

# 四种补血草组织培养的比较研究

徐美隆<sup>1,3</sup>, 李永华<sup>2,3</sup>, 吴建华<sup>1,2</sup>

(1. 种苗生物工程国家重点实验室, 银川 宁夏 750004; 2. 国家经济林木种苗快繁工程技术研究中心, 宁夏 银川 750004;

3. 宁夏林业研究所(有限公司), 宁夏 银川 750004)

**摘要:**以叶片和带腋芽的花茎为外植体对不同补血草品种(P104、UH4、429、867)进行组织培养比较研究。结果表明:在培养基 MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.6 mg/L 上,品种均能通过带腋芽的花茎分化出芽,出芽率依次为 P104>UH4>867>429,但污染严重;“情人草”品种 P104、UH4 能通过叶片诱导出愈伤组织,而“勿忘我”品种不能;在生根培养基 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+Vc 200 mg/L+PP<sub>33</sub> 0.2 mg/L 中,4 个品种均能生根,其生根率依次为 P104>UH4>429>867。

**关键词:**补血草;组织培养;品种差异;比较研究

**中图分类号:**S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)02-0157-04

补血草(*Limonium*)属蓝雪科(*Plumbaginaceae*)多年生或 2 a 生草本植物,该属有近 20 种可作观赏用。因其花朵细小,干膜质,色彩淡雅,观赏时期长,与满天星一样,是重要的配花材料。除作鲜切花外,还可制成自然

干花,用途更为广泛,是近年来发展较快的一类新型配花类鲜切花。当前,补血草属植物作为各种类型插花作品的优良配花正受到越来越多的人喜爱。

补血草属植物一般采用种子繁殖。但补血草属植物的遗传性十分特殊,其花粉有 A、B 型之别,柱头有玉米状、乳头状和头状之分,其杂交亲和性取决于花粉和柱头的形态组合;同时补血草具有大量的不孕枝和同型杂交不孕的特性,种子结实少,所以补血草若用种子繁殖,种子来源的可靠性就限制了批量生产<sup>[1]</sup>。当前,植

**第一作者简介:**徐美隆(1979—),男,四川大竹人,硕士,助理研究员,现主要从事植物组织培养方面研究工作。E-mail: xml1106007@163.com。

**收稿日期:**2009-08-20

- [5] 吴京姬,吴基日,吴松权,等.桔梗花药培养初报[J].植物研究,2008,28(1):79-81.
- [6] 张美萍,申家恒,管贺群.桔梗胚胎学研究[J].吉林农业大学学报,1992,14(2):31-34.
- [7] 杨九艳,王连侠,李凤云.桔梗的染色体核型分析[J].内蒙古医学院

学报,1998,20(3):185-186.

- [8] 赵华,杨培君,李慧宁.三种植物染色体组型分析[J].汉中师范学院学报(自然科学),2004,22(1):70-73.

- [9] 朱徵.植物染色体及染色技术[M].北京:科学出版社,1982:42-93.

## Preliminary Study of Ovule Culture of *Platycodon grandiflorum*

WU Jing-jie<sup>1</sup>, YAN Yi-zi<sup>2</sup>, WU Song-quan<sup>2</sup>, PIAO Xue-mei<sup>2</sup>, WU Ji-rui<sup>2</sup>

(1. Yanbian Agricultural Research Institution of Biological, Longjing, Jilin 133400; 2. Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

**Abstract:** Ovule of *Platycodon grandiflorum* growing to of different length was inoculated in four differentiation culture medium and induced callus, the induced callus was transfered in differentiation culture, trying to get haploidy in this study. The results showed that the culture medium of the highest (82.9%) induced rate of callus was N<sub>6</sub>+2,4-D 1 mg/L+6-BA 0.2 mg/L; induced rate the highest (82.4%) from ovule to 1.8 cm length flower bud, the highest differentiation rate was 74.5%; in the culture of N<sub>6</sub>+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L, puny green plant in differentiation was haploid with the result of chromosome number of root.

**Key words:** *platycodon grandiflorum*; ovule culture; haploid

物组织培养技术已成为植物快速繁殖和作物品种改良的重要手段<sup>2-3</sup>,为克服种子繁殖所带来的缺点,近年来国内外正在研究采用组织培养方法来繁殖补血草。在前人的基础上对补血草属植物不同品种组织培养快速繁殖进行较为全面和深入的研究,为补血草属植物工厂化组培快繁提供尽可能多的技术参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

情人草(杂种补血草 *Limonium latifolium*)品种 P104、UH4 穴盘苗,勿忘我(深波叶补血草 *Limonium sinuatum*)品种 429、867 穴盘苗,均由宁夏林业研究所(有限公司)从日本引进。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 消毒处理** 在大田或温室中分别选取补血草品种 P104、UH4 和 429、867 生长健壮、无病虫害的母株带腋芽花茎和幼嫩叶片为试验材料,用洗衣粉刷洗表面,自来水冲洗 2 h。70%酒精消毒,叶片 45 s 至 1 min,花茎 1 min,再用 0.1% 的升汞消毒叶片 5~6 min,花茎 6~8 min,无菌水冲洗 4~5 次,无菌滤纸吸干多余水分备用。

**1.2.2 芽的诱导** 以品种 UH4 为代表进行芽诱导试验,然后将最适合该品种芽诱导的培养基应用于其它品种中。将消毒处理过的叶片切割成 1 cm×1 cm 左右大小的切块,花梗以带有 1 个腋芽为切段。叶片背面接触培养基,花茎形态学下端直接插入培养基,分别接入下列培养基: 1: MS+6-BA 0.5 mg/L; 2: MS+6-BA 1.0 mg/L; 3: MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.05 mg/L; 4: MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.6 mg/L; 5: MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L。以上培养基琼脂浓度均为 0.7%,蔗糖浓度均为 30 g/L, pH 6.0(下同)。培养 3 周后分别统计其污染数、褐化数、成愈数、出芽数。

**1.2.3 生根培养** 以品种 P104 为代表进行生根试验,然后将最适合 P104 的生根培养基应用于其它补血草品种中。当芽长至 2~3 cm 时,将芽接种于生根培养基中,2 周后统计生根率、根数、根长。生根培养基配方: 08.1: 1/2MS+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.2 mg/L+Vc 200 mg/L; 08.2: 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 0.2 mg/L+Vc 200 mg/L; 08.3: 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.6 mg/L+Vc 200 mg/L+PP<sub>333</sub> 0.2 mg/L; 08.4: 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+Vc 200 mg/L+PP<sub>333</sub> 0.2 mg/L。

**1.2.4 试管苗的移栽和定植** 当株高长至 2.5~3.5 cm, 2 条根以上时进行试管苗的移栽。首先,将试管苗连同培养瓶一起移至智能温室练苗 1 周。移栽前 1~2 d, 打开瓶盖,然后用镊子小心取出试管苗,洗净根部琼脂,用 800 倍代森锰锌溶液浸泡 1~2 min,移栽

于 128 穴盘中,其中基质成分为:草炭:蛭石:珍珠岩=5:3:2,移栽后 7 d 内保持温度(25±2)℃,湿度 85%~90%,以后逐渐降低温度和湿度至智能温室室内自然状态。移栽后 10 d 在叶面喷施肥 0.2%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,然后每 7 d 交替喷施 0.2%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和 0.2%尿素。当长至 6~8 片叶片时即定植。

**1.2.5 培养条件** 如无特别说明,培养条件均为温度(25±2)℃,光照 14 h/d,光照强度 2 000~3 000 lx。

**1.2.6 统计方法** 研究中的数据分析和制图采用 Excel 2003 和 DPS3.01 等软件进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱导分化

由表 1 可知,以花茎为外植体, UH4 能在各种培养基中分化出芽,但由于培养基成分不同,其芽分化存在显著差异,其中 4 号培养基中出芽率最高。但花茎外植体在芽诱导过程中有较高的污染率,平均达到 60.22%,同时伴随有 22.17%的褐化率,说明在外植体消毒过程中,消毒剂的浓度和消毒时间已经达到相当高度,如此高的污染率可能与花茎材料本身带菌程度有关。

以叶片为外植体时,污染率明显低于花茎,但仅有 2 号和 5 号培养基能诱导出愈伤组织(表 2)。虽然 UH4 在 2 号培养基上的出愈率最高,但该培养基上诱导出的愈伤组织没有芽点,不利于后期芽的分化,而 5 号培养基上诱导出的愈伤组织有芽点,因此,初步确定 5 号培养基比较适合 UH4 叶片诱导。

表 1 UH4 花茎芽分化情况

品种	培养基	培养时间 /d	污染率 /%	褐化率 /%	出芽率 /%
UH4	1	21	72.5	26.4	60.2 bc
	2		64.7	19.0	52.0 c
	3		43.8	27.5	68.4 b
	4		52.4	25.6	81.0 a
	5		60.0	36.7	53.4 c



图 1 429 叶片芽诱导情况

将其它补血草品种的花茎和叶片外植体分别接种在 4 号和 5 号培养基上。在 4 号培养基上,各品种花茎

外植体都能分化出芽,但不同品种花茎外植体出芽率存在显著差异(见表 3),与 UH4 一样,不同品种花茎外植体接种都表现出污染率、褐化率偏高的现象。

表 2 UH4 叶片诱导芽情况

品种	培养基	培养时间 d	污染率 %	褐化率 %	出愈率 %	有无芽点
UH4	1		22.2	45.6	0	
	2		18.5	12.7	82.50	无
	3	21	31.6	49.3	0	
	4		25.4	50	0	
	5		24.2	18.5	71.40	有



图 2 UH4 叶片芽诱导情况

相对花茎外植体而言,以叶片作为外植体时,在 5 号培养基中“情人草”品种 UH4、P104 能诱导出芽,且污染率和褐化率都较花茎外植体要低,但不同品种之间,出芽率存在显著差异(表 4),而“勿忘我”品种 429、867 均不能诱导出芽。

表 3 不同品种花茎诱导情况

品种	商品名	培养基	培养时间 / d	污染率 / %	褐化率 / %	出芽率 / %
UH4	情人草			0.52	0.26	0.81
P104				0.50	0.31	0.90
429	勿忘我	3	21	0.42	0.25	0.63
867				0.42	0.28	0.79

2.2 生根培养

将 2 cm 左右的 P104 不定芽接种在设计好的各种培养基中,2 周后统计结果,除了培养基 08.2 以外,P104 在其它培养基均能生根,但在不同培养基中,其生根率、根数、根长存在显著差异(表 5),其中 08.4 培养基上生

根率和根数都显著高于其它培养基,植株生长健壮,初步确认培养基 08.4 最适合 P104 的生根。

将其余供试品种不定芽接种在 08.4 号培养基中,各品种之间存在显著差异,“情人草”系列品种在 08.4 培养基上的生根情况表现良好,生根率在 70%以上,且根数较多,而“勿忘我”系列品种在 08.4 培养基上的生根情况表现较差,生根率仅在 50%以下,根数较少(见表 6)。

表 4 叶片诱导情况

品种	培养基	培养时间 d	污染率 / %	褐化率 / %	出愈率 / %	出芽率 / %
UH4			24.200	18.500	0.714	a
P104			21.500	9.600	0.991	b
429	5	21	39.400	68.300	0.000	c
867			35.200	59.800	0.000	c

表 5 P104 在不同培养基中的生根情况

品种	培养基	生根率 %	根数	根长
P104	08.4	88.5	A	22.2
	08.1	84.4	A	2.9
	08.3	54.7	B	18.5
	08.2	0	C	0

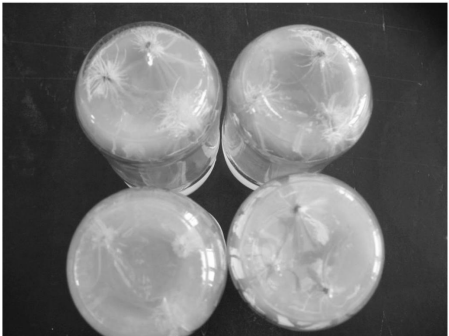


图 3 P104 在不同培养基上的生根

表 6 不同品种生根情况

品种	商品名	培养基	生根率 / %	根数 / 条	根长 / cm
P104	情人草	08.4	88.5	a	22.2
UH4			70.1	b	4.7
429	勿忘我		46.2	c	1.6
867			39	c	2.3



图 4 补血草的移栽情况



图 5 补血草的定植情况



图 6 补血草试管苗生产

### 2.3 移栽定植

补血草属植物试管苗 1 000 株批次移栽成活率达到 90% 以上(图 4), 定植成活率达到 90% 以上(见图 5)。目前, 通过该方法体系累计生产补血草试管苗 21 万株。

### 3 讨论

在植物组织初代培养中, 污染直接影响无性系建立的速度<sup>[4]</sup>。就外植体而言, 污染主要原因一种是外植体组织本身带菌, 另一种是外植体体表杀菌不彻底。该研究中补血草花茎外植体污染较严重, 可能是因为花茎外植体组织本身带菌的原因。

基因型对试管苗再生能力的影响较大, 外植体类型对组织培养和试管苗产生的影响也受到了普遍重视<sup>[5]</sup>。由于基因型不同而导致的植物组织培养中各品种的再生能力不同, 这在其它很多植物组织培养的研究中得到了证实<sup>[6-7]</sup>。该试验进一步证明了补血草属植物由于品种的差异, 其再生能力存在显著的差异, 甚至同一品种不同器官, 其再生能力也存在显著差异。

在植物组织培养过程中, 植株激素的种类和浓度都将影响愈伤组织的诱导、芽分化、生根等各个环节<sup>[8-9]</sup>。在补血草组织培养中, 低浓度的 6-BA 适合带腋芽花茎外植体芽的诱导, 而高浓度的 6-BA 适合叶片外植体愈

伤组织的诱导。这可能是植物不同组织器官内源激素存在明显差异的结果。由于腋芽分化程度相对较低, 高浓度的 6-BA 反而会抑制芽的诱导; 而叶片分化程度相对较高, 只有高浓度的 6-BA 才能进行脱分化。

### 参考文献

- [1] 冯晓英. 勿忘我组织培养快速繁殖研究[J]. 贵州农业科学, 2002, 30(1): 9-13.
- [2] 黎外奎, 陈幼竹, 周宇. 肝片吸虫抗原基因转基因苜蓿再生的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2003, 40(1): 144-147.
- [3] Mesfin T, Stephen J T, Deboran L A, et al. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum[J]. Plant Physiology, 2001, 127: 1836-1844.
- [4] 刘跃成, 刘月, 廖玲玲. 不同品种一品红愈伤组织诱导能力初步研究[J]. 安徽技术师范学院学报, 2004, 18(5): 39-43.
- [5] 于惠敏, 石竹, 杨俊杰. 番茄的不同基因型对组培植株再生能力的影响[J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 2007, 22(4): 120-121.
- [6] 谭和平, 余桂容, 杜文平. 不同茶树品种组培快繁技术研究[J]. 西南农业学报, 2003, 16(1): 102-104.
- [7] 沈周高, 项艳, 蔡诚. 3个杨树品种叶片再生体系的建立[J]. 中国农学通报, 2006, 22(11): 90-96.
- [8] 田志强. 植物激素对大花蕙兰组培快繁的影响[J]. 北方园艺, 2008(5): 205-206.
- [9] 孙爱花, 李哲, 黄天带. 植物激素(或生长调节物质)在橡胶树组织培养中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(3): 593-596.

## Comparative Analysis of Tissue Culture Efficiency in Four Varieties in *Limonium*

XU Mei-long<sup>1,3</sup>, LI Yong-hua<sup>2,3</sup>, WU Jian-hua<sup>1,3</sup>

(1. State Key Laboratory of Seedling Bioengineering, Yinchuan, Ningxia 50004; 2. National Center of Economic Forest Seedling Speediness Propagation Engineering and Technology, Yinchuan, Ningxia 750004; 3. Ningxia Forestry Institute(Limited Company), Yinchuan, Ningxia 750004)

**Abstract:** Blades and flower stalks with axillary buds were used as explants to compare the difference of tissue culture of four *Limonium* varieties(P104, UH4, 429, 867) by scales in vitro. The results showed that buds can be induced from the flower stalks with axillary buds of the four *Limonium* varieties can be obtained buds in the induction medium(MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.6 mg/L). The induction rate order, from higher to lower level, was P104, UH4, 867 and 429. But all of the varieties in the experiment had a high contamination rate. Blades of *L. latifolium* varieties can be induced to from callus but *L. latifolium* varieties can not. At the same time, all the varieties can be form roots in the rooting medium (1/2MS+IBA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+Vc 200 mg/L+PP333 0.2 mg/L), but the root formation rates were significantly difference.

**Key words:** *Limonium*; tissue culture; variety difference; comparative study