

绣线菊再生体系的建立

王 大 庆, 张 娇

(黑龙江省农垦经济研究所, 黑龙江 哈尔滨 150036)

摘 要:以金山绣线菊的茎尖、茎段、叶片、叶柄为外植体,以 MS 培养基为基本培养基,在初代、继代增殖和生根培养等不同阶段通过添加不同种类和浓度的激素进行对比试验,建立了适宜金山绣线菊组织培养的再生体系。结果表明:诱导愈伤组织培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L 2,4-D,愈伤组织诱导不定芽培养基为:MS+0.8 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA,生根培养基为:1/2MS+0.25 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA,腋芽增殖培养基为:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA。

关键词:金山绣线菊;组织培养;再生体系;优化

中图分类号:S 682.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0089-04

金山绣线菊(*Spiraea × bumalda* ‘Golden Mound’)属蔷薇科绣线菊属灌木,产于河南、陕西、山东、江苏、浙江等省,喜光也稍耐阴,不耐寒冷和干旱,耐修剪,且萌芽萌蘖能力强,生态适应性一般。枝繁叶茂,复伞房花序,花瓣粉红色,花期长,观赏性很强,是一种有很高应用和观赏价值的园林植物。我国绣线菊属植物资源丰富,也相继有学者对粉花绣线菊、绣球绣线菊等属内其它品种进行了研究,但是目前很少开展对金山绣线菊的深入研究工作^[1-2]。1978 年报道了日本绣线菊的组织培养和快繁体系^[3-4];之后的中科院昆明植物研究所等几个单位先后报道了椭圆叶绣线菊、粉花绣线菊等变种的组培与快繁技术应用研究情况^[5-8];萤雅茹等^[9]研究得出了柳叶绣线菊由腋芽到成苗的各阶段培养基配方;张立

磊等^[10]以 MS 培养基为基本培养基,初步建立了金叶绣线菊组培快繁模式,可见对于金山绣线菊组织培养的研究不深入;刘慧民等^[11]的研究表明,金山绣线菊是绣线菊家族中抗寒性和生态适应性都较弱的品种,因此,研究构建金山绣线菊的组织培养再生体系可为金山绣线菊进行分子生物学方面的研究(转基因、基因克隆、基因沉默等)奠定理论基础^[12-14]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料选取东北农业大学园艺试验站温室和室外露地栽培的金山绣线菊植株。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选择与消毒 4—5 月选择晴朗无风天气的上午,分别采集温室和露地栽植长势良好的金山绣线菊当年新生枝的茎段、茎尖、叶片和叶柄作为外植体,不定芽途径的外植体选择温室和室外露地栽培的生长

第一作者简介:王大庆(1969-),男,博士,研究员,现主要从事农业经济等研究工作。E-mail:183189637@qq.com。

收稿日期:2016-02-14

Abstract: The anther of Chinese cabbage and B₅ medium were used to study the effect of adding different concentrations of sucrose, agar, 2,4-D, 6-BA, potato and the culture time in weak light on the formation of vitrification and browning at embryo and seedling growth stage. The results showed that the rate of vitrification was increased by adding 2,4-D and lower concentration of sugar to medium at embryo growth stage. At seedling growth stage, the rate of vitrification and browning was inhibited by the longer culture time in natural light, the rate of vitrification was 52.00%, 37.50%, 23.91% and 22.92% respectively, and the rate of browning was 20.00%, 14.58%, 8.69% and 8.33% respectively in the culture time of 3, 5, 7 and 9 days. There was extremely remarkable difference among 3, 5 and 7 days; the higher concentrations of sucrose, agar, and potato had inhibition to the formation of vitrification; formation of vitrification was promoted by 6-BA, and the higher concentrations, the higher rate of vitrification. Besides the culture time in weak light, the effect of other factors on the rate of browning was little in all the culture stage.

Keywords: Chinese cabbage; anther culture; vitrification; browning

健壮的金山绣线菊植株上带饱满腋芽的茎段,将其放入烧杯中加入洗洁精在流水下冲洗 30~45 min 后,在无菌操作台中进行外植体表面灭菌。将外植体放到 75%乙醇中灭菌 20~30 s,无菌水冲洗 2 次;将外植体放到加有 2 滴吐温的升汞溶液中灭菌 5~7 min,无菌水冲洗 2~3 次;再将外植体放到 2% NaClO 溶液中消毒 30~40 s,再用无菌水冲洗 3 次;将外植体用无菌滤纸吸干表面水分,将叶片切割成 0.5 cm×0.5 cm 带有主脉的方块,茎段和叶柄切成 1.0~1.5 cm 长,准备接种。

1.2.2 愈伤组织途径 愈伤组织的诱导采用在预试验中对愈伤组织诱导效果最好的培养基:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L 2,4-D,将灭过菌切割完成的外植体接种到上述培养基中,每种外植体接种 15 瓶,每瓶 3 株,每处理重复 3 次;10 d 后观察并记录各外植体愈伤组织的萌发量及比例;3 周后对比筛选出最适宜的诱导愈伤组织外植体。不定芽分化和增殖培养在无菌条件下,将金山绣线菊愈伤组织接种到愈伤组织增殖培养基中:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.03 mg/L NAA,7 d 后将增殖的愈伤组织接种到含有不同浓度 TDZ 和 NAA 的诱导分化不定芽的培养基中;附加 TDZ 浓度分别为 0.8、1.0、1.2 mg/L, NAA 浓度为 0.05、0.10、0.15 mg/L,配成 9 组培养基配方,2 周后观察记录并统计不定芽诱导率,筛选出最佳诱导分化不定芽培养基激素配方。生根培养为将长到 3 cm 左右的芽接种到添加有不同浓度 6-BA 和 NAA 的 1/2MS 培养基上诱导生根,分别添加 6-BA 浓度为 0、0.25、0.50 mg/L 和 NAA 浓度设置为 0.5、1.0、2.0 mg/L,观察不同激素浓度对幼芽生根的影响,2 周后记录各培养基配方生根数量及比例,选出最佳生根培养基。

1.2.3 腋芽途径 将灭过菌的茎段切割成长 1.0~1.5 cm 含有饱满腋芽的茎段,分别接种到添加激素浓度 6-BA 0.5、1.0、2.0 mg/L 和 NAA 0.1、0.2、0.3 mg/L 的 9 组培养基中,每处理接种 15 瓶,每瓶 3 个茎段。每处理重复 3 次。7 d 后统计萌芽展叶量,15 d 后统计生长量。对比筛选出腋芽萌动的最适浓度。诱导生根培养与愈伤组织途径诱导生根相同。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织途径的优化

从表 1 可知,在附加 1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基中,不同外植体都表现出较高的诱导率,而茎尖在 8 d 左右出现浅白黄色致密的愈伤组织,并且分化出芽,可见茎尖的诱导效果最佳,可达到 90%,明显高于茎段、叶柄和叶片。试验的 9 个不同配方对不定芽分化的影响情况如表 2 所示,添加 0.8 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA 和添加 1.0 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA 的培养基的诱导率都

很高,但是添加 1.0 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA 的培养基中诱导出的芽有明显的玻璃化现象,综合考虑诱导率及芽的生长情况,最佳诱导分化不定芽培养基为 MS+0.8 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA。表 3 表明,9 组不同激素配比的培养基中,附加 0.25 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 和 0.25 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA 的培养基中生根率较高,而附加 0.25 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 培养基中生根数量和根长明显好于后者,因此最佳诱导生根培养基为 MS+0.25 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA。

表 1 不同部位外植体对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different parts of explants on callus induction

外植体 Explant	愈伤组织诱导率 Callus inducing rate /%	产生愈伤组织的时间 The time of producing the callus /d
茎尖	90	8
茎段	78	10
叶柄	72	13
叶片	68	14

表 2 不同激素浓度对不定芽分化的影响

Table 2 Effect of different hormone concentrations on the differentiation of adventitious bud

处理 Treatment		增殖个数 Multiplication number	增殖倍数 Multiplication multiple
TDZ /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)		
0.8	0.05	29.5	2.95
0.8	0.10	53.2	5.32
0.8	0.15	34.7	3.47
1.0	0.05	40.8	4.08
1.0	0.10	56.3	5.63
1.0	0.15	43.4	4.34
1.2	0.05	38.9	3.89
1.2	0.10	27.6	2.76
1.2	0.15	23.2	2.32

表 3 不同激素浓度对幼苗生根的影响

Table 3 Effect of different hormone concentrations on rooting of seedlings

处理 Treatment		生根率 Rooting rate /%	根长 Root length /cm
6-BA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)		
0	0.5	69.31	1.48
0	1.0	72.54	1.62
0	2.0	75.08	1.75
0.25	0.5	72.35	2.08
0.25	1.0	90.87	2.64
0.25	2.0	84.56	2.31
0.50	0.5	68.79	1.62
0.50	1.0	71.36	1.73
0.50	2.0	73.67	1.90

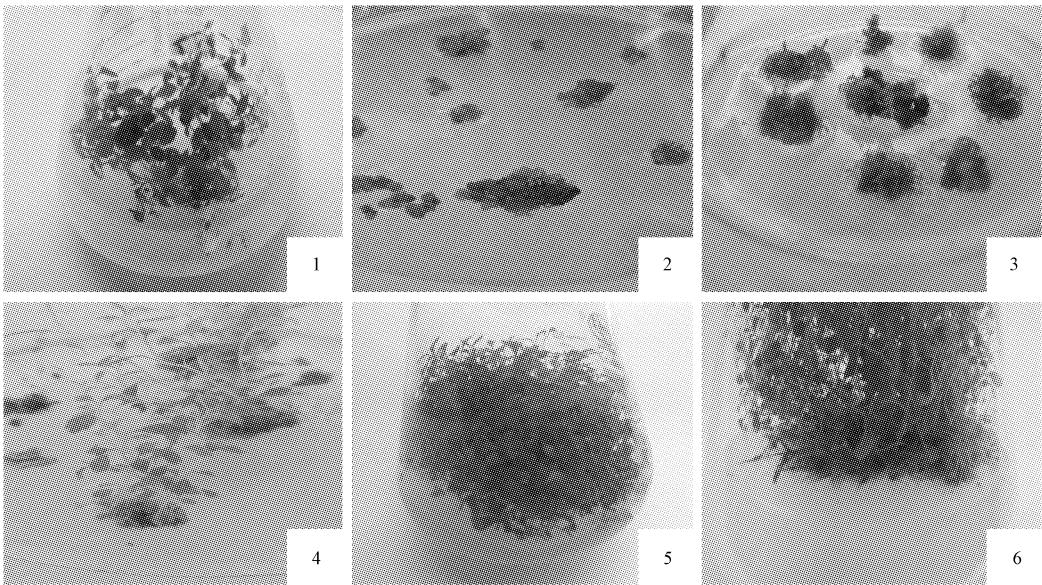
2.2 腋芽途径的优化

由表 4 可以看出,不同激素浓度对芽的增殖影响很大,当 6-BA 和 NAA 浓度比值为 10 时,增殖倍数较高。而且低浓度的 6-BA 可以促进芽的分化,而当提高浓度时,增加产生丛生芽的比例也会抑制节间生长,有效抑制苗徒长。MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 和

MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基中的萌芽情况显著好于其它培养基,而后的萌芽展叶情况和萌芽伸长量都更好一些,所以选择 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 的培养基进行增殖培养。生根培养与愈伤组织诱导途径的生根培养结果相同。

表 4 不同激素浓度对腋芽萌发的影响
Table 4 Effect of different hormone concentration on axillary bud germination

处理 Treatment		7 d 萌芽展叶情况	15 d 萌芽伸长量
6-BA/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)	Condition of the bud after 7 days	Growth quantity of the bud after 15 days
0.5	0.1	4 株展 2 叶,1 株展 1 叶	1.67
0.5	0.2	2 株展 2 叶	1.58
0.5	0.3	2 株展 2 叶,1 株展 1 叶	1.62
1.0	0.1	1 株展 3 叶,8 株展 2 叶,2 株展 1 叶	2.08
1.0	0.2	4 株展 2 叶	1.73
1.0	0.3	5 株展 2 叶,1 株展 1 叶	1.71
2.0	0.1	3 株展 1 叶	1.42
2.0	0.2	2 株展 3 叶,10 株展 2 叶,3 株展 1 叶	2.31
2.0	0.3	3 株展 2 叶,3 株展 1 叶	1.56



注:1. 腋芽萌发;2. 愈伤组织形成;3. 不定芽再生;4. 不定芽增殖;5. 腋芽增殖;6. 生根培养。

Note:1. Axillary bud germination;2. Callus formation;3. Adventitious bud regeneration;4. Adventitious buds proliferation;5. Axillary bud proliferation;6. Rooting culture.

图 1 金山绣线菊组织培养不同时期形态

Fig.1 Form of *Spiraea×bumalda* 'Golden Mound' in different tissue culture phase

3 讨论与结论

采样时间应选择在初春 4、5 月份,此时金山绣线菊结束了休眠期开始萌动,长出鲜嫩的枝梢,温室中的植株在这段时间长势也相对较好,更有利于无性繁殖,而夏季细菌滋生速度快,组培苗的污染率也相对较高,而冬季属于休眠期,分生效果最差,因此取材时间选在初春,这与 JACOBSSON 等^[15]的试验结果相一致。

由于试验材料本身特点,腋芽被芽鳞包裹,而芽鳞

上有致密的绒毛,将会影响表面灭菌的效果,因此在次氯酸钠溶液中加入 2 滴吐温,吐温是一种表面活性剂和分散剂,有助于将叶片和有芽鳞包裹的腋芽张开充分灭菌。同时,在接种时将不同外植体分别接种,防止交叉感染细菌和霉菌^[16-17]。

在愈伤组织途径中,诱导愈伤时很容易出现褐化现象,叶片容易皱缩,组培苗长势弱,很难进行下一步的继代操作。针对这个问题可以通过采用最佳培养基、添加

防褐剂、黑暗培养、调低温度、尽量缩短继代周期等方法来尽量减轻和避免。

“玻璃化”是指植物在进行组织培养过程中,常会出现试管苗叶或嫩梢呈现透明或半透明状态,植株矮小肿胀生长缓慢,叶片皱缩失绿且易碎的现象。植物在出现玻璃化现象后,很难继续扩繁和增殖培养,移栽也会难以成活,这会严重降低组培的效率。因此总结出应对措施有:在培养过程中,培养室的光照强度要保证在1 600 lx以上^[18];降低培养基中外源激素的浓度尤其是6-BA浓度,并且降低培养基中的水势可以有效减少玻璃化苗的出现^[19];采用适宜的温度,换用通透性良好的封口膜增加透气性都有助于降低玻璃化苗出现的概率^[20]。

组培苗在继代培养过程中,随着增殖系数的提高,长出的芽往会出现生长势减弱、纤细弱小、很难生根和移栽成功。这个问题同样也影响着木本植物的组织培养,该试验中通过选择适宜的细胞分裂素和生长素的种类及不同浓度配比,可以同时满足增殖和壮苗的不同要求。高浓度的生长素和低浓度的细胞分裂素的组合有利于形成壮苗。因此,在以丛生芽方式进行增殖时,适当降低培养基中6-BA等细胞分裂素的浓度,并增加NAA等生长素的浓度,并且提高C/N比值等方式来达到壮苗培养的目的。

该试验初步建立了金山绣线菊再生体系,4种不同的外植体中,茎尖的诱导率最高,明显好于茎段、叶柄和叶片,诱导愈伤组织最佳培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L 2,4-D;愈伤组织诱导不定芽最佳培养基为MS+0.8 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA;最佳生根培养基为1/2MS+0.25 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA;最佳诱导腋芽增殖培养基为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA。

参考文献

[1] 赵冰,张欣欣. 粉花绣线菊的组织培养与快繁技术[J]. 北方园艺,

2010(13):157-159.

[2] 李晶,孙海滨,刘强. 不同因子对华北绣线菊离体培养启动的影响[J]. 中国林副特产,2010(5):25-27.

[3] 徐倩. 华北绣线菊引种繁育研究[D]. 青岛:青岛农业大学,2007.

[4] 陈发棣,腾年军,房伟民,等. 三个菊花品种花器官愈伤组织辐射效应的研究[J]. 中南林学院学报,2003(5):27-29.

[5] 李云峰,王玉贤. 日本绣线菊的组织培养[J]. 植物生理学通讯,1987(2):51.

[6] 胡益明,甘烦远,彭丽萍,等. 星花绣线菊的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2001(3):235-236.

[7] 赵沛基,甘烦远,沈月毛. 椭圆叶绣线菊的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2004(1):71.

[8] 胡益明,甘烦远,彭丽萍,等. 药用植物粉花绣线菊的组织培养[J]. 中草药,2001,32(11):1030-1033.

[9] 黄雅茹,王瑞库,王丽艳. 石刁柏、珍珠梅、柳叶绣线菊腋芽茎段的离体培养[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,1994(4):23-26.

[10] 张立磊,李保印,郭巧玲,等. 彩叶植物金叶绣线菊组织培养研究[J]. 经济林研究,2005(1):47-49.

[11] 刘慧民,仇茜,苏青,等. 18种绣线菊苗期抗寒性评价与筛选[J]. 园艺学报,2014,41(12):2427-2436.

[12] 冯楠楠. 6种绣线菊抗寒能力的比较研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008.

[13] 杨玉想. 盐碱地区金山绣线菊的繁殖与栽培技术[J]. 河北林业科技,2005(6):51.

[14] 周春华,尤超,陈凝华. 百合组织培养研究进展[J]. 北方园艺,2013(14):193-195.

[15] JACOBSSON S, KARLTORP K. Micropropagation of wild cherry K-I [J]. Rastenievni Nauki,1995(7/8):97-98.

[16] 薛银芳,赵大球,周春华,等. 芍药组织培养的研究进展[J]. 北方园艺,2012(4):167-170.

[17] 李厚华,阙怡,费昭雪,等. 红肉苹果组织培养及转基因体系的建立与优化[J]. 北方园艺,2011(15):175-179.

[18] 郭风云. 芍药组织培养技术的研究[D]. 北京:北京林业大学,2001.

[19] 贾海慧. 影响樱桃试管苗玻璃化的因素与克服措施[J]. 山东林业科技,2010(4):72-73.

[20] 任东植,李峰,曲云琴. 影响枣组培苗玻璃化的几个因素及其防治[J]. 植物生理学通讯,2000(1):21-23.

Study on the Establishment of Regeneration System of *Spiraea × bumalda*

WANG Daqing, ZHANG Jiao

(Economic Research Institute of Heilongjiang Province Agricultural Reclamation, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: The stem apex, stem, leaves and petiole of *Spiraea × bumalda* ‘Golden Mound’ were taken as explants for tissue culture *in vitro*. Different species and concentrations of hormones were added to MS medium during the different periods of first, subculture and rooting culture for establishing of regeneration system suitable for tissue culture of *Spiraea × bumalda* ‘Golden Mound’. The results showed that, medium for callus induction was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L 2,4-D, medium for adventitious bud induction was MS+0.8 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA, medium for rooting was 1/2MS+0.25 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA, medium for axillary bud proliferation was MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA.

Keywords: *Spiraea × bumalda* ‘Golden Mound’; tissue culture; regeneration system; optimization