

运用茎尖培养技术进行花卉品质改良

唐焕伟¹, 张 兴¹, 李文生²

(1. 黑龙江省科学院自然资源研究所, 哈尔滨 150060; 2. 黑龙江省经济作物指导站, 哈尔滨 150030)

中图分类号: S68; S603.6 文献标识码: B

文章编号: 1001-0009(2004)02-0062-02

植物组织培养是上世纪初开始, 以植物生理学为基础发展起来的一项技术即应用无菌操作方法培养植物的一个离体器官、组织或细胞, 发展到现在可以说几乎所有的植物其器官、组织或细胞都能离体培养成功, 在发展和应用这一技术上已在快速繁殖、去除病毒加速育种进程等各方面取得了巨大经济效益和社会效益, 其中在花卉产业化方面利用组织培养技术对珍稀、优新品种进行快速繁殖实现种苗育苗工厂化, 运用茎尖培养技术对采用扦插、分株等营养繁殖和长期无性繁殖造成病毒积累、危害加重、品质下降、花变小、色泽暗淡、产花少的花卉进行品质改良等方面都取得了巨大成功。尤其是运用茎尖脱毒对花卉品质改良这一技术对花卉产业化发展具有深远的意义。

1 茎尖培养脱毒

茎尖是植物顶端的原生分生组织, 细胞分裂很旺盛, 有很强的生命力。现已在很多种类的植物茎尖进行培养再生获得成功。当植物病毒感染营养繁殖体时(已证明大多数病毒不能通过植物的有性世代传播)。病原体从一个营养世代传播到下一个营养世代, 当某种植物无性系的全部种群受到病毒感染时, 特别是当不可能察觉的症状潜伏的病毒感染时这种植物的品质和产量就会逐年降低甚至造成毁灭性危害。当前所有栽培植物的无性系都包含着一种甚至几种病毒侵害, 为了获得栽培植物更高的产量和更优的品质, 人们就希望得到无病毒的植物材料。

2 茎尖培养脱毒的原理

日本农事试验场的森宽一在1958年~1967年的10年中进行了10多种作物无病毒苗培养的研究都获得了成功, 积累了大量的经验。他认为: 茎尖分生组织培养之所以能除去病毒是由于病毒在感染植株体内的不均匀分布, 老叶及成熟的组织和器官中病毒含量较高, 而幼嫩的及未成熟的组织和器官病毒含量较低。生长点在(0.1 mm~1 mm(毫米))区域则几乎不含或含病毒很少, 这是因为病毒繁殖运转速度与茎尖分生区组织细胞生长速度不同, 病毒向上运输速度慢而分生组织细胞增殖快这样的结果就使茎尖分生组织区域的细胞不含病毒。

3 茎尖培养的方法和程序

茎尖培养的工作程序一般可分为: 无菌培养的建立、外植体增殖、诱导生根、试管苗的移栽驯化这4个阶段。

以下以我国主要切花品种: 菊花、月季、香石竹为例把在日本山形县立园艺试验场所做的脱毒试验简述如下。

3.1 菊花

菊花起源我国并被列为传统十大名花之一。菊花的栽培历史悠久, 品种丰富, 花型花色千变万化, 观赏价值极高, 作为鲜切花的品种而言, 今天菊花已经成为世界上四大切花之一。在我国切花的生产中菊花作为开路先锋已经发展为我国四大切花之首。但是由于长年进行扦插等无性营养繁殖使其植株体内病毒含量增高使切花的品质和产量急剧下降, 解决以上问题的最好方法就是通过茎尖培养使其脱毒进行植株的更新。菊花茎尖培养的方法及步骤:

3.1.1 培养基 初代培养基: 植物复合营养剂 2 g/L(克/升)、 NH_4NO_3 100 mg/L(毫克/升)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L(毫克/升)、Fe-EDTA 30 mg/L(毫克/升)、 B_6 4 mg/L(毫克/升)、蔗糖 30 g/L(克/升)、琼脂 6 g/L(克/升)、BA 0.4 mg/L(毫克/升)、Kin 0.5 mg/L(毫克/升)、6-氨基嘌呤 4 mg/L(毫克/升)、pH 5.7; 继代和生根培养基: 植物复合营养剂 2 mg/L(毫克/升)、 NH_4NO_3 100 mg/L(毫克/升)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L(毫克/升)、Fe-EDTA 30 mg/L(毫克/升)、 B_1 1 mg/L(毫克/升)、蔗糖 30 mg/L(毫克/升)、琼脂 6 g/L(克/升)、pH 5.7。

3.1.2 外植体选材及调整 在苗圃中挑选无病虫害的健康母株移栽到盆内, 在温室等比较干净的环境内栽培。待植株生长后外植体要取在花蕾形成前的生长点, 取侧芽前端约3 cm(厘米)长除去无用的叶片。

3.1.3 外植体的消毒 把调整后的外植体(茎尖)放入中性洗液中洗净后用流水冲洗, 再放入次氯酸钠(含氯3%)中滴入1~2滴Tween20消毒15 min(分钟)。在超净工作台用无菌水冲洗3~4次后备用。

3.1.4 接种 在超净工作台内将消毒后的茎尖把肉眼能看到的叶柄切除, 在实体解剖镜下用解剖刀剥离顶芽至露出带有1~2片叶原基的生长点, 生长点大小约在0.3 mm~0.5 mm(毫米)左右。大于以上尺寸脱毒率将会下降反之成活率将会下降。迅速将摘出的生长点置于培养基中。

3.1.5 培养 在25℃约3 000 Lx(勒克斯)16 h(小时)长日照下培养约1~2个月即可长成约1 cm(厘米)长可移栽的侧芽, 移栽到生根培养基约一个月生根并可出瓶进行驯化。如果需要继代培养在幼苗长到3 cm~4 cm(厘米)左右可在节间部切割数段移栽到继代培养基中进行继代培养。

3.1.6 驯化 把已生根长度在3 cm~4 cm(厘米)的幼苗从瓶中取出, 在不伤根的前提下洗净琼脂, 意在冬季用于冲洗琼脂的水温应接近于室温。把幼苗栽于用蒸气消毒好的蛭石中。移栽初期应注意逐步降低湿度增加光照强度, 最后放置到普通栽培条件的环境中。在普通环境下培养约一个月即完

成驯化。

3.1.7 定植 完成驯化的幼苗用通常栽培的管理方法进行, 应注意病虫害的防治, 施肥管理要彻底。

3.2 月季

切花月季属于常绿灌木性多年生木本花卉植物, 其枝条粗壮直立性较强。切花月季的株高可以达到 1.5 m ~ 2 m (米)。月季与菊花、香石竹一样都具有无性繁殖的特性。目前在日本利用组织的方法进行增殖的很少, 其主要原因是用茎尖培养的组培苗与扦插苗相比花期约推迟 3 周(日本 1985)。另一方面, 月季组培苗在植物激素过高或长期继代培养的情况下易发生变异。但从育种角度考虑可以利用这一点诱导变异选育新品种加速品种更新换代, 迅速普及优良品种。月季茎尖培养方法及其步骤:

3.2.1 培养基 初代培养基用 MS+BA2 mg/L(毫克/升)+NAA0.1 mg/L(毫克/升)+蔗糖 30 mg/L(毫克/升)+琼脂 9 g/L(克/升)pH5.7, 继代培养基同上, 生根培养基用 1/4MS 或 1/4MS+NAA0.05 mg/L~0.1 mg/L(毫克/升)。

3.2.2 外植体选材与调整 外植体选用生长健壮的当年生枝条约 2 周前新摘心后饱满而未萌发的侧芽作为外植体。把肉眼能看到的未展开的新叶去掉进行粗调整。

3.2.3 外植体消毒 把调整好的外植体用中性洗液清洗后再用流水反复冲洗约 20 min(分钟), 再用 70%酒精浸泡数秒后用含氯 2%的次氯酸钠加入 Tween20 均匀搅拌消毒 10 min~20 min(分钟), 在超净工作台内用无菌水冲洗 3~5 遍备用。

3.2.4 接种 接种时应注意生长点的上下方向不要把生长点埋在培养基中, 摘取生长点时要迅速。在实体解剖镜下用解剖刀从外侧开始去掉叶片直到露出带有 1~2 片叶原基的生长点, 在不伤到生长点的情况下用解剖刀取出约 0.3 mm~0.5 mm(毫米)的生长点迅速接种。

3.2.5 培养 应在室温 25℃光照强度 2 000 Lx(勒克斯)光照时间 16 h(小时)的条件下培养。接种后约 1 周生长点变绿开始生长, 一个月后即可开始继代培养, 继代培养的间隔时间约为一个月。作为品种保存可以把继代组培苗放入 1℃~2℃的冰箱中这样可保存 6~10 个月。生根培养把 2 cm(厘米)以上的苗转入生根培养基中 2~3 个月后将开始生根, 当根系长到 2 cm(厘米)以上时取出, 用流水冲洗掉根部的琼脂后移栽到消毒后的珍珠岩或蛭石的基质中。

3.2.6 驯化 移栽到基质后 3~4 周新叶开始展开, 根系已基本发达。在这几周温度应保持在 20℃以上, 相对湿度应在 70%~80%左右。一个月后按普通管理方法进行管理。

3.3 香石竹

又名康乃馨, 是石竹科石竹属的多年生草本植物。作为鲜切花香石竹的产量几乎同菊花、月季以及唐菖蒲的生产量不相上下, 已成为我国的四大生产切花之一。香石竹扦插生根很容易且成活率很高, 一般都是通过扦插作为增殖的方法。香石竹组织培养的目的不是要大量增殖而是通过茎尖培养获得提供可扦插的健康的无毒的母本。香石竹茎尖培养的方法及步骤:

3.3.1 培养基 一般用 MS 培养基, 初代培养基 MS+

IAA0.1 mg/L(毫克/升)+Kin0.01 mg/L(毫克/升)+蔗糖 30 g/L(克/升)+琼脂 6 g/L(克/升), pH5.7; 增殖和生根培养基为 MS+NAA0.1 mg/L(毫克/升)+蔗糖 30 g/L(克/升)+琼脂 6 g/L(克/升), pH5.7。

3.3.2 外植体选材与调整 香石竹除了顶端的生长点外各节间都有 1~2 个芽, 这些生长点都可以培养, 但是同茎尖的生长点相比病毒含量高且不易成活。另外取出的生长点大小与此也有关系, 香石竹生长点一般带有 1~2 片叶原基(0.3 mm~0.5 mm(毫米))为宜。调整, 从具有明显品种特性的优良品系中采取 10 cm~15 cm(厘米)长的茎段, 除去展开的叶片把包含茎尖在内的茎段切成 50 mm(毫米)长保存在培养皿中备用。应注意材料不要脱水如脱水茎尖的组织就会变软, 这样在摘出生长点时就会遇到困难。

3.3.3 外植体的消毒 中性洗涤液清洗后用流水冲洗 30 min(分钟)再放入含氯 3%的次氯酸钠中滴入 1~2 滴 Tween20 浸泡 25 min(分钟), 为了使消毒液有效的渗透外植体内应适当的均匀旋转。在超净工作台中用无菌水清洗 3~5 遍, 在滤纸上滤去多余水分放入培养皿中备用。

3.3.4 接种 切掉调整材料时剩下的叶柄, 生长点是在几重叶原基的包围下, 要从外到内逐一切掉外层叶原基, 当生长点露出时把包括 1~2 片叶原基在内的生长点切下, 迅速移入事先预备好的培养基内, 注意生长点的方向及不要把生长点埋在培养基内。

3.3.5 培养 接种后放入温度 25℃光照 3 000 Lx(勒克斯)的培养室内, 16 h(小时)光照培养 3 个月, 植物体可长到 20 mm(毫米)左右。普通情况下这种状态即可上盆驯化, 但如需增殖时可在植物体长到 50 mm(毫米)时分割移入继代培养基中。把 20 mm(毫米)左右的幼苗移入生根培养基内约 1 个月后将开始生根。

3.3.6 驯化 用珍珠岩+蛭石=1:1 作为基质, 基质和育苗钵以消毒的为宜。把植物体从瓶中取出用流水冲洗掉根部的琼脂, 这时应注意水温和不要伤及叶片和根部。在移栽到育苗盘后要保持湿度, 在移栽后的 3~4 日内湿度应保持在近 100%以后逐步降低湿度, 两周后方可进行普通栽培管理。

香石竹组培苗通过扦插在苗圃中进行增殖, 组培苗上盆后约 6 个月即可开花, 在此期间进行脱毒检测挑选合格的种苗作为增殖母本栽培。从无毒母本上采穗进行反复扦插即可获得大量优质种苗。

花卉品质改良是花卉业的重要工作。是适应人们的需求和促进产业发展的关键, 通过茎尖培养进行脱毒对花卉品质改良的技术虽然已趋向成熟, 但还存在着诸多问题有待研究解决。例如一些花卉品种如“菊花”、“月季”等在组织培养过程中培养周期过长或植物激素浓度过高等情况下将会发生变异, 它会直接影响花卉品质改良的效果, 如果发现不及时势必造成巨大的经济损失。如何解决、防止或提早发现变异的发生等问题是今后有待研究的方向。另一方面, 由于植物组织培养体系的建立需要一定的技术力量和资金, 而我国花卉产业的中坚力量是广大的中小农户, 因此如何在全国或局部地区形成一个优良种苗开发、生产与销售的良性循环体系的问题等等也是将来研究的方向。