

玉荷包的组织培养技术

孙新秀¹ 刘良宏²

(1.湖北省咸宁市园林化管理局,湖北 咸宁 437100; 2.湖北咸宁市碧云园林绿化有限公司,湖北 咸宁 437100)

摘要:以顶芽为起始外植体,采用常规手段对玉荷包的组织培养技术进行研究。结果表明,玉荷包在MS基本培养基上,附加一定浓度的5-BA及NAA,顶芽生长与分化都效果良好,诱导分化比率可达98%,诱导出的顶芽、节段可再次转入扩增;诱导分化的幼芽转入添加适量NAA及活性炭的半量MS培养基中,生根率达到了100%。

关键词:玉荷包;组织培养;培养基;NAA

以玉荷包的顶芽和茎段为起始外植体,进行组织培养技术的常规研究。结果表明玉荷包的顶芽和茎段(腋芽)在MS+6-BA 2mg/L+NAA0.1 mg/L培养基上,无论是顶芽还是腋芽诱导分化效果都较好,诱导率可达98%;诱导出的顶芽或腋芽前期转入MS+6-BA1 mg/L+NAA0.01 mg/L的培养基中继续培育,从第4代以后,视增殖倍率,对6-BA的用量进行调整,可控制增殖比例在5倍以上;所得增殖芽在1/2MS(培养基中部分成分减半)+NAA0.02+AC0.1g/L的培养基中诱导生根,生根率达100%。

1 植物名称

玉荷包(*Dischidia pectinoides*, 萝藦科青蛙藤属肉质藤本植物)。

2 材料类别

顶芽和带腋芽的茎段。

3 培养条件

(1)启动培养基:MS+6-BA 2 mg/L+NAA0.1 mg/L(单位下同)+蔗糖3%;(2)继代增殖培养基:A、MS+6-BA1 mg/L+NAA0.01 mg/L+蔗糖3%;B、MS+6-BA 2~3+NAA0.01 +蔗糖3%;(3)生根培养基:1/2MS+AC 1g/L +3%蔗糖(1/2MS表示基本培养基中KNO₃ NH₄NO₃、MgSO₄、MnSO₄、ZnSO₄、CuSO₄、KH₂PO₄、Na₂MoO₄、NaH₂PO₄、H₃BO₃用量减半)。上述培养基均加有8%卡拉胶,pH5.8~6.0。培养温度为25~27℃。

4 生长与分化情况

4.1 无菌苗的获得

选取生长旺盛一致的盆栽玉荷包作为母本,现将其避雨处自然阴干5~7天。用锋利的刀片切取植株上部茎段,去除叶片,并用自来水洗净所取茎干;用洗衣粉将所取材料浸泡5min,并用流水冲洗10min,放入无菌瓶带回工作台,进行切段和表面消毒。分段时尽量每段1节位。消毒:采用0.1%的升汞进行消毒,消毒时间视材料老嫩情况而定,通常8~10min即可,消毒成功率可达48%左右。消毒后再用无菌水洗4~5次,每次3~5min。用手术刀切除顶芽茎段两端变色部分,直接接入上述启动培养基中,注意不要将材料放倒。为节约能源起见,首代培育可采用光强

300~500Lux,2~3代光强1500~2500 Lux(单支日光灯管即可),光照时间12小时/天。接种10天后顶芽和侧芽均有明显生长。

4.2 继代增殖

将上述启动培养得到的幼芽,当芽高超过1cm时,将基部老组织切除,转入新鲜培养基继续培养。经3次继代培养后,幼芽开始即可由单株形成团块,每团芽数2~4株幼苗。在此后每代继代培养切割中,要求按团块上芽生长的方向进行切割,保持每个团块2~3个小芽;团块上芽高>25mm时,从芽顶向基部按2~3个节进行截取,直到顶端离基部高度小于25mm为止,且截下的节段长度应小于25mm;同时剔除黄化、枯叶、基部疏松愈伤组织及团块上的长须根等。将上述处理好的材料接种到培养基(2)-A(2~3代)或培养基(2)-B(3代以后)中。如此可在较短的时间里可得到大量芽苗,4代以后整体繁殖倍率可达5倍以上;平均继代周期以为35~40天为宜(团块增殖苗见图2)。从第4、5代开始,要求控制光照强度在2500~4000Lux之间。值得指出的是,光照控制是决定幼苗品质的关键因子之一,光照时间偏短或光照强度太低,团块基部(尤其是老叶)会出现大量黄叶现象,甚至会有部分苗从基部直接死亡,因此要注意加强光照控制。



图2 培养4~5代后的增殖苗

4.3 生根与移栽

将芽苗切割单株或小团块状态(每团不超过3株),接种到生根培养基(3)中,此时培育温度控制至22~24℃,约30天后开始生根,每株幼苗可分化出1~3条白色须根,生根率达100%(见图3)。当根长达0.5~1.0 cm时,即可松开瓶盖,并置于温室炼苗2~3d。移植前用800~1000倍的多菌灵或甲基托布津溶液浸泡1~2min,捞起后放入育苗盘内稍稍晾干,备植。种植基质用普通泥炭藓或草炭、珍珠岩3:1的混合基质中,采用50~72目穴盘

花粉发育时期与取样时期 对白菜小孢子胚诱导的影响

赵建平 姚祥坦

(浙江省嘉兴市农业科学研究院, 浙江 嘉兴 314016)

摘要:以上海青、精选长梗白菜和高华青梗白菜为试材,对花粉发育时期与取样时期对白菜小孢子胚诱导的影响进行了研究。结果表明,当花瓣与花药长度比为 $1/2 \sim 2/3$,花蕾长范围在 $2.2 \sim 2.8$ mm时,供试白菜小孢子胚诱导率最高,与此对应的最佳白菜小孢子培养时期为单核中期至单核靠边期。蕾期末和初花期的花蕾取样,小孢子培养胚诱导率最高。

关键词:白菜 游离小孢子培养 花粉发育时期 取样时期 胚诱导

自1982年Lithcher^[1]首次成功进行了甘蓝型油菜游离小孢子培养以来,许多十字花科作物小孢子培养都获得了成功。小孢子培养技术现已成为十字花科作物育种中一项非常重要的育种技术。在小孢子培养中,通过胚胎发生产生单倍体植株,可以有效加速育种材料的纯化,提高育种效率,从而加速育种进程。另外,小孢子培养的诱导频率一般比花药培养的频率高,产胚的基因型范围和产胚量等方面均显著优于花药培养,且避免了体细胞的干扰,避免了鉴别真伪单倍体的难题。小孢子培养的关键在于游离小孢子如何进入胚胎发育途径,即小孢子胚诱导问题,已有大量研究对小孢子胚诱导影响因素进行了探索^[2]。小孢子胚诱导影响因素主要有:供体材料基因型、小孢子发育时期、取材时期、低温预处理、高温胁迫诱导、蔗糖、激素等培养基成分等^[3],其中小孢子发育时期和取样时期对小孢子胚诱导的影响因作物、培养技术等因素报道结论很不一致,本试验就这两个因素对供试白菜小孢子胚诱导的影响进行了系统研究,以期对白菜小孢子培养提供更可靠的技术保障。

术保障。

1 材料与方法

1.1 材料

以白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*)一代杂种上海青、精选长梗白菜和高华青梗白菜为试验材料。种子于2007年9月25日播种,10月26移栽,2008年3月采集花蕾进行游离小孢子培养。

1.2 方法

1.2.1 花粉发育时期观察

采用孚尔根染色法进行染色。将孚尔根染液加入到花粉粒中,在显微镜下观察小孢子发育时期,并统计小孢子的单核早、中、晚期,二核期和三核期的比率。

1.2.2 小孢子的分离

在白菜花序接近开花时,每次从主花序或分枝花序上随机选取处于单核中晚期的花蕾。低温预处理,将采集的花蕾用湿纱布包起放在50ml烧杯内,置于4℃冰箱,1~2 d。将花蕾放入培养皿中,加5%(w/v)次

进行常规种植。移植后半个月内需进行遮阴,并保持较高的湿度,成活率可达90%。

5 意义与进展

玉荷包原产菲律宾,为肉质附生型藤本植物,叶细小,对生,肉质厚实,椭圆形,叶先端有一突出芒尖。通

常有一至多枚变态叶,其形状甚是肥大奇特,胀大如一只鼓着气的青蛙肚皮,又如一个绿色荷包,内部中空,生有气根,整个变态叶呈翠绿色,极具观赏价值。春秋间绽放红色小花;伞形花序,结骨突果。玉荷包性喜温暖,生长适温 $20 \sim 26$ ℃,越冬温度 5 ℃以上;需水不多,具一定耐旱力;喜明亮散射光,忌阳光直射;盆土宜疏松、透水,忌粘重。玉荷包茎蔓生,柔弱,需放支架支撑;又因其茎节处有气生根,亦可藉桫欏板或棕衣柱来攀附。玉荷包可用茎枝扦插或种子繁殖,但盆栽尤以组织培养所得种苗生长旺盛、结“苞”更多。玉荷包的组织培养国内未见报道。

第一作者简介:孙新秀(1963.9—),女,湖北咸宁人,咸宁市园林绿化管理局副主任;主要从事园林规划设计、施工组织管理等工作。

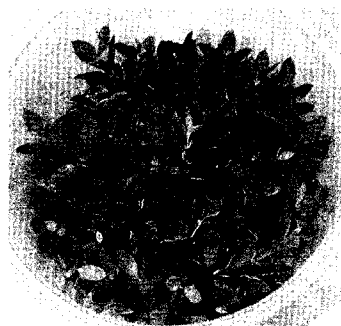


图3 塑料杯中的生根苗