

文章编号: 1001-3776 (2007) 03-0015-04

黄藤以芽繁芽组培快繁研究

李湘阳, 曾炳山, 裘珍飞, 刘英, 范春节

(中国林科院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要: 用萌蘖芽为外植体对黄藤进行组培快繁试验, 结果表明, 高浓度的 6BA 及多激素组合有利于丛芽诱导, 但在继代增殖过程中需要适当降低 6BA 的浓度及除去 2,4-D 以利于芽伸长壮苗; 0.25 ~ 0.50MS 诱导根效果好; 培养基中加入 0.1 g/L 活性炭显著提高生根率; NAA 诱导的根过粗, 不利于幼苗生长和移植成活; 而 IBA 诱导的根细长, 形态上接近自然根, 幼苗易长高, 移栽易成活。

关键词: 黄藤; 萌蘖芽; 外植体; 组培快繁

中图分类号: S564.1

文献标识码: A

黄藤 (*Daemonorops margaritae*) 原产华南, 为我国特有藤种, 是热带及南亚热带地区森林的主要伴生藤本植物^[1]。藤茎具有良好的工艺特性, 是藤编家具及工艺品的优良材料; 藤嫩梢富含人体所需多种营养成分, 可作蔬菜食用^[2]; 果实可萃取“麒麟血褐”药品。因此, 黄藤是具有较高经济价值和开发前景的多用途珍贵森林植物^[3], 也是华南地区广泛人工栽培的主要商品藤种之一。由于棕榈藤的种子成熟期长、保存期短、发芽慢、时间长等因素造成苗木发芽率低, 制约了苗木的生产和供应, 20 世纪 90 年代以来, 国内开展了黄藤的组培快繁研究^[4], 但所用外植体都是种胚。由于黄藤雌雄异株, 是高度异花传粉的植物, 利用种胚培养出来的植株并不能完全代表母株的遗传特性, 故以种胚为外植体进行组织培养显然还无法做到真正意义上的良种繁育。本研究首次突破了以种胚为外植体的局限性, 以黄藤的营养器官——萌蘖芽为外植体进行组培快繁, 现报导如下。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

黄藤萌蘖芽采自广东省肇庆市金鸡坑林场。

1.2 外植体采集

用锯将萌蘖芽从母株上锯下来。

1.3 外植体消毒方法

用洗衣粉液将萌蘖芽外植体清洗干净, 剥去 1~2 层叶鞘, 75%酒精消毒 15~20 s, 0.1%升汞消毒 8~10 min, 无菌水漂洗 1 次 5 min, 剥去多余叶鞘并修剪至适合于培养的大小 (约 3~4 cm), 0.1%升汞消毒 1~2 min, 无菌水漂洗 3 次, 分别为 5、5、10 min。

1.4 不定芽的诱导

芽诱导培养基为: ①改良 MS + 6-BA 4.00 mg/L + IBA 0.25 mg/L + 2,4-D 0.75 mg/L; ②改良 MS + 6-BA 4.00 mg/L + IBA 0.25 mg/L + 2,4-D 0.75 mg/L + 抗坏血酸 10.00 mg/L + 半胱氨酸 2.00 mg/L; ③改良 MS + 6-BA 4.00 mg/L + IBA 0.25 mg/L + 2,4-D 0.75 mg/L + 聚乙烯吡咯烷酮 1.00 g/L。

收稿日期: 2007-01-09; 修回日期: 2007-03-02

基金项目: “十一五”国家科技支撑项目“棕榈藤无性快繁工艺研究”及国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2006AA100109)

作者简介: 李湘阳 (1970-), 女, 湖南宁远人, 助理研究员, 博士, 从事林木组培及转基因研究。

1.5 继代与增殖培养

继代培养以改良 MS 为基本培养基, 加入不同浓度的 6-BA、IBA 和 2,4-D, 采用单因素实验方法, 配制了 14 种培养基, 每个处理组合接 8 瓶, 每瓶接 3 丛芽。所有培养基 pH 值均为 5.8, 卡拉胶 9.00 g/L, 培养温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照强度 1 500 ~ 2 000 lx, 每天光照 12 h。

1.6 根诱导及移植

根诱导采用单因素实验方法, 以大量元素、活性炭、NAA、IBA 为参试因子, 每个处理组合接 10 瓶, 每瓶接 4 棵苗。苗生根后移至黄心土与珍珠岩按 3 : 1 混合的基质中, 覆盖薄膜以保持湿度大于 80%, 在移植后 1 ~ 7 d 遮阳 90%, 8 ~ 30 d 遮阳 70%, 以后按遮阳 30% 进行管理。移植后, 每周喷施 1/1 000 复合肥一次并交替喷施 1/800 的百菌清和 1/800 的多菌灵进行杀菌、消毒。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒

黄藤以芽繁芽的难点之一就是外植体的消毒, 如果采用以往藤类种胚的消毒方法^[5], 消毒的成功率只有 5% 左右, 而采用现有改进的专门针对黄藤萌蘖芽的消毒方法, 在接种一周后消毒的成功率可达到 65%, 但在接种两周左右时会有芽陆续出现自芽内向外渗出的细菌性污染, 导致消毒的成功率下降到 50% 左右, 以后则基本稳定。这可能是由萌蘖芽的内生污染引起的。

2.2 不定芽的诱导

诱导黄藤萌蘖芽产生不定芽的关键之一就是必须控制萌蘖芽的褐变, 如果萌蘖芽持续严重褐变不止将导致芽的死亡。在芽诱导培养基中分别加入抗褐变剂抗坏血酸 + 半胱氨酸、聚乙烯吡咯烷酮, 结果表明能显著控制萌蘖芽的褐变 (表 1), 其中联合加入抗坏血酸和半胱氨酸的效果要好于聚乙烯吡咯烷酮。在芽不褐变情况下, 培养 4 ~ 5 个月

表 1 不同处理对黄藤萌蘖芽褐变的影响

处理方式	无褐变/%	褐变 $\leq 1/4$ 培养基/%	褐变 $\geq 1/3$ 培养基/%
抗坏血酸 10 mg/L + 半胱氨酸 2 mg/L	75	25	0
聚乙烯吡咯烷酮 1 g/L	50	50	0
不加防褐变剂	0	0	100

后, 约有 3% 的外植体开始产生丛芽进入增殖状态。

2.3 继代与增殖培养

丛芽诱导后, 最初的 1 ~ 4 代继代增殖培养, 增殖倍数较低仅 1 ~ 2 倍, 随后增殖逐渐加速, 至 8 ~ 10 代时, 增殖倍数可达到 6 倍, 但增殖苗普遍矮小细密, 不易伸长壮苗、生根。对增殖培养基进行优化选择, 共设置 14 种培养基组合 (表 2)。实验结果表明, 随着 6BA 含量的上升, 苗的高度下降, 但苗玻璃化的比率也在下降。IBA 浓度的提高能促进苗的长高, 但当 IBA 增加到 0.75 mg/L 时, 苗的高度又开始下降。IBA 的加入有促使苗出现玻璃化的倾向。2,4-D 的加入显著降低苗的高度, 并导致苗出现严重玻璃化。

2.4 根诱导及移植

将高度为 2 ~ 3 cm 的单芽苗接种到大量元素为 1/2MS, 微量元素和有机质为 MS, 活性炭为 0.1 g/L, NAA 或 IBA 分别为 1.0、2.0、3.0 mg/L 的生根培养基上, 结果表明, NAA 浓度为 1.0 mg/L 时, 生根率最高, 随着 NAA 浓度的提高, 生根率反而下降; IBA 的作用则相反, 随着 IBA 浓度的提高, 生根率也升高。比较而言, NAA 对黄藤根的诱导效率要高于 IBA, 但用 NAA 诱导出来的根都很粗, 且根系的生长量过大, 一定程度上抑制了苗的生长, 导致生根苗长高速度慢, 延长了苗在瓶中的培养时间, 增加了生产成本。在后期移植中, 过粗的根也容易腐烂而导致成活率下降。而 IBA 诱导的根则较细, 形态上接

表 2 不同激素组合对黄藤增殖芽的影响

6BA 浓度 /mg · L ⁻¹	IBA 浓度 /mg · L ⁻¹	2,4-D 浓度 /mg · L ⁻¹	苗净生长 高度/cm	苗玻璃化率 /%
0.00	0.25	0.125	0.76	37.5
1.00	0.25	0.125	0.51	26.1
2.00	0.25	0.125	0.34	25.0
3.00	0.25	0.125	0.20	18.5
4.00	0.25	0.125	0.21	10.0
1.00	0.00	0.125	0.33	16.7
1.00	0.12	0.125	0.35	20.8
1.00	0.50	0.125	0.79	26.7
1.00	0.75	0.125	0.48	44.4
1.00	0.25	0.000	0.98	19.6
1.00	0.25	0.250	0.49	63.3
1.00	0.25	0.500	0.38	66.7
1.00	0.25	0.750	0.17	63.0
0.00	0.00	0.000	0.60	28.6

近自然根, 根系生长量适中, 有利于生根苗在组培瓶中长高和移植成活, 但当 IBA 的浓度增加到 3.0mg/L 时, 根也开始增粗, 因此, 黄藤的生根诱导宜用 IBA, 且浓度控制在 1.0 ~ 2.0 mg/L。

在微量元素和有机质为 MS, 活性炭为 0.1 g/L, NAA 为 1.0 mg/L, 大量元素从 0.25 ~ 2.00 MS

变动的培养基上进行生根诱导, 实验表明, 大量元素为 0.25MS 或 0.50 MS 都有利于黄藤生根, 当大量元素提高到 1.00MS, 生根率明显下降。活性炭对黄藤生根有明显作用, 当加入微量活性炭时 (0.1g/L), 生根率显著提高, 随着活性炭含量的提高, 生根率开始下降, 但也仍然比不加活性炭高。

分别将苗高 > 4 cm 和苗高 < 4 cm 的生根苗移植到基质中, 其中苗高 > 4 cm 的生根苗成活率可达到 80%, 而苗高 < 4 cm 的生根苗则在移植 10 ~ 15 d 后逐渐枯黄而死。所以试管生根苗必须达到 4 cm 时才能考虑移植。

3 讨论

消毒与褐变是以黄藤萌蘖芽为外植体进行组培快繁必须首要突破的难关, 由于黄藤萌蘖芽被层层叶鞘包裹, 且深植于土壤中, 内生污染不可避免, 而雨水会加剧这种污染。所以萌蘖芽的采集应在少雨的秋季并连续放晴数周后进行。由于萌蘖芽比种胚的分化程度高, 而且在接种过程中又必须要经过切割、修剪, 所以褐变极其严重, 如果在培养基中不加任何防褐变物质, 在接种 2 d 后, 几乎整个培养基都变成黑色, 数天后外植体也开始枯焦变黑。通常认为在培养基中加入抗氧化剂如抗坏血酸、半胱氨酸、聚乙烯吡咯烷酮能防止外植体褐变^[6], 本研究证明在培养基中联合加入抗坏血酸和半胱氨酸对防止黄藤萌蘖芽外植体褐变是很有效的。但即使在培养基中加入了防褐变物质, 也必须在接种后以每周一次的频率连续转接两次, 才能最终控制住褐变。转接时, 要将原来已褐变的培养基清除干净, 但已褐变的组织不能切除, 否则会进一步加剧褐变。

高浓度的 6BA 及多激素组合有利于诱导黄藤萌蘖芽产生丛芽, 但是在连续继代 6 代左右后, 就应该适当降低 6BA 的浓度, 否则芽过细小, 不易伸长壮苗, 但 6BA 的浓度不能降得太低, 当 6BA 浓度降为 0 时, 部分增殖苗开始死亡。从实验结果来看, 当培养基中有多种激素时, 在单独降低 6BA 浓度的情况下, 黄藤组培苗的玻璃化倾向反而增加, 这与多数前人的研究结果不同^[7-9], 与丁小维等的研究结果类似^[10], 这说明 6BA 不是导致黄藤组培苗出现玻璃化的原因。而在 6BA 浓度一定的情况下, 单独降低 IBA 或 2,4-D 的浓度, 都会减轻苗的玻璃化, 可见 IBA 和 2,4-D 才是影响黄藤组培苗玻璃化的主要因素。2,4-D 对黄藤苗玻璃化作用尤其严重, 同时 2,4-D 也是导致增殖苗矮小的原因之一, 因此, 在继代增殖培养基中应考虑去除 2,4-D。IBA 虽然也有促使增殖苗玻璃化的作用, 但影响的力度远低于 2,4-D, 而且低浓度的 IBA 对苗的长高有一定的作用, 所以在继代增殖培养中可以采用较低浓度的 6BA (1.0 ~ 2.0 mg/L) + 低浓度的 IBA (0.25 ~ 0.50 mg/L)。尽管黄藤萌蘖芽诱导产生丛芽的再生能力比较差, 效率也不高, 但是一旦形成丛芽后, 再经过 3~4 代的继代增殖培养, 增殖能力会大大加强, 丝毫不逊色于以种胚为外植体诱导产生的丛芽, 而以萌蘖芽繁芽产生的组培苗能完全继承母本的遗传特性, 才能进行优良无性系的生产和推广, 这是以种胚为外植体进行组培快繁无法做到的。因此, 黄藤以芽繁芽组培快繁技术的建立将对黄藤优良藤种的开发利用和人工栽培提供坚实的基础。

参考文献:

- [1] 许煌灿, 尹光天, 曾炳山, 等. 黄藤生态生物学特性的研究[J]. 林业科学研究, 1994, 7 (1): 20-26.
- [2] 许煌灿, 周再知, 尹光天. 藤茎嫩梢的营养成分分析[J]. 林业科学研究, 1991, 4 (4): 459-461.
- [3] 许煌灿, 吴金坤, 尹光天. 棕榈藤的研究和发展[J]. 世界林业研究, 1999, 12 (5): 37-42.
- [4] 曾炳山, 许煌灿, 刘英, 等. 大量元素对棕榈藤组培增殖的影响[J]. 中南林学院学报, 1999, 19 (1): 24-28.
- [5] 曾炳山. 短叶省藤离体快繁研究[J]. 中南林学院学报, 1997, 17 (4): 37-43.
- [6] 沈惠娟. 木本植物组织培养技术[M]. 中国农业科技出版社, 1992.
- [7] 李娅莉, 张健, 潘远智. 观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22 (3): 279-282.

表 3 大量元素、活性炭、NAA、IBA 对黄藤生根诱导率的影响

大量元素	生根率 /%	活性炭 /g · L ⁻¹	生根率 /%	NAA /mg · L ⁻¹	生根率 /%	IBA /mg · L ⁻¹	生根率 /%
0.25MS	71.2	0.0	50.0	1.0	76.0	1.0	37.5
0.50MS	72.9	0.1	72.9	2.0	60.3	2.0	56.3
1.00MS	59.9	0.2	63.3	3.0	63.3	3.0	65.6
1.50MS	61.3	0.3	62.5				
2.00MS	45.1	0.4	58.9				

