

仙客来组织培养技术的研究

祁永琼, 许邦丽, 褚素贞, 李开云

(云南农业职业技术学院, 云南 昆明 650031)

摘要: 用5个仙客来品种的叶片、叶柄作为外植体, 在培养基MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 2.5 mg/L上可诱导形成愈伤组织。在培养基MS+6-BA 2 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L上叶片愈伤组织易分化出多芽球茎和单芽球茎。无糖培养较有糖培养生根率高。

关键词: 仙客来; 愈伤组织; 球茎; 无糖培养

仙客来(*Cyclamen persicum*)是报春花科(Primulaceae)仙客来属植物,别名一品冠、兔耳花、翻莲瓣、萝卜秋海棠,是一种多年生球根草本花卉。原产于地中海沿岸、希腊、西亚叙利亚等地。仙客来叶浓绿且有美丽斑纹,花形奇特,花期长,花色艳丽,盛花期适逢圣诞节、元旦和春节,花姿奇特优美,具有较高的观赏价值和经济价值。目前,仙客来多用种子进行繁殖,后代分离严重,优良性状很难保持,且种子发芽迟缓,出苗不整齐。因此,保持优良性状且繁殖率较高的组织培养技术是仙客来重要的繁殖方式^[1-5]。无糖组培是一门新技术,在工厂化规模育苗生产中,有着广泛的应用空间^[9-11]。本试验对仙客来进行组织培养研究,并利用无糖组培技术生根,为仙客来优良品种的工厂化育苗提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为仙客来的5个品种,即粉红、大红、天丽-1、天丽-2、财神,分别用A、B、C、D、E表示,种植于云南农业职业技术学院温室,取开花后植株的叶片、叶柄作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 诱导愈伤组织

取仙客来植株上尚未充分展开的幼嫩叶片(带叶柄),用流水冲洗干净,在70%酒精中浸泡30~60 s,转入0.1%升汞溶液中浸泡8~10 min,无菌水清洗3次,放入无菌盘中备用。剪去已灭菌的叶片边缘,切成1 cm ×

1 cm正方形小块,叶柄切成长1 cm的节段,接种于初代培养基上,诱导愈伤组织。培养基采用MS培养基,其中分别添加不同浓度的6-BA和NAA,共设4个处理:I. MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 2.5 mg/L; II. MS+ 6-BA 0.2 mg/L+NAA 3.0 mg/L; III. MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 2.5 mg/L; IV. MS+ 6-BA 0.3 mg/L+NAA 3.0 mg/L,蔗糖浓度为3%,琼脂0.8%,pH值5.6~5.8。接种后的材料分别置于光照和弱光照条件下培养,温度为25℃,共5×2×4个处理,30 d后统计结果并计算愈伤组织形成的频率,愈伤组织可继代培养进行增殖。

1.2.2 愈伤组织再分化球茎

初代培养中诱导形成的愈伤组织转入继代培养基中培养,诱导球茎。根据愈伤组织发生的状况,在继代培养中分别设3个不同配方的培养基,即X₁: MS+6-BA 2 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L; X₂: MS +6-BA 2 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+KT 0.2 mg/L; X₃: MS+6-BA 2 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L。40 d后,统计愈伤组织分化球茎的数量,从而确定适宜继代培养基的配方。球茎经继代培养后长成再生新梢。

1.2.3 生根培养

1.2.3.1 有糖组培生根

把再生新梢转入1/2MS+NAA 0.5 mg/L (R₁)、1/2MS+NAA 1.0 mg/L (R₂)、1/2MS+IBA 0.5 mg/L (R₃)、1/2MS+IBA 1.0 mg/L (R₄) 4种培养基中进行生根试验,蔗糖浓度2%,琼脂0.8%,pH值5.8。培养30 d后,观察苗情,统计结果并计算生根率。

1.2.3.2 无糖组培生根

采用1/2 MS培养基,培养基中除去维生素、氨基酸、糖等有机营养,基质为蛭石:珍珠岩=1:3。

将已灭菌的基质和1/2 MS培养溶液混合均匀,装入苗盘内,切取仙客来再生新梢,蘸0.5 mg/L IBA溶液后插在基质上,喷少量无菌水后,放入已消毒的大型培养容器内。整个培养期间,光照强度500~3 000

收稿日期: 2008-05-13

基金项目: 云南农业职业技术学院课题(YNAVC2005012)。

作者简介: 祁永琼(1978-),女,云南宜良人,讲师,主要从事植物遗传育种和组织培养教学。

lux, 温度为 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, CO_2 浓度为 $1\ 000 \sim 1\ 500 \times 10^{-6}$, 补充 CO_2 的时间与光照同步进行, 相对湿度不小于60%, 培养30 d后出苗, 观察苗情, 统计结果并计算生根率。

2 结果与分析

2.1 诱导愈伤组织

不同激素、不同光照对不同外植体诱导愈伤组织的形成影响不同。初代培养30 d后, 5个品种的叶片、

叶柄在不同光照条件下形成的愈伤组织数目不同(见表1)。从表1可见, 不同品种愈伤组织形成的频率差异较大, 在6-BA浓度为0.2 mg/L, NAA浓度为2.5 mg/L, 弱光照条件下, 仙客来愈伤组织形成频率高, 叶片愈伤组织形成频率比叶柄高(见图1、图2)。从形成的愈伤组织经继代增殖后, 光照条件下形成的愈伤组织块小, 褐色, 色泽暗淡(见图3), 而弱光照条件下形成的愈伤组织疏松块大, 呈白色有光泽(见图4)。

表1 不同激素和不同光照对仙客来愈伤组织形成的影响

培养基	光照	不同品种愈伤组织形成的频率(%)									
		A		B		C		D		E	
		叶片	叶柄	叶片	叶柄	叶片	叶柄	叶片	叶柄	叶片	叶柄
I	光照	18.4	10.6	2.1	1.3	11.3	7.2	10.9	7.0	3.7	1.9
	弱光照	62.5	45.7	8.3	2.8	52.1	41.3	51.2	39.4	10.1	6.4
II	光照	10.2	6.5	1.8	0.9	8.2	5.4	8.0	5.3	1.5	0.4
	弱光照	45.3	31.2	3.9	2.0	37.2	26.1	35.4	24.5	5.3	2.0
III	光照	5.4	2.1	0	0	4.5	2.1	4.0	1.8	0	0
	弱光照	40.4	28.3	4.0	1.1	32.5	21.6	30.6	19.1	3.3	1.2
IV	光照	0	0	0	0	1.9	0.4	1.0	0.3	0	0
	弱光照	15.9	11.6	0	0	12.3	8.5	5.3	3.1	0	0

2.2 愈伤组织再分化球茎

继代培养后, 愈伤组织分化出多芽球茎、单芽球茎(见图5、图6)。A、B、C、D、E 5个品种愈伤组织分化球茎的频率不同, 实验结果见表2。由表2可知, X_1 培养基中球茎分化率较高, 且培养基中加入KT能够促进球茎的形成。诱导球茎适宜的培养基为MS+6-BA 2 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L。多芽球茎经继代培养后长成再生新梢(见图7)。

表2 不同仙客来品种球茎的分化率

培养基	分化率(%)				
	A	B	C	D	E
X_1	71.6	53.2	66.8	63.2	55.0
X_2	68.9	43.5	51.4	50.3	46.8
X_3	51.7	33.1	48.3	41.6	36.5

2.3 生根培养

2.3.1 有糖生根培养

从表3可知, 再生新梢接种到有糖生根培养基上长出根系(见图8), 随生长素浓度的增加, 生根率不断提高。生根率因品种不同, 对生长素的反应也不同, A、C、D 3个品种, IBA较NAA适宜, 这与薛佳桢等的试验结果一致^[9]; B、E 2个品种则反应不明显, 这可能与形成的愈伤组织分化能力有关。

表3 不同仙客来品种有糖组培苗的生根率

培养基	生根率(%)				
	A	B	C	D	E
R_1	65.5	51.1	57.6	53.8	55.2
R_2	82.4	64.9	72.4	77.3	66.4
R_3	67.2	53.3	64.9	69.0	53.6
R_4	86.6	63.2	80.5	83.1	62.7

2.3.2 无糖生根培养

再生新梢插到无糖生根基质上, 不同的仙客来品种生根率均达到80%以上, 结果见表4, 与表3中有糖组培相比, 生根率较高。观察仙客来无糖组培苗(见图9), 植株较健壮, 根系发达; 有糖组培苗根短小, 植株瘦弱。

表4 不同仙客来品种无糖组培苗的生根率

培养基	生根率(%)				
	A	B	C	D	E
1/2MS					
IBA 0.5 mg/L	96.5	80.1	91.7	93.4	81.2

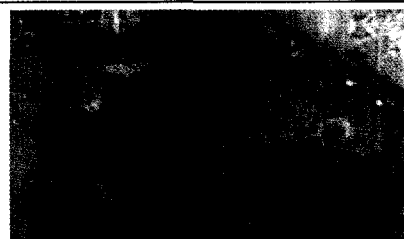


图1 叶片形成的愈伤组织

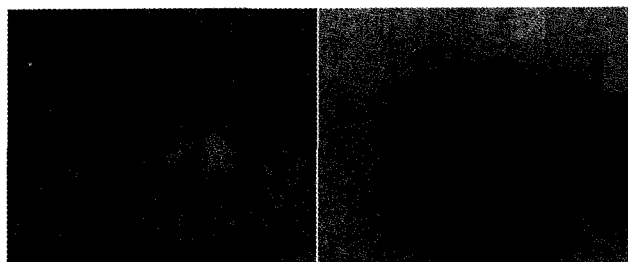


图2 叶柄形成的愈伤组织 图3 光照下形成的褐色愈伤组织

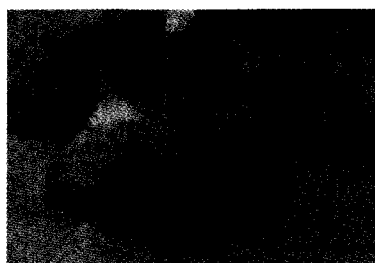


图4 弱光下形成的白色愈伤组织



图5 多芽球茎

图6 单芽球茎

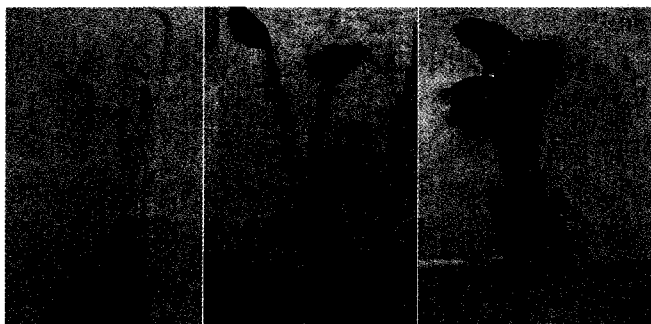


图7 再生新梢

图8 有糖组培苗

图9 无糖组培苗

3 小结与讨论

仙客来野生种染色体 $2n=48$, 园艺种多是野生种的同源四倍体, 即 $2n=96$ 。种子繁殖后代分离严重, 尤其是观赏价值高的品种优良性状难以保持, 因此仙客来组织培养的外植体应该是利用开花后的具有优良性状的成苗。曲复宁等研究结果证明, 利用成苗仙客来再生器官发生具有多样性和复杂性, 愈伤组织再分化的器官有多芽球茎和单芽球茎等5种再生器官类型^[7]。本试验中, 外植体由愈伤组织再分化形成多芽球茎和单芽球茎, 培养成再生新梢后生根的途径长成组培苗。

仙客来由于遗传杂合性, 属于较难培养的植物种类。在组织培养的过程中, 基因型、外植体、激素、光照等因素, 都会以不同的方式和程度影响愈伤组织的形成, 器官的发生较为复杂, 难以建立一个稳定的增殖体系, 因此, 利用组织培养达到快速繁殖的目的比较困难。本试验中, B、E品种愈伤组织形成的频率极低, 可能与品种的染色体倍数有关。

仙客来在有糖培养基中生根, 品种的遗传性是主要影响因素^[8], 不同基因型对激素种类、浓度的反应不同。随激素浓度的增加, 生根率提高, 但周余华等研究表明, 激素浓度偏高, 芽的发育质量下降。无糖培养生根, 利用多芽新梢已有的茎、叶, 插入不加糖、没有凝胶的基质上, 补充 CO_2 , 进行光合自养, 长成的组培苗生根率高, 根系发达, 植株健壮。试验中, 节省蔗糖、有机化学试剂, 珍珠岩、蛭石等基质可重复使用, 从而降低了生产成本。关于无糖组培可降低污染率、提高组培苗移栽成活率等, 有待进一步试验。希望本试验对仙客来的商业化、工厂化生产提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1]曲复宁, 由黎芳, 张敏, 等. 利用仙客来种苗组培快繁建立单株无性系[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(3): 81~85.
- [2]余会宁. 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.
- [3]Dillen W., Dijkstra L., Oud J.. Shoot regeneration in long-term callus derived from mature flowering plant of *Cyclamen persicum* Mill[J]. Plant Cell Reports(Germany), 1996, 15(7): 545~548.
- [4]Mohannad A. M., Karam N. S.. In vitro propagation wild *Cyclamen persicum* Mill from seeding tissue[A]. Proceedings of the International Symposium on Method and Markers for Quality Assurance in micropropagation [C]. Leuven: Secretariat of ISHS, 1999, 243~250.
- [5]周余华, 葛晋刚. 仙客来组培优化研究[J]. 江苏农业科学, 2003(5): 69~70.
- [6]薛佳桢, 车代第, 王金刚. 仙客来组织培养的研究[J]. 北方园艺, 2003(6): 61.
- [7]曲复宁, 由翠荣, 龚雪琴, 等. 仙客来组织培养中再生器官类型及增殖稳定性比较[J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 559~564.
- [8]曲复宁, 龚雪琴, 由翠荣, 等. 影响仙客来组培不定根发生的因素分析[J]. 华北农学报, 2003, 18(2): 17~20.
- [9]肖玉兰. 植物无糖组培快繁工厂化生产技术[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003, 1~19.
- [10]Kozai T., I. wanami Y.. Effect of CO_2 enrichment and sucrose concentration under high photon flux on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage [J]. Jap. Soc. Hort. Sci., 1998(57): 279~288.
- [11]Heo J., Kozai T.. Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth and development of potato plantlets[J]. Environ. Control Biol., 1999(37): 83~92.