

樱花花柄的组织培养

王文房, 李修岭 (临沂师范学院生命科学院, 山东临沂 276005)

摘要 在 6-BA 和 NAA2 种激素配比诱导下, 对樱花花柄进行组织培养, 得到了最适合樱花花柄形成愈伤组织的激素浓度配比。结果表明, 在 MS 培养基中添加 3.0~4.0 mg/L NAA 和 1.0~2.0 mg/L 6-BA 最适合樱花花柄形成愈伤组织。

关键词 樱花; 组织培养; MS 培养基; 愈伤组织

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)22-5839-03

Tissue Culture of Ornamental Cherries' Flowerstems

WANG Wen-fang et al (College of Life Science, Linyi Normal University, Linyi, Shandong 276005)

Abstract The favorite hormone concentration matching for leading to the callus of the ornamental cherries' flowerstems was studied by doing the experiments of tissue culture. The results showed the extent of the favorite hormone concentration matching for leading to the callus of the ornamental cherries' flowerstems were NAA between 3.0 mg/L and 4.0 mg/L and 6-BA between 1.0 mg/L and 2.0 mg/L in the MS media.

Key words Ornamental cherry; Tissue culture; Callus

樱花为蔷薇科李属观赏乔木, 原产于我国长江流域, 东北、华北及日本都有分布, 喜深厚、肥沃且排水良好的土壤, 喜光和稍湿润的环境。变种和品种较多, 有重瓣樱花、湖北樱花(花小、单瓣、白色)、日本晚樱(粉红色花、有香味)、山樱花(野生、单瓣、白或粉红)、垂枝樱等。在我国南北各地城市园林中应用广泛。近几年来, 随着人们对生活居住环境要求的不断提高, 名贵樱花走俏市场。长期以来樱花繁殖一直采用传统的嫁接法。多代无性繁殖常引起品种退化, 同时使植株生活力和抗逆性下降, 花形、花色劣变, 甚至不能正常开花。20 世纪 60 年代以来, 组织培养快繁技术广泛应用于花卉栽培、遗传育种、快速繁殖、种苗脱毒等领域, 而且集中体现在离体无性系的繁殖、胚胎培养、花粉和花药培养、原生质体培养和体细胞杂交、薄层细胞培养、试管受精及试管微体嫁接等方面。该技术在种质资源保存与交换方面展现出广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试花柄取自临沂师范院校内行道两旁正值盛开的樱花。

1.2 培养基配方 MS 基本培养基 + 6-BA + NAA, 激素浓度见表 1。培养基中加 8.0 g/L 琼脂, 诱导培养基附加 30 g/L 蔗糖, 生根培养基附加 15 g/L 蔗糖, pH 值调至 5.8。

表 1	培养基激素浓度		mg/L
	NAA	6-BA	
1	0	5.0	
2	0.5	4.5	
3	1.0	4.0	
4	1.5	3.5	
5	2.0	3.0	
6	2.5	2.5	
7	3.0	2.0	
8	3.5	1.5	
9	4.0	1.0	
10	4.5	0.5	
11	5.0	0	

1.3 培养条件 植物人工气候培养箱, 培养温度(25±1)℃, 光照强度 2 000 lx, 光照 14 h/d。

1.4 试验方法

1.4.1 外植体的选取与初步处理。 取已开放或含苞樱花花柄, 用花用剪刀从基部剪掉, 留下整个花柄。将花柄放在自来水下冲洗 12 h, 以冲洗掉大的土壤颗粒。然后, 将材料置于小烧杯中, 移至超净工作台上进行表面消毒及接种处理。

1.4.2 消毒。 用 95% 酒精灭菌 20~30 s, 立即用无菌水冲洗, 用 0.1% HgCl₂ 溶液灭菌 6~8 min, 用无菌水冲洗 3~5 次。

1.4.3 接种处理。 在无菌操作台上放一张无菌纸, 将已消毒的材料切成 0.4~0.5 cm 长的小段, 与消毒剂接触过的切面在转移到无菌培养基前应切去。然后, 依次接入不同浓度激素的培养基中, 每个处理接 10 瓶, 每瓶 4 株。在操作中严禁用手触动材料。最后, 放入无菌培养室中培养, 3 d 后开始观察, 统计结果。

2 结果与分析

2.1 激素浓度对愈伤组织形成的影响 从表 2 可以看出, 培养 3 周后第 7、8、9 3 个激素浓度的培养基出愈率达 95% 以上, 愈伤组织生长状况良好, 而这 3 个浓度梯度中 2 种激素(NAA+6-BA)的比例是 3.0:2.0、3.5:1.5、4.0:1.0, 说明这 3 种激素配比最适合樱花花柄愈伤组织的形成(图 1~7)。

表 2	愈伤组织出愈率与激素浓度梯度的关系			
	接种株数	实际成活株数	出愈株数	出愈率 %
1	40	38	2	5.3
2	40	37	5	13.5
3	40	38	6	15.8
4	40	36	6	16.7
5	40	38	18	47.4
6	40	37	20	54.1
7	40	34	33	97.1
8	40	35	35	100.0
9	40	35	35	100.0
10	40	37	16	43.2
11	40	34	9	26.5

作者简介 王文房(1961-), 男, 山东日照人, 副教授, 从事资源植物学方面的研究。

收稿日期 2006-08-20

2.2 培养时间对愈伤组织形成的影响 从表 3 可以看出, 7、8、9 这 3 种梯度培养基在培养 3 d 后就有胚状愈伤组织形成,



图1 1号培养基愈伤组织生长情况

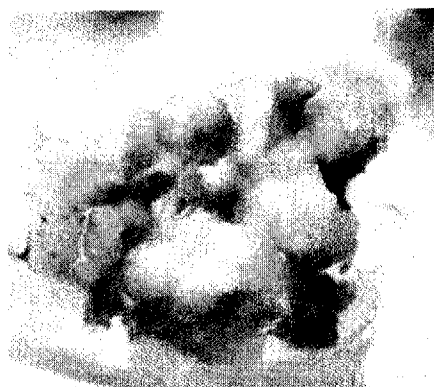


图3 6号培养基愈伤组织生长情况



图2 5号培养基愈伤组织生长情况



图4 7号培养基愈伤组织生长情况

而其他未见愈伤组织;这3种培养基中的愈伤组织生长速度较快,3周后几乎全部形成愈伤组织,而其他浓度的培养基里也有愈伤组织形成,但出愈数量较少,且生长速度较慢。

2.3 愈伤组织分化成再生苗 将外植体生成的愈伤组织

细胞团转接到含有不同浓度组合的丛芽培养基上。结果表明,以6-BA 3.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的效果最佳。14 d后2种外植体愈伤组织细胞团大部分都能够分化出绿色芽点,且最终生成再生苗。

表3

愈伤组织生长情况与培养时间的关系

	3 d	8 d	14 d	21 d
1	没有变化	没有变化	2株出现愈伤组织	没有变化
2	没有变化	3株出现愈伤组织	2株出现愈伤组织	没有变化
3	没有变化	2株出现愈伤组织	2株出现愈伤组织	1株出现愈伤组织
4	1株出现愈伤组织	4株出现愈伤组织	1株出现愈伤组织	没有变化
5	8株出现愈伤组织	9株出现愈伤组织	1株出现愈伤组织	没有变化
6	10株出现愈伤组织	9株出现愈伤组织	没有变化	1株出现愈伤组织
7	18株出现愈伤组织	10株出现愈伤组织	5株出现愈伤组织	没有变化
8	30株出现愈伤组织	5株出现愈伤组织	没有变化	没有变化
9	31株出现愈伤组织	4株出现愈伤组织	没有变化	没有变化
10	8株出现愈伤组织	6株出现愈伤组织	2株出现愈伤组织	没有变化
11	没有变化	6株出现愈伤组织	3株出现愈伤组织	没有变化

3 讨论

NAA是生长素类植物激素。在组织培养中,生长素常被用来诱导细胞的分裂和根的分化,在配合使用一定量的细胞分裂素的作用下,可诱导不定芽的分化。侧芽的萌发与生长以及在某些植物诱导胚状体产生时必须使用生长素。而6-BA是细胞分裂素类植物激素。它主要影响细胞分裂、顶端优势的变化和茎芽的分化。在培养基中加入细胞分裂素主要是为了促进愈伤组织或器官上分化不定芽。结果表明,在MS培养基中添加3.0~4.0 mg/L NAA和1.0~2.0 mg/L 6-BA时,樱花花柄易于形成愈伤组织,出愈率几乎

为100%,培养时间也较短。

在试验过程中,外植体的褐变现象和污染是植物组织培养中的常见现象,尤以木本植物组织培养中褐变现象最为严重。褐变主要发生在外植体,在植物愈伤组织的继代、悬浮细胞培养以及原生质体的分离与培养时也时常发生。一般认为这是由于多酚氧化酶(PPO)被氧化成醌类物质,并抑制许多酶的活性,从而影响植物材料的正常生长,严重时可导致培养物死亡。但是在樱花花柄的组织培养中,未见有褐变现象发生。

试验过程中的污染包括以下方面的原因:①外植体灭

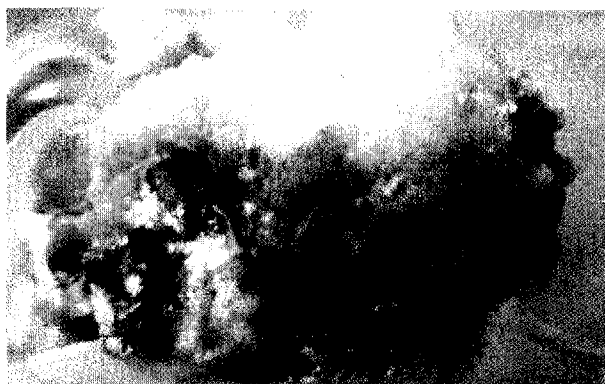


图5 9号培养基愈伤组织生长情况



图6 10号培养基愈伤组织生长情况

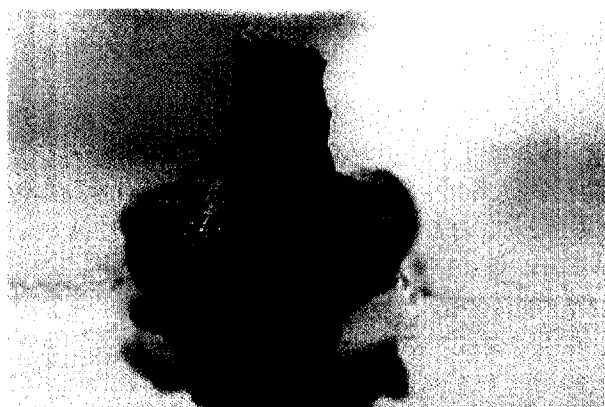


图7 11号培养基愈伤组织生长情况

菌不彻底。在外植体灭菌的过程中,由于灭菌时间过短或灭菌时由于外植体某些部位不容易灭菌,而导致植株污染。②植物组织中普遍存在内生菌。当植物组织进行离体培养

时,这些内生菌就会产生污染。表面细菌引起的污染通常在2~3 d就能在外植体周围或培养基表面形成明显的如水污状、油污状、气泡或干缩的红、黄、乳白等颜色的菌落。而若在外植体培养后3~5 d内并未发现菌落,则可能是由内生细菌引起的污染。这种污染一般不易避免,但是在用0.1% HgCl₂ 溶液灭菌的过程中,应尽量彻底杀死植物组织内的内生菌(一般为孢子)。③转接过程中的污染。在转接过程中,由于实验操作台或实验器具(镊子、剪刀等)灭菌不彻底,导致转接外植体的污染。所以在接种前,应首先对实验室内用紫外灯灭菌一段时间,实验台提前通风,工作人员用肥皂彻底清洗双手,并用酒精灭菌,实验器具彻底灭菌,并在使用过程中及时灭菌。④培养基灭菌不彻底。培养基灭菌后不应立即使用,而应放在无菌培养室中培养3~4 d,如未发现污染,方可使用。

参考文献

- [1] 利容千,王明全.植物组织培养简明教程[M].武汉:武汉大学出版社,2004:36-51.
- [2] 李俊明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,2002:120-124.
- [3] 刘庆昌,吴国良.植物细胞组织培养[M].北京:中国农业大学出版社,2003:83-96.
- [4] 刘庆林,马伟,郑玉梅.花卉组织培养[M].北京:中国农业大学出版社,2003:213-220.
- [5] 崔德才,徐培文.植物组织培养与工厂化育苗[M].北京:化学工业出版社,2003:188-200.
- [6] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986:137-146.
- [7] 谭文登,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991:214-221.
- [8] 颜昌敬.植物组织培养手册[M].上海:上海科学技术出版社,1990:187-196.
- [9] 颜昌敬.农作物组织培养[M].上海:上海科学技术出版社,1991:231-255.
- [10] 吴洪生.组织培养中的染菌及预防[J].药物生物技术,2001,8(2):239-240.
- [11] 朱广廉.植物组织培养中外植体灭菌[J].植物生理学通讯,1996,32(6):444-449.
- [12] 邱坚锋.热带地区植物组织培养中污染的控制[J].热带林业科技,1987(5):72-75.
- [13] 陈正华.木本植物组织培养技术[M].北京:高等教育出版社,1986:146-162.
- [14] 潘瑞炽.植物组织培养[M].2版.广州:广东高等教育出版社,2001:198-201.
- [15] 曹敦义.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,2001:20-37.
- [16] 朱广廉.植物组织培养中灭菌和无菌操作的几个问题[J].植物生理学通讯,1995,31(5):375-384.
- [17] 吴素萱.植物组织和细胞培养[M].上海:上海科学技术出版社,1978:65-72.

(上接第5838页)

有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杨瑞龙.粘质沙雷氏菌败血症一例[J].兰州医学院学报,2002,28(2):103-104.
- [2] 田瑛,刘淑芳.68株粘质沙雷氏菌的鉴定及药敏分析[J].工企医刊,2004,17(3):23-24.
- [3] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:370-391.
- [4] 刘志恒.现代微生物学[M].北京:科学出版社,2002.
- [5] 中国科学院微生物研究所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法[M].北京:科学出版社,1978.

- [6] 周德庆.微生物实验手册[M].上海:上海科技出版社,1983:137-163.
- [7] ALCAMO I E. Fundamentals of microbiology[M]. Massachusetts: Addison Wesley Publishing Company, Inc., 1983.
- [8] 余颢.医学微生物学[M].北京:人民卫生出版社,1983.
- [9] WOODWARD H M M, CLARKE K B. A case of infection in man by the bacterium prodigiosum[J]. Lancet, 1913:314-315.
- [10] WHEAT R P, ZUCKERMAN A, RANIZ L A. Infection due to chromobacteria: report of eleven cases[J]. Arch Intern Med, 1951, 88:461-466.
- [11] ENDOH M, OKUNO R, MUKAIGAWA J, et al. Two nosocomial outbreaks of sepsis caused by *Serratia marcescens*, which occurred in July 1999 and January 2002-Tokyo[J]. Kansenshogaku Zasshi, 2004, 78(4):295-304.
- [12] GARCIA F R, PAZ R C, GONZALEZ R S, et al. Cutaneous infection caused by *Serratia marcescens* in a child[J]. J Am Acad Dermatol, 2006, 55(2):357-358.