

彩色马蹄莲组培过程中丛生芽诱导条件的优化

郑 柱, 商宏莉

(四川师范大学 生命科学院 四川 成都 610101)

摘 要:以黄花马蹄莲块茎作为外植体,从灭菌的时间和条件,不同激素含量的搭配,以及黄花马蹄莲的生长时间、外植体自身大小等因素,针对组培的前期环节改进和提高丛生芽的诱导率进行研究。结果表明:初代体系的建立以 500 倍 50%多菌灵稀释液处理 4 h,0.1%升汞溶液处理 13 min 污染率最低,将芽块切为直径 0.4~0.6 cm 的大小,接种至 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 2 mg/L 的诱导培养基上效果最好。使用不同生长时期彩色马蹄莲块茎进行诱导在前期的差异较大,经后期继代后差异减小。

关键词:彩色马蹄莲;丛生芽;诱导

中图分类号:S 682.2⁺64 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)06-0099-03

彩色马蹄莲(*Zantedeschia hybrid*)是马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica*)的近缘种,由于其花、叶皆佳,在国内外花卉市场深受欢迎,具有很大的发展潜力^[1]。自 20 世纪 80 年代以来,我国彩色马蹄莲的种植面积逐年扩大,但至今仍没有形成大的规模,其中主要的原因就是彩色马蹄莲的生长周期长,种球生长缓慢且价格昂贵(市场上普遍按直径大小计算,即 1 元/cm,某些地区甚至更高),自然花期较短导致种植者收不抵支^[2]。

通过组织培养进行彩色马蹄莲快速繁殖的技术在一些盛产彩色马蹄莲的国家已十分成熟,但是,由于国内引种时间不长,科研投入有限等原因,在彩色马蹄莲组织培养的过程中还存在许多问题。现主要从彩色马蹄莲外植体的最佳处理方式入手,包括灭菌时间和条件,不同激素含量的搭配,以及彩色马蹄莲的生长时间、外植体自身大小等因素,针对组培的前期环节改进和提高丛生芽的诱导率,以期对彩色马蹄莲的组培及规模化生产提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

试验材料为云南省茆晓园艺公司从荷兰引进的黄花马蹄莲(*Zantedeschia elliottiana*)的种球。

1.2 试验方法

1.2.1 灭菌时间处理外植体对污染率的影响 将块茎洗去泥土和最外层褐色表皮,围绕芽眼切下组织块,在肥皂水中浸泡 15 min 后,用流水冲洗 30 min,直接转入 75%的乙醇浸泡 30 s,再用 0.1%升汞溶液进行 11、13、

15、17 min 处理,无菌水清洗 4 次,再将块茎切成不同大小的小块接种于不同配方的 MS 培养基中。每处理接种 15 瓶,每瓶 3 块,设 2 次重复。2 周后观察外植体的褐化率、污染率,进行统计分析。

1.2.2 使用杀菌剂处理外植体对污染率的影响 同样的条件,从块茎上切下组织块后,以 500、1 000 倍 50%多菌灵稀释液进行浸泡灭菌,设 4、6、8 h 处理,取出后分别放入不同的容器,肥皂水中浸泡 15 min 后,用流水冲洗 30 min,直接转入 75%的乙醇浸泡 30 s,再用 0.1%升汞溶液处理,处理时间参照 1.2.1 的最佳灭菌时间。每处理接种 15 瓶,每瓶 3 块,设 2 次重复。2 周后观察外植体的褐化率、污染率,进行统计分析。

1.2.3 不同激素浓度对诱导外植体丛生芽的影响 以 MS 为基本培养基,蔗糖浓度 3%,粉状琼脂 0.7%,pH 值 5.8 附加不同浓度的 NAA 和 6-BA 作为诱导培养基。NAA 设 2 个浓度 0、0.1 mg/L,6-BA 设 4 个浓度 1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L。块茎经灭菌后接种于各培养基上,每处理 15 瓶,每瓶接种 3 块,设 2 次重复。培养温度 26℃左右,光照强度 1 600~2 000 lx,光照时间 16 h。接种后每 10 d 调查 1 次外植体诱导出丛生芽的数量和生长情况,25~30 d 根据生长情况进行继代。

1.2.4 不同生长时间、不同外植体大小对丛生芽诱导率的影响 根据黄花马蹄莲生长状况的不同,试验分别于 2007 年 10 月中旬(种球接近休眠期),2008 年 3 月中旬(种球刚开始萌发)、7 月中旬(生长旺盛阶段)进行,参照上述最佳灭菌处理时间和诱导培养基,其它培养基本条件相同,据带芽眼的组织块大小,分为直径 0.4~0.6 cm、0.8~1.0 cm 2 种规格,灭菌后接种于诱导培养基中。每处理 15 瓶,每瓶 3 块,重复 2 次。30 d 后记录各外植体的芽诱导率及生长情况。

第一作者简介:郑柱(1983-),男,在读硕士,现主要从事遗传育种与生物技术研究工作。E-mail: seamons1800@yahoo.com.cn.
收稿日期:2008-12-27

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对黄花马蹄莲外植体污染率的影响

如表 1 所示, 用升汞对黄花马蹄莲块茎的进行灭菌, 随着时间的加长, 污染率下降, 但同时褐化率的增长也逐渐加快。接种 7 d 后染菌的部分外植体在与培养基接触部位出现较多细菌, 部分为霉菌, 14 d 后灭菌 15、17 min 的块茎有外植体的表面部分出现明显的褐化及组织死亡症状。从提高接种成活率的角度看, 灭菌时间以 13 min 的效果最好, 但是对于该试验来说, 常规灭菌条件很难得到理想的灭菌效果。

表 1 灭菌时间对外植体污染率和褐化率的影响

消毒时间/min	污染率/%	褐化率/%
11	72	7
13	50	14
15	33	40
17	12	85

2.2 使用杀菌剂处理对减少污染率的影响

从表 2 来看, 使用 50% 多菌灵稀释液对减少彩色马蹄莲初代培养污染率有良好的效果, 污染率得到很好的控制, 而褐化率只是轻微增加。其 500 倍稀释液处理 4、6 h 后外植体都有较高的成活率, 分别达到 68% 和 66%, 使用 1 000 倍稀释液处理 6 h 后外植体成活率同样为 66%, 污染率较 500 倍液的处理稍高, 但褐化率稍有降低。由此来看, 使用杀菌剂对于处理块茎耗时短、方法简便、易于操作、且对于外植体的生长没有明显的抑制作用, 是一种可取的减少污染的方法。

表 2 50% 多菌灵稀释液处理外植体对污染率和褐化率的影响

多菌灵稀释倍数	灭菌时间/h	污染率/%	褐化率/%
500	4	14	18
	6	12	22
	8	6	40
1 000	4	28	15
	6	15	19
	8	9	31

2.3 不同激素浓度对诱导外植体丛生芽的影响

诱导芽的形成, 细胞分裂素 6-BA 是必需的, 形成芽数量多少取决于 BA 的浓度, 该试验与许多植物的研究结果相似^[3]。黄花马蹄莲的芽块接种后约 1 周, 芽开始伸长, 培养 2~3 周在芽周围开始形成丛生芽, 通过观察发现, 有的萌发部位并非是块茎的芽眼, 继续培养 4~5 周丛生芽逐渐长大并有个别芽发育成苗, 此时即可将丛生芽分割进行继代培养。由表 3 可知, 30 d 后, 不添加 NAA 单独以不同浓度的 6-BA 诱导丛生芽的效果较差, 其丛生芽的诱导率很低, 远不如添加了 0.1 mg/L NAA 的培养基。随着 6-BA 浓度的增加, 芽的诱导率明显增加, 但在 2.5 mg/L 浓度下其诱导效果不如 2 mg/L, 且由于细胞分裂过快, 芽体的质量有一定的下降, 少部分

芽体出现了玻璃化的现象。由表 3 的可知, MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 2 mg/L 较适合黄花马蹄莲丛生芽的诱导培养。

表 3 30 d 后不同激素浓度对丛生芽诱导的影响

激素组合		接种个数	丛生芽诱导个数	芽诱导率/%
NAA/mg · L ⁻¹	6-BA/mg · L ⁻¹			
0	1	32	40	125.0
	1.5	28	47	167.9
	2	30	55	183.3
	2.5	26	45	173.1
0.1	1	31	58	187.1
	1.5	25	61	244.0
	2	30	88	293.3
	2.5	30	74	246.7

2.4 不同生长时间、不同外植体大小对丛生芽诱导率的影响

从时间来看, 初代培养以 2008 年 3 月整体的培养效果最好, 7 月其次, 而 10 月份的结果最低, 可能和外植体在不同生长阶段内源激素含量不同有关。以接种外植体的大小来看, 0.4~0.6 cm 的规格诱导率较高, 0.8~1.0 cm 规格芽的诱导能力非常低, 但顶芽的生长速度更快, 可能与外植体吸收激素和营养物质的能力和分布的均匀性有关(见表 4)。不过, 对于 0.4~0.6 cm 规格的各组, 经多次继代以后, 芽诱导和增殖系数差距缩小, 特别是在第 3、4 次继代后, 平均芽增殖系数均超过 3.0。

表 4 30 d 后不同生长时间、不同外植体大小对丛生芽诱导率的影响

起始时间	规格/cm	接种个数	丛生芽诱导个数	芽诱导率/%
2007.10	0.4~0.6	34	87	255.9
	0.8~1.0	28	48	171.4
2008.03	0.4~0.6	30	89	296.7
	0.8~1.0	31	68	219.4
2008.07	0.4~0.6	27	75	277.8
	0.8~1.0	26	50	192.3

3 讨论

彩色马蹄莲的组培环节较多, 受影响的因素也有很多, 目前国内不少彩色马蹄莲品种已有较为成熟的组培方法, 得以大规模的生产, 但是仍然无法满足市场的需求, 深入研究不同品系的在组培过程中的差异性, 还有待进一步加强。

除白色马蹄莲外, 彩色马蹄莲及其它杂交品种都较易感病, 且至今没有特效的农药能抑制^[4]。该试验所购买的黄花马蹄莲(*Zantedeschia elliottiana*), 在初代培养环节使用 50% 多菌灵稀释液进行灭菌处理, 可得到较低的污染率。使用相同的处理方法对白色马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica*)进行了试验, 相比之下, 白色马蹄莲在常规灭菌条件下(0.1% 升汞溶液处理 11~13 min)即可得到较高的无污染率, 可能是由于彩色马蹄莲材料自身

带菌较多,而常规的升汞和次氯酸钠溶液均属表面杀菌剂,作用不大;多菌灵属内吸性杀菌剂,能在一定程度上抑制或杀死植物体内的细菌。除了使用杀菌剂,彩色马蹄莲在建立初代培养体系的灭菌方法还有不少研究,例如李国义将彩色马蹄莲种球用蛭石在花盆中进行无土栽培1个月,切取块茎后进行常规灭菌,其外植体污染率相比原栽培土壤降低一半以上^[3]。针对不同品系、不同生长状况和来源的彩色马蹄莲块茎,利用多种有效的灭菌方法进行研究,抑制材料表层的外生菌以及内生细菌的生长,得到适宜的建立初代培养体系的条件,有利于获得大量的无菌苗。

与其它植物的离体培养相似,外源激素仍是影响彩色马蹄莲丛生芽诱导的主要因素之一^[4]。需要指出的是,不同品种的彩色马蹄莲在同样培养条件下,其芽诱导率有很大差异,外源激素的用量没有一定的标准。例如范加勤等在对几个彩色马蹄莲品种进行离体培养中发现,相同的培养条件下,奇妙、浮雕宝石、感觉几个彩色马蹄莲的组培的增殖系数比其它品种高^[7]。该试验

黄花马蹄莲在添加1.5~2 mg/L 的 6-BA 和 0.1 mg/L 的 NAA 能显著促进其丛生芽的大量诱导和增殖。在适宜的条件下,使无菌块茎直接发生粗壮的丛生芽,后期通过添加适宜、适量的激素进行丛生芽的增殖,有利于探索出彩色马蹄莲品种的快速、高效的离体培养途径。

参考文献

[1] 刘青林,马伟.花卉组织培养[M].北京:中国农业出版社,2003.
[2] 张璐萍,张素芳.萘乙酸(NAA)在彩色马蹄莲种球培育中的作用[J].中国种业,2007(3):31-32.
[3] 林荣,王秀琴.马蹄莲组织培养和快速繁殖[J].广西植物,1989,9(2):97-102.
[4] 周涤,吴丽芳.马蹄莲研究进展[J].中国农学通报,2006,22(9):284-290.
[5] 李国义.彩色马蹄莲组培快繁研究[D].哈尔滨:东北农业大学硕士学位论文,2003.
[6] 彭峰,陈嫣嫣.彩色马蹄莲 Parfait' 不定芽诱导增殖培养条件的优化和筛选[J].植物资源与环境学报,2006,15(2):47-49.
[7] 范加勤,张雯雯.几个彩色马蹄莲品种的离体培养与快速繁殖[J].南京农业大学学报,2005,28(2):28-31.

Optimization on the Induction Conditions of Caespitose Shoots From *Zantedeschia hybrid* in Tissue Culture

ZHENG Zhu, SHANG Hong-li

(College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610101, China)

Abstract: *Zantedeschia eliotiana* tubers were cultured on MS medium as test materials. The research was concerned with different factors which including sterilization times and conditions, contents of hormone, growth times of plants and sizes of explants to improve the prophase link in tissue culture and raises the inductivity of adventitious buds. The result indicated that: immerse the tuber in 50% carbendazim by 500 times water in 4 hours and then in 0.1% mercury bichloride solution in 13 minutes had the lowest rate of pollution in primary culture. Tubers about 0.4~0.6 cm in diameter on MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 2 mg/L had the best effects on inducing caespitose shoots. Tubers from different growth times of *Zantedeschia eliotiana* had different inductivities in primary culture, but the differences reduced after several successive transfer cultures.

Key words: *Zantedeschia hybrid*; Caespitose shoots; Induction