

绣线梅组织培养技术

袁柳祥¹, 李厚华¹, 付林江², 马凯恒³, 刘小微¹, 唐豆豆¹

(1. 西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 六盘水师范学院, 贵州 六盘水 553000;

3. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以绣线梅(*Neillia thyrsiflora*)的茎尖或带腋芽的茎段为外植体,采用组织培养技术,研究了绣线梅快速繁殖体系。结果表明:芽诱导最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,诱导率为 90%;MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为最佳增殖培养基,增殖系数达 7.5;1/2MS+IBA 0.2 mg/L 为最佳生根培养基,生根率 66.7%。

关键词:绣线梅;组织培养;茎段

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)24-0087-03

绣线梅(*Neillia thyrsiflora*)属蔷薇科(Rosaceae)绣线梅属(*Neillia*)落叶灌木,高 2 m 左右,幼枝绿色;叶片卵形至卵状长圆形;总状花序,花瓣圆形或倒卵形,粉红色或淡粉红色^[1],具有良好的观赏价值。任学敏等^[2]对秦岭山地主要野生木本观赏植物资源进行评价时将绣

线梅列为具有开发利用价值的植物。

绣线梅在野外的分布比较聚集,主要靠萌蘖繁殖,采集的种子经过多种发芽试验,发现发芽率极低,种子繁殖能力差。而现代化建设步伐的迅速,自然景区和通山公路的修筑,在很大程度上会破坏绣线梅的生存环境,绣线梅面临濒危境地的可能性也会越来越大,因此开启对绣线梅的研究保护迫在眉睫。然而国内外对绣线梅属植物的研究鲜有报道,仅见于蒙玉霞等^[3]对中华绣线梅扦插繁育技术的试验和 OH 等^[4-5]对绣线梅属植物中的 LEAFY 在其系统发育中作用的研究报道,对于绣线梅的相关研究则几乎空白。现通过构建绣线梅组织培养体系,以期解决绣线梅种子繁殖难的问题,为今后其在园林绿化中的大量应用提供技术支持。

第一作者简介:袁柳祥(1991-),男,硕士研究生,研究方向为园林植物分子生物学。E-mail:961004274@qq.com.

责任作者:李厚华(1973-),男,博士,副教授,现主要从事植物基因工程和类黄酮次生代谢等研究工作。E-mail:lihouthua73@163.com.

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(201204308);西北农林科技大学基本科研业务费资助项目(QN2013079)。

收稿日期:2015-07-24

Maturation and Germination of Somatic Embryos of *Panax quinquefolium* L.

QIN Gongwei^{1,2}, CAO Xiaoyong^{1,2}, XU Hao^{1,2}, ZHAO Hua^{1,2}, HUANG Qiuping², HE Fanfan²

(1. Bioresources Key Laboratory of Shaanxi Province, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001; 2. School of Biological Science and Engineering University of Technology, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001)

Abstract: Taking *Panax quinquefolium* L. embryo tissue of somatic embryo callus (embryoid) as test materials, using the method of *in vitro* culture, the effect of somatic embryo form and composition of medium for its mature and germination were investigated, in order to determine the best grow mature embryoid culture medium and culture medium. The results showed that the torpedo of somatic embryos was the best form transferred for mature culture; the best mature medium 0.5M+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+1% AC, in which somatic embryos grew bigger, cotyledon expanded, germ and radicle grew visible to the naked eye; plant growth regulating substances under the effect of activated carbon released slow, purposed to form a large number of normal, robust, synchronous somatic embryo were achieved; the best germination medium was 0.5MA+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃, in which somatic embryos germinated, its plumule elongated and the leaf expanded.

Keywords: *Panax quinquefolium* L.; zygotic embryo; somatic embryos

1 材料与方法

1.1 试验材料

以采自西北农林科技大学种质资源圃的绣线梅带腋芽的茎段或茎尖为供试材料。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌外植体的获得 取生长健壮腋芽饱满、无病虫害的1年生嫩枝组织,除去老叶,放入加有少许吐温的洗衣粉溶液中清洗,反复振荡10~15 min,再在流水下冲洗2 h,在无菌室超净工作台上用75%的酒精浸泡30 s,无菌水冲洗4~5次,再用0.1%的升汞浸泡灭菌5~10 min,同时轻轻摇动容器,然后用无菌水冲洗5~6次,将升汞溶液洗净,置于灭菌滤纸上吸干水分,用解剖刀切取8~10 mm的带芽茎段备用。

1.2.2 初代培养 外植体接种到含6-BA(1.0、2.0、3.0 mg/L)和NAA(0.1、0.2、0.5 mg/L)的诱导培养基中,以MS为基本培养基,外加30 g/L的蔗糖,琼脂7 g/L, pH 5.6。为防止交叉污染,每瓶接种1个外植体,每种培养基20个重复,培养45 d进行结果统计分析。

1.2.3 培养条件 培养温度(25±1)℃,相对湿度70%左右,光照强度2 000~2 500 lx,光周期12 h/d。

1.2.4 继代培养 当初代培养的芽长到2~3 cm时,从基部切除,接种到继代培养基中,每种培养基接种15瓶,每瓶3株,5周后对结果进行观察记录,培养条件同上。

1.2.5 生根培养 切割继代培养后高度为3 cm以上的健壮芽苗进行生根培养,以1/2MS为基本培养基,添加IBA(0.1、0.2、0.3、0.5、0.8 mg/L),培养45 d后统计生根情况。每种培养基接种15瓶,每瓶3株。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对外植体诱导效果的影响

由表1可知,消毒时间长短对外植体成活率有较大的影响。为了筛选出合适的灭菌时间,分别对外植体用0.1%的升汞进行了5、8、10 min的消毒处理。消毒时间过长或过短均不行,时间过长,会增加外植体褐化率,消毒时间不足,则消毒不充分,污染率高。消毒8 min最合适,污染率低,为29.41%;成活率最高,为70.59%;虽然也有褐化发生,但褐化不严重,依然能诱导出不定芽。消毒5 min时污染率最高,虽然褐化率低,但成活率不高;消毒10 min时,不仅褐化严重,同时植物组织液失去

表1 不同消毒时间对
不同外植体接种效果的影响

Table 1 Effect of different sterilizing time on vaccination

消毒时间	污染率	褐化率	成活率
Sterilizing time/min	Rate of pollution/%	Rate of death/%	Rate of survival/%
5	58.82	16.18	41.18
8	29.41	19.11	70.59
10	0.00	100.00	0.00

了活力,成活率为0.00%。

2.2 不同激素浓度对初代培养的影响

从表2可以看出,外植体接种于初代培养基上约25 d后开始萌动,腋芽逐渐膨大伸长,有嫩叶生出,45 d后长成健壮的无菌芽。NAA浓度不变时,随着6-BA浓度的升高,诱导率呈下降趋势;当6-BA浓度不变时,诱导率则随NAA浓度的增加先升高后降低,符合激素低浓度促进、高浓度抑制的机制。当激素组合为6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L时,诱导率最高,为90%,且小苗长势最好,叶片绿色舒展。

表2 不同植物生长物质组合对
绣线梅芽诱导的影响

Table 2 Effect of different plant growth substances combination on
bud induction of *N. thyrsiflora*

6-BA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	接种数 /瓶	诱导数 /瓶	诱导率 /%	长势
1.0	0.1	20	14	70	粗壮,部分玻璃化
1.0	0.2	20	18	90	芽苗粗壮
1.0	0.5	20	8	40	苗细小矮化
2.0	0.1	20	12	60	部分芽苗玻璃化
2.0	0.2	20	16	80	长势较好
2.0	0.5	20	10	50	苗较弱
3.0	0.1	20	8	40	长势差
3.0	0.2	20	14	70	较细弱
3.0	0.5	20	3	30	褐化严重

2.3 不同配方继代培养基的培养情况

采取春季刚萌动的芽为外植体,经过消毒处理,用含6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,外加MS、30 g/L蔗糖、7 g/L琼脂的培养基进行培养,增殖系数极高,达7.5,诱导率为85%,而且苗生长旺盛。

2.4 不同IBA浓度对绣线梅生根的影响

绣线梅生根比较困难,接种到生根培养基20 d后才开始生根,且根伸长缓慢,总体生根率不高。由表3可知,不同浓度的IBA对绣线梅组培苗生根率,平均根数、平均根长都有很大的影响,它们都随IBA浓度的增加呈现先上升后下降的趋势。当IBA浓度为0.2 mg/L时,生根率最高,为66.7%,平均根长(2.28 cm)、平均根数(4.00根)都较高,而且根长短差异不大,整齐度高,生根快。其它浓度如IBA浓度为0.3 mg/L时,虽然生根数较多,平均为4.75根,但大多数丛生粗短,根的形成受阻,

表3 不同IBA浓度对绣线梅根诱导的影响

Table 3 Effect of different IBA concentration on
root induction of *N. thyrsiflora*

编号	IBA浓度 /(mg·L ⁻¹)	生根率 /%	平均根数 /条	平均根长 /cm	长势
A	0.1	22.2	3.50	1.50	根长短不一,根较少
B	0.2	66.7	4.00	2.28	根整齐度高,生根快
C	0.3	44.4	4.75	2.20	根丛生粗短,生根慢
D	0.5	33.3	4.00	1.63	根整齐度差,生根较慢
E	0.8	11.1	3.00	1.30	根较短,生根慢

生根慢,根长短不一。

3 讨论与结论

外植体的选择对该试验至关重要,在材料的选取上,不仅要考虑到采取的部位,还要注意采取时间。课题组着重采取了芽饱满且无病虫害的茎段和茎尖,通过试验,发现茎尖的诱导效果较好,能诱导出较多的不定芽,且芽长势较好,这是因为茎尖形态已基本建成,生长速度快,病毒含量低或无病毒^[6]。

课题组还选取了绣线梅不同时期(春、夏、秋、冬)的芽作为外植体进行诱导试验,发现采于春季当年生的嫩枝不仅诱导容易,而且污染率较低,其它三季的芽虽也能诱导出一部分,但因其生长时间较长,所带病菌、灰尘等较多,在后期培养过程中,内生菌易导致培养物生长减缓,玻璃苗增加等^[7],有时污染也会引起培养物的遗传变异^[8]。外植体的消毒也是试验成功的关键,消毒时间过长和不足都不能达到理想的效果,因此分3个消毒时间梯度,发现若消毒时间不足,则消毒不充分,2~3 d就出现大批污染;消毒时间过长,则褐化特别严重,不利于不定芽的诱导,而且大部分外植体失去生命活力。

利用初代培养的组培苗在含有低浓度的6-BA、NAA的培养基中进行扩繁试验,发现其扩繁系数低,几乎不增殖;通过叶片诱导愈伤组织途径进行增殖,也发现其愈伤诱导不明显。利用春季刚萌动的芽通过诱导侧芽进行扩繁,则扩繁系数高,为7.5。虽然愈伤组织有细胞分裂快的特点,在组培快繁中运用广泛,但愈伤组织的结构是不均一的,具有生理和遗传上的嵌合性和变异性^[9]。因此该试验扩繁阶段,通过诱导侧芽进行扩繁,这有利于绣线梅优良性状的稳定遗传。

绣线梅的花为总状花序,花瓣白色或粉红色,具有较高的观赏价值。随着人们对景观绿化要求的日益提

高,对新鲜物种的探索将会越来越深入,绣线梅作为绿化树种虽未广泛应用,但随着人们对其认识的加深,它的园林用途也会慢慢地被开发。该试验建立了绣线梅组织培养技术体系,可以为今后绣线梅在园林绿化中的大量应用提供技术支持。

该试验通过对绣线梅组织培养技术进行研究,发现外植体在MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L添加蔗糖30 g/L、琼脂7 g/L、pH 5.6的培养基上芽诱导率最高,达90%;最佳继代培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,添加蔗糖30 g/L、琼脂7 g/L、pH 5.6;最适生根培养基为1/2MS+IBA 0.2 mg/L,添加蔗糖30 g/L、琼脂7 g/L、pH 5.6,生根率为66.7%。

参考文献

- [1] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志[M]. 北京:科学出版社, 1981.
- [2] 任学敏,李思锋,黎斌,等. 秦岭山地主要野生木本观赏植物资源评价[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(5): 71-78.
- [3] 蒙玉霞,张仲举,刘馨涅. 中华绣线梅扦插繁育技术试验[J]. 陕西农业科学, 2013(5): 114-116.
- [4] OH S H. A systematic study of tribe neillieae (Rosaceae) [D]. California: University of California, 2002.
- [5] OH S H, POTTER D. Phylogenetic utility of the second intron of LEAFY in *Neillia* and *Stephanandra* (Rosaceae) and implications for the origin of *Stephanandra*[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29(2): 203-215.
- [6] 许红梅. 植物组织培养中的污染及防止措施[J]. 北方园艺, 2006(6): 148-149.
- [7] 周俊辉,周厚高,刘花全. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 41-47.
- [8] LEIFERT C, RITCHIE J Y, WAITES W M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1991, 7(4): 452-468.
- [9] 陈耀锋. 植物组织与细胞培养[M]. 北京:中国农业出版社, 2007.

Tissue Culture Techniques of *Neillia thyrsiflora*

YUAN Liuxiang¹, LI Houhua¹, FU Linjiang², MA Kaiheng³, LIU Xiaowei¹, TANG Doudou¹

(1. College of Landscape Architecture and Arts, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Liupanshui Normal University, Liupanshui, Guizhou 553000; 3. College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking stem tips and internodes with axillary buds of *Neillia thyrsiflora* as the explants, the rapid propagation system *in vitro* was studied by tissue culture techniques. The results showed that MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L was the suitable medium for explants induction of cluster buds, induction rate reached 90%; MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L was the optimizing medium for multi-propagation, and its average proliferation coefficient reached 7.5; the optimal rooting medium of shoots was 1/2MS+IBA 0.2 mg/L, the rooting rate was 66.7%.

Keywords: *Neillia thyrsiflora*; tissue culture; stem segment