

不同培养条件下长寿花叶片再生体系的构建

冯林剑, 贾东坡, 张信栓

(河南农业职业学院植物科学系, 河南中牟 451450)

摘要:以长寿花粉红色品种离体叶片为外植体, 探讨了基本培养基、暗培养以及不同植物生长调节剂组合对不定芽再生的影响。结果表明, 基本培养基以 MS 最为合适, 以 $1/2MS+BA2.0mg/L+NAA0.1mg/L$ 可以使粉红色品种的叶片不定芽的再生率高达 5.2, 暗培养 15 天可以将叶片的不定芽再生率提高到 5.47。生根培养用 $1/2MS+IBA0.1 mg/L$ 最好。

关键词:白花长寿花; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号:S681; Q949 **文献标识码:**A

Research of Different Culture Conditions on Plantlet Regeneration from Leaves of *Kalanchoe blossfeldiana*

Feng Linjian, Jia Dongpo, Zhang Xinshuan

(Henan Vocational College of Agriculture, zhongmu henan 451450)

Abstract: The ideal regeneration system of *Kalanchoe blossfeldiana* with pink flower by leaf explants was established in this study, and the effects of basic medium, dark periods and plant growth regulators external on shoot regeneration from leaves of *Kalanchoe blossfeldiana* were investigated. The results showed that the highest traticious on regeneration rate of 5.20 was obtained on the medium MS supplemented with 2.0 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA .Two weeks of dark treatment could increase the shoot regeneration rate to 5.47. MS supplemented with 0.1mg/l IBA for rooting.

Key words: *Kalanchoe blossfeldiana*, Tissue culture, Propagation

植物基因工程已在作物育种、种质资源保存等领域显示了巨大的作用。植物组织培养作为基础研究手段之一, 是植物高频、稳定、快速体细胞再生芽体系的建立和细胞转化的有效途径。长寿花 (*Kalanchoe blossfeldiana*), 又叫矮生伽蓝菜、寿星花、假川莲, 是景天科伽蓝菜属多年生肉质植物, 原产马达加斯加^[1], 花色有深红、橙红、粉红、白色等, 花期为冬、春两季。长寿花植株小巧玲珑, 株型紧凑, 叶片翠绿, 花朵密集, 是观叶和观花的优良花卉, 可采用水培盆栽、微型盆栽、大型盆栽、花坛布置等室内外栽培, 加上其耐干旱、易栽培、装饰效果好, 已成为一种很有发展潜力的“新品种花卉”, 市场前景看好^[2]。通过粉红长寿花叶片再生试验, 以期长寿花无性变异体筛选及建立适合遗传转化的再生体系, 为进一步应用遗传转化法改良长寿花品种提供实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

供试材料为河南农业职业学院园林花卉教研室

提供的粉红色长寿花品种, 2005 年 7 月剪取中上部枝条带回室内, 以叶片为外植体作为研究对象。

1.2 方法

从枝条上剪下完全展开的叶片(带叶柄), 用洗洁精液洗涤 2~3min, 流水冲洗 30min 后滤纸吸干水分置于超净工作台上, 用 75% 的酒精灭菌 10 秒, 倒去酒精, 再用 0.1% 升汞分别灭菌 2、4、6、8、10min, 最后用无菌水冲洗 5~6 遍, 无菌滤纸吸干水分, 切成 $0.5cm^2$ 大小的小块(小叶不切, 留叶柄), 接种到再生培养基上。再生培养基选用 MS、 $1/2MS$ 、B₅ 为基本培养基, 添加不同浓度生长素和分裂素(见表 1)及其它附加物(蔗糖浓度为 3%, 琼脂浓度为 0.65%), PH5.5~6.0, 121~123℃湿热高压灭菌 15~20min。每组叶片分正反两面分别接种 30 瓶, 每瓶接种一个叶片小块, 重复 3 次。接种叶片一半进行暗培养, 另一半在培养架上以日光灯为光源进行光照培养, 光照时间 12h, 光照强度 2000lx。培养温度均为 $(25 \pm 2)^\circ C$ 。叶片接种后 35d 统计叶片再生率, 并对结果进行单因子方差分析。当

第一作者简介: 冯林剑, 1967 年生, 讲师, 主要从事植物组织培养与植物学研究。通信地址: 451450 河南中牟河南农业职业学院植物科学系, E-mail: hn-nxflj@126.com, Tel: 0371-67290626。

收稿日期: 2006-01-07, 修回日期: 2006-01-17。

再生芽长到 2mm 时,剪成单芽进行生根诱导。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对无菌外植体建立的影响

灭菌时间不同,灭菌效果也不同(表 2 为 30 天统计结果)。从表 2 可以看出:叶片在 0.1%升汞灭菌 8min 的消毒条件下效果最佳,其污染率仅为 1.1%,但 90 个外植体中有 1 个叶片被灭菌剂杀死;虽然灭

表 1 $L_9(3^4)$ 试验因子水平表

因子水平	基本培养基	BA(mg/L)	NAA(mg/L)
1	MS	0.5	0.1
2	1/2MS	1.0	0.5
3	B ₅	2.0	1.0

菌 10min 时外植体材料没有污染,却有 50%叶片被灭菌剂杀死;灭菌 2min 时,细菌性污染和真菌性污染同时出现,在接种 2 天后就可观察到培养材料边缘出现

混浊的粘液状物,第 4 天开始出现菌斑,第 7 天出现各种颜色霉层,10~15 天时整个培养基基本布满霉菌,可见主要是灭菌不彻底造成的;灭菌 4min 材料也出现云雾状细菌性污染,同时出现绿霉、青霉状真菌污染的现象;灭菌 6min 细菌性和真菌性污染分别发生,仅有部分同时在一起发生。随着灭菌时间的递增,虽然污染率很低,但在杀死了微生物同时也对外植体造成了不可逆转的损伤。

2.2 培养基、培养方式及生长调节物质对叶片再生的影响

长寿花叶片上的芽再生速度比较快,暗培养条件下 15 天左右可以看出叶片近轴端有少量芽体出现,20 天时芽伸长可达 1.5mm 左右;光照培养条件下 20 天才在叶片近轴端有芽体出现,芽体数量较暗培养

表 2 不同时间对无菌体系建立的影响

灭菌时间	接种外植体数(个)	污染的外植体数(个)	污染率(%)	外植体生理状态
0.1%升汞 2min	90	90	100	叶片没有被杀死
0.1%升汞 4min	90	64	71.1	没有叶片被杀死
0.1%升汞 6min	90	48	53.5	2 个叶的边缘被杀死
0.1%升汞 8min	90	1	1.1	1 个叶片被杀死
0.1%升汞 10min	90	0	0	50%叶片被杀死

条件下少,25 天左右芽开始伸长,伸长速度相对没有暗培养条件下快,但再生芽长势比暗培养条件下健壮。表 3 为接种 35 天后对叶片的再生芽体进行统计,以再生有效芽数(芽长 0.5mm 以上的芽)/接种叶片数来统计再生率。

从表 3 看出:不同培养基、培养方式及生长调节

物质对叶片再生芽诱导的效果不同,试验无论暗培养或光培养,各处理组合的诱导再生率大小依次是:6>9>3>8>2>5>1>4>7。在具体选择的各个因子中,A 因子不同,叶片的再生率也不同,但差异不明显;随着 B 因子水平的上升,再生率呈上升趋势,三水平间差异明显;随着 C 因子含量水平的上升,再生

表 3 不同培养基、培养方式及生长调节物质对叶片再生的影响

处理	A 基本培养基		B BA(mg/L)		C NAA(mg/L)		再生率		再生体系外部表现
	光培养	暗培养	光培养	暗培养	光培养	暗培养	光培养	暗培养	
1	1 (MS)		1(0.5)		1(0.1)		1.7	2.0	芽苗少、粗壮
2	1		2(1.0)		2(0.5)		3.5	3.7	芽苗健壮
3	1		3(2.0)		3(1.0)		5.2	5.6	芽苗多,有根产生
4	2 (1/2MS)		1		2		1.3	1.5	芽壮少,有少量根
5	2		2		3		3.0	3.3	芽健壮有少量根产生
6	2		3		1		6.7	6.8	芽苗多、细弱
7	3 (B ₅)		1		3		0.9	1.2	芽粗壮,有愈组产生
8	3		2		1		4.1	4.3	芽健壮
9	3		3		2		5.8	6.0	芽多细、有少量根
类别	光培养	暗培养	光培养	暗培养	光培养	暗培养			
K1	3.47	3.78	1.30	1.57	4.17	4.37			
K2	3.67	3.87	3.53	3.90	3.53	3.73			
K3	3.60	3.83	5.90	6.13	3.03	3.37			
R	0.20	0.09	4.6	4.56	1.14	1.00			

率呈下降趋势,各水平间有差异。这说明不同培养基、激素及其含量水平对再生率的影响趋势是不同的。从表 3 还可以看出,各因子极差顺序为 B>C>A(光、暗培养一致),这反映出对再生率影响顺序是 B>C>A。再生率 A 因子以 A2 最高,B 以 B3 最高,C 以 C1 最高;再生率以组合 A2B3C1 为最高。但 B 因子中 B2 影响的芽苗健壮,数量为 3.53,对叶片再生诱导的最优组合也有可能是 A2B2C1。

对 $L_9(3^4)$ 正交试验进行单因子方差分析,结果表

明,BA 表现极显著,NAA 表现显著,基本培养基不显著,与直观分析基本相吻合。笔者对再生倍数最高的组合和有可能最优的组合进行了验证,验证结果表明:A2B3C1 组合的再生率为 5.2(光培养)、5.4(暗培养),再生芽整体健壮;A2B2C1 的再生率为 3.4(光培养)、3.7(暗培养),再生芽健壮。由于组合 A2B3C1 再生芽数比 A2B2C1 多,芽体也健壮,故为最优组合。

2.3 培养方式对叶片再生的影响

分别把叶片接种于培养基 1/2MS+BA2.0mg/L+

NAA0.1mg/L(最优组合)中,于30天时观察不同光、暗培养方式对叶片再生的影响,结果如表4所示。从表4可以看出不同的黑暗和光照条件下,再生芽苗的生理状态不一样,综合比较以先暗培养15天再进行光照培养为佳。

表4 不同培养方式组合对叶片再生的影响

暗培养(d)	光培养(d)	接种数(个)	再生有效芽数(个)	再生芽状态
0	30	30	135	芽苗壮
5	25	30	139	苗健壮
10	20	30	144	芽苗健壮
15	15	30	164	芽苗较壮
20	10	30	171	芽苗稍高弱
25	5	30	176	苗高黄白较弱
30	0	30	181	苗细高黄白弱

5)。从表5可以看出:叶片的正面接触培养基,其再生有效芽数、再生率都明显高于叶片背面接触培养基,说明叶片正面放置方式更有利于叶片再生。

2.5 激素组合对生根的影响

以1/2MS为基本培养基,分别添加不同的细胞分

表5 叶片放置方式对叶片再生的影响

培养基	接触面	接种数(个)	再生有效芽数(个)	再生率
1/2MS+BA2.0mg/L+NAA0.1mg/L	背面	90	195	2.17
	正面	90	463	5.14

后降低,在0.2 mg/L时苗基部出现轻微愈伤,0.3mg/L时出现较大愈伤块。两种激素配合时,生根条数没有单加生长素根数多。最适的生根培养基为:1/2MS+IBA0.1 mg/L。

表6 不同激素组合对生根的影响

基本培养基	IBA (mg/L)	BA (mg/L)	接种数(个)	生根数(条)	平均生根数(条)
1/2MS	—	—	30	45	1.50
1/2MS	0.1	—	30	126	4.20
1/2MS	0.2	—	30	93	3.10
1/2MS	0.3	—	30	86	2.87
1/2MS	0.1	0.1	30	38	1.27
1/2MS	0.2	0.1	30	64	2.13
1/2MS	0.3	0.1	30	89	2.97

时发现:暗培养时,再生芽数量多但芽体纤弱;光培养时再生芽个数少但芽体健壮;光、暗培养相结合时,再生芽数量增加、长势也健壮,与许多研究结果一致^[3,4]。

陈玉梁以普通长寿花叶片为材料进行再生体系研究后指出:基因型不同,影响再生的因素也不同,尤其是在外植体选择和培养基筛选上还应进一步研究。同时他在进行叶盘放置方式对再生体系建立影响的研究时,认为正面向上有利于再生^[5]。而张瑞姿用长寿花红色品种“Rako”为试验材料进行同样研究时,认为叶片背面向上有利于叶片再生^[6]。笔者用粉红长寿花品种进行研究时发现,正面向上再生率较高。Nehra等认为造成这种差异的原因是叶背面气孔较多,组织疏松,角质层不发达,有利于营养吸收^[7]。

2.4 叶片放置方式对叶片再生的影响

分别以90个幼叶按正面和背面接种于最适培养基上,接种10天时,叶片正面和背面形态无明显变化;20天后,在正面放置的叶片的近轴端有小芽体,25天生长分化出小芽。在35天后进行统计(结果见表

裂素和生长素(表6)进行生根诱导,在7天时幼根伸出,10天时培养基表面根系生长出一层白色绒状根毛,当根系伸入培养基后,不再生长白色根毛,而变为褐色根系延伸。25天对生根结果进行统计(表6)。由表6可以看出,随着IBA浓度的升高,生根数先增多

3 讨论

暗培养有利于不定器官的再生^[3],并在许多植物的离体叶片培养中都可以促进不定芽的高效再生^[4]。笔者在探讨不同的光照条件对长寿花叶片再生影响

参考文献

- 1 华金渭,刘南祥,吴华芬,等.长寿花栽培技术[J].中国花卉园艺,2005,(6):29
- 2 黄海帆,李保印,李平.影响长寿花离体培养及植株再生的几个因素[J].中国农学通报,2004,20(2):12~14
- 3 Durham R E, Korban S S. High efficiency shoot regeneration from in vitro grown leaves of apple[J].Hortscience,1993,28(5):543~551
- 4 李秀梅,汤浩茹,罗娅.金华梨子叶不定梢再生研究[J].果树学报,2004,21(4):295~297
- 5 陈玉梁,支小刚,张艳萍.长寿花叶盘离体培养及植株高效再生研究[J].中国农学通报,2004,20(5):33~34
- 6 张瑞姿,郭晓霄.长寿花叶片再生体系的研究[J].山西林业科技,2005,(1):8~9
- 7 Nehra N S, Sthshnoff C. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks[J].J Amer soc Hort Sci,1989,114(6):1014~1018

(责任编辑:秦守亮)