

火焰树的组织培养与快速繁殖

蔡月琴*, 陆銮眉, 黄志丹, 庄培玉, 柯美玉, 王艳平

闽南师范大学生物科学与技术学院, 福建漳州363000

摘要: 以火焰树种子为外植体, 研究不同培养基对种子萌发、茎段增殖和生根培养的影响。结果表明, 火焰树种子经预处理后, 用70%酒精消毒30 s, 再经2% NaClO浸泡15 min的灭菌效果较好, 污染率为16.7%; 种子萌发最适培养基为MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+GA₃ 0.1 mg·L⁻¹, 萌发率达89.1%; 较合适的茎段继代增殖培养基为WPM+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+活性炭(AC) 0.5 g·L⁻¹; 最适的生根培养基为WPM+NAA 0.2 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹+AC 1 g·L⁻¹, 生根率达96.7%, 每株平均生根数为6.8条。

关键词: 火焰树; 种子; 组织培养; 快速繁殖

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Spathodea campanulata*

CAI Yue-Qin*, LU Luan-Mei, HUANG Zhi-Dan, ZHUANG Pei-Yu, KE Mei-Yu, WANG Yan-Ping

School of Biological Science and Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China

Abstract: Using *Spathodea campanulata* seeds as explants, the effects of different culture mediums on seed germination, bud multiplication and rooting were studied. The results showed that the best sterilization method for *S. campanulata* seeds was to soak them into 70% alcohol for 30 s and 2% NaClO for 15 min after pretreatment, with the contamination rate of 16.7%; the best medium for seed germination was MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+GA₃ 0.1 mg·L⁻¹, and the germination rate was up to 89.1%; the suitable medium for bud subculture and proliferation was WPM+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+activated carbon (AC) 0.5 g·L⁻¹; the optimal rooting medium was WPM+NAA 0.2 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹+AC 1.0 g·L⁻¹, on which the rooting rate reached 96.7% and the average number of roots was 6.8.

Key words: *Spathodea campanulata*; seeds; tissue culture; rapid propagation

火焰树别名喷泉树、火烧花, 为紫葳科火焰树属常绿高大乔木, 原产热带非洲, 现于东南亚、夏威夷等地广泛栽培, 我国广东、福建、台湾、云南(西双版纳)均有引种栽培(中科院中国植物志编委会1990)。树姿优美, 花期长, 开花时花多且密集, 花大, 花色猩红, 形如火焰, 开于树冠之上, 有极高的观赏价值, 为优良的庭园观赏树与行道树种(黄建通等2013)。火焰树含有丰富的营养成分和药理成分, 具有抗菌消炎、镇惊止痛、抗氧化、降血糖等功效(杨艳等2013)。火焰树常规的繁殖方法主要采用播种、扦插等方法。但在我国引种栽培地区, 由于积温不够, 火焰树只开花, 很少结实(黄少华1998), 且一般情况下, 种子发芽率也不高(张桂莲等2006), 而扦插繁殖易受季节和穗条质量、来源的影响, 不利于火焰树的繁殖与推广应用。利用组织培养技术对紫葳科植物进行离体快繁已有一些报道, 如阳莉等(2012)以蓝花楹胚

轴为外植体进行组培快繁体系研究, 获得了大量再生植株; 韩创举等(2006)以楸树腋芽为外植体进行组培快繁试验, 认为以N₆+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.0016 mg·L⁻¹为最适增殖培养基, 当NAA浓度在0.0025~0.01 mg·L⁻¹时, 随着浓度的增大, 芽增殖数降低, 甚至不增殖; 刘小云(2010)以圆基长果楸的茎段为外植体, 研究外源添加物对丛生芽增殖的影响, 结果表明添加0.2 mg·L⁻¹多效唑最有利于圆基长果楸丛生芽的增殖。目前, 有关火焰树组培快繁的研究尚未见报道。本试验以火焰树种子为外植体, 建立火焰树组培快繁体系, 以期火焰树工厂化生产育苗与品种改良提供理论基础和实践依据。

收稿 2015-04-08 修定 2015-04-29

资助 闽南师范大学园林植物生长发育与生态配置创新团队(139004)。

* 通讯作者(E-mail: 121016113@qq.com; Tel: 13960164359)。

材料与方法

1 材料

火焰树(*Spathodea campanulata* Beauv.)种子于2013年8月采自闽南师范大学校园内行道树上。

2 方法

2.1 外植体处理

用高枝剪剪取火焰树上呈褐色成熟未完全裂开的蒴果,放入保鲜袋中带回实验室。用70%酒精棉球擦拭果实表面,剥开果皮,挑选籽粒饱满、大小一致、无畸形的种子作为外植体,用干净纱布包裹于40~50℃蒸馏水中浸泡30 min后转置超净工作台上,用70%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗2次,再用2% NaClO消毒5、10、15或20 min,无菌水冲洗5次,用无菌滤纸吸干表面水分,接种于含蔗糖20 g·L⁻¹、琼脂6 g·L⁻¹的MS培养基(pH 5.8)上。比较2% NaClO不同消毒时间的灭菌效果,7 d后观察污染情况,14 d后统计污染率和发芽率。污染率=(污染数/接种数)×100%;发芽率=[无污染发芽数/(接种数-污染数)]×100%。

2.2 种子萌发培养基的筛选

采用二因素三水平的正交试验设计,以MS为基本培养基,分别添加6-BA (1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹)、GA₃ (0、0.1、0.5 mg·L⁻¹)、蔗糖20 g·L⁻¹、琼脂6 g·L⁻¹, pH 5.8,以筛选火焰树种子萌发的最佳培养基。每瓶接种3个种子,每个处理接种10瓶,重复3次。将经灭菌处理的种子接种于上述培养基上,观察种子萌发生长情况,14 d后统计发芽率。24 d后转到MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹培养基上继续培养。

2.3 继代增殖培养

将获得的高约为5 cm的无菌苗切成带一节的茎段和带顶芽茎段,接种于以MS、1/2MS、WPM为基本培养基,分别添加6-BA (0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹)、NAA (0.1、0.2、0.5 mg·L⁻¹)、活性炭(activated carbon, AC) 0.5 g·L⁻¹、蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂7 g·L⁻¹ (pH 5.8)的继代增殖培养基上,采用三因素三水平的L₉(3⁴)正交试验设计。每个处理接种12个茎段(8个带节茎段和4个带顶芽茎段),重复3次。30 d后观察生长情况并统计芽苗增殖数,增殖数为增殖母体以外苗高不低于0.5 cm的有效芽苗数。

2.4 生根培养

选择继代培养中生长健壮、长势一致的无菌苗,切取高为2 cm左右带顶芽的茎段,转接于以WPM为基本培养基,附加NAA (0.2、0.5 mg·L⁻¹)、IBA (0.2、0.5 mg·L⁻¹)、AC 1 g·L⁻¹、蔗糖20 g·L⁻¹、琼脂6 g·L⁻¹ (pH 5.8)的生根培养基上。每瓶接种1个茎段,每个处理10瓶,重复3次。25 d后统计生根率和生根数,观察芽苗生长情况。

2.5 培养条件

以上培养条件均为:光照强度36 μmol·m⁻²·s⁻¹,光照时间14 h·d⁻¹,温度为(25±2)℃。

2.6 数据分析

采用Microsoft Excel 2003和DPS数据分析系统对试验数据进行处理与统计分析。

实验结果

1 外植体灭菌效果

从表1可以看出,随着2% NaClO消毒时间的延长,外植体污染率下降,当消毒时间达到20 min时,污染率为10.0%,但发芽率最低,仅为20.4%;当消毒时间为15 min时,污染率为16.7%,但发芽率为60.0%。由此可见,过长的NaClO消毒时间在一定程度上影响火焰树种子的发芽,综合考虑,2% NaClO消毒的适宜时间为15 min。

表1 2% NaClO不同消毒时间对外植体灭菌效果的影响

Table 1 Effects of different sterilizing time on explants sterilization in 2% NaClO

消毒时间/ min	接种数/ 个	污染数/ 个	污染率/ %	发芽数/ 个	发芽率/ %
5	60	45	75.0	7	46.7
10	60	23	38.3	20	54.1
15	60	10	16.7	30	60.0
20	60	6	10.0	11	20.4

2 不同植物生长调节剂对种子萌发的影响

从表2可以看出,火焰树种子在添加不同植物生长调节剂培养基上的发芽率为62.2%~89.1%,比不添加植物生长调节剂的MS培养基上的高。其中以5号培养基(MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+GA₃ 0.1 mg·L⁻¹)对种子萌发效果最好,发芽率最高,达89.1%,发芽时间较早,接种6 d后就萌发;8号培养基次之,发芽

表2 不同植物生长调节剂对火焰树种子发芽的影响
Table 2 Effects of different plant growth regulators on seed germination of *S. campanulata*

培养基编号	植物生长调节浓度/mg·L ⁻¹		发芽率/%	萌发时间/d
	6-BA	GA ₃		
1	1 (1)	0 (1)	62.2 ^{Ec}	11
2	2 (2)	0	71.5 ^{Dd}	10
3	3 (3)	0	63.1 ^{Ec}	10
4	1	0.1 (2)	77.3 ^{BCbc}	7
5	2	0.1	89.1 ^{Aa}	6
6	3	0.1	75.5 ^{CDc}	7
7	1	0.5 (3)	71.4 ^{Dd}	6
8	2	0.5	80.8 ^{Bb}	6
9	3	0.5	71.7 ^{Dd}	7
K ₁	70.3	65.6		
K ₂	80.5	80.7		
K ₃	70.1	74.6		
R	10.4	15.0		

大写字母表示在1%水平差异显著, 小写字母表示在5%水平差异显著。

率为80.8%, 发芽时间也为6 d。根据极差分析结果, 比较二因素各水平求得最优水平组合仍为培养基5号; 由R (GA₃)>R (6-BA)可知, 对火焰树种子发芽率影响的主次为GA₃>6-BA。方差分析结果表明, GA₃和6-BA浓度对火焰树种子发芽率有极显著影响, GA₃各浓度差异达极显著水平, 6-BA浓度2.0 mg·L⁻¹分别与6-BA浓度1.0、3.0 mg·L⁻¹差异极

显著, 且培养基5组合与其他组合差异极显著。综合考虑, 5号培养基为火焰树种子萌发最适宜的培养基, 发芽率高, 萌发时间早, 种子苗发育正常。

种子经消毒处理后接种在含有GA₃的培养基上, 4~5 d后种皮破裂, 子叶逐渐膨大展开, 转绿(图1-A), 6~7 d后种子萌发, 子叶脱离种皮, 同时胚根出现; 12 d后心叶成对长出, 顶芽出现, 胚根长约2 cm, 之后心叶逐渐转绿变大(图1-B、C)。而在仅添加6-BA的培养基上, 种子发芽时间较迟, 10 d后萌发, 18 d后心叶才出现。24 d后将上述已长出心叶的实生苗转到培养基MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹上继续培养20 d, 生长成完整的无菌苗(图1-D)。

3 继代增殖培养

从表3可以看出, 6号培养基(WPM+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹)上芽苗增殖数最高, 为25.7个, 培养效果较好, 腋芽生长健壮, 叶片大, 叶色浓绿(图1-F); 其次是9号培养基, 芽苗增殖数为21.3个。根据极差分析结果, 比较三因素(基本培养基、6-BA、NAA)各水平求得最优水平组合仍为6号培养基; 由R值大小可知, 各因素不同水平对火焰树茎段芽苗增殖数的影响大小为: 基本培养基>6-BA>NAA。方差分析结果表明, 基本培养基、6-BA和NAA浓度对火焰树茎段芽苗增殖数有显著影响, 且6号培养基与其他培养基的差异显著。

表3 不同继代培养基组合对火焰树增殖的影响

Table 3 Effects of different subculture mediums on the proliferation of *S. campanulata*

培养基编号	基本培养基	生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		30 d平均增殖数 ^a /个	生长情况
		6-BA	NAA		
1	WPM (1)	0.5 (1)	0.1 (1)	12.3 ^{de}	芽苗健壮, 叶色绿
2	1/2MS (2)	1.0 (2)	0.1	17.0 ^c	芽苗长势良好, 叶色淡绿
3	MS (3)	1.5 (3)	0.1	10.0 ^{ef}	芽苗小, 叶片少, 长势差
4	1/2MS	0.5	0.2 (2)	14.3 ^{cd}	芽苗叶色淡绿, 后期生长快
5	MS	1.0	0.2	9.3 ^{ef}	芽苗叶片小, 叶色黄绿, 生长缓慢
6	WPM	1.5	0.2	25.7 ^a	芽苗健壮, 叶色浓绿, 叶片大
7	MS	0.5	0.5 (3)	8.0 ^f	芽苗小, 叶黄绿色, 部分变褐死亡
8	WPM	1.0	0.5	15.3 ^{cd}	芽苗健壮, 叶淡绿色
9	1/2MS	1.5	0.5	21.3 ^b	芽苗正常, 少部分腋芽较细长, 叶淡黄绿色
K ₁	17.8	11.6	13.1		
K ₂	17.5	13.9	16.4		
K ₃	9.1	19.0	14.9		
R	8.7	7.4	3.3		

^a各处理接种的12个茎段经30 d培养后增殖的有效芽苗数。小写字母表示在5%水平差异显著。

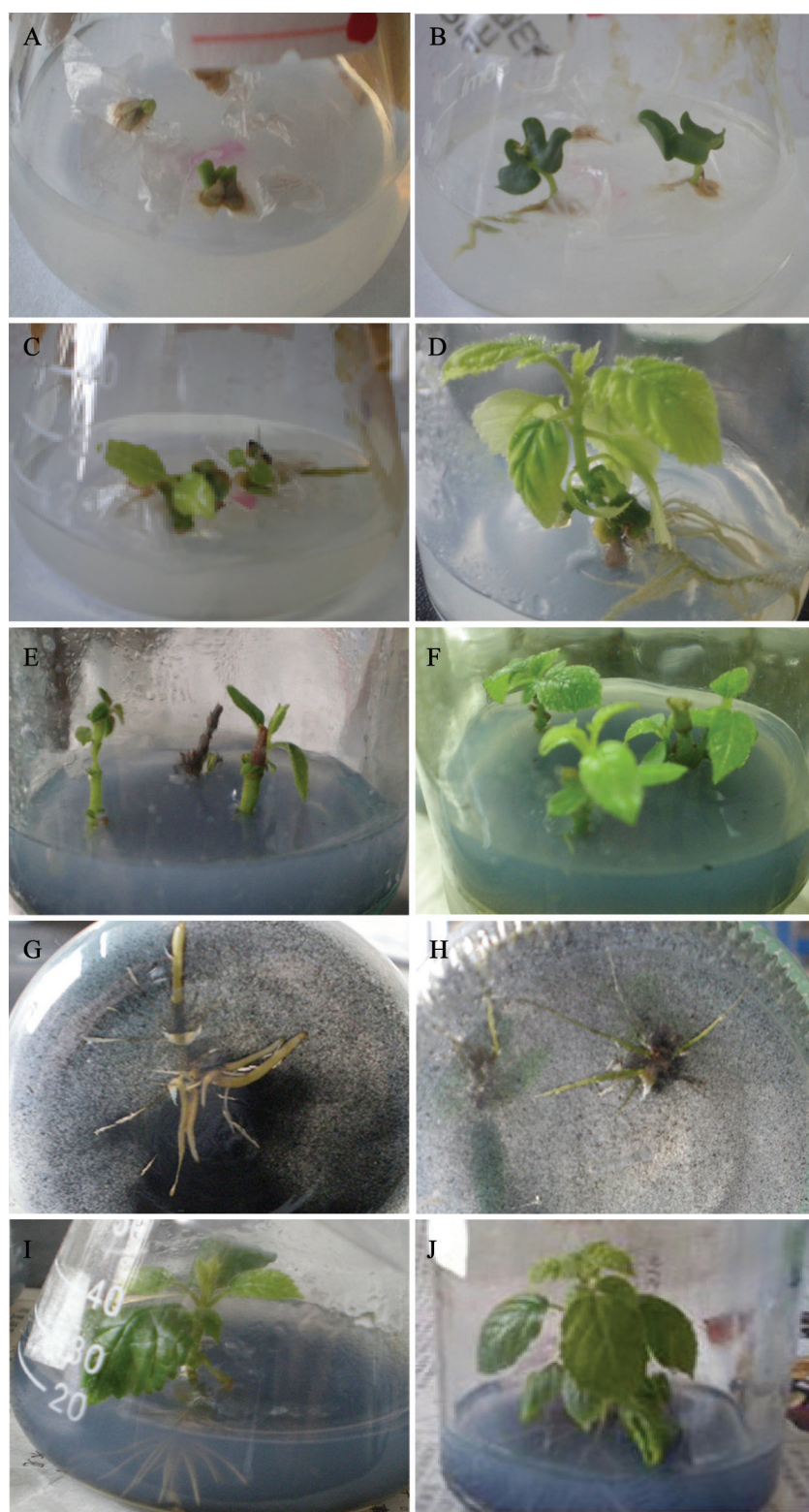


图1 火焰树种子无菌诱导植株再生

Fig.1 Plant regeneration from sterile seed of *S. campanulata*

A: 培养4 d后, 子叶展开变绿; B: 培养7 d后, 种子萌发; C: 培养12 d后, 心叶成对长出; D: 生根种子苗转接后, 继续培养20 d, 长成完整无菌苗; E: 以MS为基本培养基的继代培养基上, 增殖芽苗短小, 长势较差; F: 6号继代培养基上增殖芽苗生长健壮; G: 3~5号生根培养基上瓶苗的生根情况; H: 1~2号生根培养基上瓶苗的生根情况; I、J: 5号生根培养基上生根瓶苗的生长情况。

带顶芽茎段在各培养基上均无新增的芽苗长出, 统计获得的增殖芽苗为带节茎段诱导分化的腋芽苗。采用WPM为基本培养基, 芽苗生长良好, 叶片大, 绿色或淡绿色, 有效芽苗多, 增殖数高; 而以MS为基本培养基, 腋芽苗长势差, 叶片小, 有效芽苗少, 平均芽苗增殖数 ≤ 10.0 个, 有的不生长, 甚至变褐死亡(图1-E)。

4 生根培养

生根培养10 d左右, 茎段基部长出白色根尖。从表4可以看出, 不同浓度NAA和IBA配比对火焰树无菌苗生根率和每株生根数影响显著, NAA和IBA都能诱导生根, 且生根率都在70%以上。在仅添加NAA的培养基上, 生根率较低, 每株生根量较少, 且根系纤细(图1-H); 在添加IBA的3~5号培养基上, 无菌苗根系粗壮, 无须根, 生根率和每株生根数都提高, 其中5号培养基(WPM+NAA 0.2 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹)上的生根诱导效果最好, 生根率和每株生根数最高, 分别为96.7%、6.8条, 植株生长健壮(图1-I、J)。

表4 不同浓度NAA和IBA对火焰树生根培养的影响
Table 4 Effects of different concentrations of NAA and IBA on rooting of *S. campanulata*

培养基编号	NAA浓度/ mg·L ⁻¹	IBA浓度/ mg·L ⁻¹	生根率/ %	每株生根数/条
1	0.2	0	70.5 ^c	4.4 ^d
2	0.5	0	76.7 ^c	4.2 ^d
3	0	0.2	83.3 ^{bc}	5.3 ^c
4	0	0.5	93.3 ^{ab}	5.8 ^b
5	0.2	0.2	96.7 ^a	6.8 ^a

小写字母表示在5%水平差异显著。

讨 论

在植物组织培养过程中, 无菌材料的获得是建立无菌体系的关键。火焰树种子小, 片状, 薄且轻, 具膜质翅, 灭菌操作较困难。陈华涛等(2011)、鲁黎明和安影(2012)分别指出, NaClO是小豆和烟草无菌培养中种子消毒比较合适的消毒剂; 刘占彬和袁庆华(2009)在研究多花黑麦草种子外植体灭菌方法中提出0.1% NaClO具有很好抑菌效果, 过高浓度(2% NaClO)会造成组织损伤。本试验以火焰树种子为原始外植体, 参照阳莉(2009)

对蓝花楹种子进行40~50 °C温水浸泡的预处理方法, 采用70%酒精浸泡30 s和2% NaClO 15、20 min进行外植体表面消毒处理, 获得了比较好的灭菌效果, 污染分别降到16.7%、10.0%, 但发芽率分别仅为60.0%、20.4%, 这说明2% NaClO对种子萌发有一定的抑制作用, 火焰树种子可能跟同科植物蓝花楹一样需要一定时间的后熟期才能萌发(李帆2013; 苏连芬2009)。

合适浓度的GA₃和6-BA可以打破种子休眠, 促进种子萌发(彭茂林等2012; 吴国欣等2010)。在本试验中, GA₃和6-BA对火焰树种子萌发均有显著促进作用, GA₃的影响效果优于6-BA, GA₃和6-BA配合使用较单独添加6-BA能显著提高火焰树种子发芽率, 缩短萌发时间。

在木本植物组织培养中最常用的培养基包括MS、N₆、WPM等, 杨燕等(2008)认为最有利于楸树茎段腋芽诱导和增殖的基本培养基为N₆。翟晓巧等(2002)比较不同基本培养基对金丝楸茎段芽的诱导效果时发现WPM是最合适的培养基。在本试验中, 火焰树种子的萌发培养和种子苗的继续培养都以MS为基本培养基, 植株生长正常, 但在继代增殖培养中WPM和1/2MS比较适合火焰树芽苗的生长, 两者的增殖数较高且无显著差异, 而以MS为基本培养基的组合中, 有效芽苗数少, 腋芽生长缓慢, 植株生长不好, 这可能是含无机盐浓度较高的MS培养基不适合火焰树试管苗长时间的培养, 其对植株的毒害是一个长期积累的过程; 这与彭绿春等(2013)、蒋时姣等(2014)的研究结果相似。生长调节物质是培养基中的关键物质, 其种类与组合对培养物的器官发育起主要诱导作用, 当细胞分裂素的浓度高于生长素或只用细胞分裂素时利于不定芽的诱导, 当只用一定浓度的生长素或者配合使用低浓度的细胞分裂素时利于不定根的诱导(王军辉等2011)。本试验中, 火焰树的继代增殖培养采用6-BA和NAA的不同浓度组合, 结果表明随着6-BA浓度的提高腋芽苗增殖数有所增加, 但增殖倍数不高且无不定芽分化, 带顶芽茎段只有伸长生长, 可能是由于细胞分裂素6-BA浓度还比较低, 不足以有效抑制火焰树芽苗的顶端优势, 促进不定芽的分化(费鹏飞2007), 具体原因还有待进一步研究。在火焰树的生根诱导培养中, 单独添加IBA的生根诱导效果较单独添加NAA的好, 生

根率较高,这与孟永红等(2004)在楸树植株再生体系研究中的结果一致;采用NAA 0.2 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹的组合,生根率和生根量最高,分别为96.7%和每株6.8条,植株生长健壮,说明一定浓度的IBA与NAA混合使用,更有利于火焰树试管苗的生根诱导。

参考文献

- 陈华涛,陈新,顾和平,张红梅,袁星星,崔晓艳(2011). 小豆组织培养中种子灭菌方法研究. 江苏农业科学, 39 (5): 208~209
- 费鹏飞(2007). 楸树组织培养体系的研究[硕士论文]. 合肥: 安徽农业大学
- 韩创举,杨培华,樊军锋,谢斌,刘永红(2006). 楸树组培技术研究. 西北林学院学报, 21 (1): 80~81
- 黄建通,曾美容,石定坤,翁婷怡(2013). 火焰木的生物学特性及园林应用. 现代园艺, (12): 30~31
- 黄少华(1998). 如火如荼——火焰树. 中国花卉盆景, (6): 38
- 蒋时姣,钟宇,张帆,刘海鹰,张双,吴富雨,黄金亮,许淑芬,万雪琴(2014). 柳杉种子无菌苗组培快繁体系的建立. 植物生理学报, 50 (7): 1039~1044
- 李帆(2013). 蓝花楹种子萌发与幼苗生长特性研究[硕士论文]. 雅安: 四川农业大学
- 刘小云(2010). 楸树优良类型——圆基长果楸组织培养技术的研究[硕士论文]. 合肥: 安徽农业大学
- 刘占彬,袁庆华(2009). 多花黑麦草种子外植体组织培养灭菌方法研究. 草地学报, 17 (4): 474~479
- 鲁黎明,安影(2012). 不同消毒剂对烟草种子消毒效果及萌发的影响. 种子, 31 (4): 93~95
- 孟永红,李燕玲,杜克久(2004). 楸树植株再生体系的建立. 河北林果研究, 19 (2): 101~104
- 彭绿春,王丽花,马双喜,苏艳,张艺萍,宋杰,瞿素萍(2013). 肥荚红豆种子无菌诱导植株再生及快速繁殖. 植物生理学报, 49 (9): 917~922
- 彭茂林,杜康兮,李立芹(2012). 3种植物生长调节剂对烟草种子萌发的影响. 种子, 31 (7): 110~112
- 苏连芬(2009). 蓝花楹采种时期与种子贮藏及其萌发特性研究[硕士论文]. 雅安: 四川农业大学, 12
- 王军辉,吴丽华,林娟(2011). 生长素对楸树不定芽的诱导和增殖培养影响的研究. 林业科技, 36 (1): 1~4
- 吴国欣,王凌晖,梁惠萍,常明山(2010). 三种植物生长调节剂对降香黄檀种子发芽的影响. 基因组学与应用生物学, 29 (1): 120~124
- 阳莉(2009). 蓝花楹组织培养及植株再生体系的研究[硕士论文]. 雅安: 四川农业大学, 15
- 阳莉,石大兴,麦苗苗,王米力(2012). 蓝花楹组织培养与快速繁殖研究. 热带亚热带植物学报, 20 (1): 26~32
- 杨艳,刘学铭,杨荣玲(2013). 火焰树化学成分与药理作用研究进展及开发应用前景. 热带农业科学, 33 (11): 75~80
- 杨燕,彭方仁,岑显超,江荣翠(2008). 楸树腋芽增殖快繁技术研究. 林业科技开发, 22 (5): 65~68
- 翟晓巧,范国强,贺窑青,毕会涛,李锋(2002). 金丝楸茎段的组织培养及植株再生技术研究. 河南农业大学学报, 36 (4): 319~321
- 张桂莲,吕武杭,李键军(2006). 火焰木的引种试验. 粤东林业科技, (2): 17~19
- 中国科学院中国植物志编委会(1990). 中国植物志(第69卷). 北京: 科学出版社, 23