

鸳鸯茉莉不同外植体诱导愈伤组织研究初探

袁 媛, 连芳青

(江西农业大学 园林与艺术学院, 江西 南昌 330045)

摘 要:以鸳鸯茉莉花瓣、叶片、茎段为外植体, MS 为基本培养基, 探索外植体取材季节和部位对污染的影响; 分析植物生长调节剂的种类、浓度对不同外植体诱导愈伤组织的影响和最适组合。结果表明: 在 3、4 月取材比 5、6 月好, 12 月取材效果较差; 通过花瓣能成功诱导出健康的愈伤组织, 但诱导率较低 (27.1%), 平均出愈时间为 23~25 d, 3 种外植体中以嫩叶诱导愈伤组织的效果最好 (87.1%), 平均出愈时间最短, 为 18~20 d; 茎段愈伤组织诱导率其次 (68.1%), 平均出愈时间为 21~23 d; 2,4-D、6-BA 对以花瓣为外植体诱导愈伤组织的影响达显著水平, 花瓣诱导愈伤组织的最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L, 2,4-D 对叶片诱导愈伤组织的影响达显著水平, 叶片诱导愈伤组织的最适培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L, 2,4-D、6-B 对茎段诱导愈伤组织的影响达到极显著水平; MS+6-BA 3.0 mg/L+KT 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L 最适合茎段诱导愈伤组织。

关键词: 鸳鸯茉莉; 外植体; 生长调节剂; 愈伤诱导率

中图分类号: S 685.16 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)01-0168-04

鸳鸯茉莉 (*Brunfelsia latifolia* Benth.) 是茄科 (Solanaceae) 鸳鸯茉莉属常绿矮灌木, 花多单生, 有时数朵组成聚伞花序。花冠高脚碟形, 径约 3.8 cm, 花具芳香。花期 4~10 月。性喜温暖湿润气候, 不耐寒。要求肥沃疏松、排水良好的微酸性土壤。喜肥, 不耐涝, 不耐强光^[1-3]。

鸳鸯茉莉初开时为淡紫色, 后变为淡雪青色, 最后变为白色, 由于开花有先后, 在同一植株上同时能看到不同颜色的花, 故又得名“双色茉莉”。具有“一卉能熏一室香, 炎天犹觉玉肌凉”的诗意和极高的观赏价值, 深得人们的喜爱^[3]。

鸳鸯茉莉不结实或结实很少, 繁殖方式多采用扦插、高空压条, 但繁殖系数较低, 扦插生根较难, 生根率仅 8.9%, 且生根所需时间长, 扦插苗生长势差^[4]。远不能满足日益增长的市场需求, 通过组织培养技术可有效提高其繁殖系数。鸳鸯茉莉是木本植物, 一般用茎段作外植体组织培养分化再生植株, 自 1986 年报道过成功离体培养双色茉莉嫩叶后^[5], 以愈伤组织途径再生植株的报道很少。探索建立愈伤无菌体系的最适外植体类型及诱导培养基对以后探索愈伤增殖、分化出芽、小苗生根最适培养激素组合进而通过后一种再生途径成功获得完整植株奠定基础。此外, 首次以花瓣为外植体, 探索产生愈伤组织到分化成完整植株的可行性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为江西农业大学花卉教学基地温室大棚内生长期多年的 3 盆鸳鸯茉莉。

第一作者简介: 袁媛 (1988-) 女, 湖北人, 在读硕士, 现主要从事园林植物栽培与繁育研究工作。Email: hotley258@163.com。

通讯作者: 连芳青 (1953-) 女, 教授, 硕士生导师, 现从事园林花卉栽培学教学与科研工作。E-mail: lianfangqing@163.com。

收稿日期: 2009-09-10

Abstract: Four improved CTAB methods were used to extract genomic DNA from mature leaves of *Celtis koraiensis* Nakai and the extraction effect of the 4 methods was compared. The results showed that the 4 methods obtained no browning and intact genomic DNA. The method 2 (low concentration ethanol and high salt were used to remove polysaccharide) and 4 (only low concentration ethanol was used to remove polysaccharide) had the better effect of removing polysaccharide but with lower DNA concentration than the method 1 and 3. The ISSR amplification results showed that the genomic DNA extracted by the 4 methods could be used for ISSR amplification but the DNA from the method 2 and 3 had the better effect of ISSR amplification than the other three methods.

Key words: *Celtis koraiensis* Nakai; modified CTAB; genomic DNA; polysaccharide; browning

1.2 培养条件

以 MS 为基本培养基, 添加琼脂 0.6%, 蔗糖 3%, 调节 pH5.8~6.2, 暗培养, 培养温度(25±2)℃。

1.3 试验设计与统计方法

1.3.1 不同时期无菌体系的建立 2008 年 12 月中旬采健康叶片及茎段, 自来水下冲洗 20 min, 在超净工作台上分别用 75%酒精表面消毒 20、30 s, 0.1% HgCl₂ 浸泡 6、10 min, 无菌水冲洗 4~5 次。接入 3 种启动培养基: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, MS+6-BA 3.0mg/L+NAA 0.5 mg/L, MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 每种培养基接叶片 30 瓶, 每瓶 1 块; 茎段 20 瓶, 每瓶 1 个。2009 年 3 月上旬、4 月中旬采嫩叶、嫩茎, 先在自来水下冲洗 20 min 后于超净工作台上分别用 75%酒精表面消毒 15、20 s, 0.1% HgCl₂ 浸泡 6 min, 无菌水冲洗 4~5 次。接入同样 3 种培养基中, 每种处理接叶片 15 瓶, 每瓶 1 块; 茎段 15 瓶, 每瓶 1 个。接入后每隔 2 d 统计外植体的污染瓶数、死亡瓶数、出愈瓶数。

1.3.2 正交试验设计与统计 采用 L₁₆(4⁵) 正交设计研究外植体类型对愈伤诱导影响, 设计 4 因子 4 水平^[9], 4 因子分别为 2, 4-D、6-BA、KT、NAA, 各因子水平见表 1。试验材料为 2009 年 4 月中旬采的花瓣、嫩叶、嫩茎。外植体嫩叶每片 1.0~2.0 cm², 茎段每段 0.5~1.0 cm, 花瓣每片 0.5~1.0 cm², 每种处理均分别接入花瓣、嫩叶、嫩茎各 12 瓶, 每瓶 1 块。接种后每 2 d 记录 1 次外植体的出愈块数、污染块数、死亡块数。出愈外植体数增加

变快时每天统计 1 次, 以便计算平均出愈时间。通过 3 种外植体的愈伤诱导率, 出愈时间的比较找出诱导愈伤的最适外植体。采用极差分析、方差分析找出对各种外植体诱导愈伤组织影响显著的因子和各外植体最适的诱导激素种类及水平^[7]。

2 结果与分析

2.1 外植体采集时期对污染率的影响

12 月采的叶片、茎段的污染率均为 76.66%, 明显高于 3、4 月采的嫩叶(20.00%、12.5%)、嫩茎(48.89%、40.00%)的污染率。可能是 3、4 月正处在植物萌芽、抽梢, 生长旺盛的时期, 叶片刚由叶芽分化展开, 芽鳞随春梢伸长脱落, 外植体表面带菌少, 因此污染率低; 12 月外植体表面在生长季节中已累积了尘埃, 以至污染率高^[8]。

表 1 L₁₆(4⁵) 正交试验因子水平设计

水平	因子/mg · L ⁻¹			
	6-BA	KT	NAA	2,4-D
1	0	0	0	0
2	1.0	1.0	1.5	0.5
3	2.0	2.0	0.5	1.0
4	3.0	3.0	1.0	1.5

2.2 外植体类型对愈伤诱导率的影响

表 3 统计了鸳鸯茉莉的花瓣、嫩叶、嫩茎的平均出愈时间、愈伤诱导率。3 种外植体比较, 愈伤诱导率、平均出愈时间大小排序均为: 嫩叶> 嫩茎> 花瓣; 污染率排序则恰好相反, 嫩叶< 嫩茎< 花瓣。

外植体	外植体采集日期									
	2008 年 12 月					2009 年 3 月				
	接入块数	污染块数	污染率/%	死亡块数	死亡率/%	接入块数	污染块数	污染率/%	死亡块数	死亡率/%
叶片	90	69	76.66	12	13.33	45	9	20.00	4	8.88
茎段	60	46	76.66	9	15.00	45	22	48.89	5	11.11

注: 污染率=污染的块数/接种总块数×100%; 死亡率=死亡的块数/接种总块数×100%。

表 3 不同外植体诱导愈伤组织结果

外植体	接种块数	存活块数	出愈块数	愈伤诱导率/%	平均出愈时间/d	污染块数	污染率/%
嫩叶	180	163	142	87.10	18~20	17	9.40
嫩茎	180	138	94	68.10	21~23	42	23.30
花瓣	180	96	26	27.10	23~25	84	46.70

注: 污染率=污染数/接种总数×100%; 愈伤诱导率=未污染外植体启动数/未污染外植总数×100%。

2.3 激素种类及浓度对不同外植体愈伤诱导直观分析

2.3.1 花瓣的愈伤组织诱导 鸳鸯茉莉的花瓣非常柔嫩, 花瓣在水下轻轻清洗后就出现不同程度的黄色。故对其消毒时, 只用 75%酒精擦拭花瓣表面。接入培养基后, 大部分花瓣呈现黄褐色, 污染率较高, 死亡率也较高。未污染的花瓣能成功诱导出愈伤组织, 且呈现多种颜色, 有白色、黄褐色、透明色(图 1)。其中, 未出现黄色的花瓣诱导愈伤组织率普遍低于已经变黄的花瓣, 且生

长情况也差些。在花瓣的愈伤组织诱导结果分析中得出: R_(2,4-D)>R_(6BA)>R_(NAA)>R_(KT), 2,4-D 因子极差最大, 为 35.790 是影响鸳鸯茉莉花瓣愈伤组织启动的关键因素, 其次是 6-BA(R=33.910)、NAA(R=25.960), 6KT(R=10.800)是影响较小的因子。

2.3.2 嫩叶的愈伤组织诱导 存活的未污染的嫩叶在接入后均能不同程度的产生愈伤组织。嫩叶的最早出愈时间为 13 d, 最晚为 24 d 愈伤组织在接种后第 18~20 天集中产生。将嫩叶愈伤组织生长状况分为 4 个等级(图 1)。对正交试验(表 4)嫩叶诱导愈伤率的结果进行激素不同水平之间极差的分析得出: R_(2,4-D)>R_(NAA)>R_(6BA)>R_(KT), 2,4-D 因子的极差最大, 为 47.678, 是影响鸳鸯茉莉嫩叶愈伤组织启动的关键因素, 其次是 NAA(R=26.383)、6-BA(R=20.748), KT(R=14.188)是影响较小的因子。

2.3.3 茎段的愈伤组织诱导 所有存活的未污染的茎段基部也均产生愈伤组织。最早出愈时间为19 d 最晚时间为27 d 在接种后21~23 d 集中产生。部分种类培养基上接入的茎段同时伴随腋芽、顶芽的分化。如第7、10、12、13、14号培养基(图1)。将茎段基部愈伤组织生长状况分为3个等级(图1)。在茎段愈伤组织的诱导中, $R_{(2,4D)} > R_{(6-BA)} > R_{(KT)} > R_{(NAA)}$, 2,4-D 因子极差最大, 为45.305, 是影响鸳鸯茉莉茎段愈伤组织启动的关键因素, 其次是6-BA ($R=30.252$)、KT ($R=22.248$)、NAA ($R=8.357$)是影响较小的因子。

2.3.4 不同外植体诱导愈伤组织的激素最优组合 对不同外植体愈伤组织诱导率的极差分析可以得出: 叶片的最适诱导培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L; 茎段的最适诱导培养基为表4 不同外植体愈伤组织诱导正交试验方案及结果

处理	水平 $mg \cdot L^{-1}$				愈伤诱导率/%		
	6-BA	KT	NAA	2,4-D	嫩叶	嫩茎	花瓣
1	1	1	1	1	0.00	0.00	0.00
2	1	2	2	2	70.00	50.00	0.00
3	1	3	3	3	100.00	84.60	0.00
4	1	4	4	4	100.00	71.40	0.00
5	2	1	2	3	100.00	33.33	57.10
6	2	2	1	4	70.00	33.33	75.00
7	2	3	4	1	66.67	18.20	20.00
8	2	4	3	2	70.00	77.70	0.00
9	3	1	3	4	88.89	80.00	33.33
10	3	2	4	3	100.00	80.00	50.00
11	3	3	1	2	90.90	100.00	0.00
12	3	4	2	1	81.80	62.50	66.67
13	4	1	4	2	100.00	100.00	0.00
14	4	2	3	1	58.30	22.22	0.00
15	4	3	2	4	100.00	88.89	33.33
16	4	4	1	3	100.00	100.00	57.10

注 愈伤诱导率= 未污染外植体启动数/ 未污染外植总数×100%。

MS+6-BA 3.0 mg/L+KT 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L; 花瓣的最适诱导培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L。

2.4 不同外植体愈伤组织诱导率的方差分析

对3种外植体愈伤组织诱导率的结果进行方差分析, 确定各激素对 各外植体诱导愈伤影响的差异显著性。各激素及误差项的离差平方和算出后, 将F 值小于1 的变异项的平方和和自由度与误差项的平方和和自由度合并, 作为试验的调整误差项⁹。合并后方差分析结果如表5 所示。2,4-D 对以叶片为外植体诱导愈伤组织有显著影响; 2,4-D、6-BA 对以茎段为外植体诱导愈伤组织有极显著影响, KT 有显著影响; 2,4-D、6-BA 对以花瓣为外植体诱导愈伤组织有显著影响。

表5 不同外植体愈伤组织诱导正交试验的调整方差分析

变异来源		离差平方和 SS	自由度 df	均方 Ms	F 值	显著性	
嫩叶	6-BA	1 054.001	3	351.3337	1.493	4.760	9.780
	NAA	1 578.757	3	526.2523	2.236	4.760	9.780
	2,4-D	4 850.172	3	1 616.724	6.870 *	4.760	9.780
	调整误差	1 411.94	6	235.3233			
	总变异	8 894.87	15				
嫩茎	6-BA	3 069.865	3	1 023.288	13.301 **	4.760	9.780
	KT	1 525.465	3	508.4883	6.610 *	4.760	9.780
	2,4-D	4 714.238	3	1 517.413	20.426 **	4.760	9.780
	调整误差	461.59	6	76.9317			
	总变异	9 771.158	15				
花瓣	6-BA	3 058.480	3	1 019.493	6.041 *	4.760	9.780
	NAA	1 526.308	3	508.7693	3.015	4.760	9.780
	2,4-D	3 158.402	3	1 052.801	6.239 *	4.760	9.780
	调整误差	1 012.52	6	168.7533			
	总变异	8 755.71	15				

注: *表示此因子对愈伤组织诱导有显著影响 **表示此因子对愈伤组织诱导有极显著影响。

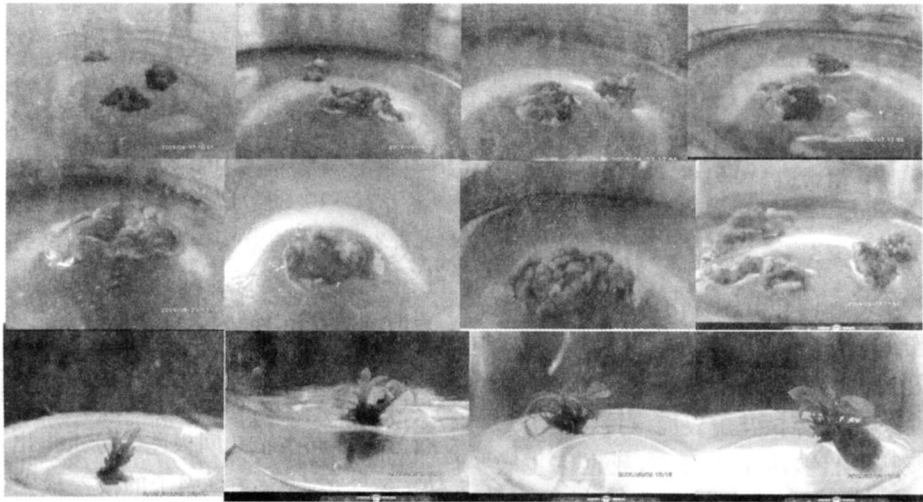


图1 花瓣、嫩叶、茎段诱导

注 第1排为花瓣诱导愈伤组织的结果。从左往右依次为等级1、2、3、4。第2排为嫩叶诱导愈伤组织的结果。从左往右依次为等级1、2、3、4。第3排为茎段诱导愈伤组织时产生的侧芽及顶芽的分化情况。

3 结论与讨论

3、4月采取的材料污染率明显低于12月采取的材料,表明3、4月份采取生能力强的幼嫩器官比成熟器官更合适。嫩叶诱导愈伤组织的污染率、死亡率最低,平均出愈时间短,是建立愈伤组织无菌体系的理想材料;嫩茎的愈伤诱导率其次,污染率、死亡率高于嫩叶,但诱导愈伤的过程中较易伴随芽的分化发生,说明嫩茎→芽分化→根分化→完整植株是鸳鸯茉莉以茎段为外植体再生植株的较好途径;花瓣诱导愈伤组织污染率、死亡率高,可能跟消毒剂种类、搭配及消毒时间有关,能产生愈伤组织的花瓣外植体均黄褐色,未变色的反而不产生愈伤组织,这其中可能的细胞生理方面的机理还有待研究;此外产生了愈伤组织但后来污染的花瓣致使整瓶培养基均呈黄色,这是否类似褐化的机理还不清楚;花瓣外植体能成功诱导出鲜活的愈伤组织,这为探索通过花器官组织培养再生完整植株的新途径的可能性奠定了一定基础。

L₁₆(4⁵)正交设计中各激素的水平是在预试验结果分析的基础上设定的。横向比较:3种植体中嫩叶诱导愈伤组织效果最好。纵向比较:直观分析和方差分析可得出各激素因子对外植体诱导愈伤组织的影响显著性,筛选各外植体最适的愈伤组织诱导激素组合。为愈伤组织大量增殖作准备。

外植体→愈伤组织→分化出芽/生根→完整植株和

茎段→芽分化→根分化→完整植株,为建立快繁体系的2种途径,试验探索的仅是不同外植体对愈伤组织诱导上的影响,是否能高效快繁还要进一步试验。

关于以花瓣外植体诱导愈伤组织的报道较少,仅有些关于花蕾组织培养的报道^[10]。探索花瓣的合适消毒试剂及消毒时间以降低污染率、死亡率,从而进一步分化成完整植株是值得研究的;此外,研究基本培养基类型和激素与花瓣上胚状体发生概率的关系也值得尝试。

参考文献

[1] 陈俊愉,程诸珂.中国花经[M].上海:上海文化出版社,1990.
[2] 郑万钧.中国树木志[M].1卷.北京:中国林业出版社,1983.
[3] 侯娥.鸳鸯茉莉的盆栽养护技术[J].河北林业科技,2009,2(1):65.
[4] 杨秋生,陈树国.鸳鸯茉莉扦插繁殖试验初报[J].河南农业大学学报,1991(3):18-19.
[5] 付凯,王玉英.双色茉莉的组织培养[J].植物杂志,1986(1):17.
[6] 宋英今,季静,刘海学,等.安祖花愈伤组织诱导及其分化的正交试验设计[J].核农学报,2008,22(3):300-303.
[7] 柯石山,曾黎辉.双色茉莉组培快繁技术研究[J].福建热作科技,2003,28(3):3-5.
[8] 龚雪琴,曲复宁,由翠荣,等.彩色马蹄莲叶片愈伤组织培养体系的建立[J].烟台大学学报,2008,21(3):221-225.
[9] 王玲平,魏海龙,王米力,等.双色茉莉茎段离体培养再生植株的研究[J].浙江林业科技,2008,28(5):20-24.
[10] 及华,李瑞先,张海新.两色茉莉花蕾组织培养再生植株[J].河北林业科技,1995,6(2):55-56.

A Preliminary Study on the Callus of *Brunfelsia latifolia* Induced by Different Explants

YUAN Yuan, LIAN Fang-qing

(Art and Garden faculty of Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

Abstract: The petal, leaf and stem segment of *Brunfelsia latifolia* as different explants were cultivated on MS basic medium added hormones of different types and concentrations. Studied the effects of different explants for inducing callus; Though orthogonal design combined with range analysis and variance analysis, studied the optimal type and concentration of hormones for each explant to induce callus. The result indicated that: Explants collected in march and april were better than explants collected in december; petal as explant could successfully induce normal callus but induction rate was only 27.1% and average induction time was 23~25 d; Among three kinds of explant, young leaf's callus induction rate was the highest(87.1%)and average induction time was the shortest(19~21 d); the induction rate of stem segment was 68.1%, average induction time was 21~23 d; 2, 4-D, 6-BA had a significant influence on petal explants' callus induction and the optimal induction medium was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L, 2, 4-D had a significant influence on leaf explants' callus induction and the optimal induction medium for leaf was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L, 2, 4-D, 6-BA had a very significant influence on stem explants' and the optimal induction medium was MS+6-BA 3.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L.

Key words: *Brunfelsia latifolia*; explant; plant hormones; callus induction rate