

仙客来的组织培养及植株再生

王 波¹, 王 鹤¹, 谭 巍², 任如意¹, 郭长虹¹

(1. 哈尔滨师范大学生物系, 150080; 2. 黑龙江省农业科学院园艺分院, 哈尔滨 150069)

摘 要:以仙客来叶片、叶柄、花梗等部位为外植体进行组织培养及植株再生。结果表明, 叶片(及叶基部)诱导率较高, 叶柄次之, 花梗最次。经试验筛选出最适合诱导愈伤组织的培养基为 MS+6-BA 2.0+2,4-D 0.2+KT 0.2, 诱导培养基同上。

关键词:仙客来; 组织培养; 愈伤组织; 诱导

中图分类号:S 682.2⁺62; S 603.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2007)01-0166-02

仙客来(*Cyclamen persicum* Mill)为报春花科仙客来属植物, 半耐寒多年生球茎类草本。别名兔耳花, 兔子花, 又叫一口冠、萝卜海棠、翻瓣莲。原产于地中海沿岸的希腊、突尼斯等国, 20 世纪 30 年代才传入我国, 但很快便传播开来。仙客来观赏价值较高, 且花期特长, 主要在鲜花极少的冬、春季节开花, 正逢圣诞节、元旦和春节, 故深受人们喜爱, 成为优美、理想的冬季盆栽花卉。在欧洲花卉市场上, 仙客来被视为十大盆花之一^[1]。在日本, 也是仅次于兰花的第二大盆花, 且市场价格昂贵^[2]。仙客来主要靠种子繁殖, 但其变异性大, 商品或园艺仙客来大多是杂种一代(F₁), 用种子繁殖难以保存 F₁ 代的原有性状和杂种优势^[3]。对仙客来进行组织培养可以解决以上问题, 又能降低仙客来的生产成本, 使仙客来走进千家万户。

试验对仙客来的组织培养及植株再生条件进行了探索, 为通过组织培养法对仙客来进行扩繁以及进一步开展仙客来的基因工程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 外植体

试验所用材料取自黑龙江省农业科学院, 为法国引种仙客来。选舒展的幼嫩叶片、叶柄、花梗等为外植体。

1.2 材料处理

取材后流水冲洗 3~5 min, 75% 酒精消毒 5~8 min, 无菌水冲洗 1~2 次, 0.1% 升汞溶液中浸泡 10 min, 再用无菌水冲洗 3~4 次。分割材料: 把叶片切成 5×5 (mm) 的小块, 叶柄 5~6 mm, 花梗 3~4 mm, 迅

速在无菌操作台上接种到诱导愈伤组织的各种固体培养基中。

1.3 培养条件

温度为 20 ℃ 左右; 光照初期为无光照, 中期弱光照, 后期强光照; 培养基以 MS 培养基为基本培养基, 添加不同浓度的激素, 部分培养基中添加 KT、20% 硫代硫酸钠(5 ml/L)或活性炭, pH 范围 5.6~5.8, 筛选的主要培养基其配比如下:

A. MS+6-BA 1.0+2,4-D 1.0+活性炭(0.1%); B. MS+6-BA 2.0+2,4-D 0.2+KT 0.2; C. MS+6-BA 2.0+2,4-D 0.2+KT 0.2+20% 硫代硫酸钠; D. MS+6-BA 1.0+2,4-D 1.0+20% 硫代硫酸钠; E. MS+6-BA 1.0+2,4-D 0.5+KT 0.2+少量活性炭(大约 0.05%); F. MS+6-BA 2.0+2,4-D 0.5+KT 0.2+活性炭(0.1%)。

2 结果与分析

于 2005 年 10 月至翌年 6 月采用仙客来不同外植体, 在不同激素配比的培养基上进行了初代诱导培养和继代增殖培养。

2.1 愈伤组织与不定芽的诱导

将处理过的叶片、叶柄、花梗等外植体分别接种于 A、B、C、D、E、F 6 种培养基中, 观察结果见表 1。

通过以上观察可以看出, 以培养基 B 的诱导效果最好, 产生愈伤多, 生长速度快, 有 20%~30% 的外植体上直接产生不定芽, 最后转化为叶原基分化; C 次之, 主要是愈伤组织的增生; D、E、F 则较差, A 效果最差。

不同培养基的愈伤组织平均诱导率及苗分化率见表 2。

2.2 继代增殖培养

将培养基 B、C 中的愈伤组织块分割后转入原培养基中, 并且在 20 ℃ 强光下照射进行继代培养。原愈伤组织增生, 并逐渐形成芽丛(图 3)。

第一作者简介:王波, 男, 1982 年生, 硕士研究生, 主要研究方向为植物基因工程。

通讯作者:郭长虹, 女, 1968 年生, 教授, 研究方向为植物遗传学与基因工程。

基金项目:黑龙江省科技攻关资助项目, 编号:GC05B108。

收稿日期:2006-09-10

表 1 各种外植体在不同培养基及培养条件下的观察

培养条件及观察时间(d)		观察记录
20℃左右 暗培养	5 d后	A,D,E,F培养基中外植体切口处颜色变深; B,C培养基中外植体均无明显变化。
	10 d后	A,D,E,F培养基中叶柄、花梗褐化程度加深,叶片次之; B,C培养基中叶片、叶柄切口处颜色加深,花梗已部分褐化。 A培养基中外植体大部分褐化;
	20 d后	D,E,F培养基中个别叶片(及叶基部)有增厚迹象,花梗全部褐化,原培养基继代; B,C培养基中叶片(及叶基部)开始增厚,个别有褐化现象,花梗、叶柄全部褐化。 B,C培养基中叶片(及叶基部)增大,切口处膨大,出现白色瘤状愈伤组织块,其中C培养基中出现愈伤数量较B少;
	20 d后	D,E,F培养基褐化严重; B,C中外植体原培养基继代。
	20 d后	B,C培养基中愈伤组织表面逐渐出现白色或浅绿色突起即芽球基,个别愈伤上出现单芽球基和片状结构,后有小叶产生,其中C培养基中出芽数量较B少,而且生长缓慢;
	30 d后	D,E,F培养基中叶片、叶柄、花梗大部分褐化。

表 2 愈伤组织的平均诱导率和苗分化率 (%)

培养基	外植体	愈伤组织诱导率	苗分化率
A	叶片(及叶基部)	7.5	0
	叶柄	0	0
	花梗	0	0
B	叶片(及叶基部)	97.5	88.2
	叶柄	85.1	77.3
	花梗	0	0
C	叶片(及叶基部)	87.6	63.5
	叶柄	78.1	56.7
	花梗	0	0
D	叶片(及叶基部)	10.9	2.2
	叶柄	8.3	1.6
	花梗	0	0
E	叶片(及叶基部)	30.3	12.2
	叶柄	24.1	11.4
	花梗	0	0
F	叶片(及叶基部)	21.1	8.7
	叶柄	20.8	7.2
	花梗	0	0

3 讨论

试验结果表明,培养基增加适量KT,能促进仙客来外植体的细胞分裂,有利于愈伤组织的形成,这一结果

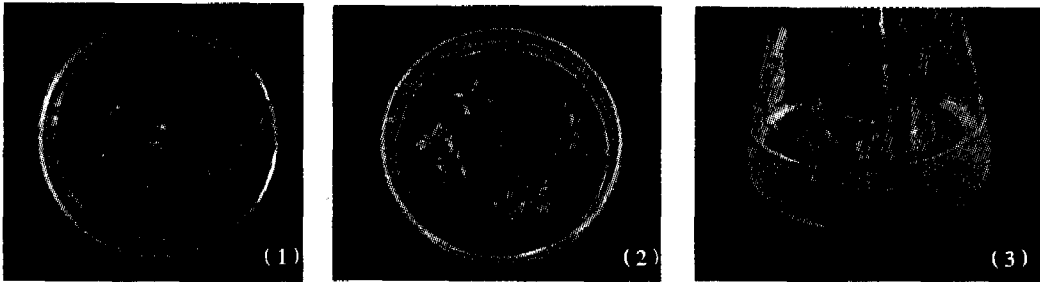
与李会宁等(2001)^[4]的试验结论是一致的。而2,4-D浓度过高,在一定程度上抑制了愈伤组织的生长。

在试验中初期诱导愈伤组织时进行了约20 d的暗培养,产生稍带褐色的愈伤组织,个别为淡白色愈伤组织,进行芽的诱导时分期置于弱光和强光下,芽的诱导显著。由以上结果可以看出,无光照对仙客来组织的诱导有利,而强光照对芽的诱导及叶原基的分化有利。

仙客来组织培养过程中外植体褐化情况严重,为了缓解褐化,我们在培养基中加入了适量的活性炭和硫代硫酸钠溶液,结果显示它们的效果并不明显。值得注意的是,加入活性炭的培养基,其愈伤诱导率及分化率均下降,原因可能是活性炭在吸附有毒酚类的同时,也吸附培养基中的生长调节剂。

4 结论

以仙客来幼叶(及叶基部)为外植体进行诱导,愈伤组织诱导频率最高,可达97.5%;诱导愈伤组织效果最好的培养基为MS+6-BA 2.0+2,4-D 0.2+KT 0.2;诱导芽最适宜的培养基同上。



图版 仙客来愈伤组织及再生

注:1. 培养3周左右的愈伤组织; 2. 愈伤组织上分化出再生芽; 3. 丛生芽

参考文献:

[1] Stefan A. Rensing, Daniel Lang, Eik Schumann et al. EST sequencing from embryogenic cyclamen persicum cell cultures identifies a high proportion of transcripts homologous to plant genes involved in somatic embryogenesis [J]. 2005,24,102-115.

[2] 梁莉,李刚. 名花栽培技艺与欣赏丛书—鹤望兰、仙客来 [M]. 长春: 延边大学出版社,2003. 53-155.

[3] 曹改义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社,1999.

[4] 李会宁. 仙客来的离体无性试管繁殖研究[J]. 氨基酸和生物资源. 2001,23(3): 21-23.

[5] 郭成金,王 宽,何俊英. 仙客来组织培养[J]. 天津师范大学学报(自然科学版),1991,1: 59-64.

[6] Ryutaro Aida, Yukio Hirose, Sanae Kishimoto, Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Cyclamen persicum Mill[J]. Plant Science, 1999, 148: 1-7.