

小花扁担木的组织培养及无性系建立研究

马依妮, 刘 玮, 任 杨, 徐 娜, 姜长阳*

(辽宁师范大学 生命科学院, 辽宁 大连 116029)

摘 要:以小花扁担木为材料, 通过对生长点生长、分化、试管苗的生根与移栽及田间移植的试验, 完成了小花扁担木组织培养及无性系建立的研究。结果表明: $1/2MS + GA\ 1.0\ mg/L + BA\ 0.1\ mg/L + IAA\ 0.3\ mg/L$ 是促进离体生长点生长的理想培养基; $MS + La(NO_3)_3\ 1.2\ mg/L + BA\ 1.0\ mg/L + NAA\ 0.2\ mg/L$ 是分化培养的理想培养基; $1/3MS + IAA\ 1.5\ mg/L$ 是小花扁担木生根培养与生根继代培养的理想培养基。

关键词:小花扁担木; 组织培养; 无性系; 快速繁殖

中图分类号: S794.372 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1714(2008)02-0025-03

小花扁担木(*Grewia biloba*) 又称扁担木、孩儿拳头, 属于椴树科扁担木属落叶灌木^[1]。小花扁担木可药用, 能治小儿疳疾等疾病; 果实既可鲜食, 又可酿酒; 其树皮可作为人造棉的原料; 同时, 小花扁担木的果实橙红美丽, 能在冬季宿存枝头两三个月, 是优良的观果绿化美化树种, 适于在庭院、公园丛植、篱植, 或与山石配植, 适应性较强, 抗病抗虫力强。正是因为小花扁担木在园林栽培中的绿化美化效果好, 使之成为近年来很受人们欢迎的园林树种, 在城乡中多有栽培^[2]。但是, 由于野生小花扁担木的种子往往被鸟类采食, 或被人们采收酿酒, 且种子发芽率较低, 所以, 园林生产上所需要的苗木几乎都是在山上挖取或者分株而来的。在山上挖取不仅野生资源非常有限, 而且会破坏环境; 采用分株繁殖的速度慢, 也无法满足园林绿化对种苗的需要。为此, 对小花扁担木进行了组织培养及快繁技术研究, 以期满足园林栽培的需要。

1 材料与方法

1.1 材料及灭菌

秋季在山上选择生长非常旺盛的小花扁担木植株后做好标记。翌年 4 月上旬采即将萌动的枝条, 在 20℃ 左右的室内水培 7~10d。当芽刚刚开始萌动时, 剪成具 2 个对生芽的茎段, 放到磨口广口瓶中, 自来水冲洗 30~60 min 后, 用 0.05% 安利洗涤

液振荡洗涤 10min, 洗至没有泡沫时置于超净工作台上, 75% 乙醇灭菌 30s 后, 迅速用无菌水洗涤 3 次, 接着用 0.1% $HgCl_2$ 振荡灭菌 5 min, 再加入等体积无菌水, 继续振荡灭菌 15 min。接着用无菌水振荡洗涤 5 次, 即获得无菌材料。

1.2 培养条件

以 MS、 $1/2MS$ 和 $1/3MS$ 为基本培养基, 附加不同浓度的细胞分裂素 (BA) 和生长素 (IAA、IBA、NAA、2,4-D)。以 MS 为基本培养基时, 添加蔗糖 30g/L; 以 $1/2MS$ 为基本培养基时, 蔗糖 15g/L; 以 $1/3MS$ 为基本培养基时, 蔗糖 10g/L。培养基胨力强度为 $180\ g/cm^2$ ^[3], pH 值 5.8~6.0, 培养温度 24℃, 光照 12 h/d, 光照强度 3 000 lx。

1.3 试验方法

1.3.1 激素对生长点生长培养的影响

在超净工作台上, 用解剖针和解剖刀将无菌的萌动芽剥离成 1mm 左右的生长点, 接种到附加不同浓度 BA、IAA、IBA 的 $1/2MS + GA\ 1.0\ mg/L$ 培养基上, 于 27℃ 恒温培养箱中进行暗培养。50d 时观察统计。

1.3.2 激素对分化培养的影响

把上述培养的黄化芽切成具有 1 个生长点的茎段, 接种到添加不同浓度 BA (0.5mg/L、1.0mg/L、1.5mg/L) 和 NAA (0、0.2mg/L、0.6mg/L、1.0mg/L、

1.4mg/L)的 MS + La(NO₃)₃ 1.2mg/L 培养基上,进行黄化芽的光照分化培养。培养 50d 后观察统计。

1.3.3 生长素对生根培养的影响

将继代培养的分化不定芽从基部剪下,接种到以 1/3MS 为基本培养基,附加不同浓度 IAA、NAA 和 IBA 的培养基上进行生根培养。

1.3.4 不同基质对试管苗移栽成活及长势的影响

将培养瓶瓶塞打开,在光强 5 000 lx 左右、温度 15~25℃条件下炼苗 3d 后,用镊子把生根试管苗从培养瓶中取出,先在清水中洗去根部培养基,再分别移栽到上面覆盖着约 6cm 厚园土、炉灰渣、珍珠岩、蛭石、1/2 珍珠岩 + 1/2 蛭石、1/2 炉灰渣 + 1/2 园土共 6 种不同基质的温室苗床中,在湿度 95% 以上、温度 25℃左右、没有直射光照的条件下,移栽 20d 后观察统计。在温室中移栽成活的试管苗,于 4~5 月移植到田间。

2 结果与分析

2.1 不同激素对生长点生长培养的影响

表 1 不同浓度激素对生长点生长的影响

序号	浓度(mg/L)			接种数 (个)	生长数 (个)	生长率 (%)	长势
	BA	IBA	IAA				
1	0	0	0	50	0	0	0
2	0	0.3	0	50	0	0	0
3	0.1	0.3	0	50	34	68	++
4	0.5	0.3	0	50	13	26	+
5	0.9	0.3	0	50	19	38	+
6	0.1	0.6	0	50	6	12	+
7	0.5	0.6	0	50	3	6	+
8	0.9	0.6	0	50	4	8	+
9	0	0	0.3	50	0	0	
10	0.1	0	0.3	50	49	98	+++
11	0.5	0	0.3	50	28	56	++
12	0.9	0	0.3	50	15	30	+
13	0.1	0	0.6	50	42	84	+++
14	0.5	0	0.6	50	2	24	+
15	0.9	0	0.6	50	6	12	+

注:+++长势好;++长势较好;+长势一般。

由表 1 可见,在不加激素或 IAA、IBA 单独使用时,生长点均不能生长;而不同浓度的 BA 与 IAA、IBA(0.3 mg/L、0.6 mg/L)配合使用时,在离体条件下,可以促进生长点生长。但是,从平均生长率和芽的长势看,BA 与 IAA 配合使用效果要好于 BA 与 IBA 配合使用。当 BA 为 0.1 mg/L、IAA 为 0.3 mg/L 时,不仅生长点的生长率达到 98%,且长势旺盛;观察还表明,生长点初期生长的芽为白色,后来逐渐变成浅黄色的黄化芽;生长点生长的前 10d 左右生长

速度较慢,而后开始加快。

培养到 50d 时,就会生长为具有 5~6 个芽(包括一个顶芽)、高 4~5cm 的黄化芽。4 次重复试验的结果基本一致,表明培养基 1/2MS + GA 1.0 mg/L + BA 0.1 mg/L + IAA 0.3 mg/L 是促进小花扁担木离体生长点生长的理想培养基。

2.2 不同激素组合对芽分化培养的影响

观察表明,培养 10d 左右不仅所有的黄花芽由黄色变成了绿色,而且在有的培养基上芽伸长并开始分化,见表 2。

表 2 不同激素浓度组合对芽增殖的影响

序号	激素组合(mg/L)		接种数 (个)	芽分化数 (个)	增殖 系数
	BA	NAA			
1	0.5	0	50	0	0
2	0.5	0.2	50	215	4.3
3	0.5	0.6	50	126	2.5
4	0.5	1.0	50	68	1.4
5	0.5	1.4	50	24	0.5
6	1.0	0	50	0	0
7	1.0	0.2	50	386	7.7
8	1.0	0.6	50	111	2.2
9	1.0	1.0	50	132	2.6
10	1.0	1.4	50	19	0.4
11	1.5	0	50	0	0
12	1.5	0.2	50	0	0
13	1.5	0.6	50	0	0
14	1.5	1.0	50	0	0
15	1.5	1.4	50	0	0

由表 2 可见,在 BA 单独使用和 BA 为 1.5mg/L 时,接种培养的芽不分化;而 BA(0.5mg/L、1.0mg/L)和 NAA(0.2mg/L、0.6mg/L、1.0mg/L、1.4mg/L)配合使用时培养基上接种的芽可以分化。尤其是 BA 为 1.0 mg/L、NAA 为 0.2 mg/L 时,单芽增殖系数达 7.7。观察还表明,在这一培养基上不仅分化的不定芽呈丛生状,而且叶色鲜绿、生长旺盛,高几乎都在 1cm 以上。把分化丛生不定芽剪成长 0.5cm 左右、具有生长点的茎段,接种到相同培养基上进行分化继代培养,连续培养 6 代,除了培养时间缩短为 45d 外,分化增殖系数及分化不定芽的生长性状基本保持不变。说明 MS + La(NO₃)₃ 1.2 mg/L + BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 是小花扁担木分化培养的理想培养基。

2.3 不同生长素对生根培养的影响

培养 9d 时根原基形成,培养 20d 时,试管苗根系与植株开始迅速生长。40d 后可以长到 5 cm 左右、有多条根的试管苗,见表 3。

表3 不同生长素种类和浓度对生根的影响

序号	激素(mg/L)			生根数 (条)	生根率 (%)	平均单株 生根数(条)
	IAA	NAA	IBA			
1	0	0	0	0	0	0
2	0.3	0	0	0	0	0
3	0.6	0	0	0	0	0
4	0.9	0	0	10	20	3.4
5	1.2	0	0	31	62	2.0
6	1.5	0	0	48	96	5.9
7	1.8	0	0	19	38	3.9
8	0	0.3	0	0	0	0
9	0	0.6	0	0	0	0
10	0	0.9	0	0	0	0
11	0	1.2	0	0	0	0
12	0	1.5	0	0	0	0
13	0	1.8	0	0	0	0
14	0	0	0.3	0	0	0
15	0	0	0.6	0	0	0
16	0	0	0.9	23	46	2.1
17	0	0	1.2	48	96	4.8
18	0	0	1.5	40	80	4.6
19	0	0	1.8	12	24	2.5

由表3可见,添加0.9~1.8 mg/L IAA或IBA的1/3MS培养基可诱导试管苗生根。从生根率看,添加1.5mg/L IAA与1.2mg/L IBA的培养基生根率均达到96%。从平均生根数看,以添加1.5mg/L IAA的培养基为最高,达到了每株5.9条。同时,观察还表明,在添加1.2mg/L IBA培养基上所生出的根,基部周围生长着较为松软的愈伤组织,而在添加浓度为1.5mg/L的IAA培养基上所生出的根,都是由基部茎直接发出的。由于基部周围具有愈伤组织的根往往为无效根^[4],所以,添加1.5mg/L IAA培养基上所培养的生根苗才是理想的试管苗。把在1/3MS+IAA 1.5mg/L培养基上培养的生根试管苗剪成长1.5cm左右、具有两个生长点的茎段,接种到相同培养基上进行生根继代培养,35d又可以培养成高5cm以上、生长旺盛的生根试管苗。连续培养7代,不仅试管苗生长旺盛,而且35d的平均繁殖系数为3.2。说明1/3MS+IAA 1.5 mg/L是小花扁担木生根培养与生根继代培养的理想培养基。

2.4 试管苗移栽及长势

移栽于以炉灰渣为基质的试管苗不仅成活率达到了95%,而且生长较旺盛。5次重复试验都证明炉灰渣是小花扁担木试管苗生根移栽的理想基质。

移植到田间中的试管苗,不仅移植成活率近100%,而且与同期播种的实生苗相比,试管苗具有

生长旺盛整齐、根系增加约1倍等特点。

3 结论与讨论

3.1 通过对生长点生长、分化、试管苗的生根与移栽及田间移植试验,结果表明:1/2MS+GA 1.0mg/L+BA 0.1mg/L+IAA 0.3mg/L是促进离体生长的理想培养基;MS+La(NO₃)₃ 1.2mg/L+BA 1.0mg/L+NAA 0.2mg/L是分化培养的理想培养基;1/3MS+IAA 1.5mg/L是小花扁担木生根培养与生根继代培养的理想培养基。

3.2 利用不定芽分化培养的方法,45d的增殖系数为7.7,按照这个增殖速度,每年可繁殖出7.7⁸个试管苗;利用生根继代的方法35d的繁殖系数为3.2倍,按照这个增殖速度,每年可繁殖出3.2¹⁰个试管苗。这表明,不论采用哪种方法进行快速繁殖,每年都能繁殖出满足人们需要的种苗。但是,由于采用不定芽分化培养的方法繁殖试管苗不仅生长较弱,而且形成一些无效苗,所以,生产上应该采用生根继代的方法进行快速繁殖。

3.3 移植于田间的试管苗具有生长旺盛整齐、根系增加约1倍的特点,一方面是与在研究中所使用实验材料是选择了生长非常旺盛的植株(材料本身具有优良遗传型)有关;另一方面还与在研究中使用了生长素有关,试管苗移植到田间后生长素仍在发挥着后效作用。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所.中国植物志图鉴(第二册)[M].北京:科学出版社,1972.799.
- [2] 陈有民.园林树木学[M].北京:中国林业出版社,1990.564-565.
- [3] 姜长阳.培养基琼脂用量的商榷[J].植物生理学通讯,1990,16(2):53-54.
- [4] 安利佳,姜长阳.植物组织培养导论[M].大连:辽宁师范大学出版社,1996.28-30.
- [5] 吕校石,杨建民,刘云强,等.椴树组织培养污染控制技术初步研究[J].河北林果研究,2004,19(1):1-5.
- [6] 王彦彬,颜玉敏,陈荣,等.紫椴的组织培养技术研究[J].防护林科技,2002,(2):37-39.
- [7] 尹阳,石井克明著,赵仲望译.心叶椴成龄木离体培养再生植株[J].国外林业,1996,(1):17-18.
- [8] 张亚君,徐妙珍,王秀凡.紫椴芽离体培养诱导分化条件的研究[J].吉林林业科技,1996,25(1):43-44.
- [9] 史丰厚,卢芳,沈元宝,等.椴树属植物研究进展[J].林业科技开发,2006,20(1):12-15.

(责任编辑:张素清)