

洋桔梗组培苗生产关键技术研究

钟 波

(广西壮族自治区种子管理总站, 广西 南宁 530022)

摘 要:以开粉色花的洋桔梗包衣种子为试材,通过叶片诱导、单芽增殖和生根等培养基的筛选,研究了洋桔梗组培苗生产关键技术。结果表明:叶片诱导的适合培养基为 MS+6-BA 0.4 mg/L+IBA 0.1 mg/L,每叶盘分化的正常芽为 5 个左右;单芽诱导的适合培养基为 MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.05 mg/L,每母株分化的正常芽为 5 个左右,并有 55% 的芽达生根标准;生根的适合培养基为 1/2MS+IBA 1.0 mg/L,生根率达 95%。

关键词:洋桔梗;组培苗;关键技术

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)16-0090-03

洋桔梗(*Enstoma grandiflorum*)为龙胆科龙胆属观赏植物,又名草原龙胆,原产于美国、墨西哥。洋桔梗花姿高雅秀丽,妩媚动人且插花效果好,花朵寿命可达2~3周,是国际上流行的切花品种,现已成为世界十大切花之一。洋桔梗的种子细小且价格昂贵,国内种植大多依赖进口。因此,以离体培养获得种植材料是有效降低生产成本的措施之一。近年来,对洋桔梗离体培养的研究也较多,但大多停留在洋桔梗离体培养的某一阶段^[1-4],没有上升为洋桔梗组培苗规模化生产流程的程度。现以开粉色花的洋桔梗品种为材料,从获得无菌苗开始,利用第2代分化苗的叶片和小苗再次增殖,到生根移栽的全过程进行研究,以期为洋桔梗组培苗规模化生产提供直接参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以开粉色花的洋桔梗包衣种子为材料进行播种获得无菌苗。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 用无菌水浸泡种子约 30 min,待包衣溶解后,把种子移到离心管中,加 10% NaClO(次氯酸钠)并在摇床上摇 20 min。在超净台内用无菌水冲洗 5~6 次,每次冲洗时间约 1 min,冲洗时反复轻摇离心管,倾倒时轻敲管壁以使种子沉淀,然后倾出洗液待播。

1.2.2 叶盘诱导 取诱导第2代苗再转 MS 20 d 的叶片(已消除激素影响),均切成 0.4~0.5 cm² 大小的叶盘背面朝下接表 1 分化培养基中诱导,30 d 后统计结果。

1.2.3 单芽诱导 取诱导第2代苗并接 MS 壮苗消除激素影响后的小苗,均为 2~3 对叶不去顶接表 1 分化培养基中诱导,15 d 后统计结果。

1.2.4 生根培养 以高约 2 cm 的正常分化苗为材料,诱导生根的培养基为 B₁:1/2MS+IBA 0.5 mg/L;B₂:1/2MS+IBA 0.8 mg/L;B₃:1/2MS+IBA 1.0 mg/L,20 d 后统计结果。1/2MS 为大量元素减半,蔗糖 20 g/L,其它与 MS 相同。

1.2.5 培养条件 培养条件为温度(26±2)℃,光照强度 2 000 lx,光照时间 8 h/d。

表 1 培养基配方

Table 1 Composition of the medium

| 培养基 Medium | MS | BA /mg·L ⁻¹ | IBA /mg·L ⁻¹ | NAA /mg·L ⁻¹ | 蔗糖 Sucrose/% | 琼脂 Agar/% | pH |
|---------------|----|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|--------------|----|
| A1 | MS | 0.2 | 0.05 | — | 3 | 1 | 6 |
| A2 | MS | 0.2 | 0.10 | — | 3 | 1 | 6 |
| A3 | MS | 0.4 | 0.05 | — | 3 | 1 | 6 |
| A4 | MS | 0.4 | 0.10 | — | 3 | 1 | 6 |
| A5 | MS | 0.5 | — | 0.01 | 3 | 1 | 6 |
| A6 | MS | 0.3 | — | — | 3 | 1 | 6 |

2 结果与分析

2.1 叶片诱导

叶盘在 A₁~A₆ 中诱导,15~20 d 时在切口出现愈伤,并可见有芽点,25 d 后芽点长成具有 2 片叶的不定芽,30 d 时进行统计。由表 2 可知,叶盘在 A₄ 中诱导的效果最好,平均每叶盘分化的正常芽数为 4.7 个,正常芽比率达 98%,且芽点粗壮,叶色浓绿。A₅ 为 BA 0.5 mg/L,在此培养基中诱导的不定芽多玻璃化,正常芽的比率为 72%,平均每叶盘正常不定芽数仅为 2.6 个,表明 BA 浓度高于 0.5 mg/L 即出现玻璃化现象。由此可见,A₄ 为

作者简介:钟波(1973-),男,广西兴业人,本科,农艺师,现主要从事品种审定及品种推广工作。

收稿日期:2012-05-08

较理想的叶盘诱导培养基,并且此叶片来源广泛而稳定,重复性和可操作性强,是实现稳定、高效洋桔梗组培苗规模化生产的理想外植体材料。

表2 培养基 A₁~A₆ 对洋桔梗叶片诱导的效果

Table 2 Effect of A₁~A₆ medium on induction of leaves of *Enstoma grandiflorum*

| 培养基 Medium | 叶盘数 Total leaves /个 | 分化总芽数 Total bubs /个 | 正常芽数 Normal bubs/个 | 平均每叶盘正常芽分化数 Number of normal bubs per leaves/个 | 正常芽比率 Normal bubs rate/% |
|----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--|--------------------------------|
| A ₁ | 10 | 14 | 14 | 1.4 | 100 |
| A ₂ | 10 | 16 | 12 | 1.2 | 75 |
| A ₃ | 10 | 28 | 23 | 2.3 | 82 |
| A ₄ | 10 | 48 | 47 | 4.7 | 98 |
| A ₅ | 10 | 36 | 26 | 2.6 | 72 |
| A ₆ | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |

2.2 单芽诱导

单芽在 A₁~A₆ 中诱导,4~6 d 左右从顶芽算起最后 1 对侧芽始萌发,15 d 时观察到有些小苗已有 2 对叶以上,高 1.5~2.0 cm,达到生根标准,15 d 时进行统计。由表 3 可知,单芽在 A₁~A₆ 中均能诱导,几乎没有出现玻璃化现象,能适应的激素范围较广泛,在以上培养基中平均每株正常苗分化数从 3.06~5.25 倍不等,表现出较好的组培特性,尤以 A₁ 诱导效果最佳,每株的增殖倍数为 5.25 倍,能直接生根的比率达 55%。由于增殖的母株是没有去顶端优势的植株,不能直接生根的芽应及时切下接 MS 中壮苗。

表3 培养基 A₁~A₆ 对洋桔梗单芽诱导的效果

Table 3 Effect of A₁~A₆ medium on induction of single bub of *Enstoma grandiflorum*

| 培养基 Medium | 单芽数 Single bubs/个 | 分化总芽数 Total bubs /个 | 正常芽数 Normal bubs/个 | 正常芽比率 Normal bubs rate/% | 直接生根芽数 Direct rooting bubs/个 | 直接生根芽比率 Direct rooting rate/% |
|----------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| A ₁ | 16 | 84 | 84 | 100 | 46 | 55 |
| A ₂ | 16 | 69 | 69 | 100 | 25 | 36 |
| A ₃ | 16 | 63 | 61 | 96 | 12 | 19 |
| A ₄ | 16 | 69 | 69 | 100 | 27 | 39 |
| A ₅ | 16 | 72 | 72 | 100 | 32 | 44 |
| A ₆ | 16 | 47 | 47 | 100 | 17 | 35 |

2.3 生根培养

由表 4 可知,B₂ 与 B₃ 生根率均达 90% 左右,均可作为洋桔梗适宜的生根培养基,但从降低成本考虑,B₂ 就可以了。

2.4 移栽

练苗 1 周后,取出生根苗,洗净基部培养基栽入消

表4 培养基 B₁~B₃ 对洋桔梗生根的影响

Table 4 Effect of B₁~B₃ medium on rooting of *Enstoma grandiflorum*

| 培养基 Medium | 总苗数 Total seedlings/株 | 已生根苗数 Rooted seedlings/株 | 生根率 Rooting rate/% |
|----------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| B ₁ | 37 | 29 | 78 |
| B ₂ | 37 | 33 | 89 |
| B ₃ | 37 | 35 | 95 |

毒过的蛭石中,盖膜保温 1 周,掀开膜后每隔 5~7 d 喷 1 次营养液,此方法可使生根苗成活率达 95% 左右。25~30 d 后,待根系发育成侧根发达的根团时,淘汰弱小植株后即可移栽定植。

3 结论与讨论

在 MS+6-BA 0.4 mg/L+IBA 0.1 mg/L 培养基中,每叶盘诱导的正常苗数为 5 株左右。每片叶可切为 6~8 个叶盘,以每片叶切为 6 个叶盘计,1 个月后每片叶的增殖倍数达 30 倍左右。并且此叶片来源广泛而稳定,重复性及可操作性强,可作为实现稳定、高效的洋桔梗组培苗工厂化生产的理想外植体。虽用叶片作外植体增殖的倍数大,但在切割外植体时,由于操作时间长也易造成污染。

单芽在 MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.05 mg/L 中诱导,15 d 时统计增殖倍数达 5.25 倍,且有 55% 的分化苗可直接生根。把不能直接生根的芽及时切下壮苗,再把母株接回原诱导培养基中,过 15 d 后统计仍有 3~4 倍的增殖倍数。这样仅有 2~3 对叶的小苗,1 个月后的增殖倍数达 8 倍左右。利用单芽诱导增殖,操作相对简单一些,对降低污染有一定的作用。

在实际操作中发现,生根苗有 2 条正常根以上,就能移栽成活,因此,从降低成本考虑,生根培养基为 1/2MS+IBA 0.8 mg/L。把生根苗直接移到消毒的蛭石中,成活率达 95% 左右。

以上研究结果所用的材料为第 1 代继代苗,对外植体的继代增殖应控制在多少代内,才能避免遗传变异性机率和种性退化,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 张淑娟,刘与明. 洋桔梗 F₁ 无菌播种和试管苗的快速繁殖[J]. 亚热带植物通讯,1996,25(2):13-16.
- [2] 杨永刚,周根余,程磊. 洋桔梗叶片体外再生系统的激素调控[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),2001,30(1):98-100.
- [3] 达克东,张松,臧运祥,等. 洋桔梗叶片培养不定芽发生和微繁殖研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2003,34(4):494-498.
- [4] 傅玉兰,杨海燕,姚萍. 植物激素在洋桔梗组培快繁中的应用研究[J]. 安徽农业科学,2005,33(10):1847-1848.

Study on Key Technology of Production Tissue Culture Seedling of *Enstoma grandiflorum*

ZHONG Bo

(Seed Administration Station of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530022)

毛尖紫萼藓配子体再生体系的建立

沙 伟, 崔 巍, 张 梅 娟

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:以消毒试验后所得的毛尖紫萼藓原丝体为材料,通过培养,成功的建立了毛尖紫萼藓配子体再生体系。结果表明:MS培养基、低 pH 能促进毛尖紫萼藓原丝体褐化;葡萄糖能诱导出弱小的配子体;激素对毛尖紫萼藓配子体诱导效果不理想; NH_4NO_3 浓度为 2.5 g/L 的 Prat 培养基,适合于毛尖紫萼藓原丝体分化成配子体;将褐化到一定程度的原丝体接种到 Prat 培养基后,20 d 可以生长出较理想的配子体。

关键词:毛尖紫萼藓;组织培养;配子体

中图分类号:S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)16-0092-03

毛尖紫萼藓(*Grimmia pilifera* P. Beauv. Prodr.)为紫萼藓科(Grimmiaceae)紫萼藓属(*Grimmia*)藓类植物,植物体粗壮,稀疏成片丛生,高 3~4 cm。茎倾立,挺硬,衡疏叉状分枝,中轴细胞不分化的小型早生藓类。在我国南北各省区均有分布,呈现出东亚与北美的间断分布^[1]。毛尖紫萼藓有着特殊的抗旱机制^[2],但对于其抗旱机制相关的研究并不深入。得到新生的配子体是组织培养的重要步骤,也是最终目的。通过组织培养可以去除野外采集材料的杂质,得到纯种的、均一的材料,为毛尖紫萼藓生理、分子生物学等更深入的研究打下基础,从而确定植物体中的特殊成分,分析其效用,进一步开发毛尖紫萼藓的实际应用价值,开发出造福人类的商业成品。

1 材料与方法

1.1 试验材料

毛尖紫萼藓采自黑龙江省五大连池市石龙地区。

1.2 试验方法

1.2.1 试材的消毒 将植物体清洗干净,充分复水,预

培养 15 d,解剖镜下取茎尖部约 5 mm。流水冲洗 5 h,在浓度为 0.025% 的升汞溶液旋流振荡消毒 105 s,无菌水振荡冲洗 5~8 次。接种在 Beneck 培养基中,得到毛尖紫萼藓原丝体。

1.2.2 原丝体培养条件 以改良后的 Prat 培养基(NH_4NO_3 浓度从原来的 2.5 g/L 改为 0.5 g/L)为基础培养基,不添加糖类,琼脂为 9 g/L, pH 5.5,培养温度 23℃,光照强度 3 000 lx,光照周期 12 h/12 h。

1.2.3 MS 培养基对配子体诱导进行培养 将毛尖紫萼藓原丝体继代到 MS 培养基中, pH 6.0,培养 30~50 d 后,继代到 pH 5.5 的改良的 Prat 培养基中,30 d 后观察试验结果。

1.2.4 pH 为 4.5~5.0 的改良的 Prat 培养基对配子体诱导进行培养 将毛尖紫萼藓原丝体继代到 pH 为 4.5~5.0 的 Prat 培养基中,培养 20 d 左右,继代到 pH 为 5.5 的改良的 Prat 培养基中,30 d 后观察试验结果。

1.2.5 pH 为 6.0 的 MS+葡萄糖培养基对配子体诱导进行培养 将毛尖紫萼藓原丝体继代到 pH 为 6.0 的 MS+葡萄糖(30 g/L)培养基中,30 d 后观察试验结果。

1.2.6 不同激素配比对毛尖紫萼藓配子体诱导 将毛尖紫萼藓原丝体继代到不同激素配比的 Prat 培养基上,30 d 后观察试验结果,不同激素配比及培养基见表 1。

第一作者简介:沙伟(1963-),女,博士,教授,博士生导师,现从事植物学和植物遗传学的教学与科研工作。E-mail:shw1129@163.net。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31070180)。

收稿日期:2012-05-23

Abstract: Taking the capsuled of *Enstoma grandiflorum* with pink flower as the material, the key technologies of production tissue culture seedling of *Enstoma grandiflorum* were studied. The mediums of leaves induction, single bubs enrichment culture and rooting were elected and the other methods of production were summarized. The results showed that the best medium of leaves induction was MS+6-BA 0.4 mg/L+IBA 0.1 mg/L and the normal bubs every leaf was 5 in it. The best medium of single bubs enrichment was MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.05 mg/L and the normal bubs every single bubs was 5 in it. The best medium of rooting was 1/2MS+IBA 1.0 mg/L and rooting rate was 95% in it.

Key words: *Enstoma grandiflorum*; tissue culture seedling; key technology