

香雪球离体培养及植株再生体系的建立

袁秀云¹, 张先云¹, 马杰¹, 侯晓芳²

(1. 郑州师范高等专科学校 生物技术研究所, 河南 郑州 450044; 2. 辉县市高级中学 河南 辉县 453600)

摘要: 对香雪球无菌苗的叶片及茎段离体培养及植株再生过程进行研究, 建立香雪球再生体系。结果表明: 香雪球茎段最适作为外植体进行诱导培养; MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 可作为诱导愈伤组织的最适培养基; 愈伤组织及不定芽继代的最适培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L; 最适生根培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg/L+Ac 0.1%

关键词: 香雪球; 离体培养; 再生体系

中图分类号: S 681.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0145-02

香雪球 (*Lobularia maritima* (L.) Desv.) 属十字花科香雪球属草本植物^[1], 又名香芥、庭芥, 原产欧洲地中海沿岸。香雪球植株矮小而多分枝, 总状花序顶生, 密集成球状, 有白、淡紫、深紫、紫红等色, 花开时似绒毯一般, 香气清雅, 又耐干旱, 适应性较强, 为优美的岩石园花卉, 可作地被或花坛、花境边缘的镶边植物, 也可盆栽或作窗台花卉; 香雪球是镍超富集植物, 体内可以耐受有1%的镍金属的成分^[2], 随着对植物修复污染土壤技术的研究, 目前已发展为商业用修复和检测金属富集植物。香雪球一般用种子繁殖, 收集种子及大量繁殖受季节限制。通过离体组织培养技术, 可以打破季节的限制, 快速获得大量种苗; 同时, 通过遗传转化技术培育新品种也需要高效的离体再生体系作为基础, 因此香雪球离体培养及植株再生体系在园林绿化、美化及生态修复中有长远的应用前景。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为香雪球种子购自郑州市陈寨花卉市场。

1.2 试验方法

- 1.2.1 无菌播种 将种子用自来水浸泡 1~2 h 后, 先用 75% 的酒精表面灭菌 30~60 s, 用无菌水冲洗 3 次, 再用 0.1% 氯化汞溶液进行表面灭菌 6 min, 灭菌后用无菌水冲洗 5~6 次, 接种在 1/2MS 基本培养基中进行萌发。
- 1.2.2 诱导及增殖培养 将无菌苗的茎段切割成 1 cm 的小段, 叶片切割成 0.5 cm×1 cm 的小片, 分别接种于 1~3 号培养基中(见表 1), 观察诱导情况, 待不定芽或愈伤组织诱导至一定程度分别于 4~6 号培养基中用于继

代增殖培养。

1.2.3 生根培养 将高 2~6 cm 的植株分别接种于 7~9 号培养基中用于生根培养。

1.3 试验结果统计方法

诱导率=诱导愈伤组织的外植体数/培养的外植体数×100%; 分化率=愈伤数/总愈伤数×100%; 增殖倍数=不定芽或愈伤组织继代数/接种数; 生根率=生根苗数/培养苗数×100%。

1.4 培养条件

所有培养条件均为: 培养温度 (25±2) °C, 光照强度 2 500 lx, 光照时间 12 h/d; 所用培养基添加蔗糖 0.3%, 琼脂 0.8%, pH (5.8±0.1)。

表 1 培养基的类型

编号	用途	激素组合
1	诱导	MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L
2		MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L
3		MS+6-BA 4 mg/L+NAA 0.1 mg/L
4	继代	MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L
5		MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.05 mg/L
6		MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.05 mg/L
7	生根	1/2MS+IBA 0.5 mg/L+Ac 0.1%
8		1/2MS+NAA 0.1 mg/L
9		1/2MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L+2,4-D 0.01 mg/L

2 结果与分析

2.1 无菌苗的形成

香雪球种子在 1/2MS 培养基中 7 d 时萌发, 长出胚根和胚芽, 逐渐长成无菌苗, 25 d 时无菌苗高 5~7 cm。

2.2 愈伤组织的诱导

2.2.1 茎段的诱导 在 3 种培养基中, 茎段均能产生愈伤组织, 诱导率均达 100%, 但产生的愈伤组织状况不同(见表 2)。在 1 号培养基中, 7 d 时茎段膨大, 14 d 时产生淡绿色愈伤组织, 30 d 时愈伤组织直径达 1~1.5 cm (见图 1); 在 2 号和 3 号培养基中, 产生愈伤组织的速度稍快, 且愈伤组织逐渐发黄。35 d 左右, 在愈伤组织上出现绿色小点, 并逐渐分化出不定芽。如果继续培养, 不定芽会继续长大长高, 同时没有分化出不定芽的愈伤

第一作者简介: 袁秀云(1970-), 女, 河南许昌人, 博士, 副教授, 现主要从事植物生物技术方面的研究工作。E-mail: yuanyuyun@163.com.

基金项目: 郑州市重点科技攻关资助项目 (051SGDS17017)。

收稿日期: 2009-12-04

组织变黄死亡。在 1~3 号培养基中, 随着 6-BA 浓度增大, 愈伤组织产生的多、快, 但愈伤组织疏松, 分化率降低。

表 2 不同培养基对外植体诱导的影响

编号	茎段		叶片	
	愈伤组织状况	诱导率	愈伤组织状况	诱导率
1	100%	淡绿色; 组织致密; 90% 能够分化	65%	淡绿色; 组织致密; 70% 能够分化
2	100%	淡绿色至黄绿色; 65% 能够分化	85%	淡绿色至黄绿色; 55% 能够分化
3	100%	黄绿色; 组织疏松; 10% 能够分化	85%	黄绿色; 组织疏松; 5% 能够分化

2.2.2 叶片的诱导 与茎段的诱导相比, 叶片的诱导速度较慢。在 7 d 左右边缘开始卷曲翘起, 15 d 时在基部开始出现淡绿色的愈伤组织。在 1 号培养基中, 愈伤组织的诱导率为 65%, 愈伤组织淡绿色, 组织致密, 45 d 时愈伤组织直径约 1~1.5 cm; 如果继续培养, 可在愈伤组织中出现绿色小点, 继而分化, 分化率 70% 左右; 在 2 号和 3 号培养基中, 愈伤组织的诱导率增大, 但愈伤组织逐渐变黄, 且分化率降低 (见表 2)。



图 1 愈伤组织 图 2 不定芽 图 3 生根苗

2.3 愈伤组织和丛生芽的继代培养

在芽体出现之前将愈伤组织切割, 分别接种于 4~6 号培养基中, 愈伤组织小块可继续增殖。在 4 号培养基中, 22 d 时增殖系数约 4.8, 愈伤组织淡绿色, 致密, 继续培养 7 d 左右开始分化产生不定芽, 最终分化率达 100% (见图 2); 在 6 号培养基中, 产生的愈伤组织更多, 但色黄, 不定芽产生的少, 分化率只有 25%; 在 5 号培养基中, 愈伤组织也为淡绿色, 形成的较 3 号的快, 也产生较少的不定芽, 分化率为 55%。

将愈伤组织产生的不定芽分割也接种于 4~6 号培养基中, 结果表明, 在 4 号培养基中, 22 d 时产生大量不定芽, 增殖系数达到 6.5, 不定芽基部有少量愈伤组织, 而在 6 号培养基中, 不定芽基部也产生少量愈伤组织, 但产生不定芽较少, 增殖系数最高为 2.0, 且不定芽逐渐

变黄, 下部叶片脱落, 不定芽逐渐死亡; 在 5 号培养基中, 不定芽的增殖系数约为 3.5, 不定芽长势次于 4 号, 但好于 6 号。

2.4 不定根的诱导

将继代培养的株高为 5~6 cm 的不定芽分割, 分别接种于 7~9 号培养基中进行生根诱导, 结果发现, 在 7 号培养基中, 7 d 时在不定芽基部, 培养基表面上产生少量白色绒毛, 14 d 时白色绒毛逐渐增多, 围绕整个不定芽基部, 30 d 时在培养基中产生大量不定根, 不定根最长约 5 cm (见图 3), 生根率为 100%; 在 8 号培养基中, 20 d 时基部产生大量绒毛, 40 d 时有大量不定根, 不定根最长约 3.5 cm, 生根率为 40%; 在 9 号培养基中, 不定芽基部膨大有少量愈伤组织, 40 d 时没有产生不定根。

3 结论与讨论

香雪球的叶片和茎段均可被诱导产生愈伤组织, 建立再生体系, 但由于叶片的愈伤组织产生慢, 同时愈伤组织分化率低, 故以茎段作为外植体离体培养最为合适; 由于随着细胞分裂素 6-BA 浓度的增加, 愈伤组织产生的尽管快, 但组织疏松, 分化率低, 因此 0.5 mg/L 的 6-BA 配合 0.1 mg/L 的生长素 NAA, 诱导愈伤组织的效果最好; 在愈伤组织和不定芽的继代培养中, 高浓度的细胞分裂素不利于有效愈伤组织的增加和不定芽的增殖, 以 0.5 mg/L 的 6-BA 和 0.05 mg/L 的 NAA 配比增殖效果最好; 在再生体系过程中还发现, 继代培养周期较快, 无论是愈伤组织的诱导还是愈伤组织及不定芽的继代培养, 当愈伤组织及不定芽产生到一定程度, 必须进行切割和分株继代, 否则愈伤组织或者不定芽均会变黄死亡; 对于不定芽的生根培养, 香雪球的生根诱导也比较奇特, 首先是在不定芽基部, 培养基表面产生白色绒毛, 然后在培养基中产生不定根。分析认为, 白色绒毛可能是气生不定根, 但这些气生不定根非常细, 呈绒毛状, 接着在基质中产生较粗的不定根; 从试验结果分析, 高浓度激素配比有利于愈伤组织的产生, 但不利于生根诱导。同时与 0.1 mg/L NAA 的浓度相比, 0.5 mg/L IBA 配合活性炭的生根诱导率为 100%, 效果较好。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 (第三十三卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 127-129.
- [2] 王默存. 品尝重金属的滋味 [J]. 大科技·科学之谜, 2004(3): 48-49.

Tissue Culture *in Vitro* and Establishment of Regeneration System of *Lobularia maritima*

YUAN Xi-yun¹, ZHANG Xian-yun¹, MA Jie¹, HOU Xiao-fang²

(1. Bio-technology Institute Zhengzhou Teacher's College, Zhengzhou, Henan 450044; 2. Huixian High School, Huixian Henan 453600)

Abstract: The regeneration system of *Lobularia maritima* was established in this paper by using leaves and stem as explants *in vitro* culture. The results showed that stem was optimum explant for induction. The optimum medium for callus was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L; The optimum medium for subculture was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L; The optimum rooting medium was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L+Ac 0.1%.

Key words: *Lobularia maritima*; *in vitro* culture; regeneration system