

文章编号:1674-7054(2011)01-0053-06

地涌金莲试管苗生产技术研究

潘学峰, 赵 强

(海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘 要:以地涌金莲的吸芽作为外植体进行组织培养,研究了无菌外植体的构建、芽的增殖及生根培养等几个关键步骤的培养基配方。实验操作按植物组织培养的常规方法进行,实验数据采用 SAS 软件进行分析。结果表明:地涌金莲吸芽纵切后接种于 $MS + 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖培养基上,25 d 后长出幼芽;丛生芽在 $MS + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + 10% CW 的增殖培养基上,效果最佳,芽生长正常且色泽浓绿,增殖速度快,增殖倍数达 5.47;在丛生芽增殖过程中,当 6-BA 质量浓度高于 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,芽呈失水状、畸形芽,玻璃化芽增多;地涌金莲试管苗在 $1/2 \text{ MS} + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭的生根培养基上,效果最好,平均生根条数为 3.07,平均根长达 2.43 cm,平均生根率达 96.7%。此外,试管苗移栽在河砂与表土(河沙:表土 = 1:1)的基质中,成活率可达 93.7%,且植株生长良好。

关键词:地涌金莲;试管苗;吸芽;组培快繁

中图分类号: S 682.31

文献标志码: A

地涌金莲(*Musella lasiocarpa* (Franch) C. Y. WU)是芭蕉科地涌金莲属植物。其野生资源在我国分布主要在云南中部、西部、东北部和四川西南部海拔 1500 ~ 2500 m 的山间坡地^[1]。因其形如金色莲花,故名“地涌金莲”。地涌金莲是一种很好的庭院绿化和园林景观植物^[2],其花朵色彩富丽祥和且花期(200 多天)长,其在假茎的叶腋中还能开出众多的小花朵,形成“众星捧月”的奇观。佛教把它作为寺院中必须种植的“五树六花”之一^[3]。地涌金莲除了作为庭院绿化和园林景观植物外,其假茎还可作为家畜饲料;其花苞还可入药,味苦涩、性寒,有收敛止血之效;其茎汁还有解毒功效,可解酒和草乌中毒^[4]。目前,地涌金莲的人工繁殖方式主要有匍匐茎繁殖、分株吸芽繁殖和种子繁殖,其生产周期相对过长,不能满足大规模推广种植的需求。国内学者对地涌金莲在组织培养方面的研究较少^[5-7],因此,地涌金莲试管苗生产技术的生产具有重要的推广价值。

1 材料与方法

1.1 材料 地涌金莲(*Musella lasiocarpa* (Franch) C. Y. WU)吸芽。

1.2 方法

1.2.1 外植体处理 选取大小适中、无病虫害健壮的地涌金莲吸芽,及时带回实验室进行处理。先用自来水将吸芽冲洗干净,截去芽体上下端,从外到里层层剥去松动的叶鞘,然后用干净的小刀切取约 1.5 cm^3 的柱体。在超净工作台上用 $\varphi = 75\%$ 的酒精浸泡柱体 30 s,柱体再转入 $w = 0.15\%$ 的 HgCl_2 溶液中浸泡 15 min,用无菌水冲洗柱体 4 ~ 5 遍,对柱体进行切割接种。切割时,切去芽体外层褐化组织,直至露出茎尖为止,然后纵切茎尖并接种于 $MS + 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ 培养基上。为避免交叉感染,每瓶只接种 1 块外植体。

1.2.2 培养基 以 KC, MS, H 为基本培养基,在不同阶段的培养基中分别添加不同的激素和附加物。所有培养基均含有 $w = 3\%$ 的食用白糖, $w = 0.7\%$ 的卡拉胶, pH5.8。装瓶的培养基均经 $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 0.14 MPa

收稿日期: 2011-01-02

作者简介: 潘学峰(1963-),男,海南文昌人,海南大学农学院高级实验师。

高温高压灭菌 20 min^[8]。

2.2.3 培养条件 培养温度为(25±2)℃,日光灯为光源,光照强度为2 000~2 500 Lx,光照时间为10~12 h·d。

1.2.4 移栽基质 移栽基质采用干净河沙和肥沃的表土按 $V_{\text{河沙}}:V_{\text{表土}}=1:1$ 比例混合而成。

2 结果与分析

2.1 无菌材料的获得和芽的诱导 接种后外植体开始分泌褐色物质,3 d 后培养基开始呈现褐色,12 d 左右培养基显蓝褐色(见图版 1),25 d 左右可分化出芽(见图版 2)。培养基颜色变化不会影响外植体的生长。萌发出新芽的即可用解剖刀切成数块,转入相同的培养基进行增殖培养。周而复始,可获得较大数量的丛生芽(见图版 3)。

2.2 丛生芽的增殖

2.2.1 不同基本培养基对丛芽增殖的影响 为了筛选出较适宜地涌金莲的基本培养基,将诱导出的丛生芽切割,接种到添加 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 的 KC,MS 和 H 培养基上进行增殖,25 d 后观察芽的增殖情况。不同基本培养基对丛芽增殖的影响结果见表 1。

表 1 不同基本培养基对丛芽增殖的影响

培养基	重复			平均增殖倍数	丛芽的生长状况
	I	II	III		
MS	4.5	4.3	4.6	4.46a	长势良好、芽体健壮
H	3.0	2.7	2.8	2.83b	长势一般、芽体健壮
KC	2.5	2.2	2.0	2.23c	长势稍弱、芽体纤细

注: $F=109.3>F_{0.05}=5.14$,不同小写字母为差异显著,相同字母为差异不显著,丛芽的生长状况是重复 II 的观察结果(表 2~5 相同)

由表 1 可以看出,3 种基本培养基之间的差异均达到显著水准,其中以 MS 为基本培养基的处理效果最好,其丛芽平均增殖倍数为 4.46,丛芽长势良好、芽体健壮;其次是 H 基本培养基的处理,平均增殖倍数为 2.83,长势一般、芽体健壮;KC 基本培养基的处理效果最差,平均增殖倍数为 2.23,丛芽的长势均不比以 MS 和 H 基本培养基处理的好。因此,笔者选择 MS 为基本培养基是正确的。

2.2.2 不同种类细胞分裂素对丛芽诱导的影响 为了筛选出较适宜地涌金莲增殖的细胞分裂素,以 MS 为基本培养基,以质量浓度均为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ZT,6-BA,KT 3 种细胞分裂素进行比较试验,接种 25 d 后的观察结果见表 2。

表 2 不同种类细胞分裂素对诱导丛芽的影响

细胞分裂素	重复			平均增殖倍数	丛芽的生长状况
	I	II	III		
ZT	4.4	4.5	4.7	4.53a	长势良好、芽体健壮
6-BA	4.3	4.6	4.3	4.40a	长势良好、芽体健壮
KT	3.2	3.0	2.9	3.03b	长势一般、芽体细

注: $F=80.91>F_{0.05}=5.14$

由表 2 可以看出,ZT 和 6-BA 2 种细胞分裂素的处理结果虽然不同(平均增殖倍数 ZT 为 4.53,6-BA 为 4.40),但差异并不显著,且丛芽的长势差别不大,但它们与 KT 处理都有显著的差异,因此 ZT 和 6-BA 均可作为地涌金莲组织培养的细胞分裂素。由于市场上 ZT 的价格相对较 6-BA 高,在大规模生产试管苗时,从经济上考虑,建议选用 6-BA 较适宜。

2.2.3 不同 6-BA 质量浓度对丛芽增殖的影响 为了筛选出较适宜地涌金莲增殖的 6-BA 质量浓度,笔者以 MS 为基本培养基,设 6-BA 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 7 个质量浓度梯度进行比较实验,25 d 后观察丛芽的增殖情况,并对所得数据进行统计分析,结果见表 3。

表 3 结果表明:6-BA 质量浓度在 0.5~3.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,丛芽的平均增殖倍数随着质量浓度的

升高而升高,但丛芽的生长状况不尽相同。除了 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 差异不显著外,其他处理之间的差异均达到显著水平。从丛芽的生长状况来看, $0.5, 1.0, 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的丛芽色泽淡绿,芽体纤细; $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的丛芽浓绿且健壮; $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的丛芽鲜绿,但较细,有少许芽易断; $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的丛芽淡绿、纤细,而且开始出现玻璃化苗;虽然 $3.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的平均增殖倍数最高,但丛芽玻璃化现象严重(见图版 4)。因此,从平均增殖倍数和丛芽生长情况来看,笔者认为, $6-\text{BA}$ 的质量浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时丛芽的增殖(见图版 5)效果较好。

表 3 不同 6-BA 质量浓度对丛芽增殖的影响

6-BA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	重复			平均增殖倍数	丛芽的生长状况
	I	II	III		
0.5	1.3	1.5	1.5	1.43e	淡绿、纤细
1.0	1.8	1.7	1.8	1.76de	淡绿、较细
1.5	1.7	2.0	1.9	1.86d	淡绿、较细
2.0	4.3	4.1	4.4	4.26c	浓绿、健壮
2.5	4.4	4.2	4.4	4.33c	鲜绿、较细、有少许芽易断
3.0	4.7	4.6	5.0	4.77b	淡绿、纤细、开始出现玻璃化苗
3.5	5.1	5.3	5.6	5.33a	淡绿、纤细、玻璃化苗较多

注: $F=307.64>F_{0.05}=3.00$

2.2.4 添加椰子水(CW)对丛芽继代增殖的影响 椰子水(CW)是一种天然复合有机物,含有丰富的氨基酸、矿物质、维生素和碳水化合物等,这些物质可促进培养物的生长^[8],为此,笔者在增殖培养基中添加 $\varphi=5\%$ 和 $\varphi=10\%$ 的椰子水与不加椰子水为对照进行比较,接种后 25 d 观察丛芽生长情况。

表 4 不同体积分数的 CW 对丛生芽增殖的影响

$\varphi(\text{CW})/\%$	重复			平均增殖倍数	丛芽的生长状况
	I	II	III		
0	4.5	4.4	4.2	4.37b	芽浓绿、正常
5	4.5	4.7	5.0	4.73ab	芽浓绿、正常
10	5.2	5.4	5.8	5.47a	芽浓绿、健壮

注:培养基为 $\text{MS}+6-\text{BA}\ 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $F=15.69>F_{0.05}=5.14$

从表 4 可以看出, $\varphi=5\%$ 的 CW 与其他处理的差异不显著,而 $\varphi=10\%$ 的 CW 显著优越于对照组(不加椰子水)的培养基,芽的生长浓绿、健壮。因此,添加 $\varphi=10\%$ 的 CW 较适合芽的增殖。所以丛芽增殖的较优配方是: $\text{MS}+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 6-\text{BA}+10\%\ \text{CW}$

2.3 生根培养 为了选出较适宜地涌金莲试管苗生根的培养基,笔者以 $1/2\ \text{MS}$ 为基本培养基,附加 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭,设置 $\text{NAA}\ 0, 0.5, 1.0, 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 个质量浓度梯度,当试管苗长出 1~2 片叶时将带叶芽苗剪下转入上述生根培养基,25 d 后观察生根情况,结果见表 5。

表 5 不同质量浓度的 NAA 对试管苗生根的影响

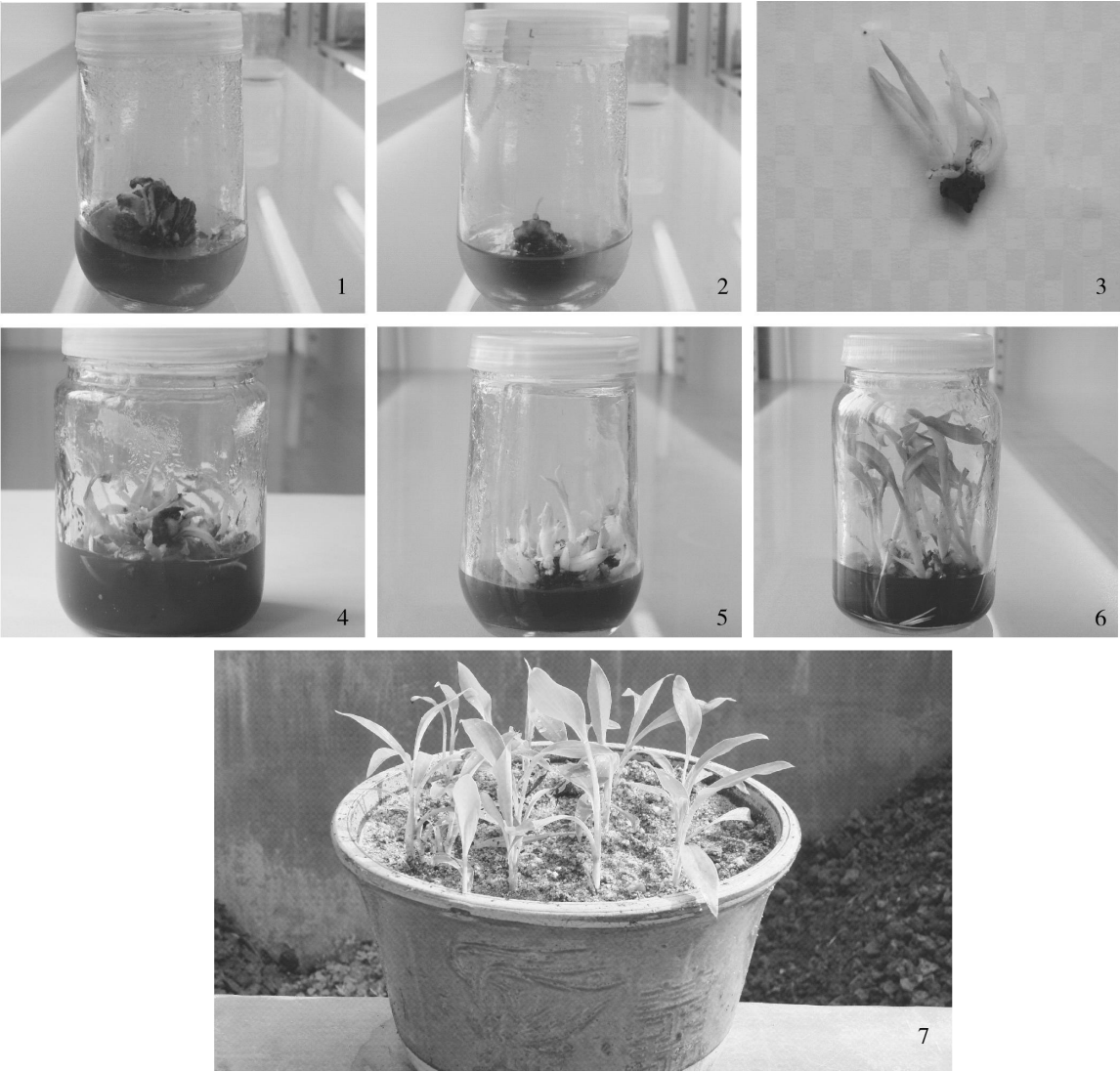
NAA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	平均生根条数/条	平均根长/cm	平均株高/cm	平均生根率/%	备注
0	2.5c	2.87a	4.4d	78.3b	纤细
0.5	2.67b	2.73ab	4.73c	89.2a	粗壮
1	2.93ab	2.57bc	5.03b	93.3a	较粗壮
1.5	3.07a	2.43c	5.97a	96.7a	较粗壮

注: $F_{\text{生根条数}}=26.19, F_{\text{根长}}=9.84, F_{\text{株高}}=108.98, F_{\text{生根率}}=9.90$ 均大于 $F_{0.05}=4.07$

从表 5 中可知,在所试的生根培养基中,试管苗均能生根(见图版 6),但效果不同。随着 NAA 质量浓度的增高,地涌金莲试管苗的生根条数、株高、生根率也随着增加,但平均根长却是减少的。从生根条数

来看,NAA 质量浓度在 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平均生根条数(3.07 条)最多,与 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的平均生根条数(2.57 条)无显著差异,但均显著高于其他 2 个处理。从根长来看,不添加 NAA 的对照处理平均根长最长达 2.87 cm,与 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的(2.73 cm)无显著差异,但与其他 2 个处理均显著差异; $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的平均根长最短只有 2.43 cm。从株高来看, $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的平均株高最高,达 5.97 cm,均显著高于其他处理。从生根率来看,不添加 NAA 的对照处理生根率最差,仅为 78.3%,其他 3 个处理之间无显著差异,其中以 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理效果最好,平均生根率为 96.7%。综合以上分析,认为添加 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAA 有利于促进地涌金莲试管苗的生根。

2.4 试管苗的出瓶移栽 由于组培苗一直生长在相对恒定的最适环境条件下,未经环境锻炼,成苗培养后的生根苗比盆栽苗相对弱小和自身获取养分的能力较差,且植株的抗病能力低,因此,在假植前要进行适当的炼苗,逐渐让生根苗适应外界变化的环境。炼苗前要将试管苗移出培养室,于室温下放置 2~3 d,以提高幼苗的抗性。移栽前要洗净根部附着的培养基,然后移栽于河砂与表土的混合基质中($V_{\text{河砂}}:V_{\text{表土}}=1:1$)。移栽的时候要小心细致,以免伤根。试管苗移栽 30 d 后即可成活(见图版 7),其成活率可达 93.7%(移栽 110 株,成活 103 株),且植株生长良好。



图版说明

- 1. 外植体接入 12 d 左右培养基显蓝褐色;2. 外植体开始萌芽;3. 丛生芽;
- 4. 玻璃化芽;5. 增殖的丛生芽;6. 生根的试管苗;7. 移栽成活的试管苗

3 讨 论

6-BA(6-苄氨基嘌呤)分子式: $C_{12}H_{11}N_5$,是一种细胞分裂素,在培养基中加入6-BA的目的主要是为促进细胞分裂和愈伤组织或器官分化不定芽^[9]。本实验结果表明,2.0 mg·L⁻¹的6-BA促进地涌金莲丛芽增殖效果最好,增殖的丛生芽浓绿、健壮;2.5 mg·L⁻¹的6-BA增殖的丛生芽鲜绿,但较细,有少许芽易断;3.0 mg·L⁻¹的6-BA增殖的丛生芽淡绿、纤细,且开始出现玻璃化苗;3.5 mg·L⁻¹的6-BA处理的平均增殖倍数最高,但丛生芽玻璃化现象严重。本实验结果与曾宋君等人^[5](最佳质量浓度为4.0 mg·L⁻¹)和关文灵等人^[7](最佳质量浓度为3.0 mg·L⁻¹)得出的结果有差异,这可能与选用的地涌金莲的遗传差异或实验用的6-BA质量有关,具体原因有待于进一步研究。

褐化(browning)是指外植体在诱导初分化或再分化过程中,自身组织从表面向培养基释放褐色物质以至培养基逐渐变成褐色,外植体也随之进一步变褐而死亡的现象^[10]。目前认为植物组织培养中的褐化现象主要是由酶促褐化引起的,培养材料变褐主要是由伤口处分泌的酚类化合物引起的。在受体材料组织培养过程中,由于组织中多酚氧化酶被激活,使细胞中的代谢发生变化,酚类物质被氧化成棕褐色的醌类物质,并且会逐渐扩展到培养基中,抑制其他酶活性,毒害整个外植体^[11],因此,褐化是外植体诱导脱分化及再生芽的重大障碍。一般可通过外植体的预处理、选择适宜的培养基和培养条件、添加防褐剂等方法来解决组织培养中褐化现象的难题^[12-13]。张树河等人发现,地涌金莲吸芽在诱导与增殖过程中有较为严重的褐变现象,且春夏比秋冬严重,添加少量活性炭,可明显抑制褐变,从而提高诱导率和分化率^[6]。在本实验中,也出现了褐化现象,在增殖培养过程中培养基显蓝褐色,但只要在25 d内及时转瓶,褐化物质就不会对地涌金莲丛生芽的增殖产生不良影响;如果培养时间超过30 d,芽苗就开始显现失水干枯;当培养时间超过50 d时,芽苗出现坏死,因此认为,及时转瓶是减少地涌金莲芽苗褐化坏死的有效措施。

参考文献:

- [1] 冯国楣. 中国珍稀野生花卉[M]. 北京:中国林业出版社,1995:102.
- [2] 龙雅宜. 常见园林植物认知手册[M]. 北京:中国林业出版社,2006:59.
- [3] 柏斌. 云南特产的野生花卉——地涌金莲[J]. 农村实用技术,2005,7(2):29.
- [4] 中国科学院植物研究院. 中国高等植物图鉴,第5册[M]. 北京:科学出版社,1976:582.
- [5] 曾宋君,吴坤林,陈之林,等. 珍稀药用和观赏植物地涌金莲的组织培养和快速繁殖[J]. 热带亚热带物学报,2007,15(1):55-62.
- [6] 张树河,林江波,甘勇辉,等. 地涌金莲的组培快繁技术研究[J]. 亚热带植物科学,2004,33(4):35-36.
- [7] 关文灵. 地涌金莲吸芽的离体培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2002,38(4):358.
- [8] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1995:9-59.
- [9] 李浚明. 植物组培教程[M]. 第2版. 北京:中国农业大学出版社,2002:26.
- [10] 翟晓巧. 木本植物组织培养褐化控制策略[J]. 河南林业科技,2008(1):38-40.
- [11] 李胜,李唯. 植物组织培养原理与技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007:240-245.
- [12] 周俊辉,周家容,曾浩森,等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报,2000,27(增刊):481-486.
- [13] 徐振彪,傅作申,原亚萍,等. 植物组织培养过程中的褐化现象[J]. 国外农学:杂粮作物,1997(1):55-56.

Study on Rapid Propagation of *Musella lasiocarpa*

PAN Xue-feng, ZHAO Qiang

(College of Agricultural, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The suckers were used as explants to perform the rapid propagation of *Musella lasiocarpa*. The ideal medium prescription for some key procedures, such as the establishment of sterile materials, the proliferation of clustered buds and the rooting, were developed. According to the routine methods of plant tissue culture, the experiments were operated and SAS software was used to analysis the data. The results showed that after the suckers were longitudinally cut and cultured on the medium (MS + 2.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 30 g · L⁻¹ sugar) for 20 days, the young adventitious buds continuously appeared; the best proliferation effects could be obtained by transplanting the young buds onto the medium (MS + 2.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 30 g · L⁻¹ sugar + 10% CW) for multiplication culture, on which the young shoots with deep green color grow normally, and with a proliferation coefficient of 5.47; when the concentration of 6-BA was higher than 2.5 mg · L⁻¹, the young shoots showed a dehydrated-like growth phase, and the malformed and vitrified shoots increased; the optimum rooting effects could be obtained by transplanting the young shoot onto the medium (1/2MS + 1.5 mg · L⁻¹ NAA + 2.5 mg · L⁻¹ active carbon), on which the average root number of single plant was 3.07, the average root length was 2.43 cm, and the average rooting percentage was 96.7%. Additionally, when the vessel plantlets of *Musella lasiocarpa* were transplanted in the mixed substrate (river sand: surface soil = 1:1), the survival percentage of the young plantlets amounted to 93.7% and it grew very well.

Key words: *Musella lasiocarpa*; sucker; rapid propagation