

牡丹花石榴的茎尖组织培养再生体系研究

刘广甫¹, 李洪涛², 陈延惠³, 胡青霞³, 刘丽³

(1.郑州市园林局, 郑州 450003; 2.郑州市园林科研所, 郑州 450003;

3.河南农业大学林学院园艺学院, 郑州 450002)

摘要:以牡丹花石榴茎尖为材料,通过研究不同的激素配比对芽的增殖和生根的影响,探索牡丹花石榴的最适增殖培养基和生根培养基。结果表明:牡丹花石榴的最适增殖培养基为MS+6-BA1.0 mg/L+IBA0.3 mg/L,其增殖系数达到3.5;最适生根培养基为1/2MS+NAA1.0 mg/L,其生根率达到80%。生根处理中初期暗培养对供试品种生根具有相当大的作用。

关键词:石榴;组织培养;增殖培养;生根培养

中图分类号: S665.4

文献标识码: A

文章编号: 1003-2630(2007)03-0017-03

Study on Regenerated System by Stem Apex Tissue Culture of Mudanhua *Punica Granatum* L.

LIU Guang-fu¹, LI Hong-tao², CHEN Yan-hui³

(1.The Second Nursery of Zhengzhou Landscape Bureau, Zhengzhou 450003, China; 2.Zhengzhou Institute of Landscape and Architecture, Zhengzhou 450003,China;3.Collge of Forestry and Horticulture,Henan Agricultural University,Zhengzhou 450002 ,China)

Abstract: The effects of different phytohormone rations on the multiplication and rooting of stem apex explants from Mudanhua *Punica Granatum* L. were studied. The results indicated that the most suitable multiplication medium was MS+6-BA1.0mg/L+IBA0.3 mg/L, the multiplication index was 3.5;the best rooting media was 1/2MS+NAA1.0 mg/L, the rooting rate was 77.4%. Medium-term dark culture was very important for rooting.

Key words: *Punica Granatum* L.;Tissue culture; Multiplication culture; Rooting culture

石榴 (*Punica granatum* L.) 为石榴科石榴属多年生落叶树种,作为果树和观赏植物在我国已有2000多年的栽培历史。

石榴生产中绝大多数良种是采用扦插繁殖,扦插繁殖能够保持其优良性状的遗传稳定性。但是利用这种繁殖方法用种条量大、繁殖的数量少、速度慢,不能适应现代化生产要求。组织培养(Plant tissue culture)是指通过无菌操作,把来自植物体的各类材料即外植体(Explant),接种于人工配置的培养基上,在人工控制的环境条件下,进行离体培养的一套技术与方法,又称为植物离体培养(Plant in vitro culture),或植物的细胞与组织培养,其特点是繁殖系数大,周年生产,繁殖速度快,苗木整齐一致。并且利用微茎尖培养还可以脱除病毒,因而离体培养已经成为培育无病毒苗木的主要途径。

本试验拟对牡丹花石榴品种组培快繁的几个关键技术环节进行研究,目的是探索牡丹花石榴的

最适增殖培养基、生根培养基,为稀有品种的快繁以及石榴倍性育种和进一步的分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

供试材料为牡丹花石榴,取自河南农业大学石榴资源圃。

1.2 材料处理

于2005年11月从成龄牡丹花石榴品种树上,剪取1年生休眠枝条,在清水中浸泡1d后,插在灭菌后的蛭石中,在温度为25℃~28℃,光照2000~3000Lx下催芽,光周期为16h光照和8h黑暗。25d后休眠芽陆续萌发,生成新枝条,可作为外植体。将新萌枝条用自来水冲洗5~10min,摘除多余叶片,切取茎尖1.0cm左右,在超净工作台上用75%的酒精浸泡30s,用0.1%氯化汞浸泡8min,无菌水漂洗材料4~5次,后置无菌水中待用。

1.3 诱导分化培养

在无菌条件下,将处理好的无菌外植体材料置

于超净工作台上,用灭过菌的吸水纸吸干,在解剖镜下剥除茎尖幼叶,切取茎尖生长锥5~10 mm,接种于装有愈伤组织诱导培养基的试管中培养,愈伤组织诱导培养基选用MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1mg/L+蔗糖3%+琼脂0.7%,PH值5.6左右。培养条件:温度25℃~27℃,先暗培养72 h,以促进组织分化,后再转为光照培养,光强2 000~3 000 lx,光照时间12~16 h/d。

10~15 d后,外植体周边有白绿色愈伤组织形成并不断增大、变绿,30 d后在超净工作台上将愈伤组织块取出,用无菌水冲净愈伤组织块上残留的培养基,用无菌解剖刀将愈伤组织块切成几个小块,再接种到装有新鲜愈伤组织诱导培养基的培养瓶中,再与诱导愈伤组织相同的培养条件下继代培养,10~15 d愈伤组织块即可长大。通过继代培养可获得大量接种材料,用于分化培养。

培养40 d左右有丛生芽体分化并逐渐长大,形成小枝条后可将芽体分离,进行转管继代培养,继续扩大繁殖。

1.4 增殖培养

初期生长的试管苗需经几代的培养,才能形成较好的丛生芽,增殖生长才能不断扩大提高,从而达到快速繁殖的目的。而试管苗增殖倍数的高低,关键是要选择出适宜增芽的培养基,通过往培养基中的加入不同浓度的激素,根据试管苗的型态生长及繁殖系数对比,选出适合增芽的培养基。

待通过继代培养使石榴苗达到一定数量后即可进行增殖培养实验。在超净工作台上将芽体愈伤组织块取出,用无菌水冲净愈伤组织块上残留的培养基,用无菌解剖刀将带有芽体的愈伤组织块切成几个小块,再接种到装有增殖培养基的培养瓶中。在与芽体诱导相同的培养条件下增殖培养。增殖培养基以MS为基本培养基,分别设置BA为1.0、1.5、2.0 mg/L与IBA为0.1、0.2、0.3 mg/L相对应的组合9个,20 d后统计增殖系数和生长量。观察不同浓度条件下对增殖生长的影响,筛选出BA与IBA的最佳组合。

1.5 生根培养

待无根苗长至长约2~3 cm时,在无菌条件下,将幼枝条取出,切取无根枝条长约1 cm,接种到生根培养基中培养。生根培养基以1/2MS为基本培养基,分别设置加入IBA为0.5、1.0mg/L和加入NAA为0.5、1.0 mg/L的4个组合,30 d后统计生根率,生根株数,观察生根情况,确定最佳的生根培养基组合。

其中加入蔗糖3%、琼脂0.7%,PH5.6左右。先暗培养1周以促进根原基形成,后再转为光照培养,培养条件:温度28℃,光照培养时间12~14 h/d,光强2 000~3 000 Lx。

2 结果与分析

2.1 不同浓度BA与IBA组合对增殖生长的影响

以MS作基本培养基,3种浓度BA和3种浓度IBA组合,培养20 d后对牡丹花石榴增殖系数及生长量的影响见表1。

从表1中可以看出,当BA浓度为1.0 mg/L时的试管苗增殖系数普遍较高,增殖的最适BA浓度为1.0 mg/L。当BA浓度为1.0 mg/L而IBA浓度分别为0.1、0.2、0.3 mg/L时试管苗增殖系数分别为2.5、3.2、3.5。其中IBA为0.3 mg/L时的增殖系数最高,且植株生长健壮。故最佳的增殖培养基为MS+6-BA1.0 mg/L+IBA0.3 mg/L时的组合。其次是BA为MS+6-BA1.0 mg/L+IBA0.2 mg/L时的组合。

表1 不同浓度BA与IBA组合对增殖系数和生长量的影响

培养	BA /(mg/L)	IBA /(mg/L)	增殖系 数	20d生长量 /cm
1	1.0	0.1	2.50	1~2
2	1.0	0.2	3.20	3~4
3	1.0	0.3	3.50	2~5
4	1.5	0.1	1.70	2~3
5	1.5	0.2	2.30	2~3
6	1.5	0.3	1.70	2
7	2.0	0.1	1.80	1~2
8	2.0	0.2	2.45	1~3
9	2.0	0.3	1.07	1~2

注:芽增殖系数是指1个单株经继代培养后形成的分化芽个数。表中数字为培养20的增殖系数与生长量。

2.2 不同浓度IBA和NAA对生根培养的影响

以1/2MS为基本培养基,蔗糖30 g/L、琼脂7 g/L配合2种浓度IBA和2种浓度NAA,选用培养基接种苗形好、叶片4~5片以上、高度3 cm以上的试管苗共100株,10 d后即开始陆续生根,生根效果见表2。

试验结果表明,不同浓度IBA及NAA对牡丹花石榴根发芽时间、生根条数、生根株数、生根率、根生长情况均有不同程度影响。由表2可以看出,加NAA的植株根长势较好。加IBA的植株根系多细弱较短。整体上看加NAA的比加IBA的植株生根情况好,其中以1/2MS+NAA1.0 mg/L培养基生根率最高达80%,其根长且生根条数多且粗,为牡丹花石榴的最佳生根培养基。

3 结论与讨论

3.1 结论

表2 不同浓度IBA和NAA生根培养基对生根的影响

激素 / (mg/L)	接种数 / 株	生根 株数/株	生根 条数/条	生根 率/%	生长情况
IBA 0.5	25	8	30	32.00	细弱 根长 10~15 mm
IBA 1.0	25	10	55	40.00	细弱 根长 8~10 mm 较短
NAA 0.5	25	17	42	68.0	根长 15~30 mm 较粗
NAA 1.0	25	20	75	80.00	根长 15~35 mm 健壮

注: 表中数字为生根培养30 d后的生根株数、生根条数及生根率

3.1.1 以牡丹花石榴茎尖生长点为外植体进行增殖培养时以MS+6-BA1.0 mg/L+ IBA 0.3 mg/L培养基的增殖系数最好, 增殖率达到3.5%, 植株生长旺盛。当BA浓度分别为1.5、2.0 mg/L, IBA浓度为0.1、0.2、0.3 mg/L时的6个组合的增殖系数普遍下降, 且外植体长势变弱、节间细长叶片有发黄落叶现象。

3.1.2 进行生根培养时整体上看加NAA比加IBA的植株生根情况好, 以1/2MS+ NAA 1.0 mg/L培养基的诱根效果最好, 愈伤组织小、根系粗壮, 生根率高达到80%。加入IBA的外植体的根系则较细弱, 且生根率低, 不利于生根培养。

(上接第3页)

(Sect. *Ulmus* Seu. *Nitentes*) 至 *U. parvifolia* Sect. *Ulmus* Seu. *Nitentes*) 逐渐变短, 纤维分子逐渐变长, 说明由 Sect. *Blepharocarpus* 到 Sect. *Ulmus* Ser. *Glabrae* 到 Sect. *Ulmus* Ser. *Nitentes* 至 Sect. *Ulmus* Seu. *Nitentes* 是不断进化的。这与傅立国^[6]和黎中宝^[6]的观点相符合。

关于聚类分析谱系图, ①当阈值 T = 17 时, 所分三类与傅立国所设的 Sect. *Blepharocarpus*、Sect. *Ulmus*、Sect. *Microptelea* 完全符合; 通过方差分析, 进一步说明了傅立国的榆属下设组不设亚属是合理的。② *U. davidiana*、*U. davidiana* Var. *japonica*、*U. szechuanica* 三者亲缘关系较近, 而与同属于 Sect. *Ulmus* Seu. *Nitentes* 的 *U. castaneifolia* 和 *U. glancesscens* var. *lasiocarpa* 的亲缘关系较远, 有不少学者借助其它研究手段也对此做过报道。如黎中宝认为 *U. davidiana* 和 *U. davidiana* Var. *japonica* 组成核型的各类染色体分布位置相同, 说明二者亲缘关系密切; 它们与 *U. szechuanica* 的核型结构也很相似。辛益群等^[7]认为 *U. davidiana* Var. *japonica* 与 *U. szechuanica* 的花粉粒形状均属于粗拟网状~细拟网状类型, 而 *U. castaneifolia* 属于条纹状~脑纹状型, 说明前二者的亲缘关系较近, 而它们与 *U. castaneifolia* 的亲缘关系较远。③ *U. gausseii*、*U. macrocarpa*、*U.*

3.2 讨论

试验中NAA浓度的最高限度设置为1.0 mg/L, 对牡丹花石榴来说也许不是最佳的浓度, 高于1.0 mg/L的浓度组合也许更适合牡丹花石榴的生根培养。

参考文献:

- [1] 阎志佩. 濒危品种软子石榴的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004 (3): 331.
- [2] 黄剑华, 等. 软子石榴组培原种苗的诱导及快繁[J]. 上海农业科技, 2002 (6): 16.

(责任编辑: 王团荣)

lamellosa 的距离很近, 说明其三者亲缘关系较密切。但它们的花粉外壁纹饰, 萌发孔数相差较远^[7], 故三者的亲缘关系还需进一步研究。④ *U. chenmoui* 本属于 Sect. *Ulmus* Ser. *Nitentes*, 但谱系图上它离 *U. gausseii* (Sect. *Ulmus* Seu. *Glabrae*) 最近, 且二者的花粉外壁纹饰和萌发孔数相同^[7], 说明二者谱系图上的近缘并非偶然现象, 虽然它们在果实、叶片形态等特征上^[6]并不相同或甚至差异很大, 但是作者仍认为 *U. chenmoui* 应归于 Sect. *Ulmus* Ser. *Glabrae*。

参考文献:

- [1] 蒋承增, 等. 十种金花茶叶片横切面显微构造[J]. 广西植物, 1985, 5 (2): 105-106.
- [2] 彭海源, 等. 东北六种阔叶树散孔材超微结构的观察[J]. 东北林业大学学报, 1990, 8 (1): 72-79.
- [3] Bailey, I W, Pevlopment of vessels in angiosperms and significance in morpholgical research[J], Amer Jour, 1944, 31: 421-428.
- [4] Carlguist, S, Ecological strategies of xylem ecolution[M], mir, eulif, press, Berkeley, 1995.
- [5] 傅立国. 中国榆属的研究[J]. 东北林学院学报, 1980, 3: 1-40.
- [6] 辛益群, 等. 中国榆属花粉形态研究及其分类学意义[J]. 植物学报, 1993, 35 (2): 91-95.

(责任编辑: 王文彬)