

重瓣矮牵牛的组织培养

李 瑛

(哈尔滨市动物园)

郑国庆

(黑龙江省森林植物园)

重瓣矮牵牛可进行播种繁殖,但因雌、雄蕊瓣化,不能正常受精,种子甚小,发芽率低。扦插繁殖成功率仅有10%,因此,本实验采用组培方法,以保持品种优良性状,扩大繁殖系数,并可通过实验,了解不同品种间的差异。

实验材料及方法

1. 取材与消毒:本实验所用的材料是进口杂种一代矮牵牛播种苗,选用其中的1号、2号、3号、4号及6号,五个不同品种的叶片做外植体,这五个品种的生长状况良好,花色艳丽,枝叶繁茂,无病虫害,剪取顶梢下的第2—4个叶片,将叶片先用70%酒精轻轻擦去表面的灰尘,用自来水冲洗20—30分钟,亦可用温水加少许的肥皂浸3—5分钟,然后再用自来水冲洗干净,效果更好。在无菌条件下先用70%酒精浸10—15秒,再用5%的安替福民溶液浸10分钟,换一次再浸5分钟,再用3%的安替福民溶液重复一遍,进行消毒,在此过程中,不断的摇动,用无菌水冲洗2—3次,切成小块(1cm²左右)待接种于培养基中,进行培养。

2. 培养基的选择:以MS培养基为基本培养基,根据与此实验有关矮牵牛的资料,本实验分化培养中附加细胞分裂素6-BA 0.1—2mg/l。生长素IBA或萘乙酸(NAA) 0.2mg/l共作了六个组合,在生根培养基中,仅使用萘乙酸(NAA 0.1—2mg/l)并采用蔗糖减半(1.5%)和不减半(3%)做对比实验,共4个组合。

3. 培养条件及方法:取消毒处理后的矮牵牛的幼叶小片,接种在培养基中培养,培养基在接种前用高压

锅灭菌(在1.1kg/cm²条件下15分钟)。叶片在接种3天后就有少量的愈伤组织出现,5—7天后,在切口处形成活跃的分生细胞团,其体积明显变大,这种细胞分裂活动逐渐扩展,即形成了浅绿色的愈伤组织,约2周后,在愈伤组织处形成不定芽,再经3—4周,整个叶片切块出现多数突起的不定芽,经5周左右,芽丛的高约1.6—2.5cm,每个芽丛的直径1.3—2cm,待苗高1.5—5cm,转到生根培养基中,1周后生出正常的根,形成完全植株,移植前将瓶口打开1—2天后,将小苗由试管取出,用温水把根部及叶基部附着的培养基冲洗干净,移入蛭石基质中,罩上玻璃或塑料布,保持湿度,待苗长出新的叶片后,去掉玻璃罩,叶色深绿时,移入培养土中,即可在自然条件下正常生长。

实验结果及分析

(一)不同激素对不同品种分化生长的影响

1. 细胞分裂素(6-BA)的作用:植物器官在分化中,激素的调节起主要作用,接种的材料能否分化再生成植株,其主要决定于附加物的种类及浓度的大小,细胞分裂素(6-BA)对愈伤组织的细胞分裂,具有明显的作用,从表一可证明。

从表一中可见,不加激素的培养基A₀中的愈伤组织及芽萌动晚,生长极不整齐,生长速度慢。待培养3—4周后,已展的叶片变黄,生长停止,平均愈伤率为28.4%,在A₁中平均愈伤率为82.92%,A₁比A₀高出54.52%,这说明了细胞分裂素6-BA能引起细胞数目增加,对愈伤组织及芽的生长增殖起促进作用,从表

表一 6-BA 的作用

编 号	愈伤量情况	A ₀	A ₁
1	接种叶片数	10	10
	愈伤叶片数	2	10
	愈伤率%	20	100
	最早愈伤天数	7	4
2	接种叶片数	9	9
	愈伤叶片数	1	6
	愈伤率%	11	66.6
	最早愈伤天数	6	6
3	接种叶片数	10	10
	愈伤叶片数	5	10
	愈伤率%	50	100
	最早愈伤天数	7	5
4	接种叶片数	10	14
	愈伤叶片数	4	11
	愈伤率%	40	78.8
	最早愈伤天数	8	3
6	接种叶片数	10	10
	愈伤叶片数	2	7
	愈伤率%	20	70
	最早愈伤天数	8	3
平均	愈伤率%	28.4	82.92

二证明了这一点。

2. 6-BA 的不同浓度对不同品种的影响: 细胞分裂素 6-BA 对愈伤组织的形成及芽的分化增殖具有明显的促进作用, 但 6-BA 的用量多少对植物的生长状况却不尽相同, 在 0.1—2mg/l 的范围内所起作用如表二。

从表二可知, 在生长素 NAA 相同 (0.2mg/l) 的情况下, 细胞分裂素的浓度不同, 对不同品种产生不同的影响。6-BA 2mg/l 比 6-BA 0.5mg/l 的愈伤效果好, A₃ 组中平均愈伤率比 A₄ 组高出 7.1%, 证明了高浓度的激素有利于形成愈伤组织及分化成芽, 从愈伤组织的早晚时间也可看出, A₃ 组中的各品种均在 3—4 天形成愈伤组织, 而且愈伤量最多, 而 A₄ 组中, 虽也有第三天出现愈伤组织的, 但愈伤量少, 在生长素 IBA 相同时其 6-BA 含量分别为 0.5mg/l 和 0.1mg/l 的培养基中, 生长情况也说明了这一点。

3. 不同种类的生长素对不同品种的影响: 实验中选用了细胞分裂素 6-BA 浓度相同 (0.5mg/l), 生长素浓度也相同 (0.2mg/l), 但生长素的种类不同的两组培养基 A₂, A₄, A₅ 中的生长素为 IBA, A₁ 为 NAA,

表二 不同浓度 6-BA 对愈伤状况的影响

编 号	愈伤量情况	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
1	接种块数	9	9	9	24
	愈伤块数	6	6	6	24
	愈伤率%	66.6	66.6	66.6	100
	愈伤最早天数	4	5	5	4
2	接种块数	10	10	10	10
	愈伤块数	10	9	9	10
	愈伤率%	100	90	90	100
	愈伤最早天数	4	5	3	3
3	接种块数	14	14	14	14
	愈伤块数	11	10	12	14
	愈伤率%	78.6	71.2	85.7	100
	愈伤最早天数	4	4	5	4
4	接种块数	10	10	10	10
	愈伤块数	7	5	10	9
	愈伤率%	70	50	100	90
	愈伤最早天数	3	5	3	3
6	接种块数	10	10	10	10
	愈伤块数	10	10	8	9
	愈伤率%	100	100	80	90
	愈伤最早天数	4	6	6	4
平均	愈伤率%	83.4	73.3	88.9	96

从表二可见除 2 号、6 号之外, 其余 4 个品种均是 A₄ 组比 A₂ 组的愈伤好, 愈伤率高出 5.5%, 说明了虽然 IBA、NAA 都能促进愈伤分化, 但 NAA 的诱导效果比 IBA 好。所以, 同样浓度的不同类型的生长素表现不同的作用, IBA 仅引起有限的愈伤组织生长, 而 NAA 诱导的效果好, 速度快。

4. 同一培养基中不同品种的差异: 重瓣矮牵牛的愈伤能力及芽的生长能力是很强的, 只要有一定的环境条件及培养条件, 不同品种都能获得组培成功。保持品种优良性状, 但不同品种间也有差异, 由实验中得知, MS + (6-BA) 2mg/l + NAA 0.2mg/l 这组培养基生长的状况好, 所以, 选择了这组培养基 (A₃) 对 5 个品种进一步培养观察比较, 其结果见表三。

从表中可见: 第一, 不同品种愈伤组织的出现时间早晚不一致, 4 号和 6 号出现的最早, 第 3 天已愈伤, 而 2 号、3 号需第 4 天, 1 号愈伤的最晚, 且数量相对也少些; 第二, 从愈伤百分率分析, 4 号最高, 达 87%, 3 号次之, 为 81%, 2 号最低, 为 50%; 第三, 从不定芽丛的多少看, 4 号最多; 从不定芽的生长情况看, 苗高 4 号最高; 第四, 从叶片的平均大小看, 4 号和 6 号相对比其它

表三

同一培养基中不同品种的差异

培养基	生长状况	编号	愈伤情况(2周)					不定芽生长情况(4周)			生长状况	叶片平均大小(cm)	
			接种块数	愈伤块数	愈伤率(%)	最早愈伤天数	芽丛多少	苗高(cm)				长	宽
								最高	最低	平均			
A ₅	1	16	9	56	5	中	2	1.5	2	淡绿	0.2	0.1	
	2	16	8	50	4	少	1.5	1.0	1.5	中绿	0.3	0.1	
	3	16	13	81	4	中	3	2	2	深绿	6	4	
	4	16	14	87	3	最多	6	4	4	深绿	5	5	
	6	16	12	75	3	多	4	2	3	深绿	6	5	

注:芽丛最多——全瓶满,芽丛多——3/4瓶满,芽丛中——1/2瓶满,芽丛少——少于1/2瓶满。

的要大些。总之,从各个角度比较观察,品种间有差异,从统计角度讲,这种差异不显著,在5个品种中,4号和6号在其它组合中生长情况也较良好。五个品种从外观上看,植株差异不大,仅花色差异大,这说明是由矮牵牛本身的遗传特性决定的,即由染色体的组型决定的,说明控制花色的染色体不同,所以表现出不同的花色。一些人认为:在长期培养的组织中,通常大量出现的多倍体及非多倍体细胞,这一情况也是器官分化能力降低的一个原因,所以,造成了品种间的差异。

从上述实验可看出,五个品种从外观上看差异不大,仅花色差异较大,可能是同一种植物的不同品种除控制花色的染色体不同外其余的染色体组大致相同,在分化愈伤过程中各种差异的原因也可能是因为品种本身的内源激素含量少,不足以引起大量幼芽的分化,只有内源激素同外源激素共同作用才能取得好的效果,所以,造成了愈伤量的不同及芽丛的数量不同等差异。

(二)诱导生根

1. 生长素的不同浓度对生根的影响:生根培养基用生长素 NAA, 浓度分别为 0.2mg/10.1mg/l 的 B₁ 和 B₂ 两组培养基,在蔗糖浓度均为 3% 时的相同条件下进行比较,得知高浓度会抑制根的生长,低浓度生长素才能促进生长,高浓度生长素会抑制根的生长,低浓度生长素才能促进生长。2. 不同浓度的蔗糖对生根的影响:糖是植物组织培养中,不可缺少的碳源,在培养基中加入一定浓度的糖,即可作碳源,又可以维持一定的渗透压,由于植物不同,糖的最适浓度也有差异。

在生根培养基中只用了生长素(NAA),在生长素相同条件下蔗糖减半对根产生了明显的抑制作用,从实验中可看出,B₁的蔗糖浓度为3%,B₂为1.5%,而B₁的生根率为66.7%,B₂则为42%;生根状况B₁也好

于B₂;最早的生根时间B₁为第四天,而B₂为第五天,可见,蔗糖减半不利于诱导生根。由于糖的浓度能改变培养基的渗透压,在较低的蔗糖浓度(1.5%)情况下,使培养基的渗透压降低,使根部组织吸收的营养成份减少,因而根量减少。

(三)小苗出瓶

小苗出瓶成活的关键是基质的选择及温度湿度的控制,为使试管苗由瓶内过渡到瓶外,逐渐适应外界环境条件,在小苗出瓶前先打开瓶盖,1—2天后移入透水性强,通气良好的蛭石中,并放置于培养室中,保持一定的湿度和温度。这样,移苗成活率均在90%以上,一周后苗的叶片增大增厚,叶色变深,茎增粗,大约两周左右,即可移入培养土中,在半遮荫的自然条件下生长,移入后一周观察小苗株高、株径都比以前增加很多,小苗生长旺盛,不同品种的成活率均在96%以上。

从实验可知,不论由试管苗移入蛭石中还是由蛭石中移入培养土中,对不同品种来讲成活率都高于90%,经过45—50天的培养,所得不同品种的组培苗均已开花。

小结与建议

本实验从重瓣矮牵牛的叶片开始培养,在不同的培养基中,对不同品种均能产生愈伤组织并进行芽的分化与增殖,大约需3—4周,即可移入生根培养基中,诱导生根。生根后1—2周即可移入盆土中培养,成活率90%以上,在适当的环境条件下,各个品种均能开花。从实验结果看,重瓣矮牵牛具有很强的再生能力。用此方法可在短期内达到快速繁殖目的,使不能正常结实的重瓣矮牵牛保持各个品种优良性状,并可不受季节的限制,冬天也可在瓶中培养,早春即可大量的繁殖,为早春花坛增色添彩。(来稿时间1993年2月)