

草原龙胆无性快繁体系建立的初探

安永辉, 田会倩, 魏健 (长春师范学院, 吉林长春 130032)

摘要 [目的]研究草原龙胆以茎段为外植体的丛生芽的诱导与增殖情况。[方法]以草原龙胆为试材,用生长健壮的草原龙胆植株茎段为外植体建立其高效快繁体系,以MS、MB、N₆ 3种培养基及IBA、6-BA、GA 3种激素进行正交试验设计。[结果]结果表明,适宜的脱毒材料为0.1%的HgCl₂。当基本培养基为MB(MS大量+B₅微量+B₅有机+Fe盐),IBA为2.0 mg/L,6-BA为0.5 mg/L,GA为2.0 mg/L时,其丛生芽的诱导率、分蘖率最高。[结论]该试验结果可用于组织培养快速繁殖草原龙胆。

关键词 草原龙胆;无性快繁体系;外植体

中图分类号 S603.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)32-13962-02

Preliminary Research on the Establishment of Multiplication System of Rough Gentian

AN Yong-hui et al (Changchun Normal College, Changchun, Jilin 130032)

Abstract [Objective] The bud induction and its multiplication of rough gentian were researched in the experiment. [Method] The healthy rough gentian stem being taken as explants, the high-efficiency multiplication system was set up through the orthogonal design including 3 media (MS, MB and N₆) and 3 kinds of plant growth regulators (IBA, 6-BA and GA). [Results] The results showed that 0.1% HgCl₂ was the best sterilized agent. When the fundamental medium was the MB (macro-element of MS + trace element and organic material of B₅ + Fe) and IBA was 2.0 mg/L, 6-BA was 0.5 mg/L, GA was 2.0 mg/L, the rate of shoot induction and multiplication of rough gentian were highest. [Conclusion] The results could be used in tissue culture and rapid multiplication of rough gentian.

Key words Rough gentian; Clone multiplication system; Explants

草原龙胆(*Eustoma grandiflorum*)属龙胆科(Gentianaceae)又名洋桔梗,是观赏植物,原产于北美洲^[1]。花形美丽,花色丰富,有淡紫、粉红、深蓝、浅蓝、白色等。茎秆叶片光洁动人,目前年销售量达一亿支,列切花排名第七位^[2]。草原龙胆在目前切花生产中上升速度最快,种苗市场需求量极大。草原龙胆生长适宜温度为15~28℃,对光照反应比较敏感,长日照对其生长发育均十分有益,有助于茎叶生长和花芽形成,一般以每天16 h光照效果最好,pH值以6.5~7.0为宜,但草原龙胆种子细小,从发芽到正常生长有3~4个月的停滞期,这段时期内常有大量幼苗死亡,导致育苗困难^[3]。利用组织培养进行快速繁殖不但可以节省大量的资金,使草原龙胆的生长、发育避免受到外界环境的影响,又可以把历代种子苗中花色、花瓣轮数受市场欢迎的品种保留下来,并根据市场需求大批量生产,大大缩短了育苗周期,可以做到不受季节限制全年供苗,具有重要现实意义。

1 材料与方

1.1 材料 试验材料为草原龙胆。

1.2 方法

1.2.1 外植体的获得。取生长健壮的草原龙胆植株茎秆用自来水冲洗干净,放入小烧杯中,在无菌条件下用浓度为70%的酒精杀菌15~30 s,再转入0.1%的HgCl₂或3% NaClO灭菌5~25 min,最后用无菌水冲洗5~6次。然后用消毒滤纸吸干表面水分^[4]。

1.2.2 培养基的组成和配制。试验培养基的组成:MS、MB(MS大量元素+B₅微量+B₅有机+Fe盐)、N₆为基本成分,附加不同浓度的6-BA、IBA、GA和3%蔗糖,0.7%琼脂。

1.2.3 茎段丛生芽的诱导与增殖。将材料切成0.8~1.0 cm的小段(带腋芽)接种到附加3%蔗糖、0.7%琼脂的培养基上,共9个处理进行正交试验设计。pH值调至5.8,温度

为20~24℃,空气湿度为70%,每天光照16 h,20 d后观察丛生芽的诱导情况^[6]。

2 结果与分析

2.1 不同杀菌剂对草原龙胆外植体灭菌效果的影响 植物材料的灭菌是植物组织培养工作的重要环节,它既要求将外植体表面微生物彻底杀死,又要求尽可能少地伤害外植体组织和细胞^[7]。试验选用3%的NaClO和0.1%的HgCl₂分别对外植体进行灭菌。其中次氯酸盐是一种强氧化剂,在水中形成次亚氯酸,分解后形成盐酸和新生态的氧,具有极强的氧化性,故具有杀菌作用。它灭菌处理后易于去除,不留残毒,具有杀菌力强、低毒、价廉等优点,是组培工作者喜欢选用的杀菌剂之一;升汞是重金属杀菌剂,Hg⁺可与带负电荷的蛋白质结合,使菌体蛋白变性,酶失活,从而起到杀菌作用。在室温下,0.1%的HgCl₂在10 min内可有效地杀死附着在外植体表面的细菌及芽孢,是一种极有效的杀菌剂。但它有毒害,经升汞灭菌的外植体,需彻底去除残留的Hg⁺,以消除微量残留升汞对外植体的伤害^[5]。

在试验中,首先将外植体用自来水冲洗干净,再在70%的酒精中浸泡30 s,无菌水冲洗一次分别放入3%的NaClO和0.1%的HgCl₂分别浸泡5、10、15、20和25 min,灭菌结果见表1。比较后发现,无论使用哪种杀菌剂,随着灭菌时间的延长,外植体的无污染率均呈现出先升高后降低的趋势,当浸泡10 min时,灭菌效果最好;就杀菌试剂的种类而言,用0.1% HgCl₂效果明显好于用3%的NaClO的灭菌效果,当用0.1%的HgCl₂灭菌10 min时达到最佳灭菌效果,无污染率可达100%。建议选用0.1%的HgCl₂灭菌。

2.2 不同基本培养基成分及激素种类对茎段丛生芽的诱导与增殖的影响 从试验结果可以得出,基本培养基成分及激素的种类和浓度对以草原龙胆茎段为外植体进行丛生芽的诱导和增殖的过程中的作用显著。试验以基本培养基成分和3种激素IBA、6-BA、GA设计4因素3水平的正交试验,共9个不同搭配的试验处理,每处理重复2次。分别于20、30、

表 1 不同消毒方法对草原龙胆外植体灭菌效果的影响

Table 1 Effects of different disinfection methods on the sterilization efficacy of *E. grandiflorum* explants

	时间	接种数	死亡数	污染数	无污染//%
	min	Inoculated	Death	Polluted	No
	Time	number	number	number	pollution
0.1% HgCl ₂	5	20	0	9	55
	10	20	0	0	100
	15	20	2	0	90
	20	20	11	0	45
3% NaClO	25	20	16	0	20
	5	20	0	7	65
	10	20	3	2	75
	15	20	5	1	70
	20	20	9	1	50
	25	20	13	1	30

注:表中数据为 3 次试验所得数据的平均值。

Note: Data in the table are mean values of 3 repeats.

表 2 培养基种类及激素种类和浓度对茎段丛生芽诱导的影响

Table 2 Effects of culture medium types and the concentration and types of hormone on multiple shoot induction of stem segment

编号 Code	培养基(A)	激素种类和浓度//mg/L			接种数	分化数	增殖倍数	分化率//%	丛生芽长度//cm		
	Culture medium	Hormone concentration and type			Inoculated number	Differentiated number	Proliferation times	Differentiated rate	Length of multiple shoot		
		IBA(B)	6-BA(C)	GA(D)					20 d	30 d	40 d
1	MS	0.5	0.5	1.0	20	15	3	75	0.6	1.0	1.7
2	MS	1.0	1.0	2.0	20	12	3	60	0.7	1.0	2.0
3	MS	2.0	2.0	0	20	13	4	65	0.5	0.9	1.4
4	MB	0.5	1.0	0	20	17	5	85	0.5	0.9	1.5
5	MB	1.0	2.0	1.0	20	19	6	95	0.6	1.0	1.8
6	MB	2.0	0.5	2.0	20	20	6	100	0.7	1.1	2.0
7	N ₆	0.5	2.0	2.0	20	11	2	55	0.7	0.9	1.7
8	N ₆	1.0	0.5	0	20	9	2	45	0.5	0.8	1.2
9	N ₆	2.0	1.0	1.0	20	13	3	65	0.6	0.9	1.5

根、茎、叶、鳞茎等。而不同种类以及同一种类的不同器官之间的分化能力和对诱导条件的反应是不一致的。试验以草原龙胆茎段为外植体,通过优化培养基条件及环境条件,对影响草原龙胆快速繁殖体系建立的几个影响因素进行研究,从试验结果可以得出,以茎段为外植体,可直接萌发产生丛生芽,增殖系数可达到 5~8,完全可以满足草原龙胆快速繁殖体系建立的需要,同时变异率低,是建立草原龙胆快速繁殖体系较为适宜的途径。

3.2 不同培养基成分对草原龙胆快繁体系建立的影响 基本培养基的选择在组织培养中非常重要,丛生芽的诱导和增殖速度的快慢关键在于培养基。植物快繁最常用的培养基有 MS 培养基、B₅ 培养基、SH 培养基、W 培养基、LS 培养基等。MS 培养基适合于大多数双子叶植物^[10],含有较高的铵态氮,无机盐的浓度高,有加速愈伤组织生长的作用,能满足植物组织对矿质营养的需求。W 培养基所含无机盐较低,不含铵态氮。LS 培养基和 W 培养基的大量元素,微量元素相同,其纤维素和有机附加成分不同。SH 培养基与 B₅ 相似,在不少单子叶和双子叶植物上使用,效果很好。而 B₅ 培养基的主要特点是含有较低的铵盐,该营养成分可能对不少培养物的生长有抑制作用,对有些植物如双子叶植物特别是木本植物^[11],却更适合生长。N₆ 培养基适合于许多单子叶植物,尤其对禾本科植物的小麦水稻等很有效,其广泛应用于

40 d 后观察丛生芽的诱导和增殖情况,试验设计及结果见表 2。其差异显著性结果表明,4 个因素对以茎段为外植体丛生芽诱导过程中对分化率的影响顺序是培养基种类、GA 浓度、IBA 浓度和 6-BA 浓度。从试验结果可以得到的最优水平组合为 A2B3C1D2,即基本培养基成分为 MB,IBA 浓度为 2.0 mg/L,6-BA 浓度为 0.5 mg/L,GA 浓度为 2.0 mg/L。进一步的方差结果表明^[8],激素 GA 浓度与丛生芽长度呈正相关,在 2.0 mg/L 范围内,提高 GA 浓度,有利于植株的伸长;IBA 浓度与增殖倍数呈正相关,随 IBA 浓度的升高,丛生芽的增殖倍数逐渐升高^[9]。诱导出的丛生芽每 30 d 可继代 1 次,继代 3 次后,可适当调低激素浓度,否则幼苗玻璃化现象严重^[5]。

3 结论与讨论

3.1 草原龙胆适宜外植体的选择 外植体的选择几乎包括了植物体的各个部位,如茎尖、茎段、皮层及微管组织、表皮、

小麦、水稻及其他植物的花粉和花药培养和组织培养。试验应用的培养基分别为 MS、MB、N₆ 3 种。从试验结果可以得出,培养基以 MB(MS 大量元素 + B₅ 微量 + B₅ 有机 + 铁盐)为基本成分,草原龙胆外植体的诱导与增殖情况最好。

3.3 不同植物生长调节剂在草原龙胆快繁体系建立的研究

组织培养对培养物影响最大的是外源激素,试验选用的是 IBA、6-BA、GA 3 种激素。生长素能够促进组培苗节尖的伸长及根的形成。一般组培试验都应用 IBA,IBA 是天然合成的生长素,在根的诱导和生长上作用强烈,且作用时间长。但是 IBA 可被光迅速溶解或被酶所氧化,由于培养基中可能有氧化酶存在,所以在使用浓度上应相对较高。陈正华指出,生长素浓度过高对木本植物的增殖起抑制作用^[12]。该试验使用的 IBA 的浓度范围 0.5~2.0 mg/L。试验中也可应用 IAA 和 NAA,它们是天然生长素,合成的化合物比较稳定,但 NAA 诱导发根的能力较弱,而 IAA 在植物体内容易积累使植物中毒。细胞分裂素在组培中起着很重要的作用。BA 的主要作用是能刺激细胞分裂,诱导芽的分化。但 BA 浓度过大,可能会出现试管苗玻璃化,并抑制生根,故在生根培养基中通常除去 BA 而加入一定量的生长素。所以一般生长素与细胞分裂素配合使用。GA 起使丛生芽伸长的作用,由于它的作用往往是负面的,在使用前要慎重^[12]。从试

(下转第 13994 页)

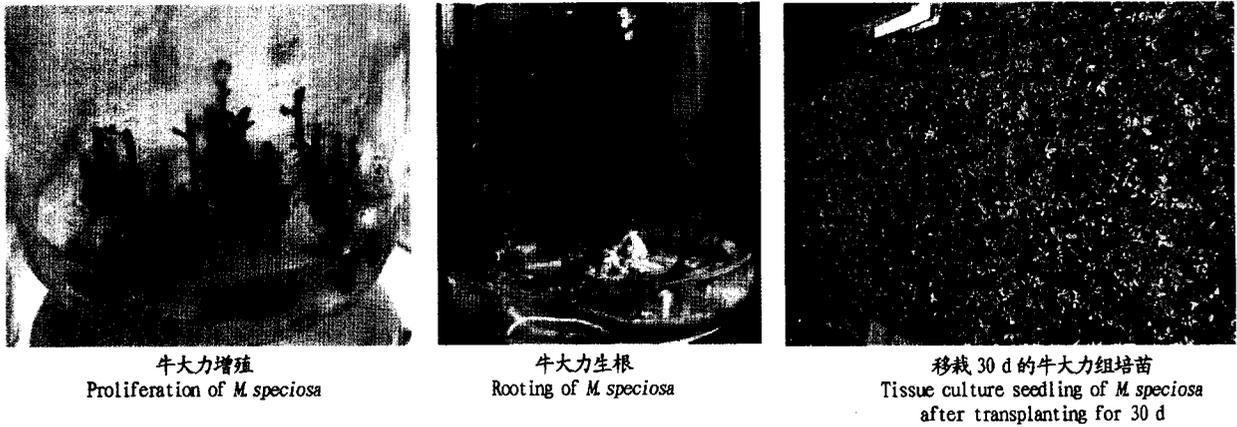


图 1 牛大力茎段组织培养

Fig. 1 Tissue culture of the stem of *M. speciosa*

表 1 不同激素浓度对比对增殖的影响

Table 1 Effects of different phytohormones on proliferation

激素浓度 //mg/L		增殖系数	材料状态
Hormone concentration		Proliferation coefficient	Material status
BA	IBA		
1.0	0.1	4.5	生长正常,产生少量愈伤
1.5	0.1	5.5	生长正常,产生少量愈伤
2.0	0.1	7.0	生长正常,产生少量愈伤
2.5	0.1	6.5	生长缓慢,产生较多愈伤
3.0	0.1	6.0	生长缓慢,较多愈伤
1.0	0.2	4.0	生长正常,少量愈伤
1.5	0.2	5.5	生长正常,少量愈伤
2.0	0.2	6.5	生长正常,有少量愈伤产生
2.5	0.2	6.0	生长较慢,有较多愈伤产生
3.0	0.2	5.5	生长缓慢,产生大量愈伤

明(表 2),一定激素浓度下利用 1/2 MS 培养基生根效果较好,MS 培养基也能诱导根原基的形成,并有部分根的出现,但达不到移栽的要求,不适宜牛大力的生根培养。在 1/2 MS 培养基中,IBA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 的组合生根率最高,且根生长状态最好,所以组合 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 为最佳生根培养基。

2.4 移栽驯化 把生根的瓶苗移至温室自然光下炼苗 1 周,然后取出小苗,洗去培养基,再用 1 000 倍多菌灵浸泡 3 min,移栽在基质为椰糠:砂 = 3:1 的苗床上,移栽后用地膜保湿 15 d 以上,成活率达 85% 以上(图 1)。

3 结论与讨论

牛大力茎段灭菌比较困难,因为牛大力茎段表面被有绒毛,用 0.1% 升汞消毒 20 min 可获得无菌材料;牛大力的启

动培养基以 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L 为好,诱导率可达 100%,且腋芽生长正常;以 MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L 为增殖培养基,培养 30 d,增殖系数可达 7.0,虽然有少量的愈伤组织产生,但不定芽生长发育正常;牛大力的生根较为困难,以 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 组合生根效果最好,生根率达 80%;移栽到以椰糠:砂 = 3:1 的基质中,覆盖地膜保湿 15 d,成活率可达 85% 以上。

表 2 不同培养基与激素组合对生根的影响

Table 2 Effects of different culture media and hormone combination on rooting

培养基	激素浓度 //mg/L		生根率 //%	根生长状态
Culture medium	Hormone concentration		Rooting rate	Rooting status
	IBA	IAA		
1/2 MS	0.1	0.1	8	生长速度慢,形态正常
	0.5	0.1	20	生长速度慢,形态正常
	1.0	0.1	18	生长速度慢,形态正常
	0.1	0.5	7	生长速度慢,形态正常
	0.5	0.5	80	生长速度快,形态正常
	1.0	0.5	46	生长速度快,形态正常
	0.1	1.0	5	生长速度慢,形态正常
MS	0.5	1.0	16	生长速度慢,形态正常
	1.0	1.0	10	生长速度慢,形态正常
	0.1	0.5	4	只形成根原基,但没有长长
	0.5	0.5	20	只形成根原基,无根伸出
	1.0	0.5	15	根原基出现,但无根伸出

参考文献

[1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:31-32.
 [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,1986:200.
 [5] 施和平. 植物组织培养[M]. 广州:广东高等教育出版社,2000:27-32, 36-37, 48-51.
 [6] 杨霞,徐康. 洋桔梗的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,1997, 33(6):435-438.
 [7] 及华,温春秀,高延厅. 洋桔梗的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1996,32(6):431-432.
 [8] 裴洪平. 生物统计学[M]. 杭州:浙江教育出版社,1990:96-125.
 [9] 倪德祥. 植物生长调节剂在组织培养中的调控作用[J]. 自然杂志, 1987,10(1):27-30,35-39.
 [10] 崔德才. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社, 2003:27-30,35-37.
 [11] 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, 1986:301-307.
 [12] 张丕芳. 植物激素对接树愈伤组织生长和器官发生的作用[J]. 复旦学报:自然科学版,1982,21(4):445-452.

(上接第 13963 页)

验结果可以看出,当激素种类和浓度分别为 6-BA 0.5 mg/L + IBA 2.0 mg/L + GA 2.0 mg/L 时,丛生芽的诱导率分蘖率最高。

参考文献

[1] 张彦萍. 切花新秀——洋桔梗[J]. 植物杂志,1998(2):20.
 [2] 赵梁君,宿有民. 我国花卉种业与发展战略[J]. 中国花卉园艺,2003 (3):6-8.
 [3] 金波,宋俊果. 鲜切花栽培技术手册[M]. 北京:中国农业大学出版社, 1998:167-170.
 [4] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯,1996,32 (6):444-449.