

蓝花楹组培技术研究*

王红梅

(江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400)

摘要: 以蓝花楹实生苗茎尖作为外植体的组培技术研究结果表明, 其组培中的启动培养基宜为 MS + 6 - BA1.0 mg/L + NAA0.2 mg/L; 增殖培养基宜为 MS + 6 - BA2.0 mg/L + NAA0.4 mg/L 或 MS + 6 - BA2.0 mg/L + NAA0.5 mg/L; 生根培养基宜为 1/2 MS + NAA0.5 mg/L。其试管苗适宜的移栽基质为营养土 + 蛭石 (比例 1 : 1), 移栽成活率为 55.10%。有利于其试管苗增殖的光照条件为 3 000 lx。继代次数对其试管苗的增殖和生根均有影响, 而适宜转向生根培养的继代数最少为 9 代。

关键词: 蓝花楹; 实生苗茎尖外植体; 组织培养技术

中图分类号: S 604 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 - 8246 (2008) 03 - 0018 - 05

Study on Tissue Culture Technique of *Jacaranda acutifolia*

WANG Hong-mei

(Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong Jiangsu 212400, P. R. China)

Abstract: The tissue culture technique of *J. acutifolia* was studied by using the stem tips of seedlings as the explants. The experimental results showed that the medium for startup culture was MS + 6 - BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L; the proliferation medium was MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L or MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; the root inducing medium was 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L. The optimum planting medium for tissue culture plant was nutrient soil + vermiculite (1 : 1), the survival ratio of transplanting was 55.10%, the optimum light condition was 3 000 lx. The proliferation and rootage were all affected by the times of successive transfer culture, 9 times of successive transfer before rooting culture was the appropriate number.

Key words: *Jacaranda acutifolia*; explant of seedling stem tip; tissue culture technique

蓝花楹 (*Jacaranda acutifolia*) 为紫葳科, 蓝花楹属 (*Jacaranda*) 的一种植物, 别名: 巴西紫葳、非洲紫葳、西紫葳、金凤花、紫云木。原产中南美洲, 分布于墨西哥、秘鲁、玻利维亚、巴西、南非、西印度群岛等国。蓝花楹的叶子很像合欢, 其蓝色花的花冠为联合钟状, 多盛开于每年春末及初夏, 花香如茉莉, 成熟果实形状似铜钱, 故又称铜钱树, 是一种优良的观叶、观花、观果树种, 成为多个国家首都城市理想的行道树种。蓝花楹在我国主要分布于热带和南亚热带地区的海南、台湾、

福建、广东、广西、云南等省 (区) 的一些主要城市, 近几年已引种至长江中下游地区。但由于蓝花楹种子缺乏, 且种子的出苗率又低, 造成种苗供应不足。而应用组织培养方法可在短期内繁殖大量蓝花楹优质苗木, 以满足生产的需要。

本项目以蓝花楹优良种子的实生苗茎尖为外植体, 研究不同激素和不同培养条件对其茎尖诱导、分化、生根的影响, 进而探寻其试管苗的炼苗和移栽方法, 以为蓝花楹的组织培养及工厂化育苗寻求技术基础。

* 收稿日期: 2008 - 03 - 20

基金项目: 江苏农林职业技术学院内课题 (NO. 2005 - 02)。

作者简介: 王红梅 (1976 -), 女, 河北任丘人, 讲师, 硕士, 主要从事林木育种方面的教学与研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料的来源

组培试验所用蓝花楹实生苗的种子来源于南非的约翰内斯堡和伊丽莎白港。在江苏农林职业技术学院花房内对其种子进行播种育苗, 第二年春季, 待所育蓝花楹实生苗长到 1.0 m 以上高度, 并有大量新芽萌生时, 剪取其苗的茎尖作为本项试验用的外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的灭菌

于晴天中午, 采集蓝花楹实生苗的幼嫩茎尖作外植体, 用洗衣粉浸泡 5 min 左右再用自来水冲洗 30 min, 然后移至超净工作台, 将外植体剪成 1.5 cm 左右的带腋芽的茎尖段, 剪去其多余的叶片, 在无菌条件下用 70% 的酒精浸泡 30 s, 再用 0.1% 升汞灭菌 6 min, 倒去升汞液, 用无菌水冲洗 3~4 次, 接种于已准备好的启动培养基上。

1.2.2 培养条件

蓝花楹实生苗茎尖外植体组培试验的培养室温度为 25 ± 2 °C, 相对湿度 50%~70%, 光照强度 2 000~3 000 lx, 辅助光照时间为 12 h。启动培养基和增殖培养基的蔗糖含量均为 30 g/L, 生根培养基蔗糖含量为 20 g/L, 附加琼脂量均为 6 g/L, 其 pH 调至 5.8~6.0。

1.2.3 启动培养

以 MS, 1/2 MS, B₅ 为蓝花楹实生苗茎尖外植体组培试验的基本培养基, 其附加的 6-BA 设 0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L 3 个水平, NAA 设 0.2 mg/L、0.1 mg/L、0.3 mg/L 3 个水平, 2, 4-D 设 0 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L 3 个水平。采用 L₉(3⁴) 正交试验设计, 共 9 个处理, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 2 个蓝花楹实生苗茎尖外植体, 设 3 次重复。培养 30 天后观察统计其启动培养阶段的成活率。

1.2.4 增殖培养

(1) 在无菌条件下待其启动培养期诱导出的蓝花楹实生苗茎尖外植体的不定芽长到 2 cm 时剪下, 将其分割成单芽, 接入增殖培养基中作增殖培养。增殖培养基分别设: ①MS + 6-BA2.5 mg/L + NAA0.3 mg/L; ②MS + 6-BA2.0 mg/L + NAA0.3 mg/L; ③MS + 6-BA2.0 mg/L + NAA0.4 mg/L; ④MS + 6-BA2.0 mg/L + NAA0.5 mg/L 4 个处理。

每个处理接种 20 瓶, 每瓶接种 6 棵, 重复 3 次。培养 30 天后, 统计其增殖系数。以了解各培养基的增殖效果。

(2) 在其他培养条件均相同的条件下, 仅对不同光照强度的蓝花楹实生苗茎尖外植体的增殖培养效果进行试验。采取两种光照强度处理, 即 1 200 lx; 3 000 lx。每个处理接种 20 瓶, 每瓶 6 棵。30 天后观测其增殖系数及长势。上述两种处理所用的培养基均为 MS + BA2.0 mg/L + NAA0.4 mg/L。

(3) 将经启动培养期所获的蓝花楹试管苗剪成 1 cm 左右的单芽茎段, 接种于 MS + 6-BA2.0 mg/L + NAA0.4 mg/L 培养基上作继代培养。在继代培养的各代每代接种 10 瓶, 每瓶接种 6 个茎段, 培养 30 天后再次转接, 直到转接 10 代。调查各代转接茎段的增殖情况。

1.2.5 生根培养

(1) 待经增殖培养的蓝花楹试管苗长到 2.0 cm 以上时, 将其生长健壮的芽从芽丛中切离出来, 并转移至生根培养基上作不同生根培养基对其生根影响的试验, 以 1/2 MS 为其的基本培养基, 安排 4 个处理, 分别为: NAA0.2 mg/L, NAA0.4 mg/L, NAA0.3 mg/L + IBA0.2 mg/L; NAA0.5 mg/L。每个处理 10 瓶, 每瓶 3 株, 随时观察其生根情况, 30 天后统计各处理的生根结果。

(2) 从蓝花楹实生苗茎尖外植体组培增殖培养期中继代培养的第 5 代开始至第 10 代, 每代选取长度 2 cm 以上的蓝花楹健壮组培苗接种于 1/2 MS + NAA0.5 mg/L 的生根培养基上, 每代接种 10 瓶, 每瓶 3 株, 接种 30 天后调查生根情况, 以观察其不同继代次数对蓝花楹实生苗茎尖外植体组培苗生根的影响。

1.2.6 炼苗移栽

(1) 当蓝花楹实生苗茎尖外植体所获的组培苗在其生根培养基上生长 30 天左右、苗高达 3~5 cm, 生长健壮且有 3 条以上正常根时将其拿至温室阳光充足的地方进行炼苗。瓶内炼苗时间 14 天, 开瓶炼苗的时间为 2 天。

(2) 其蓝花楹组培苗经炼苗后作移栽试验。移栽所用的基质为蛭石 + 营养土 (比例为 1:1)。移栽时用镊子轻轻从瓶中取出试管苗, 在 20°C 左右的温水中浸泡数分钟 (时间根据其培养基的干湿度而定。黏附的培养基较干时, 浸泡时间可加长), 换水两次, 将黏附于试管苗根部的培养基清洗干净, 迅速栽入装有基质的育苗盘中, 喷淋透

水,然后放在干净、排水良好的温室内,并用塑料薄膜覆盖严密,每天上午10时前和下午4时后揭开塑料薄膜透气各10 min,一周左右后半揭开塑料薄膜继续培养一周,让其苗继续锻炼驯化。其间对其移栽苗进行适量的叶面追肥,即喷洒1/4 MS大量元素。继续培养一周后,当移栽苗开始了新的生长时,调查移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 启动培养的效应

不同培养基对蓝花楹实生苗茎尖外植体组培启动培养结果的极差分析表明,其参试的3个因素对

试验结果影响的大小为 $NAA > 6 - BA >$ 基本培养基。根据K值的大小对其3因素各水平进行比较,得出蓝花楹实生苗茎尖外植体组培启动培养阶段培养基的最佳组合为 $MS + 6 - BA 1.0 \text{ mg/L} + NAA 0.2 \text{ mg/L}$ (表1)。

对其启动培养期各处理统计的成活率,进行反正弦 $x \rightarrow \sin^{-1} \sqrt{x}$ 转换后,再进行方差分析。发现其不同培养基3个试验因素的3个水平间无显著差异。说明此3试验因素各水平的选取跨度还应加大。所以,本项研究仅初步选定了适宜于蓝花楹实生苗茎尖外植体组培启动阶段的培养基为 $MS + 6 - BA 1.0 \text{ mg/L} + NAA 0.2 \text{ mg/L}$,而更适宜的培养基还需作进一步的研究。

表1 不同培养基对蓝花楹实生苗茎尖外植体组培启动的影响

Tab. 1 Effects of different media on survival rate during initiation period

处理号	1 培养基	2 (6 - BA) /mg · L ⁻¹	3 (NAA) /mg · L ⁻¹	接种数	平均成活数	成活率/%
1	MS	0.5	0.2	20	16.33	81.67
2	MS	1.0	0.1	20	15.33	76.67
3	MS	2.0	0.3	20	18.33	91.67
4	1/2MS	0.5	0.1	20	15.00	75.00
5	1/2MS	1.0	0.3	20	16.00	80.00
6	1/2MS	2.0	0.2	20	13.33	66.67
7	B ₅	0.5	0.3	20	10.67	53.33
8	B ₅	1.0	0.2	20	19.33	96.67
9	B ₅	2.0	0.1	20	16.00	80.00
K ₁	250.01	210.00	245.01			
K ₂	221.67	253.34	231.67			
K ₃	230.00	238.34	225.00			
\bar{X}_1	83.34	70.00	81.67			
\bar{X}_2	73.89	84.45	77.22			
\bar{X}_3	76.67	79.45	75.00			
R	9.45	14.45	6.67			

最佳搭配: $MS + 6 - BA 1.0 \text{ mg/L} + NAA 0.2 \text{ mg/L}$

表2 不同培养基对蓝花楹实生苗茎尖外植体组培增殖系数的影响

Tab. 2 Effects of different media on proliferation coefficient

处理号	接种数	平均分化数	平均苗高 /cm	平均增殖 系数
1	120	400.67	1.60	4.93B
2	120	386.00	1.33	4.57C
3	120	388.00	2.17	5.40A
4	120	379.00	2.23	5.40A

注:平均增殖系数 = 平均苗高/1.0 + 平均分化数/接种数;采用LSR (0.05) 水平上显著性检验。

2.2 增殖培养的效应

2.2.1 不同培养基的增殖效果

经过一个月的培养,统计蓝花楹实生苗茎尖外植体的增殖分化情况。方差分析和多重比较结果表明,各增殖培养基处理只有3,4之间无显著差异,其余各处理间均有显著差异。所以,适宜蓝花楹实生苗茎尖外植体增殖培养的培养基为3,4号(表2)。

2.2.2 不同光照强度的增殖效果

不同光照强度对蓝花楹实生苗茎尖外植体组培

试管苗的增殖系数有明显的影响(表 3)。经统计分析,在参试的两种蓝花楹实生苗茎尖外植体组培增殖培养期的光照强度中,其适宜的强度为 3 000 lx。

表 3 不同光照强度对蓝花楹实生苗茎尖外植体增殖培养的影响

Tab. 3 Effects of different light intensity on proliferation coefficient

光照强度 /lx	接种数	平均分化数	平均苗高 /cm	平均增殖系数
1 200	120	310.00	1.3	3.90a
3 000	120	396.00	2.2	5.50b

注: LSR (0.05) 水平上显著性检验。

2.2.3 继代次数的增殖效果

连续试验结果表明,在增殖培养期其继代次数对蓝花楹实生苗茎尖外植体的增殖培养也有一定影响。继代次数较少其增殖系数较低,原因是幼苗分蘖较少。随着继代次数的增多,其外植体的丛生芽大量长出,5~8 代增殖系数都较高,但从 8 代以后,分化出来的苗明显变弱,且畸形苗较多,植株老化现象也不断增加。因此,从第 9 代开始可将其分蘖出的幼嫩小苗继续进行增殖培养,而健壮的大苗可转入下一步的生根培养(图 1)。

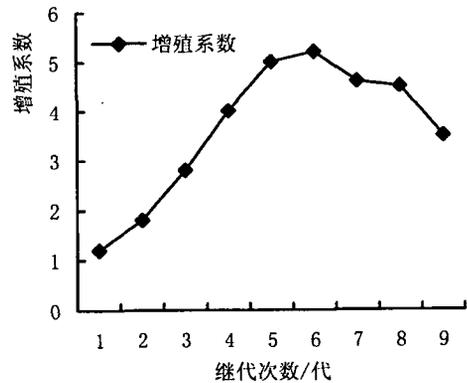


图 1 继代次数对蓝花楹实生苗茎尖外植体组培增殖系数的影响

Fig. 1 Effects of different generations on proliferation coefficient of *J. acutifolia*

2.3 生根培养的效应

2.3.1 不同培养基的生根效果

经增殖期继代培养后的蓝花楹实生苗茎尖外植体组培苗,转入生根培养基上 7 天后,组培苗基部便膨大,但在其生根培养过程中,不同培养基上组培苗的生根速度各异(表 4),且健壮的组培苗有叶片萎蔫现象。表明在其组培的生长培养期间不同的培养基对蓝花楹实生苗茎尖外植体组培苗的生根状况具有明显的影响。

表 4 蓝花楹实生苗茎尖外植体组培苗在不同培养基上的生根情况

Tab. 4 Rootage of *J. acutifolia* on different media

培养基种类	接种数/个	生根数/条	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm	长势
1	30	0	0	/	/	/
2	30	9	30.00	3.06	0.42	弱
3	30	25	83.33	18.26	0.77	健壮
4	30	28	93.33	23.17	0.62	健壮

试验结果表明,其组培苗以第 3 种和第 4 种培养基的生根率为高,结合平均根数和平均根长及根的生长势,选定第 4 种培养基,即 1/2 MS + NAA0.5 mg/L,为蓝花楹实生苗茎尖外植体组培苗生根培养期的适宜培养基。

2.3.2 继代次数的生根效果

继代次数对蓝花楹实生苗茎尖外植体组培苗生根具有明显的影响。在相同的培养基和培养条件下,从第 5 代开始对其组培苗进行生根状况观测,直到其继代苗为 9 代时才有根长出,到第 12 代,其继代苗根的生长势仍较旺盛,至于何时根的生长势降

低,仍在继续试验中。

2.4 炼苗移栽的效应

炼苗移栽的蓝花楹实生苗茎尖外植体组培试管苗,在刚移栽后的一周内,其苗的茎、叶均处于生长状态,但一周后有部分苗出现了萎蔫现象。主要原因是试管苗适应了湿度较大的生长环境,移栽后的第一周其育苗盘有塑料薄膜覆盖,基本能保证苗木生长对其湿度环境的要求,但在一周揭膜后,因湿度降低,部分试管苗无法适应而死亡。又因长出的部分根愈伤组织,与其苗根的疏导组织不连通,这也导致了试管苗的死亡。蓝花楹实生苗茎尖外植

体组培移栽苗约在移栽后的3周有明显的生长,此时调查其成活率为55.1%,且移栽苗的生长表现正常。

3 结论与讨论

(1) 蓝花楹实生苗茎尖外植体组培适宜的启动培养基为MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.3 mg/L。增殖培养基为MS+6-BA2.0 mg/L+NAA0.4 mg/L或MS+6-BA2.0 mg/L+NAA0.5 mg/L。生根培养基为1/2 MS+NAA0.5 mg/L,其组培苗适宜的移栽基质为营养土+蛭石(比例为1:1)。

(2) 在蓝花楹实生苗茎尖外植体组培的增殖培养期一定的继代次数内(8代),随着继代次数的增加,其试管苗的增殖系数也相应增加,但到达一定代数(9代)后,试管苗的增殖率降低,且出现畸形苗的几率增加。有关的研究认为,在植物组培的继代培养中其组培苗分化能力降低或丧失的原因除遗传因素外,还与在培养过程中逐渐消耗原有母体组织中存在的与器官形成的特殊物质有关。在刺梨(*Rosa roxburghii*)组培的继代培养中也有随继代次数增加植株变异率明显提高的现象。蓝花楹实生苗茎尖外植体组培苗,在其增殖培养期所出现的这种现象是否由于这些原因造成,还需进一步研究。此外,随继代次数的增加,其试管苗的生根率也呈现明显的增加趋势,但并非无限制的增加。可能是随继代次数的增加,其试管苗体内的激素大量积累,尤其是细胞分裂素积累最多、最快,而此间生长素的积累相对较慢,反使其细胞分裂素与生长素的比例降低,从而影响了试管苗的生根率。

(3) 在蓝花楹实生苗茎尖外植体组培的启动、

增殖及生根培养过程中,其组培苗的叶片出现不同程度的萎蔫现象。在启动、增殖培养前期其组培苗生长健壮,叶片萎蔫现象主要出现在20天以后,可能是由于蓝花楹实生苗茎尖外植体组培苗对培养基中的营养吸收过快,而导致其苗营养不良的结果。采用快速转移的方法,对预防其组培苗出现叶片萎蔫现象起到了良好的作用。而在生根培养过程中其试管苗出现叶片萎蔫的问题,可能是由于生根培养基不适合,或因培养条件等其他因素不适合所致。

(4) 本次试验只对6-BA、IBA和NAA3种激素的作用进行了研究,而其他激素尚未涉及。

参考文献:

- [1] 赵志法,谢益民,张业聪,等.速生材新品种——蓝花楹[J].黑龙江造纸,2006(4):1-5.
- [2] 黄英辉.蓝花楹[J].园林,2003(10):36-37.
- [3] 谢玉华.优美的园林树种——蓝花楹[J].西南园艺,2004,32(6):31-33.
- [4] 龚峥,周志坚,翟应昌,等.南洋楹的组织培养[J].广东林业科技,1989(1):1-5.
- [5] 奚伟鹏,张华通.南洋楹快速繁殖技术[J].广西林业科学,2003,32(2):81-83,90.
- [6] 杨增海.园艺植物组织培养[M].北京:农业出版社,1987.
- [7] 高相福,高天勇.刺梨试管繁殖技术研究[J].园艺学报,1994,21(3):235-238.
- [8] 范贤熙,胡秀,王奇,等.木本切花植物极美泰洛泊的组织培养研究[J].西部林业科学,2006,35(2):86-89.