

花叶络石愈伤组织培养初探

杨锋利, 杜保国, 罗国荣, 何晓芸, 罗雪梅

(绵阳师范学院 城乡建设与规划学院, 四川 绵阳 621000)

摘要:以多年生花叶络石幼嫩茎段和叶片为外植体, 探讨了不同消毒方式、不同外植体类型以及不同激素浓度对比对愈伤组织诱导的影响。结果表明: 75%的酒精处理 30 s+0.1% HgCl₂ 处理 10 min, 最适合幼嫩茎段的消毒; 75%的酒精处理 30 s+0.1% HgCl₂ 处理 6 min, 最适合幼嫩叶片的消毒; 其较理想的愈伤组织增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L。

关键词:花叶络石; 愈伤组织; 诱导; 增殖

中图分类号: Q 949.776.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0143-03

花叶络石(*Trachelospermum jasminoides* Flame)为夹竹桃科络石属常绿木质藤蔓植物, 又名石龙藤。整个植株叶片由粉色叶、白色叶、白底绿斑叶、绿底白斑叶和绿色叶组成, 叶色丰富, 色彩斑斓, 且观赏期长, 是攀援、垂直等立体绿化的好材料^[1-3]。在园林上, 它是极其美丽的地被植物, 可以作为常年“开花”植物用于各种花境布置; 同时它又是优良的盆栽植物材料, 也可用作家庭盆栽的优良植物。花叶络石常用扦插及压条方式繁育种苗, 但繁殖系数低, 繁苗速度慢, 满足不了生产的需求, 而目前多代扦插容易造成性状退化, 采用组织培养技术则可以有效地克服这些缺点^[4]。因此, 开展花叶络石组培快繁技术研究, 对优良种质资源保存及优良品种工厂化生产具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取生长健壮、无病虫害的当年生幼嫩枝条作为试验材料, 以幼嫩茎段、叶片为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 将幼嫩茎段和叶片在洗洁精溶液中浸泡 0.5 h, 浸泡期间用软毛刷轻轻刷洗, 然后在流水下冲洗 1 h; 而后均用 75%酒精消毒 30 s, 无菌水冲洗 2~3 次, 再用 0.1% HgCl₂ 处理不同时间后, 无菌水冲洗 3~4 次。其中茎段分别消毒 7、10、13 min, 叶片分别处理 6、8、10 min。将消毒好的外植体接种于 MS+NAA

0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 的培养基上。叶片和茎段的每种处理均接种 10 瓶, 每瓶接 3 个, 3 次重复。20 d 后统计不同消毒方式的污染率、致死率。

1.2.2 植物生长调节剂正交实验 以 MS 为基本培养基, 采用 L₉(3²) 正交实验设计(表 1、2), 考查不同浓度 6-BA 与生长素(NAA, 2, 4-D)对比对花叶络石愈伤组织增殖培养的影响。每个处理接种 10 瓶, 3 次重复。培养 28 d 后统计观察其愈伤组织生长情况。

1.3 培养条件

琼脂 8 g/L, 蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 光照 12 h/d, 光照强度为 1 500~2 000 lx。如无特别说明则培养温度为 25℃。

1.4 统计分析

定期观察外植体污染、褐化、死亡、愈伤组织的生长情况。每天对污染率、褐化率、出愈率等指标观察记载数据采用 SPSS 13.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 最佳消毒方法的确定

表 1 结果表明, 随着升汞消毒时间的加长, 死亡率增高, 出愈率减少, 究其原因: 升汞消毒效果虽然是最有效的, 但对外植体的活化和分化等方面影响也很大。在消毒液处理中, 能有效杀死外植体表面的微生物, 同时也对植物细胞造成了损伤, 导致外植体死亡增高, 细胞的分化也就受到了不同程度的影响, 从而也影响到外植体的愈伤化^[5]。由此可看出: 75%的酒精处理 30 s+0.1% HgCl₂ 处理 10 min 最适合幼嫩茎段的消毒, 75%的酒精处理 30 s+0.1% HgCl₂ 处理 6 min 最适合幼嫩叶片的消毒, 2 种处理既能有效降低外植体的污染率, 又不会对外植体产生强烈的毒害作用, 影响愈伤组织的生长。

第一作者简介: 杨锋利(1978), 女, 新疆人, 硕士, 讲师, 现从事园林植物繁育及养护工作。E-mail: yangfengli09@126.com。

基金项目: 四川省教育青年基金资助项目(09ZB104; 07125531)。

收稿日期: 2010-09-06

表 1 0.1% 升汞处理对愈伤组织诱导的影响 %

处理	处理					
	幼嫩茎段			叶片		
	7 min	10 min	13 min	6 min	8 min	10 min
污染率	52.9	20.6	7.6	16.5	8.2	0
致死率	0	8.6	38.8	4	20.3	45
出愈率	47.1	70.8	53.6	82.4	72.5	55

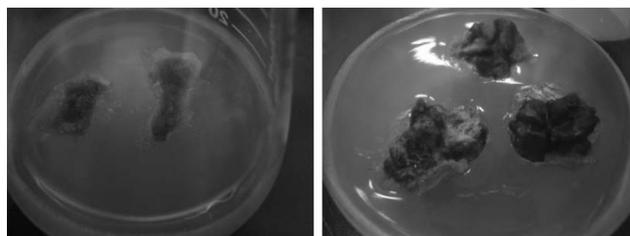


图 1 茎段诱导的愈伤组织 图 2 叶片诱导的愈伤组织

2.2 不同外植体愈伤组织的形成

由表 1 可看出, 叶片的愈伤组织诱导率高于茎段的诱导率, 但在试验中结合愈伤组织生长情况来看, 幼嫩茎段诱导愈伤组织的效果好于叶片的诱导效果。将花叶络石的茎段接种于 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 的培养基上, 6~10 d 左右茎段开始膨胀, 15 d 左右茎段两端首先产生浅绿色透明的愈伤组织, 随后整个茎段表面均被白色疏松愈伤组织, 20~28 d 左右愈伤组织生长达到高峰, 产生的愈伤组织量较多 (图 1); 花叶络石的叶片接种于 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L

的培养基上, 培养 5 d 后叶片扭曲皱褶, 10~15 d 后开始从切口边缘长出淡绿色愈伤组织, 愈伤组织生长高峰不明显, 愈伤组织量较少 (图 2)。

2.3 植物生长调节剂正交组合对花叶络石愈伤组织增殖的影响

将诱导产生的愈伤组织转至增殖培养基中, 植物生长调节剂正交组合对花叶络石愈伤组织增殖的影响试验结果 (表 2、3) 表明, 生长素种类是决定愈伤组织增殖的主要因子。由 T 检验分析结果可看出, 在 99% 的置信区间下, $P=0.006 < 0.001$ 时 NAA 和 6-BA 的组合与 2,4-D 和 6-BA 的组合对愈伤组织的诱导具有极显著差异。因此, 对于生长素来说, 2,4-D 的增殖效果显著高于 NAA。同时在试验过程中, 添加了 NAA 的培养基, 愈伤组织疏松, 愈伤组织老化时间较短, 约 13~15 d 左右愈伤组织开始发黄老化 (图 3)。且随着 NAA、6-BA 浓度的增加, 愈伤组织老化加剧, 严重影响到愈伤组织的增殖生长。

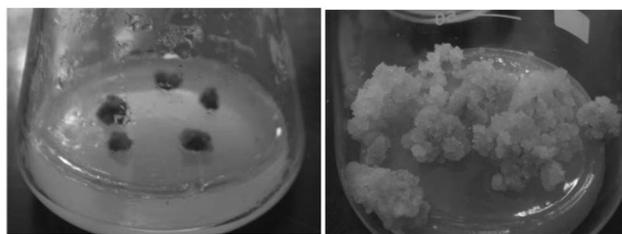


图 3 MS+6-BA 1.0 mg/L 图 4 MS+6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L

表 2 NAA 作为生长素的正交实验结果

组合	6-BA/mg · L ⁻¹	NAA/mg · L ⁻¹	增殖倍数	愈伤组织特征			
				颜色	质地	老化时间	愈伤量
1	1.0	0.01	6.33	黄褐色	较疏松	14	++
2	1.0	0.1	15.83	黄白色稍带绿色	较疏松	18	+++
3	1.0	0.5	5	黄白色部分褐色	疏松	14	++
4	2.0	0.01	4	黄白色部分褐色	较疏松	15	+
5	2.0	0.1	4.5	多为褐色	疏松	13	+
6	2.0	0.5	6.67	部分白色部分褐色	较疏松	16	++
7	4.0	0.01	4.5	几乎全为褐色	较疏松	15	+
8	4.0	0.1	4.67	几乎全为褐色	较疏松	15	+
9	4.0	0.5	2.83	全褐色	疏松	13	+

注: 老化时间是指变色老化的愈伤量占增殖后的总愈伤量 30% 时的时间; +, 愈伤组织面积 < 0.3 cm², ++, 0.3 cm² < 愈伤组织面积 < 0.6 cm², +++, 愈伤组织面积 > 0.6 cm², 下同。

表 3 2,4-D 作为生长素正交实验结果

组合	6-BA/mg · L ⁻¹	2,4-D/mg · L ⁻¹	增殖倍数	愈伤组织特征			
				颜色	质地	老化时间	愈伤量
1	1.0	0.01	10	多为白色	疏松	31	+
2	1.0	0.1	15.5	黄白色	疏松	33	++
3	1.0	1.0	20.5	白色中略带淡绿色	较疏松	40	+++
4	2.0	0.01	8.67	白色略带褐色	疏松	29	+
5	2.0	0.1	16.67	黄白色略带褐色	疏松	29	++
6	2.0	1.0	13.33	多为白色	较疏松	34	++
7	4.0	0.01	5	几乎全褐色	疏松	25	+
8	4.0	0.1	8.33	多为褐色	疏松	27	+
9	4.0	1.0	16.67	黄白色	较疏松	34	++

愈伤组织在附加 2,4-D 和 6-BA 组合的培养基中(图 4),愈伤组织增殖率较高,且老化时间较晚。其中,添加了 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L 的培养基中,愈伤组织增殖倍数高达 20.5,愈伤组织疏松、湿润,白色中略呈淡绿色,培养 40 d 后才出现老化现象,愈伤组织增殖效果及生长情况良好。

3 结论与讨论

从 2006 年高燕会等用花叶络石茎段获得再生植株以来^[6-8],有关花叶络石组织培养研究陆续展开,到目前为止,组织培养已是一项较成熟的技术,差别仅是培养基选择种类、激素组合比例、培养条件和外植体的选材上。在花叶络石研究中,多数学者采用茎段,经增殖、继代培养,最后诱导生根^[6-7],各自选出了最佳激素组合的培养基。目前未见以愈伤组织诱导的研究报道。该试验以研究愈伤组织诱导、增殖为目的。愈伤组织的形成是花叶络石在离体组织培养过程中脱分化,并进一步分化成苗的关键环节。愈伤组织的质地、增殖率等在一定程度上决定了其后期出愈质量、分化成苗效率。试验采用幼嫩茎段及叶片为外植体进行愈伤组织诱导,其诱导率与外植体消毒方式、外植体类型密切相关。

激素种类和浓度是影响愈伤组织增殖的重要因素。倪德祥研究报道表明,植物生长物质对植物离体培养中的细胞分化和形态建成具有明显的调节作用^[9]。该试验以 MS 为基本培养基,考察了不同浓度 6-BA 与不同生长素配比对愈伤组织增殖的影响。结果表明,2,4-D

与 6-BA 的组合愈伤组织增殖效果显著高于 NAA 与 6-BA 组合。添加了 NAA 的培养基愈伤组织老化严重,不利于愈伤组织的增殖生长。2,4-D 有利于愈伤组织的增殖生长,添加了 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L 的培养基,愈伤组织的增殖倍数及老化时间均优于其它组合。

该试验以期通过愈伤组织诱导因素、增殖培养的研究,为愈伤组织诱变育种,以及利用细胞悬浮培养生成次生代谢产物提供重要的参考依据。

参考文献

- [1] 李玉巧,吴纲.立体绿化花卉优良品种栽培选择试验[J].江苏林业科技,2002,29(4):16-19.
- [2] 邢升清.络石造景要点及养护管理[J].中国花卉盆景,2001(11):35.
- [3] 陈旭君,林于健.花叶络石的耐阴性试验和应用[J].华东森林经理,2006,20(2):31.
- [4] 李浚明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业出版社,2000:257-262.
- [5] 潘瑞炽.植物组织培养[M].北京:高等教育出版社,2000:57-60.
- [6] 王福银,史清云,朱艳.花叶络石离体快繁技术研究[J].江苏林业科技,2008,35(3):26-29.
- [7] 高燕会,董再康,黄华宏,等.花叶络石的组织培养[J].浙江林学院学报,2006,23(6):701-704.
- [8] 祝泽刚,俞振良,陈旭,等.花叶络石扦插快繁技术[J].农机服务,2009,26(3):128.
- [9] 倪德祥.植物生长调节剂在组织培养中的调控作用[J].自然杂志,1987,10(1):35-39.

Callus Induction and Proliferation of *Trachelospermum jasminoides* Flame

YANG Feng-li, DU Bao-guo, LUO Guo-rong, HE Xiao-yun, LUO Xue-mei

(College of Contraction and Planning of Urban and Rural, Mianyang Normal University, Mianyang, Sichuan 621000)

Abstract: We used the young stems and leaves of *Trachelospermum jasminoides* Flame as experiment material to compare effect of different dissection methods, different hormones on callus inducing and proliferating. The results showed that the disinfection method of 75% of the alcohol to deal with 30 s and 0.1% mercuric chloride to deal with 10 min was the most suitable for young stems. The disinfection method of 75% of the alcohol to deal with 30 s and 0.1% mercuric chloride to deal with 6 min was the most suitable for young leaves. The optimal proliferation medium was that MS addition with 6-BA 1.0 mg/L and 2,4-D 1.0 mg/L.

Key words: *Trachelospermum jasminoides* Flame; callus; induction; proliferation