

克克万年青组织培养和快速繁殖技术研究

张超, 陈立思

(广州花卉研究中心, 广东 广州 510360)

摘要:以克克万年青带侧芽的茎段为外植体,进行组织培养及诱导植株再生研究,结果表明:适宜的芽启动培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+ NAA 0.05 mg/L;最适增殖培养基为1/2MS+6-BA 2.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L,增殖系数达3.6倍;适宜的生根培养基为1/2MS+IBA 0.2 mg/L,生根率达88.5%;生根试管苗移栽到Klasmann 泥炭422+Klasmann 泥炭413(2:1)混合基质中,成活率高达94.3%。

关键词:克克万年青;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S682.1+4; S604+.4 文献标识码:B 文章编号:1004-874X(2008)06-0050-03

Study on tissue culture and rapid propagation of *Dieffenbachia amoena* cv. Kiki

ZHANG Chao, CHEN Li-si

(Guangzhou Flower Research Centre, Guangzhou 510360, China)

Abstract: Tissue culture and rapid propagation of *Dieffenbachia amoena* cv. Kiki was studied with stem nodes with axillary buds taken as explants. The results showed that the appropriate medium for axillary bud germination was MS + 6-BA 1.5 mg/L+ NAA 0.05 mg/L, the best medium for shoot proliferation was 1/2MS + 6-BA 2.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L, and each plant produced 3.6 shoots, the most suitable medium for shoot rooting was 1/2MS + IBA 0.2 mg/L, and the rooting rate was 88.5%, plantlets survival rate reached 94.3% when transplanted onto the mixed substrates of Klasmann 422 and 413 (2:1) for 42 days.

Key words: *Dieffenbachia amoena* cv. Kiki; tissue culture; rapid propagation

克克万年青(*Dieffenbachia amoena* cv. Kiki)为天南星科花叶万年青属植物,叶缘墨绿色,中央有大小不等的黄白色斑纹,是极具观赏价值的室内耐阴观叶植物。在生产上,花叶万年青属植物主要靠茎段侧芽萌发和分株繁殖^[1],但繁殖系数低、速度慢,很难满足商品化生产需求。为此,国内外许多学者开始探索利用组织培养技术快速繁殖花叶万年青属植物,但由于其外植体彻底消毒困难、培养周期长及品种差异较大等原因,以致进展比较缓慢^[1-5]。本研究以克克万年青带侧芽的茎段为外植体,建立高效的离体再生体系,以期为该品种的种苗工厂化生产提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 无菌外植体获得和无菌苗诱导

于广州花卉研究中心种质资源圃切取温室中春季生长的克克万年青茎段,剥去外层叶片,切成长约0.5

cm的带侧芽茎节,用自来水冲洗30 min,然后在超净工作台上先用6%次氯酸钠消毒5 min、无菌水冲洗2次,再用0.1%HgCl₂(加2滴吐温)消毒10 min、无菌水冲洗5次。将经灭菌的外植体取出,放在无菌纸上,吸干水分,接种于MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L培养基中诱导侧芽萌发,建立无菌培养体系。

1.2 丛生芽增殖培养

1.2.1 不同细胞分裂素对芽增殖的影响 将初代培养的无菌苗接种于附加不同浓度6-BA(0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L)、KT(0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L)和2ip(0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L)的1/2MS+NAA 0.1 mg/L培养基中进行增殖培养,每隔40 d继代1次,连续继代转接3次,统计增殖系数和芽高。

1.2.2 不同生长素对芽增殖的影响 将初代培养的无菌苗接种到分别附加不同浓度NAA(0.05、0.1、0.2、0.5 mg/L)和IBA(0.05、0.1、0.2、0.5 mg/L)的1/2MS+6-BA 2.0 mg/L培养基中进行增殖培养,每隔40 d继代转接1次,连续继代转接3次,统计增殖系数和芽高。

1.3 生根培养

收稿日期:2008-03-05

作者简介:张超(1978-),男,硕士,助理农艺师,E-mail:daochao_zhang@yahoo.com.cn

选取生长一致、高约 2.5~3.0 cm 的无根试管苗,接种于附加不同浓度 IBA (0.05、0.1、0.2、0.5 mg/L)和 NAA(0.05、0.1、0.2、0.5 mg/L)的 1/2MS 培养基中进行生根培养,培养 30 d 后观察生根情况,统计生根率和平均生根数。

在试管苗诱导、丛生芽增殖和试管苗生根培养中采用的所有培养基均附加白砂糖 30 g/L、卡拉胶 5.8 g/L,pH 值 5.8,培养室温度为 (25±2)℃、光照强度为 2 000 lx、光照时间为 16 h/d。

1.4 炼苗与移栽

将生根的试管苗连瓶置于遮阴率为 70%的温室 内闭口炼苗,7 d 后取出,洗净附着的培养基,放入多菌灵 1 000 倍溶液中浸泡 30 s,然后移栽于 Klasmann 泥炭 422+Klasmann 泥炭 413(2:1)混合基质中,放入遮阴棚内覆盖保湿,每隔 5 d 淋水 1 次,15 d 后撤去遮阴棚进行正常的肥水管理(相对湿度保持在 80%~90%,温度为 23~25℃),42 d 后调查移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 诱导培养

克克万年青茎段外植体用 6%次氯酸钠消毒 5 min 和 0.1%HgCl₂ 消毒 10 min 后,接种在诱导培养基上,接种 8 d 后茎基部明显膨大,20 d 后大部分腋芽开始萌动,接种 32 d 后腋芽高 1~2 cm、萌发率达 90%左右。

2.2 增殖培养

克克万年青初代培养小芽长至 1.5~2.0 cm 时转接到附加不同浓度细胞分裂素和生长素的 1/2MS 培养基中进行增殖培养,研究不同细胞分裂素和生长素对芽增殖和生长的影响,结果见表 1 和表 2。

由表 1 可知,当 6-BA 浓度低至 0.5 mg/L 时,增殖系数仅为 1.2 倍;6-BA 浓度升至 2.0 mg/L 时芽增殖效果最好,增殖系数达 3.6 倍,芽高 3.71 cm,且芽生长迅速、健壮,叶色浓绿;6-BA 浓度达到 4.0 mg/L 时,部分植株开始出现叶片黄化、生长畸形的现象;而当 6-BA 浓度高于 4.0 mg/L 时,丛生芽大量出现玻璃化现象,芽节间缩短,叶片展开困难,芽基部出现大量愈伤组织团块。由表 1 还可以看出,随着 KT 浓度的升高,芽增殖系数逐渐升高,当 KT 浓度达 4.0 mg/L 时增殖系数最高,达 2.4 倍,且植株生长正常;而当 2ip 浓度小于 4.0 mg/L 时芽高和增殖系数差异均不明显,但 2ip 浓度为 4.0 mg/L 时增殖系数和芽高显著降低,但植株均生长正常。6-BA、KT 和 2ip 对克克万年青试管苗的增殖效果比较说明,在添加 2ip 的培养

基中植株生长正常,但芽增殖系数较低,芽较矮;在添加 KT 的培养基中,低浓度(0.5~2.0 mg/L)处理的植株节间生长过长、长势弱,高浓度(4.0 mg/L)处理的植株生长正常但增殖系数较低;而在添加 6-BA 的培养基中,浓度为 2.0 mg/L 时的增殖系数最高,且芽生长最好。

由表 2 可知,随着 NAA 附加浓度的提高,丛生芽增殖系数呈先升高后降低的变化趋势,当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时增殖系数表现最高,但 NAA 浓度继续升高时增殖系数逐渐降低,当 NAA 浓度达 0.5 mg/L 时靠近培养基的芽切口处产生大量愈伤组织。从表 2 还可以看出,增殖培养基中加入 IBA,随着附加浓度的升高,增殖系数和芽高均出现逐渐降低的变化趋势。其中,当 IBA 浓度为 0.05 mg/L 时,增殖系数和芽高均表现最好;当 IBA 浓度为 0.5 mg/L 时,芽基部产生大量愈伤组织,部分植株生长畸形。从试管苗生长情况来看,NAA 0.05~0.2 mg/L 处理的试管苗生长健壮,而 IBA 0.05~0.2 mg/L 处理的试管苗比较纤细。

表 1 不同细胞分裂素对克克万年青丛生芽增殖的影响

细胞分裂素	浓度(mg/L)	增殖系数(倍)	芽高(cm)
6-BA	0.5	1.2	4.75
	1.0	2.3	4.30
	2.0	3.6	3.71
	4.0	2.7	1.75
KT	0.5	0.4	5.82
	1.0	1.0	5.58
	2.0	1.2	4.07
	4.0	1.9	3.48
2ip	0.5	2.1	2.46
	1.0	1.8	2.39
	2.0	2.0	2.45
	4.0	1.2	1.64

注:基本培养基为 1/2MS+NAA 0.1 mg/L。

表 2 不同生长素对克克万年青丛生芽增殖的影响

生长素	浓度(mg/L)	增殖系数(倍)	芽高(cm)
NAA	0.05	3.1	4.17
	0.10	3.6	3.71
	0.20	3.0	3.46
	0.50	2.4	3.03
IBA	0.05	3.6	4.60
	0.10	3.4	4.22
	0.20	3.0	4.18
	0.50	2.0	4.10

注:基本培养基为 1/2MS+6-BA 2.0 mg/L。

综合分析表明,有利于克克万年青增殖的植物生长调节剂组合为 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,即最适增殖培养基为 1/2MS + 6-BA 2.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L,增殖系数可达 3.6 倍。

2.3 生根培养

对生根率的调查结果显示,培养基中附加的 IBA 浓度为 0.2 mg/L 时最有利于克克万年青试管苗生根,生根率达 88.5%;而 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时最不利于试管苗生根,生根率仅为 40.0%;在一定范围内,克克万年青生根率随 IBA 浓度升高而逐渐升高,但当 IBA 浓度增加到 0.5 mg/L 时,生根率反而显著降低。从 NAA 的不同浓度来看,随着 NAA 浓度的升高生根率逐渐降低。

从平均单株生根数来看,培养基中附加的 IBA 浓度为 0.5 mg/L 时单株生根数最多可达 4.2 条,且随着 IBA 浓度的升高,平均生根数有增加的趋势;而附加 NAA 的单株生根数最多只为 2.6 条,并随着 NAA 浓度的升高,平均生根数表现为先增加后减少。

从根的生长状态来看,NAA 诱导形成的不定根短而粗,当 NAA 浓度大于 0.1 mg/L 时,芽基部产生较多愈伤组织;而在含有 IBA 的培养基中,接种后 5~6 d 可见不定根原基突起,IBA 浓度低至 0.05 mg/L 时根长而细弱,当浓度达到 0.1~0.2 mg/L 时根生长健壮,但当浓度增加至 0.5 mg/L 时则于接种后 8 d 可见试管苗基部形成较多灰白色致密的愈伤组织。从总体上看,IBA 有利于根的诱导,生根数量多,生长状态好,附加浓度以 0.2 mg/L 为宜。

表 3 不同生长素种类和浓度对克克万年青幼苗生根的影响

生长素	浓度 (mg/L)	生根率 (%)	平均根数 (条)	根生长状态
IBA	0.00	25.5	1.2	细、较长
	0.05	70.0	2.0	细、较长
	0.10	82.3	2.4	正常、健壮
	0.20	88.5	3.1	正常、健壮
	0.50	61.1	4.2	较粗,较多愈伤
NAA	0.05	71.5	1.3	较粗、短
	0.10	58.1	2.6	过粗,畸形
	0.20	46.3	1.5	较多愈伤
	0.50	40.0	1.2	大量愈伤

2.4 炼苗与移栽

在炼苗温室中闭口炼苗 7 d,取出小苗,用自来水洗净附着的培养基,移栽到 Klasmann 泥炭 422 和 413 (2:1)的混合基质中,然后置于相对湿度为 80%~90%、温度为 23~25℃的环境中培养,移栽 42 d 后成活率达 94.3%。

3 结论与讨论

本研究结果表明,在克克万年青组培繁殖中,细胞分裂素的增殖效果大小顺序为:6-BA>KT>2ip,而生长素 NAA 的增殖效果则优于 IBA,其中当培养基附加的 6-BA 浓度为 2.0 mg/L、NAA 浓度为 0.1 mg/L 时可获得大量生长健壮的丛生芽。王怀宇等^[2]研究认为 6-BA 浓度为 10 mg/L 时有利于花叶万年青增殖,而本研究则显示 6-BA 浓度达到 4.0 mg/L 时花叶万年青丛生芽已经出现黄叶和生长畸形的现象,更高浓度的 6-BA 容易导致玻璃化芽产生,同时芽基部会出现大量愈伤组织。

本研究结果还表明,IBA 诱导克克万年青产生不定根的效果比 NAA 更有效,且以 IBA 浓度为 0.2 mg/L 时的生根效果最佳;另外,IBA 诱发的根多而细,而 NAA 诱发根少而粗且易产生愈伤组织,该研究结果与韩美丽等^[3]的报道相一致。但张苏锋等^[6]的研究结果表明 NAA 比 IBA 更适合玛丽安万年青生根,这可能与品种不同有关。

参考文献:

- [1] 朱根发,张远能,邹春萍,等.花叶万年青的组织培养和快速繁殖[J].热带亚热带植物学报,1999,7(3): 243-247.
- [2] 王怀宇,陈明昭.花叶万年青的组织培养[J].植物生理学通讯,1987,23(4): 57.
- [3] 韩美丽,唐玉贵,黄华艳.不同品种万年青组培再生体系的建立研究[J].广西林业科学,2000,29(4): 175-178.
- [4] 周俊辉,刘花全,罗慧君,等.玛丽安万年青茎段培养的污染防治[J].仲恺农业技术学院学报,2002,15(4): 43-48.
- [5] Voyiatzi C, Voyiatzi S. In vitro shoot proliferation rate of *Dieffenbachia exotica* cultivar 'Marianna' as affected by cytokinins, the number of recultures and the temperature[J]. Sciential Horticulture, 1989, 40: 163-169.
- [6] 张苏锋,赵兴兵,赵冬梅.玛丽安万年青的茎尖培养与快速繁殖[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2000,13(1): 95-98.