

山定子组培脱毒技术

建德锋, 刘 洋, 孙 铭

(吉林农业科技学院植物科学系, 132101)

中图分类号: S 665.9 文献标识码: B

文章编号: 1001-0009(2007)02-0184-02

山定子(*Malus baccata* Borkh.), 又名山荆子, 蔷薇科、苹果属, 它是一种落叶乔木, 具有很好的观赏效果, 春天白花满树, 秋季红果累累, 且经久不凋, 甚为美观, 在园林上可用做庭园观赏树, 丛植、独植或与其他树种林植效果都比较好。常见的繁殖方法是播种繁殖, 但在其生长的过程中易感染苹果褪绿叶斑病毒、苹果茎痘病毒和苹果茎沟等病毒, 影响其观赏效果, 甚至可导致全株死亡。此外一些潜隐性病毒侵染植株后, 症状不明显, 不易被发现, 尤其危险, 而受病毒侵染的植株终身带毒, 目前尚无药物可以治愈。随着组培技术的发展, 其快速繁殖、脱毒性能好等特性使人们开始尝试采用组培方法来生产山定子无病毒苗。现详细地介绍山定子组培脱毒的方法, 希望给大家在山定子的组培生产

方面提供一些参考。

1 脱毒试管苗培养

1.1 茎尖培养脱毒

1.1.1 取样与消毒 取样: 用于脱毒的山定子母株应该是患病群体中病害相对较轻的植株, 可直接从选定的植株上取顶芽梢段进行消毒接种, 也可以在植株的休眠期剪取带休眠芽的枝条, 在温室内水培养一段时间, 待其发芽后采其顶芽与侧芽来进行接种; 消毒: 剪取顶芽梢段 3~5 cm, 摘去大叶片, 在自来水下冲洗于净, 在 75% 酒精中浸泡 30s 左右, 然后用 1%~3% 次氯酸钠浸泡消毒 10~20 min, 最后用无菌水冲洗材料 4~5 次备用。

1.1.2 剥取茎尖与接种 接种培养基类型: 常用的接种培养基配方为 MS+BA0.5 mg/L+CH300 mg/L, 糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L, 培养基在使用前一定要高压消毒 (以后培养基均如此); 接种过程: 在超净工作台上, 将已消毒的山定子顶芽或腋芽放在垫有滤纸的培养皿中, 在双筒解剖镜下, 用解剖针和镊子将材料固定于视野中, 用解剖刀尖仔细剥去幼叶, 至出现露的生长点, 用刀尖切下带 1~2 个叶原基的生长点, 大小为 0.1~0.3 mm, 用解剖针或解剖刀尖将切下的茎尖转至芽诱导培养基上, 每试管或三角瓶接种 1 个茎尖; 接种注意事项: 为防止茎尖失水, 可用无菌水润湿滤纸。操作中注意随时更换滤纸和接种工具, 剥取茎尖时切勿损伤生长点。严格按接种的要求操作, 在接种前镊子和剪刀一定要浸泡酒精, 然后在酒精灯上灼烧消毒, 茎尖放入瓶中的前后瓶口一定要灼烧。此外, 在超净工作台内瓶口不能正朝上放置。

第一作者简介: 建德锋, 男, 1976 年生, 讲师, 硕士, 现于吉林农业科技学院植物科学系从事教学与科研工作。

收稿日期: 2006-09-21

[4] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297-302.

[5] Levan, A. Fredga k Sandberg A. Nomendature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas. 1964 52: 197-201.

[6] Stebbins G L. Chromosomel evolution in higher plants[M]. London: Edward Aronld 1971: 88.

[7] Arano H. Cytological studies in subfamily carduoideae(compositae) of

Japan[J]. IX Bot Mag, 1963, 76: 32.

[8] 邓可京, 曲志才, 沈大棱. 植物染色体图形分析的现状和展望[M]. 上海科学技术出版社, 1995, 17(2): 80-81.

[9] HUJin-Yao, SUZhi-xian, YUEBao-liang. Progress of Karyotype Analysis Method in Plants Research[J]. 四川师范学院学报(自然科学版), 2002, 23(3): 239-243.

The Chromosome Number and Analysis of Karyotype of *Antirrhinum Majus* L.

SHI Li ran, LIU Gu rong

(Department of Biology, Hengshui Normal College, Hebei 053000)

Abstract: The *Antirrhinum majus* L. is an anual or biennial herbal flower. The reports has not be seen about the karyotype analysis of *Antirrhinum majus* L. We studied the chromosome number and karyotype of *Antirrhinum majus* L. with low temperature method. The results showed that the number of chromosome of the *Antirrhinum majus* L. was $2n=16$, Chromosome base for 8, and its karyotype formula was $K(2n)=2x=16=12m+2sm+2st$, belong to 2B type. Through *Antirrhinum majus* L. for the chromosome number and Karyotype for the traditional patterns of plant classification description provided cytology information.

Key words: *Antirrhinum majus* L.; Chromosome; Analysis of Karyotype

1.1.3 培养与继代 接种后培养: 接种后材料置 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 先在光照度 $1\,500 \sim 5\,000\text{ Lx}$, 每日光照 $10 \sim 16\text{ h}$ 条件下培养, 等叶原基变绿并有长大表现时, 然后在 $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 条件下进行暗培养, 使其长成黄化苗; 继代增殖: 待黄化幼苗长至 $4 \sim 5\text{ cm}$ 时进行继代, 常采用 $\text{MS} + \text{BA} 0.5\text{ mg/L}$ 、糖 30 g/L 、琼脂 7 g/L 的培养基配方, 将增殖的苗切成 1 cm 左右长的小段, 保持极性放置到继代增殖培养基上, 均匀放置, 每瓶中可放置多个, 然后放入培养室进行光培养。

1.1.4 生根诱导 待苗木在增殖培养基上转绿且健壮, 长度为 $2 \sim 3\text{ cm}$ 高时进行转瓶生根培养, 配方 $1/2\text{MS} + \text{IAA} 1.0 \sim 1.5\text{ mg/L}$ 、糖 30 g/L 、琼脂 7 g/L 。生根培养保持在 $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$, 每天光照 10 h , 直至生长出健壮的不定根。

1.2 茎尖微体嫁接脱毒

1.2.1 砧木培养 从新鲜果实中取出种子, 认真清洗, 然后晾干, 去掉种皮后接种于含 MS 无机盐的无激素琼脂培养基上, 在 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的环境条件下进行暗培养 2 周, 再转光照培养。过一段时间种子发芽, 让其自然生长, 一般待苗木高达 $3 \sim 4\text{ cm}$ 、生出 $4 \sim 5\text{ cm}$ 左右长的根系时使用。

1.2.2 茎尖选取 直接从选定的植株上取顶芽梢段进行消毒接种, 也可以在植株的休眠期剪取带休眠芽的枝条, 在温室内水培养一段时间, 待其发芽后采其芽梢段。剪取芽梢段 $3 \sim 5\text{ cm}$, 摘去大叶片, 在自来水下冲洗干净, 在 75% 酒精中浸泡 30 s 左右, 然后用 $1\% \sim 3\%$ 次氯酸钠溶液浸泡消毒 $10 \sim 20\text{ min}$, 最后用无菌水冲洗材料 $4 \sim 5$ 次备用。

1.2.3 嫁接 在超净工作台上, 同茎尖培养脱毒方法一样来剥取茎尖, 得到带 $1 \sim 2$ 个叶原基的生长点, 大小为 $0.1 \sim 0.3\text{ mm}$ 。然后从试管中取出砧木, 切去过长的根, 保留 4 cm 根长, 切顶留 1.5 cm 左右茎。在砧木近顶处一侧切一个“U”形切口, 深达形成层, 用刀尖挑去切口部皮层。将茎尖移置砧木切口处, 使茎尖紧贴切口横切面。微尖嫁接苗一般采用液体滤纸桥方式培养。事先在纸桥中开一小孔, 将砧木的根通过小孔植入液体培养基, 按常规光照培养管理。开始用较低光强 $800 \sim 1\,000\text{ Lx}$, 长出新叶后可提高光强。

2 试管苗移栽与管理

苗木培育成活后要进行出瓶移栽, 出瓶移栽技术环节非常关键, 移栽不当就前功尽弃, 另外出瓶后环境改变比较大, 要及时的进行管理。

2.1 出瓶移栽

2.1.1 时期 当试管苗高约 3 cm 并生有 $3 \sim 4$ 条 1 cm 左右长的新根时(嫁接苗根系可长至 $5 \sim 8\text{ cm}$), 即可进

行移栽。

2.1.2 移栽基质 基质可采用经过灭菌处理的腐叶、园土、蛭石按体积比以 $1:1:1$ 的比例配成的混合物。

2.1.3 出瓶方法 出瓶前一般要练苗 $3 \sim 5\text{ d}$, 然后再移栽。提前配制好 $40^{\circ}\text{C} \sim 45^{\circ}\text{C}$ 温度的温水, 出瓶时用镊子轻轻从瓶中夹出组培苗, 先在温水中将苗木根系黏附的琼脂洗掉, 然后将苗木的根系用 75% 的百菌清可湿性粉剂 500 倍液浸泡 10 min , 主要是为了减轻移栽病害发生。然后将苗木按一定的株行距栽植到事先准备好的基质容器中, 覆上薄膜。

2.2 苗木管理

移栽前期, 要将空气湿度保持在 $80\% \sim 90\%$ 间, 遮光率为 50% , 环境温度控制在 $12^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ 间。经 $1 \sim 2$ 个月的管理, 即可定植于富含腐殖质的砂质壤土中。山定子喜欢湿润的土壤环境。在定植时可以施用少量基肥, 随着小苗对外界环境的适应, 可每隔 $1 \sim 2$ 周追施一次稀薄液体肥料。山定子虽喜阳光充沛的环境, 但其试管苗定植后不可接受过强的日光照射, 应该采用先遮荫, 再逐渐增加光照的管理方法。其喜温暖、耐严寒, 最好将环境温度保持在 $18^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$ 间, 越冬温度不宜低于 0°C 。

参考文献:

[1] 裴文达. 园艺植物组织培养[M]. 上海: 上海科技出版社, 1999: 66 68.
[2] 罗士伟, 许智云. 经济植物组织培养[M]. 北京: 中国科技出版社 1998: 35 38.
[3] 韦三立. 花卉组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社 2001: 23 26.
[4] 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, 2000: 84 100.
[5] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科技出版社 1990: 358 359.
[6] 王清连. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社 2003, 151 152.
[7] 王凯基. 几种木本植物培养及器官发生[J]. 植物生理学通讯, 1982 4: 23 27.
[8] 王熊. 不同类型试管植物的培养[J]. 植物生理学通讯, 1981, 4: 13 17.
[9] 陈玉昌. 苗木育苗[M]. 北京: 中国林业出版社 1990: 75 78.
[10] 陈树国. 观赏园艺学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1991: 65 68.

