

微型观赏石榴组培快繁技术

王云波, 郑扑红

(昆明学院 农学院, 云南 昆明 650213)

摘要:用饱满的微型观赏石榴种子为材料,以MS为基础培养基,添加不同浓度植物生长调节剂(NAA、6-BA)对种子进行无菌萌发试验,并对形成的愈伤组织及试管植株进行快速增殖和生根研究。结果表明:微型观赏石榴种子无菌萌发的适宜配方为MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+AC 0.3 mg/L;最佳增殖配方为MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L;最佳生根配方为MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 1.5~2.0 mg/L+NAA 1.5~2.0 mg/L。

关键词:微型观赏石榴;组培;种子无菌萌发;增殖;生根

中图分类号:S 665.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0153-03

微型小石榴(*Punica granatum* L.)属于石榴科石榴属的观果型花卉。微型小石榴因植株矮小而得名,其叶片、花朵、果实虽不大,但花期长,坐果率高,果色鲜艳,非常适合家庭盆栽观赏和造景艺术。小石榴被制作成盆景作为家居观赏型花卉和艺术造景具有很大的发展前景。但优良种苗、新品种的缺乏,病毒的危害等因素使其商品化速度和开发潜能受到了限制。组培快繁技术具有很多优点,一是可以扩大微型小石榴的繁殖系数;二是能为下一步新品种培育打下良好的基础,同时也为生产化育苗提供了科学依据;三是可降低市场价格,加速微型小石榴的商品化进程,充分发挥微型小石榴的观赏价值。目前已有微型小石榴栽培的相关研究,但微型小石榴组培快繁技术的研究还未见报道。该研究采用饱满的小石榴种子为材料,以MS为基础培养基,用不同激素(IBA 吲哚乙酸、NAA 萘乙酸、6-BA 6-苄基嘌呤、AC 碳粉、KT 激动素)对石榴种子进行无菌萌发,并对增殖和生根的效果作比较,得出微型小石榴组织培养的技术和方法。

1 材料与方法

试验于2009年10月9日在云南农业大学花卉研究所进行。

1.1 试验材料

选取饱满的微型观赏石榴种子。准备室:工作台、高压灭菌锅、药品柜、清洗水池、烧杯、天平等设备,进行药品的配制、培养基的制作、分装、高压灭菌等。无菌操

作室:超净工作台、无菌箱、空调机、刀、镊子、酒精灯等设备,进行材料处理。培养室:有空调、培养架子和灯光设备,进行光照、温度、湿度等调控。培养条件:温度控制在26~28℃,光照1 000~2 000 lx,每天光照10~12 h。生根、增殖培养基均采用MS,蔗糖3%、琼脂0.6%、pH 5.8~6.0。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的无菌萌发 取饱满种粒,用75%的乙醇浸泡20~30 s,无菌水冲洗2次,或用20%的84消毒液浸泡20 min后用无菌水冲洗4~5次,0.5%的NaClO溶液中处理10 min,无菌滤纸吸干。在25℃条件下,黑暗培养2~3周,获得发芽苗。设2个MS试验组,一组加AC(碳粉)0.3 mg/L,一组不加,每组以6-BA为变量,设5个对照,先暗培养10 d,再在光下培养,于接种后20 d统计萌发率及污染率。

1.2.2 继代增殖培养 选用颜色与质地均一、疏松而无定型的愈伤组织,接种于添加了不同激素浓度的MS培养基中进行继代增殖培养,配方选用MS培养基,附加糖3%、琼脂0.6%、pH 5.8、NAA 0.5 mg/L,设置5种不同浓度6-BA、KT,培养30 d后,观察愈伤组织的颜色,计算增殖率。

1.2.3 生根诱导 增殖扩大培养达到一定的数量后,需进行壮苗培养。壮苗培养选用全量MS,附加糖2.0%、琼脂0.45%、pH 5.8、6-BA 0.5 mg/L、NAA 0.02 mg/L,此时芽高生长明显,有利于生根,生根率达95%以上。因此,在生根培养前首先要进行壮苗培养。生根培养基采用全MS,附加糖3%、琼脂0.6%、pH 5.8、6-BA 0.5 mg/L,设置5种不同浓度IBA、NAA,测出平均根数和平均根长。

2 结果与分析

2.1 激素配方对种子无菌萌发的影响

第一作者简介:王云波(1962-),女,本科,讲师,现从事教学及实验工作。E-mail:sunqiwen880@163.com。

收稿日期:2010-11-23

由表 1 可知,5 个处理中,激素(6-BA)浓度的不同,微型小石榴的种子萌发率和污染率都有所不同。处理 3 (6-BA 3.0 mg/L)时,种子的萌发率最高,污染率也相对较低。说明适宜浓度的细胞分裂素配以生长素能促进种子萌发。

由表 2 可知,添加 AC(碳粉),同时改变 6-BA 的浓度,处理 3 及当 6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,种子的萌发率较高,且污染率最低。

由表 1、2 可知,加入低浓度 AC 可大大提高微型小石榴的萌发率,并且可大大降低其污染率。AC 使得小石榴无菌萌发过程中 6-BA 的极值进一步提高,增强了小石榴对生长素的耐受能力。AC 在微型小石榴组培快繁过程中发挥着重要的作用。因此可得出,微型小石榴种子萌发的最佳配方为 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+AC 0.3 mg/L。

表 1 激素配方对种子无菌萌发的影响

编号	激素浓度/mg·L ⁻¹		平均萌发率/%	污染率/%
	6-BA	NAA		
1	1.0	1.0	27.5	9.2
2	2.0	1.0	31.6	4.3
3	3.0	1.0	43.2	5.7
4	4.0	1.0	35.4	6.4
5	5.0	1.0	31.6	7.2

表 2 激素配方对种子无菌萌发的影响

编号	激素浓度/mg·L ⁻¹			萌发率/%	污染率/%
	6-BA	NAA	AC		
1	1.0	1.0	0.3	33.6	8.6
2	2.0	1.0	0.3	38.7	3.2
3	3.0	1.0	0.3	45.1	2.9
4	4.0	1.0	0.3	46.3	4.5
5	5.0	1.0	0.3	37.5	6.1

2.2 激素配方对微型观赏石榴继代增殖的影响

由表 3 可知,不同激素浓度对愈伤组织增殖培养的增殖率有区别,随着 6-BA 和 KT 浓度的增加,增殖率也逐渐增加,当增加到一定值(1.5 mg/L)时,增殖率最大,此后继续增加 6-BA 和 KT 的浓度,增殖率反而减小。NAA 被广泛用于试管苗的增殖。一般而言,低浓度细胞分裂素有利于愈伤组织的增殖,该试验也可看出较高浓度的细胞分裂素对微型观赏石榴有明显的抑制作用。Skoog 等(1957,1971)发现,生长素/激动素的相对高水平有利于根的形成,反之则有利于地上部芽的形成。也就是说较高浓度的生长素有利于根的形成而抑制芽的形成,较高浓度的激动素则促进芽的形成而抑制根的形成。该试验表明,保持合适水平的激动素浓度能提高愈伤组织的增殖率的同时也促进了芽的形成。所以微型小石榴最佳增殖配方为 MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

表 3 激素配方对微型观赏石榴继代增殖的影响

编号	激素浓度/mg·L ⁻¹			增殖率/%
	6-BA	KT	NAA	
1	0.5	0.5	0.5	213
2	1.0	1.0	0.5	312
3	1.5	1.5	0.5	334
4	2.0	2.0	0.5	278
5	2.5	2.5	0.5	256

2.3 激素对生根效果的影响

由表 4 可知,不同激素浓度对生根效果有明显的影。激素浓度不能过高也不能过低,适宜的激素浓度能最大限度的提高生根效果。浓度为 2.0 mg/L 时,平均根数最多,但根长短,浓度为 1.5 mg/L 时,根数较少,但根长最大,在生根培养时应使生长素(IBA、NAA)的浓度保持在 1.5~2.0 mg/L 为最佳。即 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 1.5~2.0 mg/L+NAA 1.5~2.0 mg/L。

表 4 激素配方对生根效果的影响

编号	激素浓度/mg·L ⁻¹			平均根数/条	平均根长/mm
	6-BA	IBA	NAA		
1	0.5	0.5	0.5	1.2	5.63
2	0.5	1.0	1.0	2.3	6.34
3	0.5	1.5	1.5	3.4	7.56
4	0.5	2.0	2.0	5.6	5.78
5	0.5	2.5	2.5	4.1	4.32

3 讨论

3.1 种子无菌萌发

在种子无菌萌发试验中,种子的成熟度是种子萌发快慢的一个关键因素。在授粉后某一个时期,种子已经具有萌发能力,但种子内萌发抑制物质还没有形成。采用这一时期的种子作为材料进行无菌萌发,种子萌发整齐,萌发速度快。如果采种时间过早,种子就不能萌发,如果采种时间太晚,种子内形成了萌发抑制物质,种子萌发就比较困难。外源细胞分裂素起到了明显促进萌发的作用,但高浓度激素的使用会使种子萌发形成的原球茎容易死亡。碳粉能有效吸附有毒物质,减少污染,防止褐变现象的发生,从而提高了种子的萌发率。种子的种皮是阻碍种子萌发的主要因素之一,通过机械和化学处理方法破损种皮可以明显提高种子的萌发率。Harvais(1982)认为种皮的破损有利于种皮内的胚充分接触到空气、水和养分,从而促进种子的萌发^[3,9],该试验中微型小石榴种子在 0.5% NaClO 溶液中处理 10 min,萌发率明显提高,有力支持了这一观点。

3.2 增殖培养

愈伤组织是指植物细胞脱分化而不断增殖形成的,主要由薄壁细胞构成的非器官化组织或不定组织。外植体细胞经过启动、分裂和分化等一系列深刻变化过程,形成了无序结构的愈伤组织。之后由愈伤组织分化形成芽,再形成根。该试验中由于接种材料大小的不一

和其它一些未知、不可控的因素,使得试验数据可能有所偏差,但整体上还是准确的。种子萌发培养基中加入低浓度的碳粉,能够有效促使种子萌发,且能够降低污染率。同时,适宜的 6-BA 浓度能够最大限度的提高种子的萌发率和愈伤组织的增值率。KT 是一种细胞分裂素,保持合适水平的激素浓度在提高愈伤组织的增殖率的同时也促进了芽的形成,适宜浓度的 KT 能有效的促进细胞增值。木本植物一般生根率低或难生根,而增殖培养基中细胞分裂素的浓度较高,生长素的浓度相对较低,对生根有一定的影响,所以在生根培养基中要相应提高生长素的浓度,这样才能提高生根率^[1]。为提高生根效率,增殖扩大培养达到一定的数量后,需进行壮苗培养,而后再进行生根培养。此时芽高生长明显,有利于生根,生根率达 95% 以上^[2]。

3.3 褐变现象

褐变的发生与外植体组织中所含的酚类化合物多少和多酚氧化酶活性有关,由于植物组织中的多酚氧化酶被激活,而使得细胞代谢发生变化所致。褐变过程中会产生醌类物质,它们多呈棕褐色,当扩散到培养基后,就会抑制其它酶的活性,从而对组织产生毒害作用,导致外植体死亡。一般木本植物酚类化合物的含量较草本植物高,木本植物更易发生褐变。一些单宁含量或色素含量高的植物容易发生褐变,一些幼龄材料一般比成龄材料褐变要轻,这是跟幼龄材料中酚类化合物含量多少有关。据相关报道,用高度分化的叶片作外植体,接种后很容易褐变,而用幼嫩器官或组织等进行外植体培养,褐变较轻,因此,幼龄的茎段是诱导愈伤组织的最佳材料。该试验中种子由无菌萌发而来,是较好的组培材料。微型小石榴为观赏性花卉,研究表明,培养基中无机盐浓度过高会使某些观赏植物的褐变程度增加,此外,细胞分裂素的水平过高也会刺激某些花卉外植体的

多酚氧化酶的活性,从而使褐变现象加深。消毒时间的长短也直接影响着褐变的发生,若消毒时间短,达不到消毒目的,增大污染率,若延长消毒时间,褐化率也随之升高。另外,光照过强、温度过高、未能及时转接都会加速外植体的褐变。经过重复试验都难以控制褐变现象,微型小石榴褐化现象有待进一步的研究。

4 结论

该研究利用植物组织培养技术对微型观赏石榴种子进行无菌萌发、外植体增殖、生根培养,获得了完整试管植株。结果表明,温度 26~28℃、光照 1 000~2 000 lx、每天光照 10~12 h 的培养条件下,微型观赏石榴种子无菌萌发的最佳配方为 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+AC 0.3 mg/L;最佳增值配方为 MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L;最佳生根配方为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 1.5~2.0 mg/L+NAA 1.5~2.0 mg/L。

参考文献

- [1] 陶秀东,杨文忠,王玉兰,等.石榴组织培养技术[J].新疆农业科学,2002,39(3):155-156.
- [2] 程江华,任琪,李宝华,等.石榴疏松愈伤组织诱导条件的优化[J].经济林研究,2009,27(3):25-28.
- [3] 黄家林,胡虹.黄花杓兰种子无菌萌发的培养条件的研究[J].云南植物研究,2001,23(1):105-108.
- [4] 王家福.花卉组织培养与快繁技术[M].北京:中国林业出版社,2006.
- [5] 韦三立.花卉组织培养[M].北京:中国林业出版社,2000.
- [6] 闫志佩.软籽石榴茎尖组培快繁技术研究[J].枣庄师范专科学校学报,2003,20(2):72-73.
- [7] 张希太,李俊玲,宋九英,等.牡丹花石榴的组织培养技术研究[J].河南科学学院学报,2006,34(2):39-42.
- [8] 闫志佩.濒危品种软籽石榴的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(3):331.
- [9] 朱建峰,管耀义,袁惠贞,等.盐桦种子无菌萌发及快速繁殖研究[J].河北林业科技,2006,23(1):20-25.

Tissue Rapid Propagation Technique of Tiny Ornamental Pomegranate

WANG Yun-bo, ZHENG Pu-hong

(Kunming Agricultural College, Kunming, Yunnan 650213)

Abstract: Used flush tiny pomegranate seeds as materials, took MS as basic medium, and added with different concentration of plant growth regulators (NAA, 6-BA) to test sterile germination, carried out rapid proliferation and rooting study on callus formation. The results showed that the suitable formula for ornamental pomegranate seed germination was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+AC 0.3 mg/L; the best formula for multiplication was MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L; the best formula for rooting was MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 1.5~2.0 mg/L+NAA 1.5~2.0 mg/L.

Keywords: tiny ornamental pomegranate; tissue culture; sterile seed germination; multiplication; rooting