

颠茄的离体培养与快速繁殖研究

李 慧, 吴 松, 孙其文, 马承忠

(江苏联合职业技术学院 淮安生物工程分院, 江苏 淮安 223200)

摘 要:以颠茄的种子和种子萌发后带顶芽的幼茎段作为外植体,研究了外植体消毒方法、激素组合对其离体培养与快速繁殖的影响。结果表明:种子在 0.1%升汞+3滴吐温-80 溶液中浸泡 10 min、茎段在 0.1%升汞溶液+2滴吐温-80 分别浸泡 2 min 灭菌效果较好;外植体分化的适宜培养基为:1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L IBA;诱导丛生芽的最适培养基 1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+3%蔗糖;诱导试管苗生根的最适培养基为:1/2MS+0.2 mg/L IBA。

关键词:颠茄;组织培养;快速繁殖;激素组合

中图分类号:S 567.9;S 035.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)12-0192-03

颠茄 (*Atropa belladonna* L.), 俗名“野山茄”, 双子叶植物纲, 茄科多年生有毒草本植物。颠茄全草入药, 叶和根含莨菪碱和微量东莨菪碱, 可制成侵膏和配剂, 能抑制腺体分泌, 具麻醉和镇定作用。近年来在戒除毒瘾和网瘾上取得了显著疗效, 致使对颠茄的需求激增, 但国内颠茄的野生资源和部分地区的零星种植, 不能满足市场的需求, 因此, 通过植物组织培养途径, 短期内获得大量种苗, 扩大种植规模, 以满足市场的需要。通过采用组织培养法进行快速繁殖研究, 旨在为颠茄工厂化育苗提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2006 年 3 月至 2007 年 6 月进行。供试材料颠茄种子购自四川省重庆市, 分别以种子和种子萌发后带顶芽的幼茎段作为外植体(幼苗取自淮安生物工程分院标本园驯化池内, 2006 年 2 月种植)。

1.2 试验方法

1.2.1 消毒 种子消毒:选取饱满度一致的颠茄种子, 包在纱布小袋内, 挂于水龙头下, 用流水冲洗 2 h, 然后进行表面灭菌。在无菌条件下, 先用纯酒精迅速漂洗一下, 无菌水冲洗 3~4 次, 再分别采用升汞、次氯酸钠、吐温-80 及新洁尔灭 4 种灭菌剂, 进行不同灭菌剂的效果试验。然后将经表面灭菌处理的试验材料, 用无菌水冲洗 5 次后接种于诱导培养基上。培养条件:每天光照 12 h, 光照强度 2000 lx, 培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。茎段消毒:于晴天的下午选取带有顶芽和幼嫩侧芽的茎段, 用自来

水冲洗去除表面尘土, 然后进行表面灭菌。在无菌条件下, 先用 75%酒精浸泡 20~30 s, 无菌水冲洗 3~4 次, 再转入 0.1%升汞溶液+2滴吐温-80 分别浸泡 4.2、1 min, 无菌水冲洗 5~6 次。在以上的过程中要不断摇动, 以去除附在外植体表面的气泡。用消毒滤纸吸干水珠后, 将幼茎切成 0.3 cm 长的茎段接种在诱导培养基上。

1.2.2 不同激素浓度对外植体分化能力的影响试验 将无菌种子或茎段分别接种于添加了不同浓度 IBA 和 6-BA 的 MS 培养基上, 30 d 后统计愈伤组织诱导率, 45 d 后统计分化成苗率。

1.2.3 丛生芽增殖培养基筛选试验 将高约 1.5 cm 的无菌苗接种于添加了 6-BA、IBA、IAA 和 NAA 4 种不同激素和生长素配比的 MS 培养基上, 20 d 后统计芽数并记录生长情况。

1.2.4 生根培养基筛选试验 取高约 1.5 cm 的无菌苗接种于添加了 IBA、NAA 和 IAA 3 种不同生长素浓度的 1/2 MS 培养基上, 培养 2 周后, 记录生根率、平均根长、平均根数及根的粗细情况。

2 结果与分析

2.1 消毒剂及灭菌方法比较

2.1.1 种子消毒 植物组织培养的成功首先在于初代培养, 即能否健全在于无菌外植体, 为此进行了 5 种不同消毒方法及消毒剂的比较试验, 以便选择杀伤力小且效果较好的药剂和灭菌方法。不同消毒剂种类及消毒方法的灭菌试验结果见表 1。结果表明:用 0.1%升汞+3滴吐温-80 消毒 10 min 和用 2%次氯酸钠和 0.1%升汞消毒 8 min, 这 2 种方法灭菌效果较好, 没有污染, 但方法 3 对外植体的杀伤力却很强, 获得的无菌材料萌发率较低;方法 1、2 和 4 发芽率较高, 但方法 1 和 4 污染率也较高, 消毒不够彻底。因此, 最佳消毒方案为:用流水冲去表面尘土和部分细菌, 再用纯酒精迅速漂洗一下, 浸在

第一作者简介:李慧(1971-), 女, 江苏宿迁人, 硕士, 副教授, 主要从事园艺作物的组织培养研究。E-mail: lihui710623@163.com。

基金项目:淮安市科技发展计划项目(SN0638)。

收稿日期:2007-07-09

0.1%升汞+3滴吐温-80 溶液中 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 即可转入培养基中。

表 1 不同灭菌剂及灭菌方法对颠茄种子消毒效果的比较

编号	灭菌剂	时间	接种	污染	污染率	发芽	发芽率
		/ min	数	数	/ %	数	/ %
1	0.1%升汞	10	30.0	9	30.0	26	86.7
2	0.1%升汞+3 滴吐温-80	10	30	0	0	30	100
3	2%次氯酸钠+0.1%升汞	8	30	0	0	10	33.3
4	2%次氯酸钠	10	30	6	20.0	24	80.0
5	0.3%新洁尔灭	10	30	10	33.3	8	26.7

注: 接种 20 d 后统计结果。

2.1.2 茎段消毒 由于升汞是一种剧毒物质, 即使在升汞处理完后, 用无菌水冲洗 7~8 次, 仍然有少量残留在外植体上, 导致外植体死亡。经过 4 min 浸泡处理, 外植体染菌率为 0, 成活率为 52%。2 min 浸泡茎段, 外植体总染菌率为 2%, 总死亡数为 3 个; 当茎段浸泡 1 min 后, 外植体总死亡率为 6 个, 但总染菌率高达 56%(表 2)。从以上数据分析表明: 用 4 min 浸泡茎段处理, 外植体染菌率虽然很低, 但是死亡率过高; 茎段浸泡 1 min, 外植体死亡率大大降低, 但染菌率却很高, 这 2 种处理方法得到的未受伤害的外植体只是其中很少的一部分, 所耗费的材料太多。因此 颠茄茎段的灭菌宜用升汞浸泡 2 min。观察中发现 3 种处理外植体在接种一周内都有不同程度褐化现象并导致生长缓慢, 10 d 后, 成活的外植体褐化现象消失。这可能是由于使用乙醇进行表面消毒时酒精毒害所致。

表 2 不同时间处理对颠茄幼茎的伤害和染菌情况

处理时间	接入外植	染菌	污染	死亡	总成活	成活
/ min	体数/ 个	数/ 个	率/ %	数/ 个	数/ 个	率/ %
4	50	0	0	24	26	52
2	50	0	0	4	46	92
1	50	28	56	6	44	88

注: 接种 20 d 后统计结果。

2.2 不同激素浓度对外植体分化能力的影响

颠茄茎段接种在附加不同浓度 IBA 和 6-BA 的 MS

表 5 不同激素组合和浓度对颠茄试管苗生根的影响

激素浓度/ mg · L ⁻¹			无根苗数	生根率/ %	平均每株根数/ 条	平均根长/ cm	生根苗质量
IBA	NAA	IAA					
0.05	0	0	100	22	1.5	2.73	根细长, 无侧根
0.10	0	0	100	93	3.2	2.87	根略粗, 有少量侧根
0.20	0	0	100	100	4.6	4.14	根粗壮, 部分根具侧根
0	0.1	0	100	85	3.1	3.22	根粗壮, 部分根具侧根
0	0.2	0	100	57	2.6	2.65	根一般, 无侧根
0	0	0.1	100	59	3.1	1.27	根一般, 无侧根
0	0	0.2	100	71	3.5	2.43	根略细, 无侧根
0	0	0	100	0	0	0	切口处形成球状突起

在增殖培养试验中, 设计了 8 种不同激素及生长素浓度配比的 MS 培养基, 将无根苗转接到各培养基上, 结果见表 4。由表 4 可知, 6-BA 的浓度对丛生芽的数目有较大的影响, 6-BA 的浓度越高, 产生的丛生芽越多, 但浓

培养基上后, 均可不同程度的分化出芽(表 3)。在 6 组激素浓度中, 以 1 号、2 号和 4 号培养基的诱导效果较好, 30 d 后愈伤组织诱导率达 100%, 45 d 后愈伤组织直接分化成苗率均超过 85%。6 号培养基对愈伤组织也有一定的诱导作用, 但作用十分缓慢, 而 3 号高 IBA 浓度的培养基则对成芽起抑制作用, 出现分化停滞现象, 最后逐渐发黑趋于死亡。

在不同生长素浓度对外植体分化能力影响的试验中, 芽的形成与不同激素用量的比例有关, 在一定范围内, 成芽率与 6-BA/ IBA 呈正相关, 但 IBA 浓度对芽的形成存在一定的限制作用。

表 3 不同激素浓度对颠茄茎段分化能力的影响

编号	6-BA	IBA	培养外植体数	愈伤组织诱导率	培养外植体数 成芽率	
	/ mg · L ⁻¹	/ mg · L ⁻¹	30 d		30 d	45 d
1	1.0	0.05	30	100	50	100
2	1.0	0.10	30	100	50	88
3	1.0	0.20	30	86.7	50	24
4	0.5	0.05	30	100	50	86
5	0.5	0.10	30	60.0	50	64
6	0.5	0.20	30	46.7	50	54

注: 愈伤组织 诱导率(%)=(诱导愈伤组织的外植体数/ 接入外植体数)×100% 成芽率(%)=(分化不定芽的外植体数/ 接入外植体数)×100%。

2.3 丛生芽增殖培养基筛选

表 4 不同激素组合和浓度对颠茄丛生芽繁殖的影响

培养基编号	激素浓度/ mg · L ⁻¹				增殖率	苗高 / cm	试管苗生长情况
	6-BA	IBA	IAA	NAA			
1	2.0	—	0.10	—	9.42	6.5~8.0	严重玻璃化
2	1.5	—	—	0.10	8.63	6.5~7.5	严重玻璃化
3	1.5	0.10	—	—	6.94	5.0~6.5	严重玻璃化
4	1.0	—	—	0.05	7.86	5.0~6.0	轻微玻璃化
5	1.0	0.10	—	—	7.16	4.0~5.5	生长最好
6	1.0	—	—	—	6.83	4.0~6.0	叶片轻度卷曲
7	0.5	0.05	—	—	5.92	5.0~6.0	生长良好
8	0.1	0.05	—	—	3.24	4.0~5.5	生长良好
9	—	—	—	—	1.28	3.0~3.5	生长良好

注: 每块材料 1 单芽或带有 1 大于 2 mm 的小芽统计为 2, 不足 2 mm 的芽点突起不计。表列数据为 100 块材料的平均值; 增殖率计算式为: 继代后 20 d 平均芽数/ 继代当天平均芽数。

度高, 新生芽节间伸长, 且形成玻璃化苗的可能性增大。单独使用 6-BA 时, 新生的叶片卷曲、增厚, 有明显的愈伤化倾向, 可见在高浓度(6-BA 浓度高于 1.0 mg/ L)或单独使用 6-BA 时, 对芽的生长都有不良影响。当 6-BA

小茴香嫩茎的组织培养

帕提曼·阿不都热合曼, 秦 勇, 玉苏甫·阿不力提甫

(新疆农业大学 园艺学院, 乌鲁木齐 830052)

摘 要:以小茴香嫩茎为外植体, 进行了组织培养研究。结果表明, 适合诱导小茴香愈伤组织的最佳培养基为改良 MS 培养基+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 诱导愈伤组织所需的时间最短, 诱导率也高, 形成的愈伤组织颜色浓绿, 生长速度适中, 质地致密; 最佳生根培养基为改良 MS 培养基+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L, 生根率高, 生根数多, 质量好。

关键词:小茴香; 愈伤组织诱导; 生根培养; 最佳培养基

中图分类号:S 573⁺.3; S 035.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)12-0194-02

小茴香(*Foeniculum vulgare* Mill.), 为伞形科 1 a 生草本植物, 叶和种子均有特殊的香味。嫩叶作为蔬菜食用, 种子可作药用、调味品和香料, 是一种重要的多用途芳香植物。目前对于小茴香的研究多集中在精油成份及影响因子^[1-3]方面, 关于小茴香的组织培养未见报道。现通过小茴香嫩茎的组织培养, 获得整齐一致的小苗, 以期对小茴香的生理抗旱研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

试验用小茴香(*Foeniculum vulgare* Mill.)来自新

第一作者简介: 帕提曼·阿不都热合曼(1970-), 女, 实验师, 学士, 主要从事蔬菜栽培技术方面的研究。

收稿日期: 2007-06-17

和 IBA 配合使用时具有较好的效果, 其中以添加 1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA 的培养基为较为理想的组合, 植株无玻璃化现象, 新生叶片舒展宽大, 叶色鲜绿, 苗高为 4.0~5.5 cm, 可切成 3~5 段, 客观上扩大繁殖系数。

2.4 生根培养基筛选

将带有 1 节 2 叶的健壮苗或切段接种于添加不同生长素组合的 1/2 MS 培养基上。3 周后, 试管苗的生根情况见表 5。由表 5 可看出, 添加不同浓度的 IBA、NAA 和 IAA 均能改善生根情况, 其中 0.2 mg/L IBA 和 0.1 mg/L NAA 均能增强根的粗壮度, 但在添加 0.1 mg/L NAA 的培养基上试管苗生根率低, 根数少, 因此确定最佳的生根培养基为 1/2 MS+0.2 mg/L IBA。

2.5 练苗与移栽

9 月底至 10 月中上旬将生根幼苗连瓶搬到培养室外, 揭开瓶盖, 并喷适量清水, 让幼苗在常温下透气锻炼 24 h。移时轻轻将幼苗取出, 洗净附着在根上的培养基, 栽于灭过菌的苗床或穴盘基质中, 淋透水, 放在小拱棚

疆维吾尔自治区吐鲁番地区。用浮选法选取饱满的小茴香种子, 经自来水浸种 24 h 后, 在超净工作台上用 0.1% 升汞浸泡 10 min, 然后用无菌水冲洗 4~5 次, 接种在 1/2 Haoglans 培养基上。小苗长至 4~5 cm 高时切取 0.5~1 cm 嫩茎, 接种在不同诱导培养基上进行培养。经 15~25 d 后, 切取 1.5~2 cm 的绿苗接种到生根培养基上, 进行生根培养, 25 d 后观察生根效果。

1.2 培养基的制备

1.2.1 诱导培养基 以改良 MS 为基本培养基, 附加不同浓度配比的 6-BA(6-苄基氨基嘌呤)、NAA(α -萘乙酸), 蔗糖 3%, 琼脂 0.8%, 培养基的 pH 值调至 5.6~5.8。

1.2.2 生根培养基 以改良 MS 为基本培养基, 附加不同浓度配比的 6-BA(6-苄基氨基嘌呤)、NAA(α -萘乙酸), 蔗糖 3%, 琼脂 0.8%, 培养基的 pH 值调至 5.6~5.8。

或温室内, 温度保持在 24~28℃左右, 相对湿度在 90%~95%。由于试管苗幼嫩, 叶片角质层较薄, 根系吸水力弱, 应避免强光照射, 因此必须架设荫棚, 棚内透光度开始为 30%~40%左右, 逐步增至 50%~60%。每天雾状喷水 1~2 次, 保持叶面湿润。每 10~15 d 用 50% 多菌灵 1000 倍液或 50% 代森锰锌 800 倍液喷雾防治病害。幼苗长出一对或二对新叶时, 可用 0.2% 的尿素液装在喷雾器内, 进行喷雾施肥, 施肥后再用清水喷淋 1 次, 以免肥害, 促进苗木生长。幼苗在苗床或穴盘中生长约 1 个月左右, 生出新根抽出新叶时, 即可单株移植到苗圃中。经此方法练苗后, 最终成活率达 95% 以上。

参考文献

- [1] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [2] 刘艳梅, 张喜春, 薛玲霞. F₁代杂种番茄的组织培养与植株再生[J]. 蔬菜, 2005(5): 44-46.
- [3] 曲雪艳, 周庆红. 樱桃番茄的组织培养与离体快繁技术研究[J]. 江西农业大学学报, 2006(6): 962-964.