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要:以夏蜡梅茎段为外植体, 进行夏蜡梅组培试验, 结果表明: 外植体茎段的最佳消毒方式是先用 70% 酒精消毒 10 ~ 15 s, 再用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 3 ~ 5 min; 继代增殖培养的最佳培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 30 g/L, 增殖系数 4.03, 茎芽生长粗壮; 最佳生根培养基为 1/2MS + IBA 0.4 mg/L。

关键词:夏蜡梅; 组织培养; 增殖; 生根

中图分类号: S685.99

文献标识码: B

夏蜡梅 (*Calycanthus chinensis*) 是蜡梅科夏蜡梅属唯一种^[1], 又名牡丹木、黄琵琶等, 叶大而色翠绿, 外花被片花瓣状, 白色, 边缘紫红色, 内花被片肉质, 金黄色, 幽雅美丽, 因其在炎炎夏日开花而备受宠爱^[2]。夏蜡梅集中分布在浙江省临安市境内, 是国家二级保护珍稀濒危植物^[3]。由于夏蜡梅在植物学界的独特地位和观赏价值, 这一浙江特有的国宝已引起国际上的关注, 并被引种到美国、加拿大、荷兰、英国等国^[4]。

夏蜡梅主要靠种子繁殖, 不仅易发生性状变异, 而且繁殖率低、育苗周期长, 满足不了生产和科研的需要。利用组织培养技术可以在短时间内达到快速繁殖的目的, 并可进行植株的脱毒和品种复壮^[5]。至今国内未曾见有关夏蜡梅的组织培养报道。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为 3 ~ 4 月萌发的夏蜡梅新梢, 切取幼嫩茎段。取材地点为浙江林学院蜡梅资源圃。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 带芽茎段 (至少带有两个未萌发的芽) → 洗涤精溶液浸泡 30 min → 自然水下冲洗 20 min → 无菌超静工作台上, 70% 酒精溶液漂洗 10 ~ 15 s → 放入 0.1% 升汞中消毒 3、5、7、9 min → 无菌水漂洗数次 → 接入分化培养基。每次处理外植体茎段 20 个。观察污染情况和茎段的生长情况, 第 15 d 进行统计。

1.2.2 增殖和生根培养 将初代培养萌发的芽 (芽高 1.5 cm 左右), 接入分化培养基培养。分化培养基以 MS 为基本培养, 附加蔗糖 30 g/L、卡拉胶 5.8 g/L、NAA 0.1 mg/L 和一定浓度的 6-BA (分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L), pH 5.8。每种配方处理芽 30 个, 60 d 后观测并统计芽数和增殖系数^[6]。进行方差分析比较四个分化培养基的效果差异^[7]。

将高 2.0 cm 以上的芽转入生根培养基中培养。试验先后以 1/2MS 培养基附加 IBA (0、0.2、0.4、0.6 mg/L)。每个处理 30 个芽。20 d 统计生根情况。

1.2.3 培养条件 培养温度 24 ~ 25℃, 光照强度 1 500 ~ 2 000 lx, 光照时间 14 ~ 16 h/d。

2 结果与分析

2.1 0.1%升汞消毒时间对外植体的影响

从试验统计数据(表1)来看,用0.1%升汞处理夏蜡梅茎段7~9 min,污染率为0,但存活率仅有5%~10%;而用0.1%升汞处理3~5 min,消毒时间较短,但污染率并不高,存活率也较好,说明0.1%升汞处理茎段的适宜时间为3~5 min。这与夏蜡梅茎段幼嫩、木质部结构疏松不能忍受升汞长时间的毒害有关,另外由于试材为刚萌发的新梢,外植体感染的杂菌较少,消毒处理的时间可大大缩短。

表1 升汞消毒时间夏蜡梅对外植体的影响

消毒时间/min	接种茎段数	污染数	存活数	污染率/%	存活率/%
3	20	2	18	10	90
5	20	1	16	5	80
7	20	0	2	0	10
9	20	0	1	0	5

2.2 不同激素浓度对芽分化的影响

转接在分化培养基上后5 d左右腋芽开始萌动,8 d左右展叶,将腋芽切下转入分化培养基能够继续增殖。但在6-BA浓度不同的分化培养基上增殖系数各不相同,低的仅2.97,高的可达4.03,侧芽的生长状况也有一定差异(表2)。

表2 6-BA不同浓度对夏蜡梅芽分化的影响

培养基编号	6-BA/mg·L ⁻¹	处理芽数	芽增殖数	增殖系数	侧芽的生长情况
1	1.0	30	73	2.43	苗高0.8cm,茎干细弱
2	1.5	30	90	3.00	苗高1.0cm,茎干粗壮
3	2.0	30	121	4.03	苗高0.6cm,茎干粗壮
4	2.5	30	89	2.97	苗高0.3cm,茎干细弱

根据表2数据,求得总变异自由度DFT = nk - 1 = 10 × 4 - 1 = 39; 处理间自由度DFt = k - 1 = 4 - 1 = 3; 误差自由度DFe = k(n - 1) = 4 × 9 = 36; 矫正数C = T²/nk

表3 F测验结果

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
处理间	3	120.875	40.292	6.781**	2.87	4.38
处理内	36	213.900	5.942			
总变异	39	334.775				

= 373²/(4 × 10) = 3 478.225; SST = Σy² - C = 334.775; SSt = ΣTi²/n - C = 120.875; SSe = SST - SSt = 213.900。将上述结果录入表3进行F值测验,结果表明,4个分化培养基处理之间达到了极显著的差异。

各平均数多重比较时进行LSRa值计算,算得单个平均数的标准误差SE = 0.771。由表4可知,在诱导芽的分化上,培养基MS + 6-BA2.0 mg/L + NAA0.1 mg/L的效果显著高于其他培养基,增殖系数达4.03;而其余三种培养基之间的增殖系数虽各有不同,但并无显著差异,效果不明显。此外,在6-BA浓度高于2.0 mg/L时,在接种芽基部容易产生大量的愈伤组织。这些愈伤组织很难诱导形成芽,反而影响侧芽的正常生长。

表4 培养基效果显著性

培养基编号	平均出芽数	差异显著性	
		5%	1%
3	12.1	a	A
2	9.0	b	B
4	8.9	b	B
1	7.3	b	B

2.3 IBA浓度对生根的影响

夏蜡梅的分化芽在4种生根培养基中均可生根,一般10~15 d便有根系从基部长出。其中以1/2MS + IBA0.4 mg/L生根效果最好,生根率62.4%,其他3种配方1/2MS、1/2MS + IBA0.2 mg/L、1/2MS + IBA0.6 mg/L的生根率分别是10.0%、45.6%和32.9%。而且,随着IBA浓度的增加,产生的不定根越粗壮。但在高浓度IBA的条件下愈伤化严重,对移栽成活有不利影响。

2.4 小苗移栽

当组培苗长至3~5 cm高时,将其从培养室中移至气温较低的室内,开瓶炼苗2~3 d后再移栽。栽植前先培养土(由腐质土和珍珠岩按1:3比例混合组成)进行灭菌处理,移栽后浇透水,初期加盖塑料薄膜进行保温、保湿,并保持较高的空气湿度。移栽一周后可放小口通风,以后风口可逐渐变大,二周后可完全揭开薄膜。定期浇水,保持土壤湿润,每周用多菌灵溶液喷雾,防治病害发生。小苗有98%的成活率,移栽成活后,每周用配置好的无机营养液进行营养供给。经过一个月左右的管理,即可定植。

3 讨论

外植体选择是组织培养的第一步,不同种类或不同器官植株再生能力差异较大,应依据花卉材料的特点来选择,以便达到最佳效果。本研究在试验初期曾通过采用夏蜡梅植株不同部位为外植体进行比较:以茎尖作为外植体,污染较少,但生长很缓慢;以茎段为外植体,污染较大,但一旦成活,分化速度较快。外植体消毒时间长短也和取材季节密切相关,大多数植物的茎段用升汞处理 10 min 左右能起到较好的消毒效果。但以夏蜡梅初春幼嫩茎段为外植体,处理 3 ~ 5min 便有较好的消毒效果;而采用秋冬枝条的茎段为外植体用升汞处理 10 ~ 15 min 仍有很高的污染率,且外植体全部呈水渍状死亡。这可能是夏蜡梅的鳞芽由主芽和副芽叠生构成复芽且外被蜡质层而导致无法彻底灭菌。本试验表明,夏蜡梅以初春幼嫩茎段为外植体比较适宜,这与大多数植物应在生长开始的季节采样一致,生长末期或休眠期的外植体对诱导反应迟钝^[8]。

在培养中有茎段周围的培养基变绿现象发生,可能是叶绿体的渗透,经过多次转接,该现象可消失。随着培养时间的增长,茎段上皮孔增大,有粉末状物质溢出,其原因不明,是否影响芽的增殖和分化也有待进一步的研究。增殖培养过程中还发现,不同激素的处理以及环境条件对芽的分化也有一定的影响,其最佳培养方案有待进一步的探讨与研究,以使夏蜡梅的快繁体系更加完善。

参考文献:

- [1] 张若蕙,刘洪涛,等.世界蜡梅[M].北京:中国科学出版社,1998:2-3.
- [2] 徐江森.大明山的“山花”——夏蜡梅[J].花卉世界(浙江林业),2004(1):27.
- [3] 邵果园.氮离子注入夏蜡梅种子的 M1 代早期表型观察[J].热带农业科技,2006,29(2):12-14.
- [4] 何晓玲.临安“国宝”夏蜡梅[J].文化交流,2004(5):62.
- [5] 潘瑞焱.植物组织培养[M].广州:广东高等教育出版社,2001:37-39.
- [6] 周俊国,马远,刘弘,等.蜡梅的继代培养研究初报[J].河南职业技术学院学报,2001,29(1):19-20.
- [7] 明道绪.生物统计附试验设计[M].北京:中国农业出版社,2001.92-147.
- [8] 周涛,张启翔.观赏花卉组织培养中外植体材料的选取[J].山东林业科技,2003(1):43-44.

Study on Tissue Culture of *Calycanthus chinensis*

SHAO Guo-yuan^{1,2}, CAI Rong-rong¹, WANG Li-chao², LIANG Guo-lu²

(1. Zhejiang Forestry College Forestry and Biotechnology Faculty, Lin'an 311300, China;

2. Southwest University College of Horticulture and Landscape, Chongqing 400716, China)

Abstract: Experiment on tissue culture of *Calycanthus chinensis* by using stems as explant showed that the optimal sterilizing method was dipping the stems in 70% alcohol for 10 ~ 15 seconds and 0.1% Hgcl for 3 ~ 4 minutes. The optimum medium for multiplication was MS + 6-BA2.0mg/L + NAA0.1mg/L + sugar 30 g/L, and the rate of regeneration reached 4.03 with the IBA concentration of 0.4 mg/L in 1/2MS.

Key words: *Calycanthus chinensis*; tissue culture; multiplication; rooting