

多花山竹子组培初代培养技术研究

李肇锋¹, 黄碧华², 周俊新¹, 余荣卓¹, 黄华明¹

(¹福建林业职业技术学院, 福建南平 353000; ²福建省林业科技试验中心, 福建南靖 363600)

摘要:旨在为多花山竹子组培快繁体系建立提供参考。通过观察对比试验法、完全随机化法正交试验设计、方差分析、显著性检验、LSD多重比较, 探讨多花山竹子组培的外植体最佳消毒时间控制和最适初代培养基类型与激素浓度配方。试验表明: 多花山竹子组培的外植体消毒时间为2 min时其污染率最高、死亡率与存活率较低。消毒时间为6 min时其污染率和死亡率居中、存活率最高。消毒时间为10 min时其污染率与存活率最低、死亡率最高。以MS和B5作为多花山竹子组培的初代培养基培养效果较好, 若对MS和B5分别添加不同浓度的6-BA和NAA, 对其外植体不定芽的诱导促进作用不同, MS的最佳配比为6-BA 1.6 mg/L+NAA 0.9 mg/L, B5的最佳配比为6-BA 1.6 mg/L+NAA 0.6 mg/L。综上, 外植体消毒时间为6 min、MS+6-BA 1.6 mg/L+NAA 0.9 mg/L的培养效果最好。

关键词:多花山竹子; 组织培养; 繁殖技术; 正交试验

中图分类号: S723.132

文献标志码: A

论文编号: cjas17090017

The Primary Culture Technology of Tissue Culture of *Garcinia multiflora* Champ

Li Zhaofeng¹, Huang Bihua², Zhou Junxin¹, Yu Rongzhuo¹, Huang Huaming¹

(¹Fujian Forestry Vocational & Technical College, Nanping 353000, Fujian, China;

²Fujian Forestry Science and Technology Test Center, Nanjing 363600, Fujian, China)

Abstract: The study aims at providing references for the rapid propagation system establishment of tissue culture of *Garcinia multiflora* Champ. By means of observing the comparative experiments, completely randomized orthogonal experiment design, analysis of variance (ANOVA), significance test and LSD multiply comparative analysis, the control of the most optimal sterilization time, the optimal primary culture medium type and hormone concentration formula were discussed. The results showed that when the sterilization time of explants was 2 min, the pollution rate was the highest, while the mortality rate and survival rate were relatively low. When the sterilization time was 6 min, the pollution rate and mortality rate were medium, while the survival rate was the highest. When the time was 10 min, the pollution rate and survival rate were the lowest, while the mortality rate was the highest. MS and B5 had better effect on the primary culture medium of *Garcinia multiflora* Champ. If MS and B5 were respectively added with different concentrations of 6-BA and NAA, the induction effect of adventitious buds of explants was different. The maximum proportion of MS was 6-BA 1.6 mg/L + NAA 0.9 mg/L, and the best ratio of B5 was 6-BA 1.6 mg/L + NAA 0.6 mg/L. Taken together, the optimum sterilization time of explants is 6 min, MS + 6-BA 1.6 mg/L + NAA 0.9 mg/L has the best culture effect.

Key words: *Garcinia multiflora* Champ; Tissue Culture; Breeding Technology; Orthogonal Test

0 引言

多花山竹子(*Garcinia multiflora* Champ)为藤黄科

山竹子属, 是一种常绿小乔木, 又名山枯木、竹枯木、山枇杷等^[1]。植株一般高5~17 m, 花期4—5月, 果期

基金项目:福建省林业科研项目《多花山竹子种质资源筛选驯化与栽培技术研究》(闽林科(2012)2号)。

第一作者简介:李肇锋, 男, 1966年出生, 福建尤溪人, 副教授, 硕士, 长期从事森林培育和森林生态学教学与研究。通信地址: 353000 福建省南平市延平区海瑞路1号 福建林业职业技术学院, Tel: 0599-8467944, E-mail: 544713197@qq.com。

收稿日期:2017-09-26, **修回日期:**2017-11-21。

10—12月。花朵组成聚伞形,再排成总状或圆锥花序,顶生,花为橙黄色;其叶片对生,革质,富有光泽,枝叶浓密,枝条着生角度小,树体呈圆柱形,树姿外观紧凑优美^[2]。

该树种适应性强,在云南、四川、江西、福建、广西等海拔2000 m以下的南岭以南至华南、西南山区均有分布。多花山竹子喜肥沃、深厚、湿润的酸性土壤,在天然林中居第二、三层,属伴生树种。人工移栽后,此树种在水肥条件较好的环境中生长迅速,6年生胸径可达5~6 cm、高5 m以上,并能正常开花结果。浆果为黄绿色,近球形,果实可食部分占29%~45%,其中含可溶性固形物16.8%、柠檬酸0.63%、维生素C 12 mg/100g,内含黄色胶质,略带涩味,口感酸甜;种子中含油51.22%,可用于提炼制作肥皂和机械润滑油及生物柴油;根、果皮及树皮可提炼栲胶,亦可入药,具消肿收敛、止痛之功效^[3]。由于多花山竹子叶形秀丽,荫质好,树冠整齐,花期持续时间长,且具有抗病强、病虫害少的生长特点,日常养护较为简单,相较于外来树种栽培更易成活,因而常用于行道绿化、花坛丛植、庭荫栽植及相关园林绿化中,为优良的乡土园林绿化观赏树种。

近年来,随着林下经济发展和城镇绿化的推进,多花山竹子资源的开发利用程度不断深入,山区林农将其当作油料植物和中药材在林下加以推广种植,作为优良的乡土园林绿化观赏树种,在城镇绿化中需求量大,当前市场上苗木供不应求。据文献检索,目前对多花山竹子资源开发利用的研究较多,诸如王兵等^[3]、崔笛等^[4]、党泽方等^[5]、张宝军等^[6]、王英强等^[7]从其化学成分及药用价值进行了研究;杨志玲等^[8-9]、李秀全等^[10]、禄文林等^[11]、单永年等^[12]对其油料及经济价值进行了研究;文定青等^[13]、刘子金等^[14]对其分布和区系特征以及遗传多样性方面进行了研究;杨嵘^[15]等对其在园林中的应用进行了研究;郑小春等^[16]、刘胜洪等^[17]、李肇锋等^[18]、王英强等^[19]、瞿学昌等^[20]、傅家祥等^[21]对其种子萌发与幼苗生长分析等播种育苗和扦插繁殖技术等方面进行了深入研究探讨。从上可看出有关多花山竹子繁殖方法的研究探讨虽然不少,但大多还局限于传统的种子播种和枝条扦插繁殖方面。由于多花山竹子天然资源散生分布、种子产量少,加上受到种子采集调制和插穗枝条选取等条件的限制,传统的播种和扦插繁殖方法育苗周期长,苗木易出现变异性,导致得到的幼苗质量良莠参差不齐,无法达到快速、标准、优质的目的,无法满足市场优质苗木需求量大、供不应求的难题。植物组织培养作为一种无菌、高效、快速且可工厂

化的新型繁殖技术,虽已在植物繁殖领域得到广泛应用^[22],但有关多花山竹子通过组织培养快速繁育方面的研究探讨还未见报道。在植物组织培养繁育中,对外植体消毒时间控制和初代阶段培养基类型选择与外源激素浓度配比是繁育能否成功的关键。本研究旨在突破多花山竹子传统的播种和扦插繁育模式,通过试验研究探索多花山竹子在组织培养中的外植体消毒最佳时间控制和最适宜的初代培养基类型与激素浓度配方,为多花山竹子组织培养快速繁育体系提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

为了后代能够获得优良的遗传基因,并考虑到试验材料的可获得性,本试验选择播种繁殖2年生的超级苗植株为试验材料。从福建林业技术学院江南校区林学系教学实训基地苗圃采集多花山竹子的2年生植株健壮嫩枝条作为试验原始材料。消毒药剂为0%~75%酒精(C_2H_6O)和0.1%升汞($HgCl_2$)。培养基为MS、B5,激素为6-BA、NAA。

1.2 试验材料预处理

首先,从优选出的多花山竹子2年生超级苗植株上剪取茎尖及其苗木中上部腋芽饱满、节间较短的枝条作为外植体,去除叶片,保留叶柄,长度约10 cm。其次,用毛刷轻刷洗净附于茎枝上的细绒毛和其他粘着物,用自来水流动冲洗1~2 h后放至接种室超净工作台上。然后,用70%~75%酒精(C_2H_6O)消毒20 s,用无菌水清洗1遍,再转入0.1%升汞($HgCl_2$)溶液中^[23]。

1.3 培养环境

为防止切口褐化,在接种后需要对多花山竹子进行7~10天暗光培养处理^[22]。在光照培养阶段,要求光照强度为2000~2500 lx,每天光照时间为10~12 h,温度为 $(24\pm 2)^\circ C$ 。诱导(初代)培养蔗糖用量为15 g/L,抗坏血酸5 mg/L,半胱氨酸5 mg/L,琼脂粉7 g/L,酸碱度pH 5.9^[24]。

1.4 试验设计

1.4.1 外植体消毒时间控制试验设计 在植物组织培养中,由于不同消毒时间会对外植体的存活率和污染率产生不同的影响^[25],消毒时间太短则会导致消毒不完全,外植体污染率升高;消毒时间太长则会降低外植体的存活率,所以探究该外植体的最佳消毒时间非常有必要。根据不同植物的组织培养繁殖的实践操作经验,本试验设置了2、6、10 min这3个消毒时间,用0.1%升汞($HgCl_2$)消毒完后再用无菌水冲洗枝条(外植体)4~5遍。最后,将枝条(外植体)置于经过高温消毒

的滤纸上沥干,再切割成 1.0~1.5 cm 长度并带有 1 个腋芽的茎段。将这些茎段转接在不加激素的 MS 基本培养基上,经过 20 天观察统计其外植体的污染率、死亡率和存活率。试验设计与结果如表 1。

表 1 HgCl₂消毒时间对外植体污染率、死亡率、存活率的影响

序号	消毒时间/min	污染率/%	死亡率/%	存活率/%
1	2	63	18	19
2	6	42	31	27
3	10	12	88	0

1.4.2 初代培养基与激素配方筛选试验设计 本次试验共设置 2 个试验组和 1 个对照组,采用 L₉(3⁴)正交试验设计^[26]的方法探索研究多花山竹子组培初代阶段的最适组培配方。试验的各组基本培养基、激素浓度的基本情况(第 2 组为空白对照组)如表 2。多花山竹子初代培养正交试验设计的 9 种方案如表 3。

表 2 花山竹子初代培养正交试验因素

组别	因素		
	A(基本培养基)	B(6-BA)/(mg/L)	C(NAA)/(mg/L)
1	MS	0.5	0.3
2	White	0.8	0.6
3	B5	1.6	0.9

表 3 多花山竹子初代培养正交试验设计表

处理号	基本培养基	6-BA 浓度	NAA 浓度	空白
1	1(MS)	1(0.5)	1(0.3)	1
2	1(MS)	2(0.8)	2(0.6)	2
3	1(MS)	3(1.6)	3(0.9)	3
4	2(White)	1(0.5)	2(0.9)	3
5	2(White)	2(0.8)	3(0.6)	1
6	2(White)	3(1.6)	1(0.3)	2
7	3(B5)	1(0.5)	3(0.9)	2
8	3(B5)	2(0.8)	1(0.3)	3
9	3(B5)	3(1.6)	2(0.6)	1

根据正交试验设计表,对多花山竹子实施 9 种初代培养试验方案。每种试验方案对应一种培养基类型和激素配方,将表面经过消毒的带有侧芽的茎段接种于不同的培养基上,每种试验方案处理 50 瓶多花山竹子瓶苗。为排除偶然因素的干扰,循环重复操作 3 次。经过 30 天观察分别统计不同处理方案下,多花山

竹子的不定芽数和萌芽率,通过方差分析和显著性检验、LSD 多重比较筛选出最佳初代培养基类型与激素配方。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒时间控制试验结果

由表 1 可知,多花山竹子外植体的消毒时间控制为 2 min 时,其污染率最高,达 63%,死亡率最低,为 18%,存活率为较高,达 19%;消毒时间控制为 6 min 时其外植体的污染率和死亡率居中、分别为 42%和 31%,存活率最高,达 27%;消毒时间为 10 min 时其外植体的污染率最低,为 12%,死亡率最高,达 88%,存活率为 0。可见外植体不同消毒时间控制的消毒效果差异较大,消毒时间太短,虽然出现死亡率最低,但其污染率最高,这可能因消毒时间太短而出现消毒灭菌不彻底;消毒时间太长,虽出现污染率最低,但其死亡率最高,存活率为 0,这可能因消毒时间太长对外植体造成伤害。综合考虑外植体的污染率、死亡率和存活率 3 个因素,最后确定选择消毒时间 6 min 作为后续试验中诱导多花山竹子外植体的最佳消毒时间控制。

2.2 初代培养基与激素配方筛选结果

多花山竹子初代培养正交试验结果如表 4。多花山竹子初代培养正交试验方差分析表如表 5。

从正交试验结果表 4 和表 5 的初代培养正交试验方差分析、显著性检验、LSD 多重比较可知,3 个因素对多花山竹子外植物体诱导萌芽的影响大小依次为:6-BA>NAA>基本培养基。其中,6-BA 的方差最大,为 17.8982,NAA 的方差为 7.5448,说明 6-BA 对多花山竹子诱导萌芽的影响远大于 NAA。

由表 4 的试验结果分析发现,当多花山竹子外植体在相同培养基培养时,不同浓度的激素对外植体的诱导促进作用表现不同,外植体所生长出的不定芽数量在高浓度的 6-BA、NAA 培养基和低浓度的 6-BA、NAA 培养基上存在着显著差异。当 6-BA、NAA 的浓度相同时,外植体在不同基本培养基上生长出的不定芽数量亦存在着显著差异。

由表 4 的试验结果分析表明:在试验 3 的条件下不定芽数量最多,平均有 4.7 个不定芽;试验 9 的平均不定芽数目次之,为 3.9。试验 1 和试验 4 诱导的不定芽数均较少,这可能是因为试验 1 和试验 4 中的培养基 6-BA 和 NAA 的浓度太低,使得其对植物生长的诱导促进作用不明显。由于试验 3 的不定芽数最多,所以确定该培养基配方为多花山竹子进行组织培养的最适初代培养基类型与激素配方。即在 MS+6-BA(1.6 mg/L)+NAA(0.6 mg/L)的培养基配方下,多花山竹子外植体细

表4 多花山竹子初代培养正交试验结果

试验号	因素			不定芽数/个
	A(基本培养基)	B(6-BA)	C(NAA)	
1	1(MS)	1(0.5)	1(0.3)	0.5
2	1(MS)	2(0.8)	2(0.6)	1.9
3	1(MS)	3(1.6)	3(0.9)	4.7
4	2(White)	1(0.5)	2(0.9)	0.8
5	2(White)	2(0.8)	3(0.6)	2.4
6	2(White)	3(1.6)	1(0.3)	1.4
7	3(B5)	1(0.5)	3(0.9)	2.7
8	3(B5)	2(0.8)	1(0.3)	2.3
9	3(B5)	3(1.6)	2(0.6)	3.9
K1	2.37	2.40	3.11	
K2	1.48	2.20	4.20	
K3	2.27	1.94	3.67	
极差 R	0.74	2.72	1.72	
因子主次	B>C>A			
最优方案	A3 B3 C3			

表5 多花山竹子初代培养正交试验方差分析表

变异来源	不同处理对不定芽方差分析			
	平方和	自由度	方差	F值
因素A(基本培养基)	2.672	2	1.5915	1.2774
因素B(6-BA)	3.1830	2	17.8982	14.3653**
因素C(NAA)	35.796	2	7.5448	6.0556**
误差	15.089	2	1.2459	
总和	19.934			

胞分化能力较强,产生较多的不定芽。

3 结论与讨论

(1)在植物组织培养中,不同消毒时间会对外植体的存活率和污染率产生不同的影响。消毒时间太短,会出现消毒不完全或不彻底;消毒时间太长,则影响其存活率。对多花山竹子组培初代培养的外植体消毒时间为2 min时其污染率最高、死亡率与存活率较低,消毒时间为6 min时其污染率和死亡率居中、存活率最高,消毒时间为10 min时其污染率与存活率最低、死亡率最高;综合考虑外植体的污染率、死亡率和存活率3个因素,最后确定消毒时间6 min作为后续试验中诱导多花山竹子外植体的最佳消毒时间控制。颜敬昌^[23]、朱建华等^[24]研究植物组织培养外植物的消毒时间控制6 min时,认为消毒效果最佳,与试验研究结果相吻合。

(2)基本培养基和激素为植物组培外植物体生长

诱导的主导因子。以培养基(MS、B5)和激素(6-BA、NAA)作为多花山竹子组培的初代培养基和激素培养效果良好,其对多花山竹子外植物体诱导萌芽的影响大小依次为:6-BA>NAA>培养基(MS、B5)。对MS和B5分别添加不同浓度的6-BA、NAA,其外植体不定芽生长的诱导促进作用不同,MS的最佳配比为6-BA 1.6 mg/L+NAA 0.9 mg/L,其外植物体平均生长不定芽为4.7个;B5的最佳配比为6-BA 1.6 mg/L+NAA 0.6 mg/L,其外植物体平均生长不定芽为3.9个;综合考虑各因素和激素交互作用,MS的最佳配比(6-BA 1.6 mg/L+NAA 0.9 mg/L)优于B5的最佳配比(6-BA 1.6 mg/L+NAA 0.6 mg/L)。谭文澄等^[28]认为,MS培养基是目前使用最普遍的培养基;陈正华^[29]研究用观赏植物茎尖或苗木中上部饱满腋芽作为外植体诱导的最适培养基为MS+6-BA 1.6 mg/L+NAA 0.9 mg/L;与试验研究结果一致。

(3)本试验在多花山竹子组培初代培养中只对常用的培养基(MS和B5)、激素(6-BA与NAA)进行研究探讨,其他基本培养基类型、激素种类等因素条件有待进一步研究分析。

(4)在组培快繁中,一般对外植体的预处理除了常用70%~75%酒精(C₂H₆O)消毒,用无菌水清洗,再转入0.1%升汞(HgCl₂)溶液中外,还有消毒剂如次氯酸钠(NaClO)及其不同剂量可供选择,其不同效果尚需要做

进一步的深入研究探讨。

(5)在组织培养中,由于不同消毒时间会对外植体的存活率和污染率产生不同的影响,本试验根据多年来的组培实践操作经验设置了2、6、10 min等3个消毒时间,进行对比观察,确定存活率最高达27%的消毒时间为6 min,作为后续诱导试验的最佳消毒控制时间。至于其他不同消毒时间控制对外植体的存活率和污染率产生不同的影响,有待于进一步深入对比观察。

由于多花山竹子资源天然分布分散,种产量少,种苗市场供不应求已成为制约其资源深度开发利用的瓶颈。本试验突破传统的播种与扦插繁殖模式,运用无菌、高效且可工厂化生产的植物组织培养快繁技术,首次对多花山竹子开展组织培养与快繁技术探讨研究,不失为有效解决其优质种苗快速繁殖的重要途径。试验研究表明:多花山竹子组培初代培养的外植体最佳消毒时间控制为6 min时,其污染率为42%,死亡率为31%,存活率达27%;多花山竹子初代培养基的最适配方为:MS+ 6-BA 1.6 mg/L + NAA 0.9 mg/L,其外植体产生不定芽数量的增殖倍数达到4倍以上。这为多花山竹子组织培养快速繁育体系提供了参考依据,填补了其组织培养与快繁技术研究的空白,有效拓展了其繁殖模式,具有重要的理论价值与现实经济意义。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第五十卷,第二分册,藤黄科)[M].北京:科学出版社,1990:86-89.
- [2] 陈有民.园林树木学[M].北京:中国林业出版社,1990:247-251.
- [3] 王兵,穆淑珍,黄烈军,等.多花山竹子化学成分的研究[J].中成药,2010(11):39-41.
- [4] 崔笛,吉炳琨,黄文忠,等.多花山竹子茎叶中1个新的缩酚酸环醚化合物[J].中草药,2017(9):48-51.
- [5] 党泽方,谭红胜,付文卫.LC-MS技术在藤黄属植物化学成分研究中的应用[J].世界科学技术-中医药现代化,2017,19(2):260-263.
- [6] 张宝军,房庆伟,谭红胜,等.高速逆流色谱快速分离山竹子素的制备方法实验研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2017,19(2):254-259.
- [7] 王英强,陈静香,许碧爽,等.多花山竹子黄色素的提取及其稳定性的初步研究[J].仲恺农业技术学院学报,1997(2):86-91.
- [8] 杨志玲,王开良,谭梓峰,等.值得开发的几种野生木本油料树种[J].林业科技开发,2003(2):41-43.
- [9] 杨志玲.几种野生木本油料及其经济价值的研究[J].经济林研究,2001(4):37-38.
- [10] 李秀全,徐有明.我国主要木本油料树种资源开发与林业生物能源林建设的探讨[J].生物质化学工程,2006(1):229-234.
- [11] 禄文林.木本油料树种资源利用现状与展望[J].陕西林业科技,2008(4):146-149.
- [12] 单永年,王永高.多花山竹子种子油的研究[J].江西林业科技,1985(5):46-49.
- [13] 文定青,鄯明宏.海南岛藤黄属植物的分布及其区系特征[J].科技创新导报,2008(3):245-246.
- [14] 刘子金,杨小波,林泽钦,等.10种藤黄科植物遗传多样性的ISSR分析[J].江苏农业科学,2016(7):55-58.
- [15] 杨嵘.多花山竹子在三明园林绿化中的应用[J].现代园艺,2013(6):147.
- [16] 郑小春,龚期绳.多花山竹子的播种育苗[J].林业实用技术,2003(7):26.
- [17] 刘胜洪,黄碧珠.多花山竹子(*Garcinia multiflora* Champ)的繁殖研究[J].中国农学通报,2004,20(6):93-93.
- [18] 李肇锋,周俊新,黄华明,等.多花山竹子扦插繁殖技术研究[J].武夷学院学报,2015(12):8-11.
- [19] 王英强,冯颖竹.多花山竹子种子萌发及其幼苗生长分析[J].仲恺农业技术学院学报,1999,12(2):18-25.
- [20] 瞿学昌,宋墩福,彭丽,等.乡土树种多花山竹子育苗技术[J].林业实用技术,2009(9):38-42.
- [21] 傅家祥,赖锦良.多花山竹子育苗及移栽技术[J].中国林副特产,2015(2):48-49.
- [22] 梁称福.植物组织培养研究进展与应用概况[J].经济林研究,2005,23(4):99-105.
- [23] 颜敬昌.植物组织培养手册[M].上海:上海科学技术出版社,1990:64-65.
- [24] 朱建华,彭士勇.植物组织培养实用技术[M].北京:中国计量出版社,2002:67-72.
- [25] 崔德才,徐培文.植物组织培养与工厂化育苗[M].北京:化学工业出版社,2003:33-34.
- [26] 陈绍煌.药用植物组培快繁实务[M].北京:中国农业出版社,2014:180-185.
- [27] 罗士韦,许智宏.经济植物组织培养[M].北京:科学出版社,1988:210-215.
- [28] 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,1991:290-297.
- [29] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1994:56-65.