

微型月季茎段组培快繁技术研究

刘 慧

(安阳工学院 生物与食品工程学院, 河南 安阳 455000)

摘 要:以微型月季茎段为外植体,根据诱导出萌发芽的芽数及继代扩大繁殖的丛生芽的多少,筛选出适合微型月季茎段培养的培养基。结果表明:诱导侧芽最适宜培养基是MS+6-BA 1.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L;继代增殖最适培养基是:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L。

关键词:微型月季茎段;组培快繁;6-BA;NAA

中图分类号:S 685.12 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)14-0114-03

微型月季(Miniature Rose)为蔷薇科蔷薇属的半常绿灌木,其花色绚丽、香味浓郁,四季均可开花。目前安阳市绿化道路使用的微型月季一般为扦插、嫁接繁殖。但这些方法不能满足微型月季的市场需求,所以对微型月季组织培养技术的研究和开发是当前发展的需求。关于月季的离体培养、根诱导及移栽问题,已有了不少报道^[1-2,4]。但不同品种之间由于受基因型影响而表现出一定的差异性^[3],所以探求微型月季在快繁中使用的培养基及不同浓度的激素比具有重要的意义。试验以微型月季为材料进行了初代、继代及生根的组培快繁研究,以期对微型月季的工厂化育苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取当年生无病虫害,生长健壮的微型月季枝条,选择饱满的侧芽作为外植体。

1.2 试验方法

去掉枝条上的皮刺和叶,剪取带芽茎段1~1.5 cm,用高浓度洗衣粉水溶液洗涤浸泡30 min后,再用流水冲洗1~1.5 h,外植体冲净后,在超净工作台内先用70%酒精快速倒入装有外植体的瓶内并淹没外植体,灭菌7~8 s左右,迅速倒入无菌水以降低酒精浓度,用无菌水冲洗1次后,再使用2%的漂白粉消毒10~15 min,用无菌水冲洗2~3次后,使用0.1%的升汞溶液浸泡处理8~10 min,用无菌水冲洗5~8次后接种。将茎段两端用消毒剪(或解剖刀)去掉,将带芽的茎段接种到初代培养基上,每瓶内接3个茎段。

1.3 培养条件

温度为(24±2)℃,每日连续光照12 h,光照强度为1 000~2 000 lx,调节pH 5.8~6.2。

基本培养基为MS,蔗糖为3%,琼脂为0.8%。高

压灭菌温度为120℃,30 min。

2 结果与分析

2.1 初代培养

将茎段接种到初代培养基上进行分化诱导,3周后,诱导出单芽或多芽苗,将芽切下进一步培养,形成丛生芽。诱导培养基为MS+6-BA 0.8~1.8 mg/L+NAA 0.01~0.1 mg/L。MS培养基加不同浓度的6-BA、NAA诱导茎芽结果见表1。接种培养15 d,茎芽颜色逐渐变绿,芽顶端膨大,20 d后萌发。经过观察及统计,在添加不同浓度的NAA的情况下,外植体大部分都能萌发。其中处理Y1、Y6、Y7上诱导出的芽嫩绿、有单芽;处理Y2、Y4、Y8、Y9上诱导出的芽黄绿,单芽。Y3、Y5上诱导的芽色深绿,有1~2个丛生芽。萌发时间有所差异,处理Y3、Y5、Y6诱导萌芽时间早与其它处理,以处理Y8萌芽时间最晚。经比较,处理Y5、Y3上的萌发数优于其它处理。以MS培养基在Y5处理6-BA 1.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L时为最佳诱导侧芽萌发激素。但在诱导萌发时有真菌和细菌污染情况发生。

表1 不同浓度6-BA、NAA对微型月季萌发的影响

处理	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	接种数 /个	萌发 时间/d	萌发率 /%	萌发数 /个	污染数 /瓶
Y1	0.8	0.01	50	21	34	17	3
Y2	0.8	0.05	50	23	12	6	10
Y3	0.8	0.1	50	19	40	20	5
Y4	1.2	0.01	50	20	18	9	13
Y5	1.2	0.05	50	19	44	22	7
Y6	1.2	0.1	50	19	26	13	10
Y7	1.8	0.01	50	20	34	17	8
Y8	1.8	0.05	50	24	16	8	13
Y9	1.8	0.1	50	22	10	5	15

2.2 继代增殖培养

2.2.1 不同浓度6-BA、NAA对微型月季增殖的影响

将萌发0.5~1 cm的芽切下,接种在增殖培养基上进行继代增殖培养,培养14 d后,芽基部萌发新生小芽,经过20~25 d以后,新生小芽分化并逐渐形成丛

作者简介:刘慧(1972-),女,河南内黄人,本科,实验师,现主要从事农业生物技术实验研究工作。E-mail:aygxyllh1972@126.com。

收稿日期:2011-04-11

生芽。比较不同浓度的 6-BA、NAA 对微型月季增殖的影响, 由表 2 可知, 丛生芽长势以处理 X4、X5、X3 为最好, 芽浓绿, 茎中粗, 节间较短。其中处理 X2、X7、X8 丛生芽较多且密集, 但芽黄绿, 叶小茎细矮; 其它处理丛生芽长势一般, 芽黄绿, 茎细小。增殖系数以处理 X4、X8 为最高, 处理 X2、X7、X3、X5、X1、X9、X6 依次降低。

2.2.2 增殖芽在不同浓度 6-BA 与 NAA 处理培养基上的多重比较分析(LSR) 不同浓度激素对微型月季芽增殖的多重比较分析见表 3。结果表明, 在不同增殖培养基上以 X4 处理即 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L 为最佳增殖培养基。其中 X4、X2、X8 与 X6 之间比较有极显著差异($P<0.01$); X7 与 X6 之间有显著差异($P<0.05$); X4、X8 与 X1 之间有显著差异($P<0.05$); X4 与 X5、X9 之间有显著差异($P<0.05$)。其它不同浓度培养基无差异($P>0.05$)。

表 2 不同浓度 6-BA、NAA 对微型月季增殖的影响						
处理	6-BA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	接种数 /个	增殖总数 /个	增殖系数 /%	丛生芽长势
X1	0.5	0.01	15	25	1.7	++
X2	0.5	0.05	15	30	2	++
X3	0.5	0.1	15	27	1.8	+++
X4	1.0	0.01	15	32	2.1	+++
X5	1.0	0.05	15	26	1.7	+++
X6	1.0	0.1	15	21	1.4	+
X7	1.5	0.01	15	28	1.9	++
X8	1.5	0.05	15	31	2.1	++
X9	1.5	0.1	15	26	1.7	++

注: 每瓶转接 3 个芽; 增殖数为继代 1 次后统计结果; + 较好; ++ 好; +++ 很好。

表 3 增殖芽在不同浓度 6-BA 与 NAA 处理培养基上的多重比较(LSR)								
处理号	增殖均数	xi -4.2	xi -5	xi -5.2	xi -5.4	xi -5.6	xi -6	xi -6.2
X4	6.4	2.2 * *	1.4 *	1.2 *	1	0.8	0.4	0.2
X8	6.2	2 * *	1.2 *	1	0.8	0.6	0.2	--
X2	6	1.8 * *	1	0.8	0.6	0.4	--	--
X7	5.6	1.4 *	0.6	0.4	0.2	--	--	--
X3	5.4	1.2	0.4	0.2	--	--	--	--
X5 X9	5.2	1	0.2	--	--	--	--	--
X1	5	0.8	--	--	--	--	--	--
X6	4.2	--	--	--	--	--	--	--

2.3 诱导生根

当丛生芽长到 2~3 cm 时, 转接到生根培养基上进行生根培养。生根培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg/L, 再加入少许活性炭, 活性炭浓度在 0.3~1.0 g。10 d 后诱导出根原基。未待幼根长出, 即出瓶种植, 使用这种方法不会损伤根系, 移栽速度快, 成活率高, 可脱离培养基远距离运输。

2.4 移栽与管理

幼苗出瓶后, 先洗去沾附的琼脂培养基, 再定植到已消毒灭菌的无土基质: 蛭石: 草木灰+粗沙(1:1)。

原则是具有疏松通气、保水、保肥能力。种植密度为(2~3) cm×(4~6) cm。移栽完毕浇透水, 并用 0.1% 百菌清、多菌灵等喷雾保苗。以清除杂菌对小幼苗的危害, 对提高成活率有明显效果。对于移栽后最重要的是保持相对湿度在 80%~90% 以上, 在温室中移栽, 或在阴棚中移栽能较好地保温、保湿, 一般成活率都比较高。田间移栽可考虑塑料薄膜, 并注意通气。小规模(每天 1 000 苗左右)移栽, 成活率达到 85% 以上。首次移栽 6 周后, 须做二次移植, 应植入 10 cm 左右的育苗钵内, 每钵 1 株。二次移栽成活率达到 90% 以上。再经 4~6 周, 小苗地上地下部分都充分生长, 有些植株还能开花。这时可上盆种植或运至所需地点定植。试管苗首次移栽 1 周后, 可施些稀薄追肥。浓度慢慢增加由 0.1%~0.3%。每 7~10 d 喷 1 次杀菌剂, 如多菌灵等保苗。二次移栽后, 管理上还须注意除草、施肥, 防止病虫害的发生, 并及时掐顶打蕾, 以促侧枝的生长, 促使苗木健壮。

3 结论

该试验对微型月季茎段的组培快繁过程中的诱导及增殖培养基不同浓度激素进行比较, 选出了较适宜的初代培养基和继代培养基的激素浓度配比。试验表明, 生长素 NAA 与细胞分裂素 6-BA 对微型月季芽的分化有重要促进作用, 而细胞分裂素对于茎芽分化的作用要明显高于生长素。如: 初代培养基以 MS+6-BA 1.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L 最适, 诱导萌芽数最高; 继代培养基以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L 最适, 增殖系数最高。

该试验通过采用器官发生途径产生再生植株方法之一的茎段生殖法, 从外植体的脱分化及丛生芽培养基的筛选, 对微型月季离体培养的研究, 利用外植体不经过愈伤组织阶段而直接形成小植株, 不仅提高了繁殖速度, 而且减少了遗传变异的发生, 并且保持了品种的优良性状以及获得大量的无病毒种苗, 具有非常重要的作用。也为微型月季专业化育苗提供了科学的理论依据。

参考文献

[1] 宫本馥, 罗珍珍, 唐坚志. 丰花月季的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(2): 129-134.

[2] 林玉红. 月季试管苗繁殖的研究[J]. 甘肃农业科技, 1994(1): 36-37.

[3] 毕艳娟. 植物生长调节剂对月季组培萌芽和成芽的影响[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1996, 10(4): 37-40.

[4] 叶贻勋. 月季的离体快速繁殖技术[J]. 福建农业大学学报, 2000, 29(2): 172-175.

[5] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 147-171.

[6] 蔡军, 蔡梅英, 钱大莉. 月季多芽苗的诱导及其无性系快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1984(5): 37-40.

龙牙楸木体细胞胚胎发生的细胞组织学研究

李建民¹, 张程², 马玉林¹, 李喜文³

(1. 青海师范大学 生命与地理科学学院, 青海 西宁 810008 2. 安徽科技学院, 安徽 凤阳 233100

3. 东北师范大学 遗传与细胞研究所, 吉林 长春 130024)

摘要:以龙牙楸木幼芽为外植体,在改良 MS 培养基上以体细胞胚胎发生获得了再生植株并对其进行组织切片和扫描电镜观察。结果表明:龙牙楸木体细胞胚胎发生为典型的单细胞起源。其胚性原始细胞既有内起源,又有外起源。

关键词:龙牙楸木; 幼芽; 组织培养; 体细胞胚胎发生; 组织细胞学

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)14-0116-04

龙牙楸木是五加科(Araliaceae)楸木属(*Aralia* L.)的一种多年生乔木药用植物,又称刺老鸦,具有补气、活血、祛风、利湿、止痛等功效。分布于我国东北地区及朝鲜、日本、俄罗斯的西伯利亚地区^[1]。其幼嫩茎叶作为有名的山菜,倍受我国及东南亚一些国家的青睐。对该植物的组织培养和体细胞胚胎发生再生植株已作了报道^[2]。现对这一过程进行了组织细胞学和扫描电镜的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以野生龙牙楸木(*Aralia elata* (Miq.)Seem.)的幼芽为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 组织培养 秋末取落叶枝条,在 23~25℃室内水浸。待其休眠芽萌发出 1~3 cm 的幼芽后剪下,用

70%酒精浸泡 30 s,然后用 0.1%HgCl₂溶液灭菌 5 min,无菌水冲洗 3~4 次,在无菌条件下将幼芽切成 4 mm 左右的切段,接种于改良 MS 培养基上。基本培养基为 MS 培养基,附加 2%蔗糖、300 mg/L 水解酪蛋白、0.7%琼脂, pH 5.8,添加激素为(1)MS-1 培养基:0.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA;(2)MS-2 培养基:2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA;(3)MS-3 培养基:2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+0.2%活性炭。培养温度为 25℃,每日 16 h 光照下培养,光照强度为 1 500~2 000 lx。

1.2.2 组织解剖学观察 取不同发育时期的愈伤组织材料,用 FAA 液固定 24 h 以上。常规石蜡切片法制片^[4],切片厚 10~13 μm。用番红-固绿对染或苏木精染色,中性树胶封片。置于 Olympus-BH2 显微镜下观察并照相。

1.2.3 扫描电镜观察 取不同发育时期的愈伤组织材料,用 2.5%的戊二醛室温下固定 4 h,酒精、醋酸异戊酯系列脱水。用日本 HCP-2CO₂ 临界点干燥仪进行临界点干燥,IB-3 离子溅射仪镀金处理,最后在 HIACHI-S570 扫描电镜上观察、照相。

第一作者简介:李建民(1964),男,教授,现从事植物生物技术方面的教学与研究工作。E-mail: Beyond_3862740@163.com。

基金项目:科技部国家科技支撑计划资助项目(2006BA106A15-13);吉林省自然科学基金资助项目。

收稿日期:2011-04-19

Study on Miniature Chinese Rose Stem Section Tissue Culture

Rapid Propagation Technical

LIU Hui

(College of Biotechnology and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang, Henan 455000)

Abstract: The optimal tissue cultures of miniature Chinese rose stem section were singled out using miniature Chinese rose stems as explants, according to the number of bourgeon sprout and cluster buds of successive expanded reproduction. The results showed that the optimal nutrient medium induced lateral bud was MS+6-BA 1.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L and successive nutrient medium was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L.

Key words: miniature Chinese rose stem; tissue culture; 6-BA; NAA