

洋桔梗无菌播种与植株再生体系的建立

金雪花, 杨 薇, 李有林, 孔祥莹, 彭春秀

(昆明理工大学 现代农业工程学院, 云南 昆明 650224)

摘 要:以无菌播种方式获得无菌苗, 以叶片为外植体, 建立了洋桔梗高效植株再生体系。研究了不同激素及组合对愈伤组织诱导、不定芽分化、增殖与不定根形成的影响。结果表明: MS+6-BA 0.1~0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 为愈伤组织诱导、不定芽分化的适宜培养基; MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.02~0.05 mg/L 为继代增殖适宜培养基; 1/2MS+IBA 0.5~1.0 mg/L 为不定根形成的适宜培养基。

关键词: 洋桔梗; 无菌播种; 植株再生; 激素

中图分类号: Q 949.776.4; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)05-0048-03

洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)为龙胆科观赏植物, 原产北美洲, 其花色丰富, 花形类似玫瑰, 无刺, 在日本有“无刺的玫瑰”之称, 日本每年消费量高达 9 000 万支以上^[1], 是国际上流行的切花品种。在我国各地也已开始广泛栽培。但洋桔梗种源主要是从国外进口 F₁ 杂种, 价格昂贵, 而且种子十分细小(19 000 粒/g), 播种技术难度大, 种子萌发缓慢, 发芽率较低, 而洋桔梗扦插繁殖系数比较低, 利用组织培养进行快速繁殖是满足国内洋桔梗种苗需求的重要途径之一^[2-3]。该研究对引进于日本的洋桔梗 F₁ 杂种进行无菌播种, 以获得的无菌苗的叶片为外植体进行组培研究, 探讨由叶片诱导不定芽到继代增殖、生根过程中外源激素的调控作用, 从而建立洋桔梗叶片再生体系, 为洋桔梗的种苗产业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为洋桔梗的 F₁ 杂交种子, 引自昆明立深新园花卉有限公司。

1.2 方法

1.2.1 种子无菌播种 洋桔梗种子用细纱布包裹, 用适量洗衣粉液浸泡 5~10 min, 自来水冲洗 5~10 min, 在超净台上用 70% 酒精浸泡 20~30 s 后, 用 0.1% HgCl₂ 浸泡 8~10 min, 无菌水冲洗 5 次, 每次 2~3 min, 用无菌滤纸吸干水分。然后接种于 1/2MS 培养基上进行发芽, 并培育成无菌苗。取无菌苗叶片, 切取 5 mm×5 mm 叶盘为外植体, 接种于 6-BA 与 NAA 不同浓度水平组合的培

养基中诱导愈伤组织与不定芽形成; 切取长为 0.5 cm 的不定芽为外植体, 接种于 6-BA 与 NAA 不同浓度水平组合的培养基中继代增殖; 取高 2 cm 的试管苗为外植体, 接种于 NAA、IAA、IBA 不同浓度水平的培养基中诱导生根。

1.2.2 培养基与培养条件 以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度梯度 6-BA (0.1、0.5、1.0 mg/L) 和不同浓度梯度 NAA (0.05、0.1、0.2 mg/L) 共 9 个组合进行愈伤组织和不定芽诱导; 再以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度梯度 6-BA (0.1、0.5、1.0 mg/L) 和不同浓度梯度 NAA (0.02、0.05、0.1 mg/L) 共 9 个组合进行继代增殖培养。最后以 1/2MS 为基本培养基, 附加 NAA (0.2、0.5、1.0 mg/L) 或 IBA (0.2、0.5、1.0 mg/L) 或 IAA (0.2、0.5、1.0 mg/L), 并以 1/2MS 为对照, 共 10 个处理进行不定根的诱导。以上培养基中均附加 3% 蔗糖, 0.9% 琼脂, pH 为 5.8。培养条件: 温度为 (24±1) °C, 光照强度为 1 800~2 000 lx, 光照时间为 14 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同激素水平对愈伤组织诱导、不定芽分化影响

将大小 5 mm×5 mm 叶盘放入诱导培养基, 培养 5 d 后, 大部分叶盘切口处膨大, 20 d 后, 大部分有明显的 不定芽。不定芽既可以从愈伤组织上产生, 也可以从叶片上直接产生。培养 30 d 后的试验统计结果见表 1。

由表 1 所示, 各激素组合均可以有效诱导洋桔梗叶片发生不定芽。叶盘不定芽分化率、每叶盘平均不定芽数, 随 NAA 浓度的增加, 有降低趋势, 而随 6-BA 浓度增加, 二者表现上升趋势(6-BA 0.1+NAA 0.05 外)。但 6-BA 浓度越高, 玻璃化现象越明显, 当 6-BA 浓度高于 0.5 mg/L 时, 有 70% 以上出现玻璃化现象。

第一作者简介: 金雪花(1974), 女, 硕士, 讲师, 主要研究方向为植物组织及细胞培养。E-mail: xh_kim@sina.com。

基金项目: 昆明理工大学 青年科研基金资助项目 (2007-4-7)。

收稿日期: 2008-12-20

表 1 不同激素水平对愈伤组织诱导、不定芽分化的影响

Table 1 Effects of different levels of hormone treatment on callus induction and adventitious shoot differentiation			
激素处理	处理叶盘数	叶盘不定芽分化率	每叶盘平均不定芽数
Hormone treatment	Numbers of treated plate/ 个	Adventitious shoot differentiation rate of plate/ %	Average adventitious shoot numbers of each plate/ 个·片 ⁻¹
6-BA 0.1+NAA 0.05	65	90.77	4.11
6-BA 0.1+NAA 0.1	64	46.88	1.38
6-BA 0.1+NAA 0.2	65	30.77	0.65
6-BA 0.5+NAA 0.05	64	75	3.98
6-BA 0.5+NAA 0.1	64	56.25	2.14
6-BA 0.5+NAA 0.2	65	46.15	1.06
6-BA 1.0+NAA 0.05	64	84.38	3.78
6-BA 1.0+NAA 0.1	61	73.77	3.38
6-BA 1.0+NAA 0.2	64	46.88	1.3

在试验中发现, 不管 6-BA 浓度如何, 当 NAA 浓度为 0.05 mg/L 时, 通常不定芽从叶片直接产生, NAA 浓度大于 0.05 mg/L 时, 从愈伤组织上产生。不经过愈伤组织而直接从切口处长出的不定芽, 只有 10% 出现玻璃化现象, 而经浅绿色愈伤组织分化来的不定芽, 有 30% 左右出现玻璃化现象, 经绿色或水泡状愈伤组织分化来的不定芽, 只有 10% 左右正常。综上所述, 适宜不定芽诱导培养基为: MS+6-BA 0.1~0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L。

2.2 不同激素水平对试管苗继代增殖的影响

将长 0.5 cm 的不定芽转入继代培养基上, 培养 10 d

表 2 不同激素水平对试管苗继代增殖的影响

Table 2 Effects of different levels of hormone treatment on sub-multiplication			
激素处理	样本数	增殖系数	平均苗高 Average
Hormone treatment	Samples numbers/ 株	Propagation coefficient	height of plantlets/ cm
6-BA 0.1+NAA 0.02	30	5.30	1.6
6-BA 0.1+NAA 0.05	32	4.84	1.8
6-BA 0.1+NAA 0.1	32	3.19	2.1
6-BA 0.5+NAA 0.02	31	4.84	1.3
6-BA 0.5+NAA 0.05	29	4.48	1.4
6-BA 0.5+NAA 0.1	31	3.29	1.5
6-BA 1.0+NAA 0.02	33	4.55	0.9
6-BA 1.0+NAA 0.05	30	4.53	1.1
6-BA 1.0+NAA 0.1	35	4.26	1.2

后, 切口处诱导出愈伤组织, 叶腋间有侧芽出现; 20 d 后, 所有处理叶腋间均长出侧芽; 30 d 后, 叶腋间的侧芽不断萌发、生长形成芽丛, 少部分不定芽从愈伤组织长出。培养 30 d 后的统计结果见表 2。由表 2 可见, 6-BA 浓度越高, 试管苗越矮, 长势越弱, 即 6-BA 有抑制试管苗生长的作用, 这与前人的研究一致^[3-4], 而且 6-BA 浓度越高玻璃化现象越明显, 因此, 6-BA 浓度不宜过高。NAA 浓度增加, 试管苗株高越高, 但 NAA 浓度增加, 增殖系数下降, 而 6-BA 在该试验浓度范围内, 对增殖系数的影响未看出明显规律。综上, 适宜壮苗继代增殖培养基为: MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.02~0.05 mg/L。

2.3 不同激素水平对生根的影响

待试管苗长到 2 cm 时, 从基部切下转入生根培养基, 培养 30 d 后的试验统计结果见表 3。表 3 表明, 在未添加激素的 1/2MS 培养基上也可以生出不定根, 但生根率低、根细、无根毛。NAA 处理时, 基部均先产生愈伤组织, 然后由愈伤组织长出不定根, 根短、细, 根毛少, 苗长势弱。生根率除 0.2 mg/L 外, 在 3 种激素处理中最低。IBA 处理时, 不定根直接产生于茎段切口处, 很少见明显愈伤组织, 根长、粗壮, 根毛多, 苗长势好, 且随着 IBA 浓度的增加, 生根率增高, 根数增多。IAA 处理时, 切口处能看到明显愈伤组织, 生根率较高, 但根毛较少。

综上所述, 适宜壮苗生根培养基为: 1/2MS+IBA 0.5~1.0 mg/L。

表 3 不同激素水平对生根的影响

Table 3 Effects of different levels of hormone treatment on root formation					
激素处理	样本数	生根率	平均根数 Average	平均根长 Average	不定根形态与苗的长势
Hormone treatment	Sample numbers/ 株	Rooting rate/ %	root number/ 条	root length/ cm	Growth of adventitious shoot shape and plantlet
NAA 0.2	40	57.5	7.1	2.3	根细, 根毛较少, 苗长势弱
NAA 0.5	40	15	5.2	0.9	根细, 根毛少, 苗长势弱
NAA 1.0	40	20	2.2	1.1	根细, 根毛少, 苗长势弱
IBA 0.2	40	47.5	6.1	4.0	根粗, 根毛较少, 苗长势强
IBA 0.5	40	82.5	7.2	3.8	根粗壮, 根毛多, 苗长势强
IBA 1.0	40	90.0	9.3	4.4	根粗壮, 根毛多, 苗长势强
IAA 0.2	40	62.5	8.8	2.8	根粗, 根毛较少, 苗长势强
IAA 0.5	40	77.5	3.8	3.9	根粗壮, 根毛较少, 苗长势强
IAA 1.0	40	87.5	6.4	3.6	根粗壮, 根毛少, 苗长势强
1/2MS(CK)	40	12.5	4.6	2.7	根细, 无根毛, 苗长势弱

3 小结

洋桔梗目前在欧洲、日本及美国的销量急速上升,我国各地现也竞相引种栽培,种苗市场需求量很大。但种子价格昂贵,细小播种难,加上从发芽到正常生长有3~4个月的停滞期,这段时间内,往往有大量的幼苗死亡,发芽率低,育苗困难,扦插繁殖也很困难。利用组织培养,可以在短期内繁殖大量优质种苗。

该试验结果表明:以无菌播种方式获得洋桔梗无菌苗,再以其叶片为外植体,愈伤组织诱导、不定芽分化的适宜培养基为 MS+6-BA 0.1~0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L;继代增殖适宜培养基为 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.02~0.05 mg/L;不定根形成的适宜培养基为 1/2MS+IBA 0.5~1.0 mg/L。

该试验中发现洋桔梗组培过程中玻璃化现象明显,6-BA 浓度高于 0.5 mg/L 时,玻璃化现象明显增多,而且发现 6-BA 对试管苗高生长有抑制作用。因此浓度应控制在 0.5 mg/L 以下。NAA 浓度高虽可以促进试管苗的高生长,但不利于增殖系数的提高,还有低浓度 NAA 可能使不定芽从叶片直接产生。

参考文献

- [1] 中国台湾省洋桔梗高价畅销日本[J]. 中国花卉园艺, 2005(3): 50.
- [2] 王爱玲. 洋桔梗的栽培[J]. 园林, 1999(3): 22-23.
- [3] 张子学, 丁为群, 乔华伟, 等. 洋桔梗的快速繁殖研究[J]. 中国林副特产, 2005(4): 1-3.
- [4] 傅玉兰, 杨海燕, 姚萍. 植物激素在洋桔梗组培快繁中的应用研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(10): 1847-1848.

Aseptic Seeding and Establishment of Plant-let Regeneration System in *Eustoma grandiflorum*

JIN Xue-hua YANG Wei, LI You-lin, KONG Xiang-ying, PENG Xiur-chun

(Faculty of Modern Agricultural Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: High frequency plant-let regeneration system were established in leaf culture of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), obtaining aseptic plant by means of aseptic seeding and using parts of the leaf as explants. Effect of different hormone and its combination on callus inducement, adventitious shoot differentiation, multiplication, adventitious root formation were studied. The results showed that MS basal medium supplemented with BA 0.1~0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L was suitable for callus inducement and adventitious shoot differentiation; MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.02~0.05 mg/L was suitable for sub-multiplication; 1/2MS+IBA 0.5~1.0 mg/L was suitable for adventitious root formation.

Key words: *Eustoma grandiflorum*; Aseptic seeding; Plant-let regeneration; Hormone

知识窗

春季保健消毒

随着春季的到来,各种病毒和细菌也开始大量滋生,各种各样的传染性疾病也开始多发。因此,进入春季不妨抽时间给居家消毒,以免影响健康。

1 室内空气消毒

春季是呼吸道传染病流行时期,因此室内通风非常重要。居家通风每次只需开窗 15~30 min,使空气流通,稀释局部病毒、细菌,减少感染病毒、细菌的机会。时间最好选择在中午。

2 被褥消毒

最佳方法是日晒,日光中的紫外线具有良好的天然杀菌作用。晒被褥要放在日光下直接晾晒,不可隔着玻璃窗,时间为 3~6 h 即可,最好在上午至中午。注意羽绒制品晒时不要拍打。

3 餐具消毒

在家庭中没有传染病人的情况下,清洗碗碟只要用洗洁精即可。要注意用流动水冲干净残留在餐具表面的洗涤剂。家庭中有消毒碗柜的,可将清洗干净的餐具放在消毒柜中消毒。

4 卫浴消毒

最佳方法是有效氯 1 000 mg/L 的含氯消毒溶液。含氯消毒溶液可以有效杀灭一些病毒,尤其当家里有人出现腹泻时,一定要注意给马桶、浴缸消毒。

5 其它消毒

此外,还要给地面、桌子、柜子表面、门把手、电话听筒等消毒。可以用加了清洁剂、洗涤剂的清水擦洗,也可用 500 mg/L 有效氯的含氯消毒溶液进行抹洗消毒。