维普资讯 http://www.cqvip.com

第34卷 第1期 河南科技学院学报(自然科学版) 2006年3月
Vol. 34 No. 1 Journal of Henan Institute of Science and Technology Mar. 2006

巴西牵牛的组织培养技术研究

张希太[1],李俊玲[1],宋九英[1],宁书祥[2],陈海俊[3]
(1.邯郸市农业科学院生物技术中心,河北 邯郸 056001;2.邯郸市园林局,河北 邯郸 056001;3.邯郸学院,河北 邯郸 056001)

摘要:以在试管中萌发的巴西牵牛种子苗的茎尖为外殖体,对巴西牵牛的组织培养技术进行了研究。茎尖生长成完整的试管植株和腋芽生长增殖的最佳培养基为MS+IBA0.2mg/1。巴西牵牛试管苗驯化移栽的最佳基质为上面1/4蛭石下面3/4腐质土的双层基质。

关键词:巴西牵牛;组织培养;试管繁殖;研究
中图分类号:S681.6 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6060(2006)01-0041-04

Studys on Tissue Culture of Ipomoea Setosa

ZHANG Xi-tai, *et al.*
(Biolgical Centre of Agricultural Research Institute of HanDan, Handan, Hebei, 056001, China)

Abstract: To do experimentation with the shoot - tip of Ipomoea setosa plantets that buded from seeds of Ipomoea setosa in vitro, tissue culture technology of Ipomoea setosa had been studyed. The best medium for the shoot - tip and stem with auxillary bud of Ipomoea setosa to grow and increase is "MS + IBA0.2mg/1". The best stroma for Ipomoea setosa plantlets in vitro to transplant and training is the stroma on stroma that3/4 rotten soil covered with 1/4 vermiculite.

Key words: ipomoea setosa, tissue culture, rapid propagation in vitro, technology, study

巴西牵牛(Ipomoea setosa)是检测甘薯病毒的指示植物。其对多种侵染甘薯的病毒都很敏感,受病毒侵染后叶片上产生系统性症状,如明脉、脉带、产生褪绿斑点、中脉扭曲、整株枯死等。用巴西牵牛作为指示植物检测甘薯病毒虽然不能区分病毒的种类,但是灵敏度极高,方法简单成本低。检测甘薯病毒时,通常利用巴西牵牛苗作为砧木,待检测的甘薯苗单茎节段为接穗,嫁接后在防虫网室中培养,观察巴西牵牛新生叶片上是否出现病症。为了检测准确往往设多个重复,这就需要大量的生长一致的巴西牵牛苗。巴西牵牛虽然能产生大量的种子,但是巴西牵牛种子的休眠期较长,休眠结束时间不一至,播种后发芽率很低,出苗时间有早有晚,所以很难一次性得到大批的生长一致的苗子。如果能通过组织培养技术在试管中繁殖巴西牵牛试管苗就能够很好地克服用种子繁苗的缺点,随时培养出大批的未受任何病毒侵染的生长一致的巴西牵牛苗子,用于脱毒甘薯病毒的检测。目前未有关于巴西牵牛的组织培养研究的报道,因此我们对巴西牵牛的组织培养技术进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

巴西牵牛种子(上一年越冬前收获种子,已经休眠2个月)。

1.2 培养基

种子萌发培养基:MS_0,MS + GA_3(0.5、1.0、1.5、2.0)mg/I;茎尖启动与继代培养基:MS + 6 - BA(0、0.5、1.0)mg/I + IBA(0、0.2、0.5、8.0、1.0)mg/I。

收稿日期:2006-01-10.
基金项目:邯郸市项目《低成本超高产优质脱毒甘薯的研制与开发》。
作者简介:张希太(1966-),男,河北魏县人,副研究员,主要研究方向是植物组织培养技术与小麦DNA分子育种。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 试验方法

培养基制备后,均经 121℃,1.5 大气压灭菌 20min 备用。在超净工作台上将巴西牵牛种子,用 0.1% 的升汞(加入 2 滴吐温 -20)灭菌 20min,再用无菌水反复冲洗 6 ~ 10 遍,分别接种到以上 5 种种子萌发培养基上。每瓶接种 5 粒巴西牵牛种子,每种培养基接种 20 瓶,置于 25℃ 的培养室中培养。种子发芽前进行暗培养,种子发芽后每天进行 2000L_x 的光照 10h。种子萌发阶段注意观察巴西牵牛种子在各种培养基上的萌发情况,每隔 5d 调查一次巴西牵牛种子在各种培养基上的萌发率,并记录污染情况。将发芽后的巴西牵牛种子苗在 25℃,每天 2000L_x 光照 10h 条件下培养 7d 后,在超净工作台上,用无菌的剪刀、镊子剪掉子叶,然后切取 0.5cm 长的茎尖接种到以上 15 种组合的启动培养基上,每瓶接种 1 个茎尖,每种培养基接种 10 瓶。置于 25℃ 每天进行 2000L_x 光照 10h 的条件下培养。观察记录茎尖在各种培养基上的生长与分化情况,30d 后调查各种激素配比培养基上巴西牵牛试管苗的株高、茎节数、生根情况等。将启动培养时生长健壮的巴西牵牛试管苗剪成单茎节段,分别接种到原来 15 种组合的培养基上继代培养,将单茎节段斜插入培养基中,腋芽位于培养基表面,每瓶接 3 个茎段。在 25℃ 每天 2000L_x 光照 10h 的条件下培养。观察记录茎段腋芽的萌发率和生长情况,30d 后调查巴西牵牛试管苗的株高、茎节数、根长、根数等。

1.4 巴西牵牛试管苗的移栽方法

巴西牵牛试管苗的移栽基质采用以下几种处理。Ⅰ、双层基质法,即在花盆的底部装入 3/4 体积经消毒处理的腐质土,上面 1/4 部分装入蛭石。Ⅱ、全部使用蛭石。Ⅲ、全部使用经消毒的腐质土。将生长并生根良好的巴西牵牛试管苗从试管中取出,用自来水洗净根部的残留培养基,移栽入花盆的蛭石层中,将花盆中的基质用自来水浇透。移栽后放入防虫网室中防虫传毒,初期用塑料膜罩住保湿,以后逐渐通风使巴西牵牛试管苗慢慢适应外界环境,一般 10d 后移去塑料膜,15d 后取样调查巴西牵牛试管苗的成活率,新根生长情况。

2 试验结果与分析

2.1 不同培养基对巴西牵牛种子萌发的影响

表 1 巴西牵牛种子在各种培养基上的萌发情况

培养基 GA_3(mg/L)	接种巴西牵牛种子数	污染种子数	污染率%	不同时期巴西牵牛种子的萌发率%					
				1×5(d)	2×5(d))	3×5(d))	4×5(d))	5×5(d))	6×5(d)
0	100	0	0	0	0	0	2	3	8
0.5	100	0	0	0	0	0	21	28	34
1.0	100	0	0	0	0	6	46	24	53
1.5	100	0	0	0	3	11	65	76	79
2.0	100	0	0	0	5	18	73	84	89

由于巴西牵牛种子具有坚实光滑的种皮,在升汞中的灭菌时间可以相对延长,因此其灭菌效果很好,接种后种子的污染率均为 0。分析巴西牵牛种子在不同培养基上不同时期的萌发率可知:巴西牵牛种子的萌发比较困难,而且萌发时间参差不齐。在不含 GA_3 的 MS 培养基上,20d 时才有种子开始萌发,30d 时萌发率仅为 8%。在本试验 0.5mg/L ~ 2.0mg/的 GA_3 浓度范围内,随 GA3 浓度提高巴西牵牛种子的萌发时间开始提前,萌发率也逐渐提高。当 GA_3 浓度为 1.5mg/L 和 2.0mg/L 时巴西牵牛种子 10d 左右就开始萌发,且萌发率递增迅速,30d 时附加 GA_3 2.0mg/L 的培养基上萌发率最高达 89%。再进一步提高 GA_3 浓度,巴西牵牛种子的萌发率和萌发速度能否进一步提高,有待于进一步研究。

2.2 不同培养基对巴西牵牛茎尖生长分化的影响

分析表 2 数据,巴西牵牛种子苗的茎尖在只含有 6-BA 不含有 IBA 的 MS 培养基上,均不能成苗,但均能产生愈伤组织,出愈率为 100%,且愈伤组织都不能分化出不定芽:在 6-BA 和 IBA 配合使用的培养基上只有在 6-BA 为 0.5mg/L, IBA 浓度为 0.2mg/L、0.5mg/L、时才有很少一部分茎尖分化成苗成苗率仅有 10% ~20%,但分化出的苗不能生根,生长缓慢,营养状况很差,30d 的生长量仅有 1.3 ~2.3cm,且茎基部产生大块的愈伤组织,以后随着愈伤组织块的生长,苗子因饥饿而死亡。而其它未分化出苗的茎尖均产生愈伤组织,但均不能分化出不定芽:在 MS_0 培养基上,巴西牵牛种子苗的茎尖不产生愈伤组织可直接生长成苗,成苗率均为 100%,在茎生长的同时从茎基部生出根系:在只含有 IBA 的 MS 培养基上,巴西牵牛种子苗的茎尖同样不产生愈伤组织可直接生长成苗,成苗率均为 100%,在茎生长的同时从茎基部生出根系,且随着

维普资讯 http://www.cqvip.com

IBA浓度的提高,巴西牵牛试管苗的茎生长受到抑制,株高逐渐降低,茎节数也逐渐减少,生根的长度逐渐变短,生根数量减少。本试验浓度范围内,在MS+IBA0.2mg/L培养基上巴西牵牛试管苗生长与生根最好,在MS0上巴西牵牛试管苗生长与生根次之。

2.3 不同培养基对巴西牵牛单茎节段生长分化的影响

表2 巴西牵牛茎尖在不同培养基上的生长分化情况

培养基		成苗数	成苗率	30d后生长情况(5株平均值)				愈伤组织情况	
6-BA mg/L	IBA mg/L	(个)	%	株高(cm)	茎节数(个)	根长(cm)	根数(条)	出愈率%	分化率%
0	0	10	100	9.1	5.6	5.6	7.8	0	-
0	0.2	10	100	13.3	8.2	6.7	8.4	0	-
0	0.5	10	100	13.1	6.4	5.6	7.6	0	-
0	0.8	10	100	9.4	5.0	4.3	6.4	0	-
0	1.0	10	100	5.3	3.4	4.1	5.2	0	-
0.5	0	0	0	-	-	-	-	100	0
0.5	0.2	2	20	2.3	3.8	0	0	100	0
0.5	0.5	1	10	1.3	3.2	0	0	100	0
0.5	0.8	0	0	-	-	-	-	100	0
0.5	1.0	0	0	-	-	-	-	100	0
1.0	0	0	0	-	-	-	-	100	0
1.0	0.2	0	0	-	-	-	-	100	0
1.0	0.5	0	0	-	-	-	-	100	0
1.0	0.8	0	0	-	-	-	-	100	0
1.0	1.0	0	0	-	-	-	-	100	0

表3 巴西牵牛单茎节段在不同培养基上的生长分化情况

培养基		成苗率%	30d后生长情况(5株平均值)				愈伤组织情况	
6-BA mg/L	IBA mg/L		株高(em)	茎节数(个)	根长(em)	根数(条)	出愈率%	分化率%
0	0	100	10.3	6.2	5.4	8.7	0	-
0	0.2	100	14.6	8.6	6.3	8.9	0	-
0	0.5	100	13.8	7.2	5.1	8.1	0	-
0	0.8	100	9.7	5.8	3.8	7.2	0	-
0	1.0	100	6.1	4.2	2.9	5.8	0	-
0.5	0	0	-	-	-	-	100	0
0.5	0.2	0	-	-	-	-	100	0
0.5	0.5	0	-	-	-	-	100	0
0.5	0.8	0	-	-	-	-	100	0
0.5	1.0	0	-	-	-	-	100	0
1.0	0	0	-	-	-	-	100	0
1.0	0.2	0	-	-	-	-	100	0
1.0	0.5	0	-	-	-	-	100	0
1.0	0.8	0	-	-	-	-	100	0
1.0	1.0	0	-	-	-	-	100	0

表3数据显示,巴西牵牛试管苗的单茎节段,在含有6-BA的MS培养基上其腋芽都不能萌发成苗,而是全部愈伤组织化,形成的愈伤组织在原培养基上均不能分化出不定芽;只有在MS_0和只含有IBA的培养基上单茎节段才不愈伤组织化,腋芽才能萌发生长成试管植株并生出根系。在IBA浓度为0.2mg/L~1.0mg/L范围内,随着IBA浓度的提高巴西牵牛单茎节段再生的试管植株的株高生长受到抑制,茎节数减少,根的伸长生长受到抑制,形成粗短的根系,生根数量也逐渐减少;在MSo上虽然巴西牵牛试管苗单茎节段再生植株30d时的株高和茎节数较MS+IBA0.2mg/L~0.5mg/L上的试管苗略低,但生根数量和根长都较MS+IBA0.5mg/L上的试管苗高。综合比较巴西牵牛试管苗单茎节段再生植株在MSo和MS+IBA0.2mg/L~1.0mg/L各种培养基上的生长情况知,适合巴西牵牛试管苗单茎节

维普资讯 http://www.cqvip.com

段继代增殖的 IBA 浓度范围为 Omg/L ~ 0.5mg/L，其中以 MS + IBA0.2mg/L 为最佳。

2.4　不同移栽基质对巴西牵牛试管苗移栽成活率和生长的影响

表 4 数据显示，在基质处理Ⅰ和基质处理Ⅱ上，巴西牵牛试管苗移栽后的驯化成活率均高达 98%，而在基质处理Ⅲ上，巴西牵牛试管苗移栽后的驯化阶段出现大量的试管苗腐烂死亡现象，驯化成活率仅为 67%。主要原因是基质处理Ⅲ为腐质土，杂菌含量较高，巴西牵牛试管苗的根系直接栽入腐质土中，在驯化阶段由于湿度过大，诱生杂菌大量繁殖侵染幼嫩的试管苗造成腐烂。在基质处理Ⅰ和基质处理Ⅱ上，巴西牵牛试管苗的根系栽入蛭石中，杂菌含量较少，蛭石基质不利于杂菌的生长，因此驯化成活率高。巴西牵牛试管苗移栽后在基质处理Ⅰ和基质处理Ⅱ上新生根较多，新根生长较快，在基质处理Ⅲ上新生根数较少且生长缓慢。这是因为蛭石疏松通气性好，有利于巴西牵牛试管苗的生根，而腐质土通气性差不利于巴西牵牛试管苗的生根。从移栽后巴西牵牛苗的生长状况来看，基质处理Ⅰ上的植株叶色鲜绿，生长健壮。基质处理Ⅱ上巴西牵牛苗叶色黄，生长细弱。基质处理Ⅲ上巴西牵牛苗生长一般。这是因为单纯的蛭石中缺乏植物生长的营养元素，所以基质处理Ⅱ上的巴西牵牛苗生长较差。腐质土中虽然富含植物生长的营养元素，但其上巴西牵牛苗的根系较差，所以生长一般。基质处理Ⅰ中，上层的蛭石有利于巴西牵牛试管苗的驯化与生根，生出的新根又能扎入下层的腐质土中吸取营养，所以生长健壮。因此采用上层为蛭石下层为腐质土的双层基质最适合巴西牵牛试管苗的驯化与生长。

表 4　巴西牵牛试管苗移栽后在不同基质中的成活率与新根生长情况

处理基质	移栽苗数	成活苗数	成活率 %	新生根数(条)	新生根长 (cm)	苗生长评价 (好、一般、差)
Ⅰ	100	98	98	5	5.1	差
Ⅱ	100	98	98	4.8	5.0	好
Ⅲ	100	67	67	2	2.3	一般

3　小结与讨论

3.1　补加外源赤霉素是促进巴西牵牛种子萌发提高萌发率的有效措施，在本试验范围内以 MS + GA32.0mg/L 最好。

3.2　巴西牵牛种子苗的茎尖直接生长成完整试管植株的必要条件是培养基中不含有 6 - BA。培养基中补加适量的 1BA 对巴西牵牛种子苗茎尖长成完整的试管植株有很好的促进作用，其中以 MS + IBA0.2mg/L 最佳。

3.3　巴西牵牛试管苗的单茎节段，在含有 6 - BA 的 MS 培养基上其腋芽都不能萌发成苗，适合巴西牵牛试管苗单茎节段腋芽生长增殖的培养基为 MS + IBA0.2mg/L。

3.4　上层为 1/4 蛭石下层为 3/4 腐质土的双层基质最适合巴西牵牛试管苗的驯化与生长。

3.5　本试验为了保持巴西牵牛试管苗的遗传稳定性，只对巴西牵牛顶芽和腋芽再生系统进行了研究。虽然诱导产生了愈伤组织但通过愈伤组织再生不定芽的增殖系统有待于进一步研究。

参考文献：

[1]　中国花卉协会. 花卉快速繁殖[M]. 上海：上海科学技术出版社，1989.

[2]　谭文澄，戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京：中国林业出版社，1991.

[3]　曹孜义，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，1996.