

金缘连翘组织培养技术的研究

李林蔓, 周广柱, 汪海岩, 胡忠伟, 齐冬博, 于佳

(沈阳农业大学林学院 110161)

摘 要: 研究以金缘连翘茎段为外植体, 探索金缘连翘组织培养快速繁殖的技术体系。通过对金缘连翘进行初代培养、继代增殖培养、生根培养和移栽, 金缘连翘外植体不同取材部位(如带腋芽的茎段、芽)及不同激素种类、浓度对芽诱导及增殖的影响, 培养基不同配方的影响的研究, 筛选出金缘连翘的最佳组织培养培养基配方。金缘连翘初代培养最佳培养基配方 MS+BA3.0mg/L+NAA0.08mg/L+IBA0.08mg/L; 愈伤组织增殖最佳培养基配方 MS+BA2.0 mg/L+IBA0.08mg/L+NAA0.08mg/L; 生根最佳培养基配方 MS+IBA0.04mg/L+NAA0.04mg/L+BA2.0mg/L。

关键词: 金缘连翘; 组织培养; 外植体; 培养基

中图分类号: S 685.24 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)05—0207—03

连翘为木犀科连翘属落叶灌木, 枝髓部中空或呈薄片状。叶对生, 单叶或少有羽状 3 出复叶, 有锯齿或全缘, 花 1~3 朵生于叶腋, 先叶开放; 萼 4 深裂; 花冠黄色, 深 4 裂, 裂片长于钟状筒部。段祖安^[1], 李师翁^[2], 张红梅等^[3] 分别以金脉连翘、叶子花、花叶连翘为材料研究了外植体不同取材部位对芽诱导及增殖的影响。结果表明, 采用嫩茎的中部茎段作外植体诱导率高, 分化增殖系数大。李会宁^[4,5], 苗青等^[6] 以贯叶连翘、黄栌为材料探索组织培养快速繁殖的技术体系, 分别得出了组织培养各环节的技术要点。李浚明^[7] 在植物组织培养教程中总结到木本植物的组织培养相对来说比较困难, 是组培中的一个难题。

1 试验材料和方法

1.1 供试材料

金缘连翘植株采自大连, 经沈阳农业大学植物园露地栽植及冬季温室栽植, 生长良好。用于该金缘连翘组织培养试验的实验试材就采自于这些金缘连翘植株, 外植体取带腋芽的嫩茎茎段和饱满的嫩芽, 嫩茎包括嫩茎基部、嫩茎中部和嫩茎梢部。

1.2 培养条件

试验培养条件为: 室温 25℃±1℃, 光照时间 11h, 光强 2 000~2 500Lx。

2 试验方法

2.1 初代培养

初代培养是观赏植物组织培养快速繁殖过程的基础,

也是决定组织培养成功与否的关键, 其目的是建立无菌材料, 并使外植体发育起来。

试验首先选取金缘连翘的带节茎切段作外植体, 选择最适的组织培养条件。

2.1.1 外植体处理 半木质化茎除去叶, 留一小段叶柄, 切割成 0.8~1cm 后, 用洗洁精浸泡 30min, 然后用自来水冲洗 120min, 将茎段置于 75%酒精中浸没 30s, 再用 0.1%升汞溶液浸泡 5~9min 五个梯度, 无菌水冲洗 5~6 次后, 置于无菌滤纸上, 吸干表面水分。以金缘连翘为外植体, 消毒方法如表 1, 升汞的处理时间设 5 个梯度, 5min, 6min, 7min, 8min, 9min, 15d 统计污染数, 污染率, 死亡数, 死亡率, 成活率。

表 1 金缘连翘外植体消毒处理梯度

序号	75% 酒精消毒	0.1% 升汞消毒	无菌水冲洗
	时间(s)	时间(min)	次数(次)
A	30	5	5~6
B	30	6	5~6
C	30	7	5~6
D	30	8	5~6
E	30	9	5~6

2.1.2 无菌材料的建立 试验 MS 培养基为 8 种不同浓度的 BA、NAA、IBA 的比例的配方(见表 2), 糖 30g/L, 琼脂 7g/L, 筛选最佳初代培养基配方, 建立无菌苗, 每瓶接种一个外植体。在第 20d 对侧芽作观察记载并进行统计。

2.2 继代增殖培养

在初代培养基础上, 获得的芽、苗数量有限, 不能充分发挥组织培养快速繁殖的优势, 需经继代繁殖以获取大量增殖材料。继代培养外植体为初代培养所得的茎段。

继代增殖培养主要是愈伤组织途径的增殖培养。将

第一作者简介: 李林蔓(1981-), 女, 沈阳农业大学硕士研究生, 园林植物与观赏园艺专业, 导师周广柱教授。

收稿日期: 2007-01-10

经初代培养获得的无菌且带腋芽的茎段和芽转接到分化培养基上,进行增殖培养。继代增殖约4~5周1次。

表2 BA、NAA、IBA不同浓度的MS基本培养基配方

	BA(mg/L)	NAA(mg/L)	IBA(mg/L)
I	1	0	0
II	1	0.04	0.04
III	1	0.08	0.08
IV	2	0.04	0.04
V	2	0.08	0.08
VI	3	0	0
VII	3	0.04	0.04
VIII	3	0.08	0.08

将经初代培养获得的无菌带腋芽的茎段和芽转接到8种不同浓度比例的BA、NAA、IBA的MS培养基配方(见表2)上,进行增殖培养。在第20d对愈伤组织作观察记载并进行统计。选择最佳增殖培养基配方。

2.3 生根培养

将丛生苗分成单株,切成1.5~2.0cm长的小苗接到8种不同浓度的BA、NAA、IBA的比例的MS培养基配方(见表2)上,10d后,小苗基部出现白色根突,随后逐渐伸长,小苗变壮,叶长大,叶片的彩色逐渐明显,20d左右即可开记录数据,统计每瓶生根数、根长、生根率等。

2.4 移栽

将试管苗放在自然光下练苗1周左右进行移栽,统计移栽成活率。

3 结果与分析

3.1 初代培养

3.1.1 不同消毒处理对外植体的影响 外植体材料接种培养后,在第15d对材料作观察记载并进行统计分析。统计结果见表4和表5。

表3 不同外植体部位与不同消毒处理时间对金缘连翘的影响

外植体	序号	接种外植体数(个)	污染数(个)	污染率(%)	死亡数(个)	死亡率(%)	成活率(%)
饱满嫩芽	A	16	10	62.5	1	16.7	83.3
	B	10	4	40	0	0	100
	C	16	6	37.5	1	10	90
茎段梢部	A	12	9	75	0	0	100
	B	13	8	61.5	1	20	80
	C	15	8	53.3	2	28.6	71.4
	D	15	7	46.7	2	25	75
	E	16	7	43.8	2	22.2	77.8
茎段中部	A	10	7	70	1	33.3	66.7
	B	20	13	65	1	14.3	85.7
	C	7	4	57.1	0	0	100
	D	16	7	43.8	5	55.6	44.4
	E	25	10	40	3	20	80
茎段基部	A	18	13	72.2	0	0	100
	B	25	17	68	2	25	75
	C	23	15	68.2	4	50	50
	D	11	6	54.5	0	0	100
	E	15	8	53.3	2	28.6	71.4

从表3、表4可以看出,随着0.1%升汞处理时间的增长,金缘连翘外植体茎段的饱满嫩芽、茎段梢部、茎段

中部和茎段基部的污染率都呈下降趋势,同时死亡率稍有升高,成活率降低。因此,升汞处理时间对污染率、死亡率和成活率有较大的影响。因为升汞不仅可以杀死菌类微生物,而且对活的生物细胞具有毒害作用,处理时间越长,升汞在外植体内积累就越多,毒害作用也就越大,导致死亡。因此,从试验结果分析来看,用0.1%升汞处理金缘连翘茎段选用7min比较适宜。

表4 不同消毒处理时间对金缘连翘外植体的影响

序号	接种外植体数(个)	污染数(个)	污染率(%)	死亡数(个)	死亡率(%)	成活率(%)
A	56	39	70	2	11.7	88.3
B	68	42	61.8	4	15.4	84.6
C	61	33	54	7	25	75
D	42	20	47.6	7	31.8	68.2
E	56	25	44.6	7	28	72

3.1.2 选择初代培养最佳培养基配方 经过65d的初代培养,初代培养最佳培养基配方为VIII MS+BA3.0mg/L+NAA0.08mg/L+IBA0.08mg/L。观察并记录试验数据,整理后见表5。

表5 培养基配方Ⅷ对外植体的影响

序号	植株高度	节间数	长势
1	3.8	3	好
2	4.5	4	好
3	2.4	2	好
4	5.3	5	一般
5	1.9	2	好
6	3.8	4	好
7	3.2	3	好
8	2.9	3	好
9	1.8	2	好
10	4.5	5	好
11	3.2	3	一般
12	1.6	2	一般
13	2.6	3	好
14	4.1	4	好
15	3.3	4	好
16	2.5	3	好
17	2.8	4	好
18	3.7	4	一般
19	1.5	2	好
20	2.7	3	好

3.2 继代增殖培养

经过65d的初代培养,将部分植株转接到8种配方培养基上(见表2),继代增殖培养最佳培养配方为V:MS+BA2.0mg/L+IBA0.08mg/L+NAA0.08mg/L。经20d的培养,观察并记录试验数据,整理后见表6。由表6可以得出金缘连翘愈伤组织途径增殖平均增殖倍数为21.8。

3.3 生根培养

把经过继代增殖培养的幼苗转接到8种配方培养基上(见表2),20d时就有第一批根长出,随后根的数量进一步增多,根逐渐伸长,生根培养基最佳培养配方为IV:MS+IBA0.04mg/L+NAA0.04mg/L+BA2.0mg/L。到30d左右统计生根培养基处理的生根率,结果见表7。从表7可以看出生根培养总株数为20株,生根株数为

16 株, 平均根长为 3~4.9cm 之间, 长势大多较好。根据生根率=(生根苗数/培养苗数)×100%, 由以上数据可以算出本实验生根率为 80%。

表 6 培养基配方V对外植体的影响

序号	植株高度	愈伤组织个数	长势
1	3.8	38	好
2	4.5	10	好
3	2.4	29	好
4	5.3	6	一般
5	1.9	2	好
6	3.8	60	好
7	3.2	23	好
8	2.9	15	好
9	1.8	45	好
10	4.5	8	好
11	3.2	18	一般
12	1.6	22	一般
13	2.6	3	好
14	4.1	30	好
15	3.3	14	好
16	2.5	8	好
17	2.8	80	好
18	3.7	20	一般
19	1.5	4	好
20	2.7	1	好

表 7 培养基配方IV对外植体的影响

序号	株高	生根数	平均根长(cm)	长势
1	2.6	5	4.4	好
2	3.7	4	4.7	好
3	2.9	6	4.3	好
4	4.1	8	3.9	好
5	3	0	0	好
6	3.2	6	4.2	好
7	2.3	0	0	好
8	4.3	9	3.9	一般
9	3.5	12	3.7	好
10	2.8	4	4.9	好
11	4.3	15	4.8	好
12	4.8	6	4.4	好
13	3.4	0	0	好
14	2.9	9	3.8	好
15	3.4	2	3.1	一般
16	4.2	13	3.9	好
17	2.8	0	0	好
18	3.6	9	4.6	好
19	4	5	3.6	好
20	3.5	10	4	好

3.4 练苗移栽结果与分析

试管内生根获得的幼苗一直在无菌环境下生长, 需要经过练苗驯化才能适应自然环境条件。当试管苗长至 5cm 左右, 将试管苗放在自然光下练苗 1 周左右, 再打开瓶盖练苗 3~4d。取出试管苗, 洗去根部培养基, 用 0.1%的多菌灵浸泡 3~5 min, 移栽到湿润的砂盘中, 移栽后 10d 内, 注意空气湿度的保持, 坚持每天喷水, 并用塑料薄膜罩住; 且要防止太阳直照。30d 后观测, 成活率可达 90%以上。

4 结论

根据上述试验结果与分析, 对金缘连翘组织培养得出以下结论: 用 0.1%升汞处理金缘连翘茎段选用 7min 比较适宜。金缘连翘初代培养最佳培养基配方 MS+BA3.0mg/L+NAA0.08mg/L+IBA0.08mg/L。愈伤组织增殖最佳培养基配方 MS+BA2.0mg/L+IBA0.08mg/L+NAA0.08mg/L。生根阶段的最佳培养基配方 MS+IBA0.04mg/L+NAA0.04mg/L+BA2.0mg/L, 生根率可达 80%以上, 且生根根数多。练苗移栽以砂土为好, 移栽成活率可达 90%以上。

参考文献:

[1] 段祖安, 齐建国, 张承庆. 金脉连翘的组培快速繁育研究[J]. 山东林业科技, 2000, 129(4): 22-24.
[2] 李师翁, 范小峰, 田兴旺, 等. 叶子花的组织培养与微繁殖技术研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(6): 992-996.
[3] 张红梅, 肖小琴, 及华, 等. 花叶连翘的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2001, 38(5): 36-37.
[4] 李会宁, 安育, 杨欣. 贯叶连翘的试管快繁研究[J]. 中国植物野生资源, 2002, 21(4): 61-63.
[5] 李会宁, 王存莲. 贯叶连翘的研究进展与可持续发展对策[J]. 汉中师范学院学报, 2000, 18(1): 79-82.
[6] 苗青, 曲波, 邵美妮, 等. 黄栌的组织培养研究[J]. 辽宁林业科技, 2005, 193(1): 16-17.
[7] 李俊明. 植物组织培养教程(第二版)[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001: 32-35.

A Study on Tissue Culture of Forsythia Jinyuan

LI Lin-man, ZHOU Guang-zhu, WANG Hai-yan, HU Zhong-wei, QI Dong-bo, YU Jia
(Institute of Forestry Shengyang Agricultural University, Liaoning 110161)

Abstract: This study takes *Forsythia Jinyuan* stems as planting outside body to explore *Forsythia Jinyuan* rapid propagation tissue culture technology system. Through early-generation training, following generation multiplication training, training to take root and actually, *Forsythia Jinyuan*, planting different body parts taken (such as belt axillary bud the stems, buds) and the different types of hormones, the concentration camp lure and multiplier effects of different media recipes impact studies, to select *Forsythia Jinyuan*'s best tissue culture technique. The results showed: optimal medium for *Forsythia Jinyuan* Stubbs stem elongation MS+BA3.0mg/L+NAA0.08mg/L+IBA0.08mg/L; best medium for injuries organizations multiplication MS+BA2.0mg/L+IBA0.08mg/L+NAA0.08mg/L; The optimal media for root formation MS+IBA0.04mg/L+NAA0.04mg/L+BA2.0mg/L.

Key words: *Forsythia Jinyuan*; Tissue culture; Outside plant hardware; Media