

版纳省藤的组织培养

谷勇^{1*}, 陈芳², 吴昊¹

¹ 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 昆明 650224; ² 云南省林业科学院, 昆明 650204

摘要: 以版纳省藤的萌蘖芽为试材, 从取材、材料的处理、外植体的诱导分化、芽的增殖、生根以及影响试管苗形成几个重要因素等方面探讨了版纳省藤组织培养和快速繁殖的技术和方法, 获得了生长素与细胞分裂素对芽的诱导分化及芽的增殖最佳配比浓度。以改良MS为基本培养基, 在增殖培养基中添加 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA、 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, 产生的有效苗最多; 在生根培养基中添加 $1.5\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA生长素有利于版纳省藤组培苗生根。

关键词: 版纳省藤; 组织培养; 快速繁殖

Tissue Culture of *Calamus nambariensis* Becc. var. *xishuangbannaensis* S. J. Pei et S. Y. Chen

GU Yong^{1*}, CHEN Fang², WU Hao¹

¹Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China; ²Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China

Abstract: The techniques and measures of tissue culture and rapid propagation of *Calamus nambariensis* Becc. var. *xishuangbannaensis* S. J. Pei et S. Y. Chen were carried out from some aspects, including sample preparation, explant differentiation, bud propagation, root generation and factors affecting test-tube plantlet formation. The results have been showed that the optimum medium for inducing bud differentiation is improved MS medium plus $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT and $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, while adding $1.5\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA to the medium is favorable to root.

Key words: *Calamus nambariensis* Becc. var. *xishuangbannaensis* S. J. Pei et S. Y. Chen; tissue culture; rapid propagation

版纳省藤为棕榈科(Palmae)省藤属的中径藤, 主产于云南省西双版纳; 其藤径质地良好, 适合编织各种藤质品, 它是热带和亚热带森林中的多用途植物资源, 是仅次于木材和竹材的重要非木材林产品, 且为云南特有种(王慷林等 2002)。近年来因其经济价值较高, 价格年年上涨, 导致野生资源长期过度采收, 天然资源遭到严重破坏(江泽慧 2002)。版纳省藤种子坚硬, 实生苗发芽不整齐, 因此开展版纳省藤的组织培养研究, 为保护天然林, 发展绿色产业, 增加产藤区群众的收入, 推广种植栽培棕榈藤, 解决优良种源及大面积栽培种苗需求提供技术基础。

材料与amp;方法

1 实验材料和基本培养条件

采自云南省西双版纳勐海县版纳省藤(*Calamus nambariensis* Becc. var. *xishuangbannaensis* S. J. Pei

et S. Y. Chen)的萌蘖芽作为试验材料, 经自来水冲洗干净后, 在超净工作台上进行消毒处理。处理后用无菌水冲洗4~5次, 用剪刀剪去多余的叶片, 用无菌水冲洗1次, 最后用消毒滤纸吸干表面水分, 切成 $1.5\sim 2.0\text{ cm}$ 长的单芽茎段, 先接种于无生长素的MS培养基上初代培养(图1-A), 15~20 d后把获得的茎尖材料接种到诱导培养基中诱导芽苗形成; 将形成的无菌芽苗继代增殖扩繁然后再诱导生根再生完整植株。培养室温度为 $20\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $54\sim 90\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照时间为 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

2 适宜消毒条件的筛选

设计2组消毒试验。第1组选择适合的消毒

收稿 2010-08-05 修订 2010-09-06

资助 “十一五” 国家科技支撑项目(2006BAD19B09)。

* 通讯作者(E-mail: caguyong@163.com; Tel: 0871-3860627)。

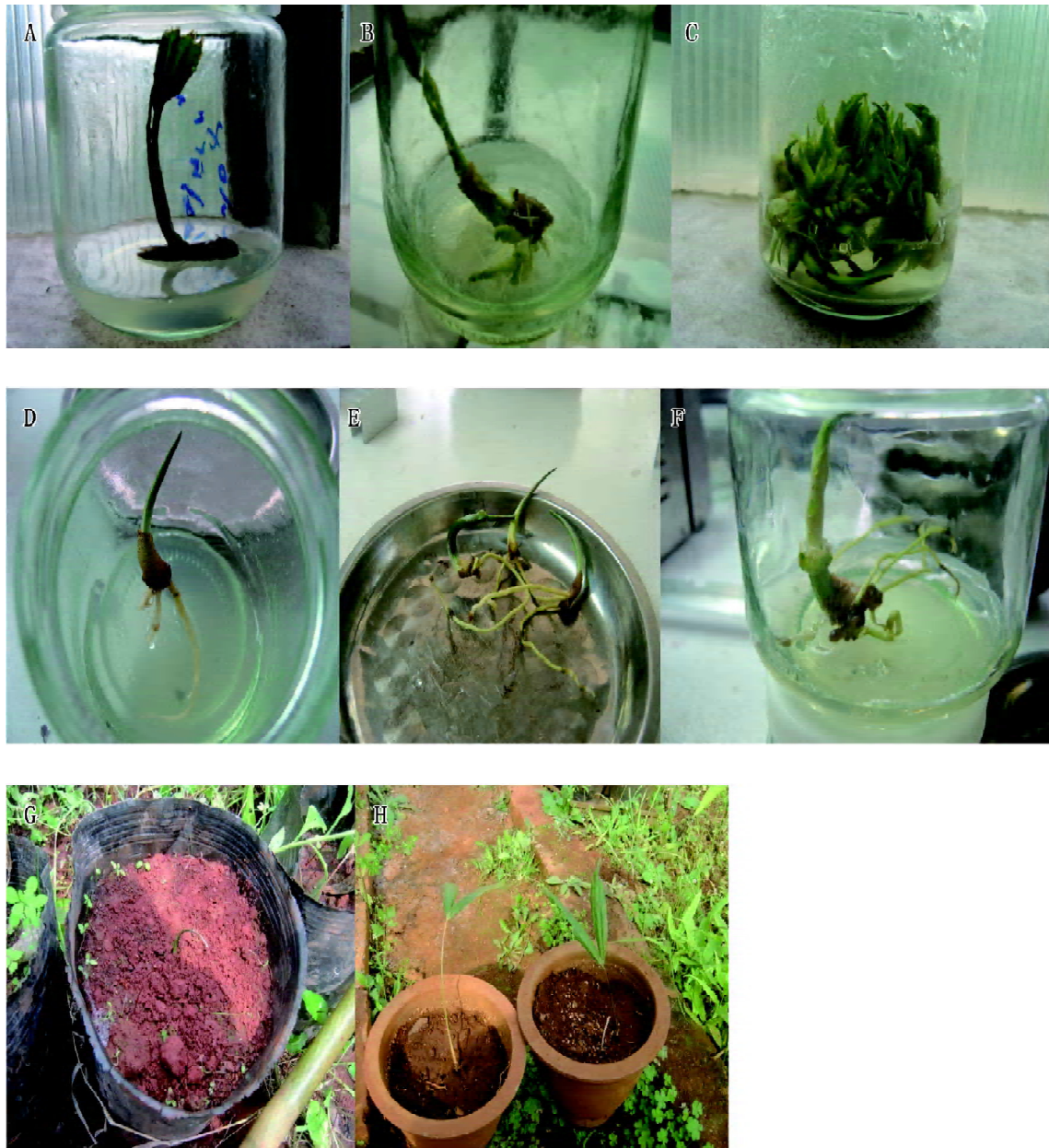


图1 版纳省藤的组织培养

Fig.1 Tissue culture of *Calamus nambariensis* Becc. var. *xishuangbannaensis* S. J. Pei et S. Y. Chen

A: 消毒处理接种好的外植体; B: 芽开始分化; C: 形成丛生芽; D、E: 第1种生根处理方式每苗仅发1~3条根, 生根率一般在30%; F: 第2种生根处理方式每苗生4~5条根, 生根率达53.3%; G: 刚移栽的试管苗; H: 移栽成活的试管苗。

剂种类, 消毒剂的种类和消毒时间如下, 0.1% HgCl_2 15 min; 2% 次氯酸钠 30 min; 饱和漂白粉 20 min; 2% H_2O_2 25 min; 0.25% 新洁尔灭 20 min。第2组筛选适宜消毒剂0.1% HgCl_2 的消毒时间, 分别设5、10、15、18和30 min 5个梯度。以上2组实验均于接种后15 d统计污染率及成活率。

3 诱导分化条件的筛选

诱导分化培养基以改良MS为基本培养基(NH_4NO_3 和 KNO_3 为3/2MS, 其余的同MS), 添加30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和0.6%琼脂。选用不同浓度配比的KT、BA和NAA, 进行三水平处理, 采用 $L_9(3^3)$ 正交试验方案进行激素种类及浓度的配比试验(顾万春

1984), 培养基的 pH 值调至 5.6~5.8。

4 增殖条件的筛选

离体培养中细胞分裂素的 2 个突出的效应是诱导离体组织的细胞分裂和脱分化。在进行增殖培养中, 发现不同浓度的细胞分裂素 KT 影响有效苗的增殖, 为此进行了不同 KT 浓度的对比试验。

5 继代培养条件的筛选

5.1 不同光照强度对试管苗生长的影响 在版纳省藤组培试验过程中, 发现光照强度对试管苗生长影响极大, 为此在人工培养箱中进行了 18、72 和 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 三组光照强度培养试管苗的试验, 每组取 50 瓶, 重复 2 次。

5.2 不同浓度间苯三酚对黄苗期的延缓效果 在继代培养中, 若 25 d 左右不及时转移到新鲜培养基中, 试管苗会发黄, 影响生长。据此, 在调整培养基硝态氮和铵态氮的比例, 增加铁盐的基础上, 添加不同浓度的间苯三酚, 研究其延缓试管苗黄化现象的作用。

6 生根培养条件的筛选

对生根培养基分别进行不同浓度配比的 IBA 和 NAA 以及不同无机盐浓度和不同蔗糖浓度的筛选, 实验培养基的 pH 值调至 5.8, 按常规方法消毒灭菌。为了提高版纳省藤生根率, 在上述实验基础

上, 进行以下 3 组不同生根处理方式的试验: (1) 1/4MS 无机盐 + 铁盐 + 1.5~2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA; (2) 1/4MS 无机盐 + 铁盐 + 120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, 培养 5 d 之后转移至不加激素的 1/2MS 中继续培养; (3) 120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 浸泡 15 min, 转移至不加激素的 1/2MS 中。

实验结果

1 消毒条件的选择

对不同消毒剂的消毒效果进行了比较, 如表 1 所示, 0.1% HgCl_2 具有较好的消毒效果, 消毒成功率达 80%; 饱和漂白粉、2% H_2O_2 、2% 次氯酸钠、0.25% 新洁尔灭消毒效果均不理想, 消毒不彻底, 污染率高。由表 2 可知: 使用 0.1% HgCl_2 消毒 18 min 效果最好, 低于 15 min 的处理污染率较高; 高于 18 min 的处理污染率虽降低, 但死亡率明显上升。因此, 较好的消毒剂为 0.1% HgCl_2 , 适宜时间为 18~20 min。

2 芽的分化与增殖

2.1 生长调节物质对芽分化的影响 由试验结果(表 3)得出: 增殖培养基 $\text{MS}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 产生的有效苗最多, 而 $\text{MS}+2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA (因素 3)

表 1 不同消毒剂的消毒效果比较

Table 1 Comparison of different sterilizing treatments

消毒处理	接种数	污染数	成活数	污染率/%	成功率/%
0.1% HgCl_2 15 min	50	10	40	20	80
2% 次氯酸钠 30 min	50	25	25	50	50
饱和漂白粉 20 min	50	35	15	70	30
2% H_2O_2 25 min	50	40	10	80	20
0.25% 新洁尔灭 20 min	50	38	12	76	24

表 2 0.1% HgCl_2 不同消毒时间的消毒效果比较

Table 2 Comparison of different sterilizing periods of 0.1% HgCl_2

消毒时间/min	接种数	污染数	死亡数	成活数	污染率/%	死亡率/%	成功率/%
5	50	50	0	0	100	0	0
10	50	30	3	17	60	6	32
15	50	5	3	42	10	6	84
18	50	2	5	43	4	10	86
30	50	1	35	23	2	70	46

和 MS+2.0 mg·L⁻¹ KT+0.1 mg·L⁻¹ BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA (因素7)两种组合对有效苗的产生有明显的抑制作用。KT 和 NAA 浓度的变化幅度较窄, 0.5~1.5 mg·L⁻¹ 基本适宜试管苗的健壮生长。

从极值R的大小及趋势, 可以大致找出对茎尖分化因素的主次关系。比较好的组合 0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+0.1 mg·L⁻¹ BA。

2.2 不同KT浓度对芽增殖的影响 结果(表4)表明: 芽增殖对KT浓度极为敏感, 在浓度为0.4~0.5 mg·L⁻¹条件下, 能促使产生丛生芽(图1-B); 当KT的浓度低于0.4 mg·L⁻¹时, 顶芽伸长, 腋芽萌发减少, 不产生丛生芽。当浓度高于0.5 mg·L⁻¹时, 顶芽生长受到抑制, 腋芽大量萌发, 但不能伸长形成正常芽, 幼芽矮小, 叶片细窄卷曲, 若及时转换到低浓度的培养基中, 幼芽将会伸长, 形成大量有效苗(图1-C),

用于生根培养。

3 试管苗的培养

3.1 不同光照强度对试管苗生长的影响 试管绿苗在 18、72 和 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 不同光照强度下进行培养试验(表5), 发现第1次得到的有效苗, 无论是数量或高度都以中强度 72 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下培养的最好, 低光强 18 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 其次, 高光强 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 最差。第2次(相距3周)仍以中光强最好, 再次是低光强, 高光强最差。而从以后绿苗生根的情况来看, 则低光强处理的较好。这可能是因为版纳省藤是阴性树种, 高光照强度影响了植物体内生长素的合成, 而低光照强度有利于体内生长素的合成, 其内源生长素含量较高, 有利于生根。

3.2 不同浓度间苯三酚的黄苗期延缓效果 试验结果(表6)表明: 在继代培养基中添加间苯三酚, 在

表3 生长调节物质 L₉(3³)正交试验结果

Table 3 Result of L₉(3³) perpendicular trial of different growth regulators

因素	生长调节物质 /mg·L ⁻¹			出苗率 /%				继代一次后有效苗 / 苗·瓶 ⁻¹			
	NAA	KT	BA	I	II	III	平均	I	II	III	总数
1	0.5	0.5	0.1	92	89	90	90.3	5	3	5	13
2	0.5	1.0	1.0	85	83	87	85	4	2	4	10
3	0.5	2.0	4.0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1.0	1.0	0.1	91	81	89	87	5	1	5	11
5	1.0	2.0	1.0	62	60	53	58.3	1	1	1	3
6	1.0	0.5	4.0	58	71	0	43	1	4	0	5
7	1.5	2.0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1.5	0.5	1.0	63	71	68	67.3	1	2	2	5
9	1.5	1.0	4.0	56	68	50	58	1	2	1	4
T ₁	23	23	24					18	15	18	51
T ₂	19	25	18								
T ₃	9	3	9								
R	14	22	15								

试验共重复3次, 每次30瓶, 每瓶4个芽。有效苗指继代后新增殖的幼苗苗高2 cm以上, 生长健壮, 可以用来生根的绿苗, 表5同。出苗率以达到以上标准的出苗瓶数除以30瓶进行计算。

表4 不同KT浓度对芽增殖的影响

Table 4 Effect of different KT concentrations on bud proliferation

浓度 /mg·L ⁻¹	接种数	增殖倍数	分化效果
0.2	30	—	不产生丛生芽
0.3	30	0~2.1	萌发减少, 产生丛生芽少
0.4~0.5	30	3.3~5.1	能促使产生丛生芽, 叶芽正常
0.6	30	6.7~7.5	顶芽生长受到抑制, 腋芽大量萌发, 但不能伸长形成正常腋生枝, 幼芽矮小, 叶片细窄卷曲

表5 光照强度对试管苗生长的影响
Table 5 Effects of illumination intensity on tube plantlet growth

处理批次	光照强度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	有效苗 / 株·瓶 ⁻¹	苗高 / cm
第1次	18	5	1
	72	6	1.5
	180	3	1
第2次	18	7	2.5
	72	10	3
	180	5	2

表6 不同浓度间苯三酚对版纳省藤试管苗发黄的影响

Table 6 Effects of different phloroglucinol concentrations on yellowing tube plantlet

间苯三酚浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	出现发黄时间 / d
0	20
50	25
100	28
150	40
200	22

每一组取20瓶进行观察, 重复2次。

0~150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度梯度范围内, 随间苯三酚的浓度的增加, 试管苗黄化的时间逐渐延迟, 其中以浓度达150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时延缓的效果为好, 浓度增加到200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 则与对照不加间苯三酚的效果类似。

4 生根培养

4.1 不同浓度的NAA与IBA生根效果 结果(表7)表明, 生根培养基中附加1.5~2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA有利于版纳省藤组培苗生根。

4.2 不同无机盐浓度的生根率 以MS无机盐, 1/2MS无机盐, 1/2MS无机盐+铁盐, 1/4MS无机盐+铁盐作不同无机盐浓度组合促进组培苗的生根试验。从表8得出: 随着无机盐浓度的减低, 有助于组培苗根系的形成, 促进幼苗健壮生长, 若加铁盐的则效果更好。

4.3 不同蔗糖浓度的生根率 试验表明培养基中蔗糖浓度对组培苗生根率也有一定的影响。蔗糖量过高抑制试管苗生根, 过低试管苗细长、发黄, 生根率也不高。参试的4种蔗糖浓度以15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 较好(表9)。

表7 不同生长素及浓度对生根的影响

Table 7 Effects of different auxins and their concentrations on rooting

生长素	浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数 / 株	生根数 / 株	生根率 / %
NAA	0.5	30	2	6.6
	1	30	4	13.3
	1.5	30	6	20
	2	30	1	3.3
	2.5	30	0	0
IBA	0.5	30	2	6.6
	1	30	5	16.7
	1.5	30	7	23.6
	2	30	11	36.6
	2.5	30	4	13.3

基本培养基为1/4MS。

表8 不同无机盐浓度对生根的影响

Table 8 Effects of different salt concentrations on rooting

培养基	接种数 / 株	生根数 / 株	生根率 / %
MS无机盐	30	1	3.3
1/2MS无机盐	30	4	13.3
1/2MS无机盐+铁盐	30	7	23.3
1/4MS无机盐+铁盐	30	11	36.6

IBA浓度为2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 铁盐浓度为MS全量, 表9同。

表9 蔗糖量对试管苗生根的影响

Table 9 Effects of sucrose contents on rooting

蔗糖量 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数 / 株	生根数 / 株	生根率 / %
5	30	3	10.0
10	30	7	23.3
15	30	11	36.6
20	30	5	16.6

培养基为1/4MS无机盐+铁盐。

4.4 不同生根处理方式的效果 从表10可以得出: 第1种处理方式单株仅发1~3条根(图1-D、E), 生根率一般在30%, 第2种处理方式单株生根4~5条(图1-F), 生根率达53.3%左右; 第3种处理方式单株生根6~7条, 基部易形成愈伤组织, 移栽不易成活。

5 幼苗移栽

幼苗在生根培养基中培养20~35 d, 根长0.2~1

表10 不同生根方式生根效果

Table 10 Effects of different treatments on rooting

生根处理	接种数	生根数/株	生根率/%
1	30	1~3	30.0
2	30	4~5	53.3
3	30	6~7	24.6

cm, 用自来水洗净苗上的培养基, 移栽在花盆或营养袋中, 基质采用2份生土:1份细沙。移栽前3~4 d加强光照, 使小苗木木质化, 以适应移栽后的环境; 移栽后在苗木上方设置小拱棚, 上面罩上塑料薄膜, 栽后7 d之内棚内相对湿度保持在90%, 然后可逐渐降低湿度, 30 d后小苗长出新根和新叶(图1-G)。1个月后可逐渐把盆栽或袋苗移至阳光下, 促其生长(图1-H)。存活率一般达到76.2%。

讨 论

自Umali-Gricia (1985)首次报道了省藤属11个种和黄藤属2个种组织培养的初步试验结果后, 90年代棕榈藤组培技术获得重大突破, 我国庄承纪和周建葵(1991)首先报道了云南省藤(*Calamus yunnanensis*)和倒卵果省藤(*Calamus obovoideus*)的植株再生, 曾炳山等先后成功地培育出短叶省藤(*Calamus egregius* Burret, 曾炳山1997)、长嘴黄藤[*Daemonorops jenkinsiana* (Griff) Mart, 曾炳山等2002]、杖藤(*Calamus rhabdocladus* Burret, 曾炳山等2003)等藤种, 但版纳省藤组培目前尚未见报道。本研究采用芽器官离体培养繁殖, 以芽繁芽, 芽器官未经过愈伤组织阶段, 有利于保持各品种遗传性

状的稳定, 这满足了对经济林植物种苗的要求。版纳省藤丛芽增殖以添加KT的效果为好, 在继代培养中须注意浓度的使用; 增殖培养基以改良MS为基础, 添加0.5 mg·L⁻¹ NAA、0.5 mg·L⁻¹ KT和0.1 mg·L⁻¹ BA, 产生的有效苗最多; 生根培养基以改良MS添加1.5~2.0 mg·L⁻¹ IBA有利于组培苗生根。生根方式不同将得到不同的结果, 在1/4MS无机盐+铁盐+120 mg·L⁻¹ IBA, 培养5 d之后转移至不加激素的1/2MS中继续培养的生根方式较好。组培实验表明, 版纳省藤的增殖与生根受许多因素制约, 除培养基无机盐浓度、生长素的种类及浓度、蔗糖含量、光照强度外, 还受取材母株年龄、季节等因素的影响。在继代培养25 d左右, 组培苗出现黄化现象, 虽加间苯三酚黄苗出现时间推迟, 但目前还无法抑制黄化现象的发生, 需及时继代培养, 黄苗发生的原因有待进一步研究。

参考文献

- 顾万春(1984). 林业试验统计. 浙江: 浙江省林业科学研究所
江泽慧(2002). 世界竹藤. 沈阳: 辽宁科学出版社
王慷林, 普迎冬, 许建初(2002). 云南棕榈藤资源及发展策略. 自然资源学报, 17 (4): 499~503
庄承纪, 周建葵(1991). 省藤组织培养的植株再生. 云南植物研究, 13 (1): 97~100
曾炳山(1997). 短叶省藤离体快繁研究. 中南林学院学报, 17 (4): 37~43
曾炳山, 刘英, 许煌灿, 尹光天(2002). 长嘴黄藤离体快繁研究. 福建林学院学报, 22 (2): 169~171
曾炳山, 刘英, 许煌灿, 尹光天(2003). 6-BA、IBA、2,4-D对杖藤组培增殖的影响. 广西植物, 23 (1): 49~51
Umali-Garcia M (1985). Tissue culture of some rattan species. In: Wong KM, Manokaran N (eds). Proceedings of Rattan Seminar. Malaysia: RIC, FRIM, 23~31