

文章编号: 1000-2286(2006)05-0665-04

多花白澳山龙眼组织培养研究

王奇, 胡秀, 范贤熙, 段晓梅, 黄美娟, 樊国盛, 邓莉兰*

(西南林学院 园林学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 对多花白澳山龙眼组织培养中的无菌发芽、增殖培养、幼芽伸长生长、根诱导等进行了研究。结果表明: 在固体培养基中的发芽率比在液体培养基中的发芽率高 5%, 最佳丛芽增殖配方为 1/2MS + 1.0BA + 0.01NAA + 15B9 + 30 g/L 蔗糖, 最佳幼芽伸长生长配方为 1/2MS + 1.5BA + 0.01NAA + 5B9 + 30 g/L 蔗糖, 最佳生根配方为 1/2MS 改良 + 30 g/L 蔗糖。

关键词: 无菌发芽; 增殖培养; 幼芽伸长生长; 根诱导; 多花白澳山龙眼

中图分类号: Q943.1; S667.2 **文献标识码:** A

A Study on Tissue Culture of *Leucadendron floridum*

WANG Qi, HU Xiu, FAN Xian-xi, DUAN Xiao-mei,
HUANG Mei-juan, FAN Guo-sheng, DENG Li-lan*

(Faculty of Landscape Architecture, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: This paper deals with aseptic germination, proliferation culture, plumule elongation and root inducing in tissue culture of *Leucadendron floridum*. The results show that the germination rate is 5% higher in solid culture medium than that in liquid culture medium, the best medium for axillary shoot proliferation is 1/2MS + 1.0BA + 0.01NAA + 15B9 + 30 g/L sugar, the best medium for plumule elongation is 1/2MS + 1.5BA + 0.01NAA + 5B9 + 30 g/L sugar, and the best medium for root inducing is 1/2Modified MS + sugar 30 g/L.

Key words: aseptic germination; proliferation culture; plumule elongation; root inducing; *Leucadendron floridum*

多花白澳山龙眼 (*Leucadendron floridum*) 又名多花银叶树, 是山龙眼科 (Proteaceae) 银叶树属 (*Leucadendron*) 的一种常绿灌木, 高 2 m。叶有银色光泽, 花黄色, 直径约 2.6 cm, 种子黑褐色, 三棱形, 长约 0.5 cm, 宽 0.3 ~ 0.4 cm, 花期 9 ~ 10 月。

本种原产于南非, 是南非的一种重要出口鲜切花, 具有较高的经济效益和生态效益。在南非, 本种生产上主要采用播种育苗方式进行繁殖, 但得到的苗木良莠不齐。目前我国主要利用种子育苗, 但由于种子引进成本高, 数量少, 使得优良种质推广受到限制, 要达到在最短的时间内推广的目的, 通过组织培养进行快繁是一条有效途径。

有关多花白澳山龙眼组织培养方面的研究, 还未见报道。为了加快多花白澳山龙眼优树的快繁和推广, 本文对多花白澳山龙眼组织培养中种子无菌发芽、增殖培养、促进幼芽伸长生长、根诱导等关键技术进行了探索研究。

收稿日期: 2006-06-15

基金项目: 国家 948 项目 (2003-4-20)、西南林学院园林植物与观赏园艺省级重点学科项目 (2002C02) 和云南省高校教师科研带头人基金共同资助 (2004SW01)

作者简介: 王奇 (1981-), 男, 在读硕士, 研究方向为园林植物资源, E-mail: w_q_007@yahoo.com.cn; * 通讯作者: 邓莉兰。

1 材料与方 法

1.1 材 料

材料采用西南林学院园林学院 2005 年 6 月从南非引进的多花白澳山龙眼 (*Leucadendron floridum*), 种子在无菌条件下发芽, 得到无菌苗后取其幼芽进行增殖、生根。

1.2 方 法

1.2.1 种子无菌发芽 将种子在蒸馏水中浸泡 24 h 后转入 $\varphi = 70\%$ 的酒精中处理 10 s, 然后用 0.1% 的 $HgCl_2$ 处理 12 min, 最后用无菌水冲洗 4~6 遍, 分别接种于 1/2MS 培养基 (有琼脂 6.5 g/L, 30 g/L 蔗糖) 和 1/2MS 培养液 (纸桥, 30 g/L 蔗糖) 中, 每个处理 3 次重复, 每个重复接种 30 粒。在光照培养箱中, 以每日光照 12 h, 光照强度为 3 000 lx, 白天 20 $^{\circ}C$, 晚上 10 $^{\circ}C$ 的条件下进行变温培养。观察并记录第 1 粒种子发芽时间、发芽结束时间及污染状况。

$$\text{污染率} = \text{污染数} \div \text{接种总数} \times 100\%$$

$$\text{发芽率} = (\text{接种总数} - \text{污染数} - \text{未发芽数}) \div \text{接种总数} \times 100\%$$

1.2.2 增殖培养和幼芽伸长生长正交试验 首先对 6-BA、KT、NAA、IAA、IBA 等生长调节剂不同浓度单因素进行试验, 发现 6-BA、NAA 对本种的丛芽分化和伸长生长作用最大。在以 MS 和 1/2MS 为基本培养基的对比试验中发现 1/2MS 比 MS 更适合植株的生长。在此基础上取无菌发芽所得的长约 1 cm 的幼苗嫩茎, 以 1/2MS 为基本培养基, 选定 6-BA、NAA 两种生长调节剂和维生素 B₉, 添加 30 g/L 蔗糖, 6.5 g/L 的琼脂, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。每个处理 3 次重复, 每个重复接种 30 个芽。在每日光照 14 h, 光照强度为 3 000 lx, 温度为 $(25 \pm 2)^{\circ}C$ 的条件下培养 40 d, 观测嫩茎抽芽数量和幼芽高度, 确定增殖培养和幼芽伸长生长的最佳配方。

1.2.3 生根培养 将长度约为 2 cm 的嫩茎剪下, 转入以 1/4MS、1/2MS、MS (改)、1/2MS (改) 为基本培养基的生根培养基中进行根的诱导, 培养基中附加不同浓度的 IBA 和蔗糖, 6.5 g/L 的琼脂, 每个处理 3 次重复, 每个重复接种 30 个芽, 在每日光照 12 h, 光照强度为 3 000 lx, 温度为 $(25 \pm 2)^{\circ}C$ 的条件下培养 50 d, 统计生根率、生根条数/株和根长度等指标, 以及观察植株生长状况。

表 1 正交试验因子及水平

Tab.1 Factors and levels of orthogonal design

水 平	因 素		
	A 6-BA /mg · L ⁻¹	B NAA /mg · L ⁻¹	C B ₉ /mg · L ⁻¹
1	0.5	0.01	5
2	1.0	0.1	15
3	1.5	0.15	25

表 2 不同发芽方式的发芽效果

Tab.2 Effects of germination on different germinate method

发芽方式	首粒种子发芽 天数/d	发芽结束 天数/d	污染率 /%	发芽率 /%
固体培养基	17	49	13	55
液体培养 (无琼脂, 用纸桥)	15	44	40	50

2 结果与分析

2.1 不同发芽条件的发芽效果

由试验得知 (表 3), 在纸桥上发芽 (图 2) 的种子于接种后的第 15 d 开始发芽, 至接种后第 49 d 发芽结束, 共历时 32 d, 其中 40% 的种子集中于第 20~35 d 之间发芽, 13% 的种子被污染, 22% 的种子未发芽。在固体培养基上 (图 1) 发芽的种子于接种后第 17 d 开始发芽, 至接种后第 44 d 发芽结束, 共历时 27 d, 其中 37% 的种子于第 23~34 d 之间发芽, 40% 的种子被污染, 10% 未发芽。因此可以看出, 两种不同的发芽方式对多花白澳山龙眼种子发芽效果有所不同, 其中以固体培养方式较好, 发芽率比液体培养方式高 5%, 但液体培养方式在发芽时间上比固体培养方式短。

2.2 不同组合对丛芽诱导及促进幼芽伸长生长的影响

由表3得知,在丛芽诱导方面,第1组、第4组和第5组丛芽增殖倍数最高,达到3.5倍;在幼芽伸长生长方面,第1、9组高度最高,均超过2 cm。在诱导丛芽方面的最优组合为 $A_2B_1C_2$,其对应的浓度分别为6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.01 mg/L、B9 15 mg/L。在促进幼芽伸长生长方面的最优组合为 $A_3B_1C_1$,其对应的浓度分别为6-BA 1.5 mg/L、NAA 0.01 mg/L、B9 5 mg/L。



图1 无菌发芽(固体培养基)

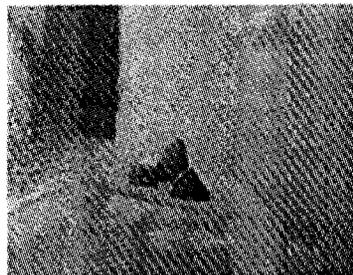


图2 无菌发芽(液体培养基)



图3 丛芽增殖及幼芽伸长生长

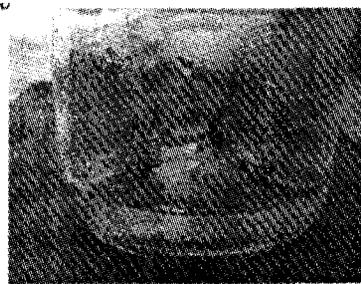


图4 生根培养

由图5极差分析可知,在丛芽诱导方面外源激素中6-BA作用最大,其极值为0.49,其次为NAA,其极值为0.36,B9作用最小,其极值为0.11;在促进幼芽伸长生长方面,B9对促进幼芽伸长生长作用最大,其极值为0.2,NAA其次,极值为0.16,6-BA作用最小,极值为0.1(图3)。

2.3 根的诱导培养

由表4得知,在以不同倍数的MS和(MS改)为基本培养基的条件下,生根率最高的两组分别为第4组的91.6%和第10组的92.3%,但从两组的平均根长、生根条数/株和植株生长状况的表现综合来看,1/2(MS改)培养基明显优于1/4MS培养基。且在以1/4MS为基本培养基的组

中,虽可以达到高的生根率,但植株普遍表现为叶色发黄。在综合考虑之下,得出1/4MS不适合用作本种生根的基本培养基的结论。由试验结果及数据分析同时可以得知,当IBA的添加浓度为2.0 mg/L时的生根率可达到最高,且添加30 g/L的蔗糖明显优于添加20 g/L。由于第2、3、5、8组的水生根率普遍偏低,第9组的各项指标都不如第10组,得出(MS改)和1/2MS都不是本种生根的最佳基本培养基的结论。因此,从试验结果综合比较可得知以1/2(MS改),不添加任何激素,添加30 g/L的蔗糖的培养基可作为本种理想的生根培养基(图4)。

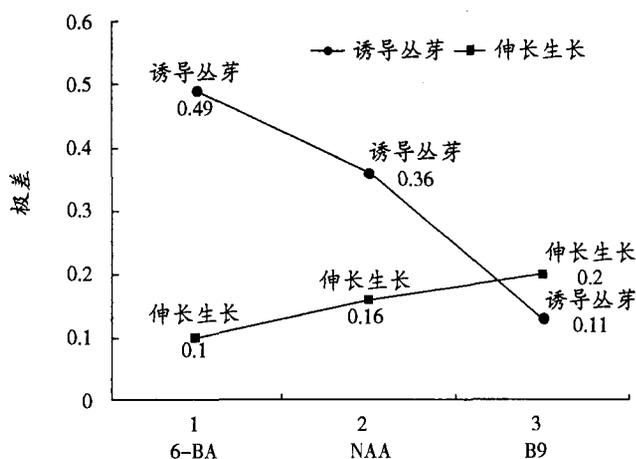


图5 极差分析

表 3 生长调节剂正交试验排列及试验结果

Tab. 3 Results of treatments crossed with all factors with different levels

试验号	因素			试验结果	
	A(6-BA)/mg·L ⁻¹	B(NAA)/mg·L ⁻¹	C(B9)/mg·L ⁻¹	增殖倍数	平均幼芽高度/cm
1	0.5(1)	0.01(1)	5(1)	3.5	2.1
2	0.5(1)	0.1(2)	15(2)	3	1.5
3	0.5(1)	0.15(3)	25(3)	2.68	1.3
4	1.0(2)	0.01(1)	15(2)	3.5	1.6
5	1.0(2)	0.1(2)	25(3)	3.5	1.8
6	1.0(2)	0.15(3)	5(1)	3.25	1.4
7	1.5(3)	0.01(1)	25(3)	3.05	1.5
8	1.5(3)	0.1(2)	5(1)	2.66	1.7
9	1.5(3)	0.15(3)	15(2)	3.05	2.0
增殖倍数	K1	3.06	3.35	3.14	
	K2	3.41	3.06	3.18	
	K3	2.92	2.99	3.07	
极差 R		0.49	0.36	0.11	
幼芽高度	K1	1.63	1.73	1.73	
	K2	1.6	1.67	1.7	
	K3	1.73	1.57	1.53	
极差 R		0.1	0.16	0.2	

表 4 诱导生根试验结果

Tab. 4 Experimental results of root induction

试验号	因素			生根情况			
	A(IBA)/mg·L ⁻¹	B(培养基)	C(蔗糖)/g·L ⁻¹	生根率/%	生根条数/株	平均根长/cm	植株生长状况
1	0.5	1/4MS	30	46.0	5.0	0.6	叶发黄
2	1.0	MS改	30	33.3	2.0	0.2	叶嫩绿
3	1.5	MS改	30	50.0	6.0	0.4	叶嫩绿
4	2.0	1/4MS	30	91.6	5.5	1.2	叶稍黄
5	0.5	MS改	20	53.3	8.0	0.5	叶嫩绿
6	1.5	1/4MS	20	41.6	4.0	0.4	叶稍黄
7	1.0	1/4MS	20	66.7	6.1	1.0	叶发黄
8	2.0	MS改	20	33.3	1.6	0.5	叶稍黄
9	0	1/2MS	30	53.3	5.5	0.6	叶绿
10	0	1/2MS改	30	92.3	6.5	0.9	叶绿

注:(MS改)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。

3 结论与讨论

试验结果显示,在对多花白澳山龙眼进行无菌发芽试验时采用固体培养基的发芽效果优于液体培养基的发芽效果,但从总体上看两种发芽方式的发芽率都偏低,污染率偏高。

在对多花白澳山龙眼进行增殖试验时发现,该种在以 1/2MS 为基本培养基,添加 1.0 mg/L 的 6-BA 可以获得较理想的增殖效果,但从芽总体表现纤细,故在以后的试验中应对其进行壮苗试验。在进行幼芽伸长生长试验时发现在向其中添加低浓度的 B9 5 mg/L,可以获得较理想的幼芽伸长生长效果。

参考文献:

- [1] Rebelo, Anthony. PROTEAS: A Guide to the Proteas of Southern Africa[M]. Fernwood Press [Southafrica], 2001.
- [2] 正交试验设计法编写组. 正交试验设计法[M]. 上海:上海科学技术出版社,1978.
- [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.
- [4] 李艳菊,陶加洪,王兰珍,等. 元宝枫组织培养研究[J]. 北京林业大学学报,2005,27(3):104-107.
- [5] 崔翠,王季春,何凤发,等. 不同 MS 和 B9 浓度对马铃薯脱毒试管苗生长的研究[J]. 西南农业大学学报,2001,23(5):414-417.
- [6] 游哲贤,陈健,林冠雄,等. 正交设计在成龄番木瓜组织培养中的应用[J]. 福建农业科技,2003(3):11-12.
- [7] 范贤熙,胡秀,王奇,等. 木本切花极美泰洛泊的组织培养研究[J]. 西部林业科学,2006(2):7-9.