

沙漠玫瑰组织培养的研究

罗远华 莫饶*

(华南热带农业大学农学院,海南儋州 571737)

摘要 以沙漠玫瑰的茎段、茎尖为外植体,经2次表面消毒后接种在MS+蔗糖30g/L培养基中诱导出芽。增殖培养基为改良MS+KT 3mg/L+蔗糖30g/L,增殖率4以上,芽苗健壮无异常。将切除基部愈伤组织的小苗在200mg/L的IBA溶液中浸泡2~3s后接种到改良MS+蔗糖15g/L培养基中生根效果最好,基部无愈伤组织,生根率为72%,且根数较多,侧根发达。将具有完整根系且基部无愈伤的小苗炼苗后移栽到沙床上,成活率95%以上。

关键词 沙漠玫瑰;改良MS;组织培养;移栽

沙漠玫瑰(*Adenium obesum* (Forsk) Balfex Roem et Schult)又名天宝花、小夹竹桃,为多年生落叶肉质小乔木,原产非洲的肯尼亚、坦桑尼亚。其根、茎肥厚短粗,叶小、革质,故常将其塑造成盆景,表现千年古树、沧海桑田的意境;花个大、量多,花色丰富、艳丽,散发出热烈、浓郁、喜庆的气氛;花期长(4~11月份),温室栽培几乎全年见花。另据研究,用甲醇作提取液可从沙漠玫瑰中提取出30种强心苷和2种孕烷,强心苷可用于治疗心脏病,孕烷可用于治疗妇科病;Cepleanu F等(1994)对沙漠玫瑰做的生物测定表明,它含有很高含量的细胞内毒素,可抵抗结肠癌细胞系Co115和SW480。

沙漠玫瑰自花结实率低,人工辅助异花授粉能提高结实率,但有性后代花色性状分离,不能保持花色的纯一性。沙漠玫瑰果熟后自然开裂,种子可借助绒毛飞散,难于采收;种子不耐贮藏,长时间贮藏(6个月)会导致生活力急剧下降,萌发率低。扦插繁殖是目前沙漠玫瑰的主要繁殖方式,但根部易腐烂而造成大批幼苗死亡。此外,扦插苗根茎不能自然膨大形成良好的株形,会大大降低观赏价值。利用植物组织培养技术建立沙漠玫瑰工厂化生产体系,可大量生产种苗,对满足不断增加的市场需求以及药用开发具有实际意义。

1 材料与方法

1.1 材料

无病虫害的嫩芽(茎段、茎尖)。

1.2 方法

取室内抽生的嫩芽自来水冲洗后置超净工作台上,用75%酒精(v/v)浸泡10s,无菌水冲洗2次后用1g/L的升汞水溶液(加1滴吐温)振荡消毒4min;然后用无菌水冲洗2次,重复上步操作过程振荡消毒3min,无菌水冲洗6~8次

(每次3min)后备用。切除残留叶柄,切成带1~2个叶腋的茎段、茎尖平放浅插接种于诱导培养基中培养。

基本培养基为改良MS,添加KT的浓度为3mg/L,IBA的浓度为0.1mg/L,浸泡无根小苗基部用IBA的浓度为0~500mg/L,生根培养蔗糖浓度为15g/L,其他用30g/L,另加6.0~7.0g/L卡拉胶进行固化,pH值调至6.0,培养温度26~28℃,光照强度1500lx,光照时间12h/d。

2 结果与分析

2.1 诱导及增殖培养

(1)诱导培养基为MS+蔗糖30g/L+卡拉胶6.0g/L。接种约1周开始萌动,2周后可以诱导出芽。诱导过程中,即使不加任何激素,外植体也极易愈伤化,影响芽的诱导。沙漠玫瑰对升汞(二氯化汞)比较敏感,稍长时间的消毒会降低芽的诱导率,甚至导致材料死亡。采用二次消毒法可以有效解决以上问题。本方法诱导率可达50%(诱导率=出芽数/接种数×100%)。

(2)增殖培养基为改良的MS+KT 3mg/L+蔗糖30g/L+卡拉胶6.0g/L。将诱导出的芽切成带2~3个叶腋的茎段、茎尖直插在培养基中培养,可以有效避免愈伤化对茎段增殖的影响。继代时间为25~30d,增殖率在4以上,芽苗健壮,但基部愈伤化较严重。

2.2 增殖培养中异常症状的出现及解决

研究可知,以MS为基本培养基在增殖过程中芽苗会出现几种异常症状(图1A~C):①茎尖坏死;②茎尖不坏死,但离茎尖较近的幼嫩叶片坏死并脱落;③整个芽苗茎杆出现白色粉末状物质。针对以上异常症状,将MS培养基进行改良,把沙漠玫瑰在各种培养基中生长情况统计,见表1。以1/2MS作为基本培养基时,接种7~10d整个芽苗缺绿并迅速变黄,表现缺素症状;3/4MS、MS为基本培养基时,植株

表1 几种基本培养基对沙漠玫瑰增殖的影响

培养基	苗数	培养时间//d	异常症状总发生率//%	生长情况描述
改良MS	64	30	0	植株健壮,叶色浓绿,基部愈伤化较严重
1/2MS	60	15	100	迅速缺绿,叶片变黄、脱落,芽苗停止生长或死亡
3/4MS	66	25	51.5	部分茎尖坏死,部分幼嫩叶片坏死并脱落,芽苗茎杆出现白色粉末状物质,基部愈伤化较严重
MS	66	25	57.6	部分茎尖坏死,部分幼嫩叶片坏死并脱落,芽苗茎杆出现白色粉末状物质,基部愈伤化较严重

作者简介 罗远华(1981-),男,作物遗传育种在读硕士。研究方向:细胞工程与种质创新。

*通讯作者。

收稿日期 2007-05-17

出现不同程度的茎尖坏死、幼嫩叶片坏死、脱落,茎杆出现白色粉末状物质的异常症状。结果表明,改良MS培养基在增殖培养时,能有效消除以上异常症状,在30d的增殖培养

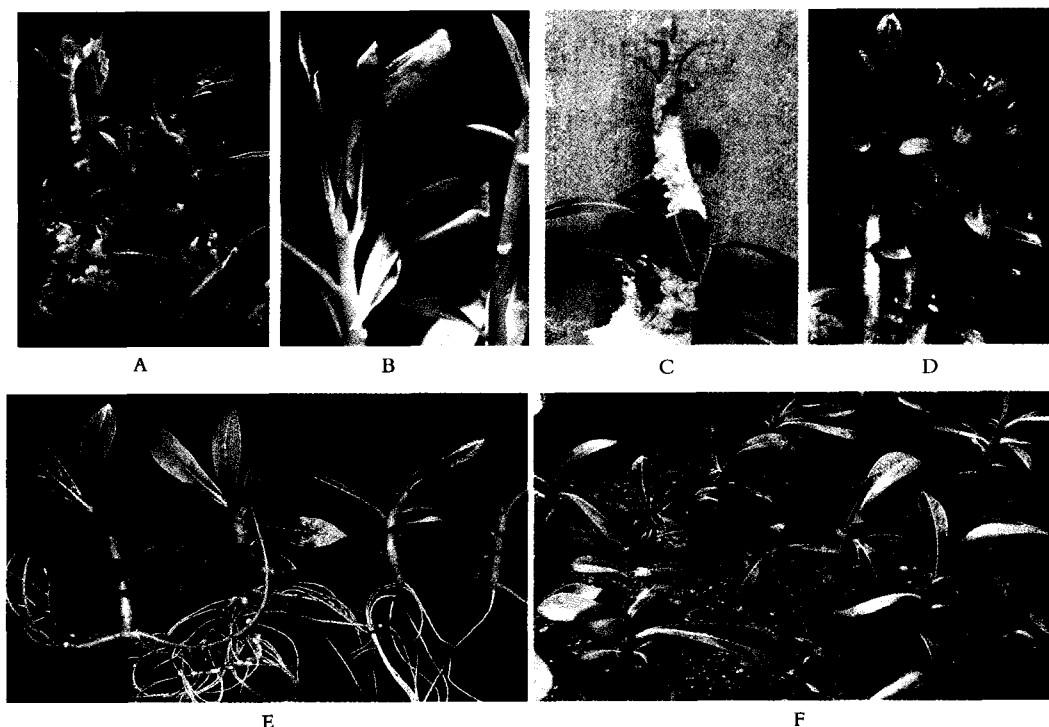


图1 不同培养基中芽苗的增殖表现

A: 茎尖坏死; B: 幼嫩叶片坏死、脱落; C: 茎段出现白色粉末状物质;
D: 正常增殖苗; E: 无愈伤化的生根小苗; F: 移栽成活的小苗

期间无异常症状出现,芽苗生长速度快、健壮,是适合沙漠玫瑰增殖的优良培养基(图1D)。

2.3 生根培养

(1)生根培养时根诱导率低,且基部极易愈伤化,即便是接种在不加任何激素的培养中,基部愈伤化也很严重。用常规方法诱导沙漠玫瑰生根,往往诱导率低且基部愈伤化,炼苗移栽成活率低。针对以上情况,对生根方法做了改进。具体方法是先把具有3~5cm高的无根小苗基部的愈伤组织切除,将其浸泡在过滤灭菌的200mg/L的IBA水溶液中2~

3s后接种在不加任何激素的改良MS+蔗糖15g/L+卡拉胶7.0g/L培养基中诱导生根(以下简称浸泡法)。

(2)将各生根方法与添加不同浓度IBA诱导生根情况统计,见表2。以1/2MS、MS为基本培养基并添加0.1mg/LIBA诱导生根时,小苗出现严重的缺绿、变黄,幼嫩叶片坏死并脱落等异常症状,导致小苗衰退、甚至死亡。不添加IBA的改良培养基基部无愈伤组织生根率为28%;浸泡法中随浸泡IBA浓度的增大,生根率也增大,但超过一定范围(>200mg/L)后生根率降低;基部愈伤化程度随IBA的浓度增加而加

表2 不同方法与使用不同浓度IBA诱导生根情况统计

培养基	IBA 浓度//mg/L	生根方法	总生根率//%	基部愈伤化生根率//%	基部无愈伤化生根率//%	生根、生长情况
1/2MS	0.1	常规	-	-	-	植株变黄,小苗衰退甚至死亡
MS	0.1	常规	-	-	-	幼嫩叶片坏死、脱落
改良 MS	0	常规	60	32	28	根 1~2 条,无侧根
改良 MS	0.1	常规	62	13	49	根 1~2 条,少量侧根
改良 MS	100	浸泡	72	14	58	根 1~2 条,少量侧根
改良 MS	200	浸泡	87	15	72	根 2~6 条,侧根较多
改良 MS	300	浸泡	75	15	60	根 2~6 条,侧根较多
改良 MS	500	浸泡	76	35	41	根膨大,愈伤化严重

强。IBA 浓度适中,根结实且数目多,侧根发达,IBA 浓度过高,根膨大并愈伤化。结果表明,本研究中所用的生根方法较好,约2周后出根,经35d的培养,基部无愈伤组织生根率为72%,且根数较多,侧根发达(图1E)。此方法是理想的沙漠玫瑰生根方法。

2.4 炼苗移栽

(1)将具有完整根系且基部无愈伤化的小苗在70%的荫蓬内炼苗1周,移栽2d前打开瓶盖。移栽时将试管苗取出,用自来水洗干净粘附在根系上的培养基;然后用0.3%~0.5%

的多菌灵水溶液浸泡植株根部15~20min,移栽到温室内的沙床上,用浸泡后的多菌灵水溶液浇足定根水,适当遮荫。1周后浇1次0.1%的多菌灵水溶液,以后见表面沙土完全干时再浇透水。约3周后小苗成活并抽生新叶,成活率在95%以上(图1F)。

(2)将基部有愈伤组织(愈伤组织连接小苗与根系)的生根小苗用上述同样方法炼苗移栽,移栽2~3d后基部诱发愈伤组织处坏死,然后整个植株萎蔫,基本不存活。

(下转第21页)

1.7 炼苗与养护

生根苗的移栽是全光照喷雾育苗的重要环节,在苗木生根后,一般根系长到3cm以上,就可以搬到荫棚区炼苗。水分管理:见干见湿,大约1个月时间。

生根苗的上盆,基质用80%泥炭+20%珍珠岩,一般泥炭都要加石灰调节pH值,同时补充钙元素。苗木上盆一般要做到随起、随种、随浇水。红罗宾的管理同平常的苗木栽培管理一样,但要特别注意小苗的管理。红罗宾是抗性比较强的品种,但在小苗阶段也容易出现小苗抗性问题,小苗抗性比较弱,容易感染病害。引起病害发生的原因主要有:冻害、高温、栽培基质长期过湿。在冬季和初春都容易发生冻害,红罗宾在冬季只要温度适合,仍会不停地生长。所以冬季小苗最好在大棚里过冬,或者冬季减少水分的供应,不施肥。夏季高温时最好在荫棚过夏。水分管理要注意见干见湿,但不能让基质过干,过干后就很难再浇透。扦插苗在移栽前要停水炼苗,促进根系的生长和提高苗木对外界环境的适应能力。移栽营养钵缓苗后15d浇1次格里克通用营养液,促进苗的生长。

2 小拱棚扦插

2.1 苗床准备

床土是扦插苗生存的基质,因此宜选沙壤土作插床,并在扦插前1周翻耕除杂物,一般采用高畦作床,畦宽1.2m,畦沟深大于20cm,畦面要求土细、上实下虚和平整。扦插前于畦面覆盖一层2~3cm厚的细沙,并用1%~2%多菌灵和福美双可湿性溶液喷洒床面,湿透土壤3cm以上,杀菌水可边扦插边喷洒。

2.2 基质、生根液的准备与扦插

基质、生根液的准备、插穗的剪取和保存,以及扦插操作与全光照喷雾扦插相同。

2.3 病害防治、保湿、遮阳

扦插完成在叶面喷施炭疽福美(红罗宾易得炭疽病)阻止病害,并搭建小拱棚(棚高大于40cm),用透光率薄膜覆盖压严(保证不漏水汽)。随后的15d内每天检查1~2次(保

证湿度85%~90%),发现薄膜破裂可用胶纸修补,随时调整好遮阳网的高度,防止遮阳网下垂到棚膜上。

3 常见问题

3.1 只形成愈伤组织不生根的现象

在红罗宾扦插过程中,这个问题是经常出现的。出现这个问题的原因有几个可能:一是穗条自身的营养水平不高。由于在采穗条时植株向上生长,枝条中大部分的营养已为顶部的生长所消耗。所以采穗的时机最好选在植株向上生长停滞、新芽开始生长之前;二是生根剂浓度不够或生根剂处理不够;三是昼夜温差太小,营养积累太少。在夏季,昼夜温差太小不利于枝条的营养积累,影响枝条的生根。

对于这部分只有愈伤组织未长根的穗条,只有进行重插。具体方法:将原先的愈伤组织剪掉,重新在生根粉溶液中浸泡。经过重插的枝条一般1周后就会开始生根,生根率在95%以上。

3.2 嫩枝扦插发黑的现象

(1)基质排水不畅,积水会造成枝条的水渍状腐烂。全光照喷雾要求基质要有比较好的排水性,也要求喷头的雾化效果要比较好,一次喷雾时间不能太长,让叶片布满水珠即可。

(2)红罗宾的生根剂多用酒精溶液配制而成,娇嫩的枝条处理后容易产生酒精过敏现象,过敏的症状就是枝条基部发黑。所以配制生根剂溶液的酒精浓度最好小于45%。

3.3 生根的枝条烂根、烂叶的现象

发生烂根的现象很有可能是基质长期过湿,这就要求在枝条生根后要及时停水炼苗,并及时补充水肥;烂叶现象很可能就是腐烂病,是环境湿度太大引起的,这时要及时采取喷药防治,并加强通风。

4 参考文献

- [1] 森下义朗,大山浪雄.植物扦插理论与技术[M].李云森,译.北京:中国林业出版社,1988.
- [2] 才淑英.园林花木扦插育苗技术[M].北京:中国林业出版社,1988.
- [3] 王慧娟,赵秀山,孟月娥,等.彩叶植物及其在园林中的应用[J].河南农业科学,2004(11):70-72.

(上接第15页)

3 结论与讨论

(1)经过对各培养阶段培养基、培养方法的筛选,可以得出:①通过2次消毒,外植体消毒效果良好且可达到50%的腋芽萌发率;②最适芽诱导培养基为MS+蔗糖30g/L+卡拉胶6.0g/L;③最适切段增殖培养基为改良MS+KT3mg/L+蔗糖30g/L+卡拉胶6.0g/L,25~30d可继代1次,增殖率在4以上,且芽苗健壮;④生根时,把具有3~5cm高的无根小苗基部的愈伤组织切除,将其浸泡在过滤灭菌的200mg/L的IBA水溶液中2~3s后接种在不加任何激素的改良MS+蔗糖15g/L+卡拉胶7.0g/L培养基中诱导生根,小苗基部无愈伤组织生根率为75.9%,根数较多,且侧根发达。

(2)即使不加任何激素,沙漠玫瑰也会出现较严重的愈伤化,这可能与其自身积累较多激素有关,在离体培养时加入拮抗物质有望减弱其愈伤程度。

(3)本研究表明,低盐条件对沙漠玫瑰的离体培养不利,在整个培养过程都需要一个较高的盐浓度,这与刘小梅等认为沙漠玫瑰的生根与含盐量有很大关系的观点有一致性。究其机制,还有待进一步研究。

(4)本研究采用的生根法能明显改善生根效果,基部无愈伤化生根率达72%,且根数较多,侧根发达。本方法为其他易愈伤化且诱导生根难的植物提供了很好的参考。此外,基部有愈伤组织的生根苗移栽基本不成活,究其机制,还有待进一步研究。

4 参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所.新编拉汉英植物名称[M].北京:航空工业出版社,1996.
- [2] 徐晔春,马晓勇.沙漠玫瑰栽培技术[J].西南园艺,2004(32):38-40.
- [3] 刘小梅,陈锡沐,陈炳铨.沙漠玫瑰试管苗生根研究[J].湖北农学院学报,2003,23(2):91-94.
- [4] 周志坚,翟应昌,周丽.沙漠玫瑰的组织培养[J].植物生理学通讯,1994,30(4):279.