紫罗兰再生体系的建立

孙婷婷,胡宝忠

(东北农业大学生命科学学院,哈尔滨 150030)

摘要:本研究以紫罗兰(Matthiola incana R.Br)无菌苗的叶片、茎段为外植体,通过组织培养的方法诱导愈伤组织,并进一步诱导分化出芽及再生植株。结果表明,建立紫罗兰再生体系的最佳外植体为生长8~10d的无菌幼苗的子叶;愈伤组织诱导最佳培养基为MS+6-BA(0.5mg/L)+NAA(0.5 mg/L)培养基;最佳分化培养基为MS+6-BA(2.0mg/L)+NAA(0.1 mg/L)培养基;最佳生根培养基为1/2 MS+NAA(0.5 mg/L)+C(0.05mg/L)。

关键词:紫罗兰;组织培养;再生体系

中图分类号:S681.203.6 文献标识码:B 文章编号:1001-0009(2006)04-0151-03

紫罗兰(*Matthiola incana R.Br*)为十字花科紫罗兰属植物,别名草桂香、香瓜对、草桂花,原产自欧洲大陆、地中海沿岸,是欧洲名花之一。花色有玫瑰红、桃红、淡黄、纯白、淡紫、雪青等,冬春开花,花期为12月至翌年3月,自然花期可达3~5个月[1]。因其花色多、花期长、气味芬芳而在欧美各国极为流行,可用于庭院、花坛、盆栽及切花等。又因其在花语中的寓意是"永恒的美丽",所以更是倍受女性的青睐。另据《中国植物志》报道,紫罗兰花可入药,有泻下、通经之功效。近年来有关学者也对紫罗兰开展了系统研究,在第九届国际十字花科植物研讨会上,有关学者提出紫罗兰是新型特用油料植物,种子油富含ω-3-亚麻酸,为保健珍品。

本研究所用的种子产自保加利亚,该国属于温带大陆性气候,花卉业闻名于世,是一些耐寒性一、二年生草本花卉及部分宿根花卉的分布中心。我国目前的园林花卉生产水平较低,花卉种类单一,进行优良花卉品种的引种已成为迫在眉睫的实际问题。由于保加利亚所处纬度与黑龙江省相近,其花卉多为耐寒品种,因此在黑龙江省进行引种并推广对于改善绿化花卉品种单一的现状具有重要意义。当前一些花卉主要是靠进口杂种一代,但进口的杂交一代种子价格高于常规种子几倍甚至几百倍,对于大量面积种植来说已是一个重大障碍。此外,因雄蕊退化发育不全而不能结实,一直以来是阻碍紫罗兰常规播种繁殖的一个难题[2,3]。随着生物技术在农业生产上的广泛应用,用组织培养技术取代传统播种繁殖方式为工厂化生产花卉种苗提供了基础,可以不受季节限制,大大缩短生产周期,降低花卉栽培成本提高经济效益。另外,植物再生体系的建立也为下一阶段运用分子生物学手段进行遗传转化提供了必备的条件。所以,本研究利用植物组织培养的方法建立紫罗兰的再生体系,一方面可对紫罗兰进行大规模快速繁殖,另一方面可为紫罗兰建立基因工程基础性平台。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为进口保加利亚紫罗兰婚纱系列种子,网上订购自虹越园艺花卉公司。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的获取 将紫罗兰种子用自来水冲洗后,室温下浸泡36h,取出后用70%的乙醇冲洗30s,再用0.1%的升汞溶液(可加1至2滴吐温)分组浸泡20min,无菌水冲洗4~5次,再分别接种到不附加任何激素的MS基本固体培养基上(蔗糖30g/L,琼脂7g/L,pH 5.8)。培养条件:温度25±1℃,光照16/8h,光强1 500Lx。待种子萌发后8~10d,在超净工作台内取出无菌幼苗,除根,将茎切成长约5mm的小段,子叶除去叶缘,但注意勿除去主脉。

1.2.2 愈伤组织的诱导 基本培养基选定MS培养基,植物生长调节剂(以下统称PGR)选定6-BA和NAA两种,其中6-BA的浓度为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L,NAA的浓度为0.1、0.5、1.0 mg/L,共15个处理组合。将制备好的外植体接入上述愈伤组织诱导培养基中,每小组分别接种10瓶,每瓶4个外植体。诱导出的愈伤组织20d继代一次。

1.2.3 不定芽的分化 分化培养基同样为MS附加不同浓度的6-BA、NAA,其中6-BA的浓度为1.5、2.0、2.5 mg/L,NAA的浓度为0.1、0.2、0.5 mg/L,共设9个处理组合。每小组分别接种5瓶,每瓶4块愈伤组织。

1.2.4 生根培养 基本培养基选定1/2MS+活性炭(0.05 mg/L)和1/2MS无附加,NAA的浓度为0.05、0.01、0.5、1.0mg/L,共8个处理组合。以上的培养基蔗糖含量均为30g/L,琼脂为7g/L,pH 5.8。培养条件为温度25±1℃,光照16/8h,光强1 500Lx。

1.2.5 驯化与移栽 健壮小苗生根(5cm以下)后,打开瓶口进行炼苗。一周后,将小苗从培养基中取出,用自来水洗净根部附着的培养基,然后移栽到细砂:腐殖土为1:1的基质中,温度25℃左右,相对湿度保持在85%以上。移栽初期适当遮荫,后期管理逐渐加强光强直至全光照。当苗长至10cm高时,移至同样基质的花盆中,进行正常的盆栽管理[4]。

2 结果与分析

2.1 最佳愈伤组织诱导培养基的选择

外植体(茎段、叶片)接种到诱导愈伤组织的培养基中培

收稿日期:2006-01-24

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

养 2~3d 后,开始膨大萌动,其中叶片的变化更为显著。4~7d 以后,切口处形成肉眼明显可见的愈伤组织。结合愈伤组织诱导率和质地状况进行分析比较,得出表 1。

表 1　不同浓度 NAA 和 6—BA 对愈伤组织诱导率的影响

外植体	愈伤组织发生率 %					愈伤组织质地状况
	NAA		6—BA			
	0.5	1.0	1.5	2.0	1.5	
叶片	0.1	62.5	52.5	72.5	65.0	67.5	淡黄绿色,较松软,多颗
	0.5	90.0	65.0	72.5	60.0	57.5	粒状,有少量放射状绒毛
	1.0	32.5	62.5	80.0	77.5	37.5	
茎段	0.1	60.0	47.5	35.0	32.5	22.5	白色或白绿色,致密而坚
	0.5	87.5	75.0	72.5	65.0	57.5	硬,有大量放射状绒毛
	1.0	45.0	52.5	57.5	75.0	45.0	

注:愈伤诱导率(%)=(形成愈伤组织的外植体数/ 接种的外植体总数)× 100%

由表 1 可见,以叶片和茎段为外植体,愈伤组织诱导率并没有显著的差异,但是愈伤组织的质地状况及愈伤的发生时间却有很明显的差别,并且其分化能力在后期也会表现得不同(这是一个十分重要的参考指标,将作为外植体选择的决定性因素)。从愈伤组织的发生时间上看,茎段接至培养基上 3~4d 即有肉眼可见的愈伤组织产生,而叶片约需 5~7d。从诱导出的愈伤组织的质地状况上看,茎段诱导产生的愈伤组织为白色或白绿色,不仅发生早,而且生长速度快,质地致密而坚硬,继代后可见局部为颗粒状,表面分布着较多的放射状绒毛;而叶片诱导产生的愈伤组织为淡黄绿色,生长速度不如前者,质地较松软,在形成初期即表现为明显的颗粒状,仅局部有少量放射状绒毛。对比各 PGR 配比,可见 MS + 6—BA(0.5mg/L) + NAA(0.5mg/L)处理的愈伤诱导率明显高于其他浓度配比的培养基,且在该培养基上外植体生长良好,基本没有褐化或玻璃化的现象,故选定其为愈伤组织诱导的最佳培养基。

2.2　最佳分化培养基的选择

表 2　不同浓度 NAA 和 6—BA 对愈伤组织分化的影响

培养基(mg/L)	接种愈伤个数	诱导生芽个数	分化率(%)
6—BA(1.5) + NAA(0.1)	20	9	45.0
6—BA(2.0) + NAA(0.1)	20	15	75.0
6—BA(2.5) + NAA(0.1)	20	9	45.0
6—BA(1.5) + NAA(0.2)	20	10	50.0
6—BA(2.0) + NAA(0.2)	20	7	35.0
6—BA(2.5) + NAA(0.2)	20	6	30.0
6—BA(1.5) + NAA(0.5)	20	5	25.0
6—BA(2.0) + NAA(0.5)	20	7	35.0
6—BA(2.5) + NAA(0.5)	20	7	35.0

注:芽分化率(%)=(诱导生芽的总数/接种的愈伤的总数)× 100%

三周后,将继代过一次的愈伤组织转入到分化培养基中,经过约 10d 的培养,大多数由叶片得到的愈伤组织颜色由淡黄绿色转为浅绿色,上表面出现一定量的绿色突起,为不定芽点,进而又由浅绿色转为深绿色,最后分化成芽。这些芽多数呈单芽状,叶片较长,少数为丛生状,叶片小而密。本研究发现,丛生状的不定芽比起前者明显具有生长速度快、成活率高等优点,故在以下试验中优先选用。而由茎段得到的愈伤组织在分化培养基中继续增大,几乎没有分化的迹象。由此,选定叶片为建立紫罗兰再生体系的最佳外植体。对不同 PGR 配比和不同外植体所得愈伤组织的芽分化率、芽的长势及颜色情况进行分析比较,得出表 2。

可见,MS + 6—BA(2.0) + NAA(0.1)的分化率最高,达到 75%。为了进一步比较不同培养基的诱导效果,从表 3 可以看出不同浓度 NAA 和 6—BA 对芽长势及性状的影响。

表 3　不同浓度 NAA 和 6—BA 对芽长势的影响

培养基(mg/L)	芽的性状
6—BA(1.5) + NAA(0.1)	芽粗壮,颜色翠绿,但数量较少
6—BA(2.0) + NAA(0.1)	芽均匀浓密,数量多,颜色翠绿
6—BA(2.5) + NAA(0.1)	芽短小,重度玻璃化
6—BA(1.5) + NAA(0.2)	芽均匀,颜色翠绿,部分叶片卷曲
6—BA(2.0) + NAA(0.2)	芽较稀疏,部分叶片卷曲
6—BA(2.5) + NAA(0.2)	分化的芽数量少,轻度玻璃化
6—BA(1.5) + NAA(0.5)	分化的芽数量很少,细弱,叶片卷曲
6—BA(2.0) + NAA(0.5)	分化的芽数量少,叶片卷曲
6—BA(2.5) + NAA(0.5)	分化的芽数量少,重度玻璃化,同时叶片卷曲

在诱导生芽的第 15d 左右,接种在 MS + 6—BA(2.0) + NAA(0.1)上的愈伤组织最早诱导出芽,不定芽均匀浓密、数量多、颜色翠绿,相比较在其它培养基中,诱导的芽丛要么数量少,要么有玻璃化现象,要么部分叶片卷曲。通过以上的比较确定 MS + 6—BA(2.0) + NAA(0.1)为最佳分化培养基。

2.3　最佳生根培养基的选择

将培养 20d 左右、高约 3.0cm 的粗壮的不定芽从丛生芽上单个切下,转入生根培养基中,如表 4 所示。

表 4　不同生根培养基对芽丛生根率的影响

培养基(mg/L)	接种的芽数	诱导生根个数	生根诱导率(%)
NAA(0.05)+活性炭(0.05)	20	9	45.0
NAA(0.1)+活性炭(0.05)	20	11	55.0
NAA(0.5)+活性炭(0.05)	20	20	100.0
NAA(1.0)+活性炭(0.05)	20	17	85.0
NAA(0.05)	20	7	35.0
NAA(0.1)	20	12	60.0
NAA(0.5)	20	19	95.0
NAA(1.0)	20	15	75.0

注:生根诱导率(%)=(诱导生根的总数/接种芽的总数)× 100%

在生根培养基中,20d 后不定芽根部开始有锥状突起,继续培养 10d,培养基中的材料开始生根,其中 1/2 MS + NAA(0.5)+ 活性炭(0.05)诱导生根的时间较早,不定根发生率最高,达 100%,故确定其为最佳生根培养基。15d 左右,根的长度可达到 1.5~2.5cm 且较粗壮,此时苗高 3.5cm 左右。

3　讨论

3.1　外植体及 PGR 配比对愈伤组织诱导的影响

本试验采用茎段和叶片为外植体,利用 MS + 6—BA + NAA 为诱导愈伤的培养基。外植体(茎段、叶片)接种到

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

野生桑黄的人工栽培技术及发展趋势

杨宏伟[1],杨永顺[2]
(1.黑龙江省鹤岗市科技情报研究所,154100;
2.黑龙江省鹤岗市兴科特种农作物研究所)

桑黄,又名鲍氏木层乳菌,是一种滋补强体、扶正固本的名贵药用菌,所含多糖体能激活人体的免疫系统,抑制癌细胞生长,增强抗癌活性,具有明显的抗肿癌功能,是已知高等真菌中抗癌疗效最好的菌类,抗癌机理已逐渐被人们所认识,桑黄作为一种名贵药用菌由于含有桑黄多糖、落叶松覃酸、三萜酸、芳香酸,对治疗血崩、血淋、盗汗等效果显著,市场前景非常乐观,由于国内外市场对桑黄的需求越来越大,野生桑黄资源逐渐枯竭,远远不能满足市场需求,因而,开发桑黄有利地保护桑黄的菌种资源,同时也是调整农业产业结构,发展质量效益型农业的有效载体,是将资源优势转化为经济优势,实现农民、下岗职工增收的有效途径。而且适合国内外市场的需求,是我国参与国际市场竞争、增加出口创汇的好方法。

人工栽培野生桑黄,桑黄素含量可达90%,桑黄子实体可以全部出口或部分出口。也可以开发桑黄功能食品和饮料,还可以采用临界或超临界萃取法提取桑黄多糖,延长产业链。增加附加值,增加就业,其社会效益与经济效益将更加显著,对于农业结构调整和社会主义新农村建设都将起到很大的作用。

我们通过对野生桑黄菌种分离、培养、选育;进行培养基原料选择,确定适合北方栽培的科学配方,培养基基料可以用北方阔叶树种(柞、桦树)作原料代替桑树(替代量80%),对桑黄进行人工栽培技术研究和栽培模式确定,开发和研制桑黄液体菌种,进行人工栽培。液体菌种的使用可以极大的缩短栽培时间,生长周期由原来的2年缩短到4个月。

技术路线是:野生桑黄菌种分离—筛选—培养—栽培菌种制作、培养—栽培袋制作—成品—晾晒—采摘—出菇—开袋—培养—接种—栽培袋灭菌。

目前桑黄人工栽培国外未见报道,国内仅有一家研究所在吉林进行小面积YAA验栽培,但生长期在1.5~2年。国内外市场对桑黄的需求越来越大,野生桑黄资源逐渐枯竭,远远不能满足市场需求。

种植2万m^2,总投资为200万元,预计年生产桑黄子实体5 000kg,产值500万元,利润350万元。

诱导愈伤组织的培养基中培养2~3d后,开始膨大萌动,其中叶片的变化更为显著,4~7d以后,切口处即形成肉眼明显可见的愈伤组织。与茎段相比,叶片诱导的愈伤组织在发生时间和生长速度上比茎段诱导的愈伤组织稍有劣势,但相差不大。但是从分化能力上比较,茎段诱导的愈伤组织分化能力几乎为零,叶片诱导的愈伤组织与之相比有绝对的优势,这与徐怀亮等人的研究[4]有所差异。另外,本试验认为,无菌幼苗的苗龄也会影响愈伤诱导率,8~10d为最佳,过老则材料容易褐化,过幼嫩则子叶没有完全伸展开,不利于切除叶缘等操作。从PGR配比上看,MS+6-BA(0.5)+NAA(0.5)培养基上的愈伤诱导率明显高于其他浓度配比的培养基,且在该培养基上,外植体生长良好,基本没有褐化或玻璃化的现象,故选定其为愈伤组织诱导的最佳培养基。

3.2 PGR配比对生芽的影响

从表2和表3中可以看出,MS+6-BA(2.0)+NAA(0.1)培养基上的愈伤组织不仅分化率是最高的,且诱导的不定芽均匀浓密,数量多,颜色翠绿,故选定其为最佳分化培养基。在诱导生芽的过程中,NAA浓度过高时,诱导出的芽部分叶片卷曲,而6-BA浓度过高时则易出现玻璃化现象[6,7],这有待于进一步的探讨。

3.3 PGR配比对生根的影响

1/2 MS+NAA(0.5)+活性炭(0.05)诱导生根的时间较早,在同一时期比较,该培养基的诱导生根率最高,不定根发生率可达100%。可见在基本培养基和PGR浓度相同的条件下,活性炭的加入对芽丛的生根有利,推测活性炭的作用在于吸收根系分泌物、平衡大量及微量元素、模拟出土壤的黑暗环境等,这与刘根林等人的报道[8]相符。

参考文献:

[1] 包满珠.花卉学(第二版)[M].北京:中国农业出版社.2003.116-235.
[2] 谭文澄.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社.2000.78-97.
[3] 刘慧民,佟桂英,袁晶波.近年来花卉类(含草皮、花灌木)组织培养技术发展综述[J].北方园艺,2000(2):38-39.
[4] 徐怀亮,罗鹏,李旭峰,等.紫罗兰愈伤组织诱导及植株再生的研究[J].中国油料作物学报,2002,24(1):19-21.
[5] 谢秀芝,李文彦.紫罗兰盆栽管理技术[J].特种经济动植物,2001,144(1):43-44.
[6] Yang Meizhu, Jia Shirong, Eng-Chong Pua. High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of Brassica carinata. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 24: 79-82.
[7] Virendra K Gautam, Aradhana Mittal, Kanan Nanda, et al. In vitro regeneration of plantlets from somatic explants of Matthiola incana. Plant Science Letters, 1983, 29(1): 25-32.
[8] 刘根林,梁珍海,朱军.活性炭在植物组织培养中的作用概述[J].江苏林业科技,2001,28(5):46-48.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net