

落葵嫩茎高效再生体系建立的研究

孙晓昕 吕博 高嵩 徐娜 姜长阳*

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

摘要:以落葵的嫩茎为外植体,在附加不同浓度的 BA、NAA、IAA、2,4-D 的 MS、1/2MS 培养基上进行离体培养,诱导嫩茎形成愈伤组织,并分化形成不定苗,建立起嫩茎高效再生体系。结果表明:MS + BA0.6 mg·L⁻¹ + 2,4-D1.2 mg·L⁻¹ 是诱导嫩茎愈伤组织培养的理想培养基;MS + BA0.6 mg·L⁻¹ + NAA0.1 mg·L⁻¹ 是愈伤组织和不定芽分化培养的理想培养基;1/2 MS + NAA0.6 mg·L⁻¹ 是落葵生根试管苗的理想培养基;试管苗移栽、扦插的理想基质是炉灰渣;移栽的试管苗生长旺盛。

关键词:落葵;组织培养;愈伤组织;无性系

中图分类号 S512.01 文献标识码 B 文章编号 1007-7731(2007)19-66-03

Establishment of Regeneration Clone of *Basella rubra*

Sun Xiaoxin Lu Bo Gao Song Xu Na Jiang Changyang* (College of Biology Scientific, Liaoning Normal University Dalian 116029, China)

Abstract: The tender stems of *Basella rubra* were used as the explant and were cultured MS, 1/2MS medium supplemented with BA, NAA, IAA, 2,4-D of different concentrations to study bud induction and differentiation. The regeneration clones of *Basella rubra* were established successfully. The results showed that the medium MS + BA0.6 mg·L⁻¹ + 2,4-D1.2 mg·L⁻¹ was the best for inducing callus, medium MS + BA0.6 mg·L⁻¹ + NAA0.1 mg·L⁻¹ was the most suitable for bud differentiation, medium 1/2 MS + NAA0.6 mg·L⁻¹ was the optimum for rooting. The ideal transplantation matrix for tube plantlets was the furnace ashes. The transplanted plantlets grew vigorously.

Key words: *Basella rubra*; Tissue culture; Callus; Clone

落葵 (*Basella rubra*) 属落葵科植物,又名胭脂豆、软姜子、藤菜等,分布于亚洲、非洲和美洲。落葵为一年生缠绕草本,紫红色茎叶,淡红色花朵和紫黑色果实、颇为可爱,适用于庭院、窗台阳台和小型篱棚装饰美化。幼苗或肥大的叶片和嫩梢作菜食用,口感鲜嫩软滑,营养丰富,有清热解毒、利尿通便、健脑、降低胆固醇等作用。由于落葵既可食用,又可观赏,还具有一定的药用价值,近年来辽宁南部地区多有栽培。在栽培中偶尔可以发现生长非常旺盛的植株。但是,由于落葵用种子繁殖存在着繁殖率低、出苗不整齐、种子贮藏易于丧失发芽力、实生苗由于分离作用无法保持其优良性状等问题,使优良变异植株的优良性状无法保存。为此,我们对落葵进行了组织培养及无性系建立的研究,以期达到使优良性状得到保存、在短期内提供大量一致的种苗,满足人们的需要的目的。

1 材料与方 法

1.1 材料及灭菌 将生长非常旺盛的落葵采回来后,剪成长 4-5cm 的茎段,并放到 500ml 的磨口广口瓶中,用自来水振荡洗涤 5 次,每次持续约 4-5min;接着用 0.05% 安利洗涤剂洗涤 5-10min,再用自来水漂洗到无泡沫时转移到超净工作台上,用 75% 酒精灭菌 30s 左右,迅速倒入无菌水,洗涤 2 次,再加 0.05% HgCl₂ 振荡灭菌 2min,再用 0.25% HgCl₂ 振荡灭菌 12min,接着用无菌水洗涤 5 次,即获得无菌材料。

1.2 培养条件 以 MS 或 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度的 BA、NAA、IAA、2,4-D。以 MS 为基本培养基加蔗糖 30 g·L⁻¹,以 1/2MS 为基本培养基加蔗糖 15 g·L⁻¹。培养基胨力强度为 180g/cm²,pH 为 5.8-6.0。培养温度 24℃,光照强度 3000LX,光照时间 12h/d。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导培养 将无菌嫩茎剪成长 0.2-0.3cm 的茎段后,接种到以 MS 为基本培养基,附加不同浓度植物激素的培养基上,进行愈伤组织诱导培养。培养 20d 左右,有的培养基上培养材料两端切口开始形成淡黄色的愈伤组织。随后,愈伤组织迅速生长,并逐渐生长成绿色的颗粒状愈伤组织。培养到 70d 时统计观察。由表 1 可见,在不加激素和只加浓度 0.2 mg·L⁻¹ (单位下同略)、0.6 的 BA 培养基上不能诱导形成愈伤组织;在不同浓度 BA 与 IAA 配合使用时,也难以诱导形成愈伤组织。而在 BA 与 NAA 或 2,4-D 配合使用时,均能诱导形成愈伤组织。尤其是在 BA 浓度为 0.6mg·L⁻¹,2,4-D 为 1.2 的培养基上,不仅愈伤组织的诱导率达到了 96.7%,而且所诱导的愈伤组织颜色嫩绿、外形光滑、呈颗粒状。这样的愈伤组织具有分化能力。把在 MS + BA0.6 + 2,4-D1.2 这一培养基上诱导落葵嫩茎愈伤组织,接种到相同的培养基上进行愈伤组织的继代培养,50 d 培养 1 代,连续培养 10 代,不仅愈伤组织形态性状保持不变,而且颗粒的生长增

殖速度达到 38 倍。这说明 MS + BA0.6 + 2,4 - D1.2 这一培养基为诱导落葵嫩茎愈伤组织培养的理想培养基。

表 1 不同浓度激素对落葵愈伤组织诱导的影响

BA	浓度(mg/L)			愈伤组织诱导数	诱导率(%)	长势
	NAA	2,4 - D	IAA			
0	0	0	0	0	0	
0.2	0	0	0	0	0	
0.6	0	0	0	0	0	
0.2	0.4	0	0	4	13.3	+
0.4	0.8	0	0	12	40.0	+
0.6	1.2	0	0	21	70.0	++
0.8	1.6	0	0	26	86.7	++
0.2	0	0.4	0	14	46.7	++
0.4	0	0.8	0	24	80.0	++
0.6	0	1.2	0	29	96.7	+++
0.8	0	1.6	0	24	80.0	++
0.2	0	0	0.4	3	10.0	+
0.4	0	0	0.8	0	0	
0.6	0	0	1.2	11	36.7	+
0.8	0	0	1.6	5	16.7	+

注:接种数量为 30; ++ 较好; + 一般。

表 2 不同浓度的激素对嫩茎愈伤组织分化的影响

BA	浓度(mg/L)			分化不定芽总数(个)	平均分化不定芽个数(个)	长势
	NAA	2,4 - D	IAA			
0	0	0	0	0	0	
0.2	0.1	0	0	246	8.2	++
0.4	0.1	0	0	288	9.6	++
0.6	0.1	0	0	396	13.2	++
0.8	0.5	0	0	110	3.7	+
1.0	0.5	0	0	56	1.5	+
1.2	0.5	0	0	0	0	
0.2	0	0.1	0	0	0	
0.4	0	0.1	0	87	2.9	+
0.6	0	0.1	0	111	3.7	+
0.8	0	0.5	0	0	0	
1.0	0	0.5	0	0	0	
1.2	0	0.5	0	0	0	
0.2	0	0	0.1	0	0	
0.4	0	0	0.1	0	0	
0.6	0	0	0.1	0	0	
0.8	0	0	0.5	0	0	
1.0	0	0	0.5	0	0	
1.2	0	0	0.5	0	0	

注:接种数量为 30; ++ 为长势较好; + 为长势一般。

2.2 愈伤组织分化及增殖继代培养 将上述继代培养的愈伤组织,接种到以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 BA、IAA、NAA 和 2,4 - D 的培养基上进行愈伤组织的分化培养。培养到 25d 时可见开始分化,60 d 时观察统计。由表 2 可见,在不添加激素的培养基上和在 BA 与 2,4 - D 配合使用时,愈伤组织不能分化;在 BA 与 IAA 配合使用时诱导愈伤组织不分化或分化率较低;而在 BA 与 NAA 配合使用时,颗粒状愈伤组织几乎都能分化,并且分化率较高;其中在 BA 浓度为 0.6, NAA 浓度为 0.1 时,不仅颗粒状愈伤组织的分化率为 99%,而且每个愈伤组织颗粒不定芽的分化数达到了 13.2 个。观察还表明,在 MS +

BA0.6 + NAA0.1 这一培养基上培养到 60 d 时,愈伤组织表面能分化成密密麻麻的丛生不定芽,并且不定芽长势较好。把在这一培养基上分化培养的不定芽从基部剪下,接种到相同的培养基上,进行不定芽的分化培养,培养到 60 d 时,就会形成长势较好、高约 1cm 不定芽丛,平均每个不定芽能分化成 12.4 不定芽。连续继代培养 10 代,其分化率及分化丛生不定芽的长势保持不变。这不仅说明 MS + BA0.6 + NAA0.1 是落葵嫩茎愈伤组织分化和不定芽分化培养的理想培养基,同时也证明 MS + BA0.6 + NAA0.1 是落葵嫩茎再生体系的理想培养基。

2.3 生根培养 将上述培养的高 1cm 左右的不定苗从基部剪掉下后,插于以 1/2 MS 为基本培养基,分别附加不同浓度 IAA、NAA 和 2,4 - D 生根培养基中进行生根培养。培养到 10 d 左右时,在有的培养基上能形成可见根原基。培养 25d 时观察统计。由表 3 可见,在不加生长素和附加 2,4 - D 的生根培养基中,不能诱导生根或生根率很低;在 IAA 浓度大于 0.8 时,也不能诱导生根;而在 NAA 浓度为 0.6 的培养基上,不仅生根率达 95%,而且平均生根数也达到 7.8 条/株。观察还表明,在 NAA 浓度为 0.6 生根培养基上,不仅生根率高、根数多,而且试管苗长势旺盛,培养至 25 d 时,可以长成株高为 5cm 左右、具有 7 - 8 条根的旺盛试管苗。将在这一培养基上生长的试管苗剪成具有一个生长点、长 1cm 左右的茎段,接种于相同的生根培养基上进行生根继代培养。25 d 时又可长成高 5 - 6cm 的生根试管苗。连续 7 代生根继代培养,不仅生根试管苗的长势非常旺盛,每代的繁殖系数达到了 3.4,而且用这种生根基代培养所繁殖的试管苗几乎没有无效苗。这表明 1/2 MS + NAA0.6 这一培养基是落葵生根试管苗的理想培养基。

表 3 不同生长素对生根的影响

浓度(mg/L)			接种数(个)	生根数(个)	生根率(%)	生根总数	平均每苗生根数
NAA	IAA	2,4 - D					
0	0	0	40	0	0	0	0
0.4	0	0	40	28	70	144	3.6
0.6	0	0	40	38	95	312	7.8
0.8	0	0	40	10	25	58	1.5
1.0	0	0	40	4	10	6	0.2
0	0.4	0	40	10	25	40	1.0
0	0.6	0	40	6	15	24	0.6
0	0.8	0	40	0	0	0	0
0	1.0	0	40	0	0	0	0
0	0	0.4	40	0	0	0	0
0	0	0.6	40	0	0	0	0
0	0	0.8	40	0	0	0	0
0	0	1.0	40	0	0	0	0

2.4 试管苗的移栽和扦插 将生根苗培养瓶瓶塞打开,置于约 5000 lx 的光照下炼苗 3 - 4 d 后,用镊子将苗取出,洗去基部培养基,把试管苗移栽到表层为约 6cm 厚的炉灰渣、园土、河砂、1/2 河砂 + 1/2 园土、1/2 炉灰渣 + 1/2 园土,下层为肥沃园土的温室苗床中。然后弥雾浇透水,保持湿度 90% 以上,温度 22℃ 以上,没有直射条件。将根

系生长旺盛的试管苗剪成至少具有2个生长点和一片正常叶子、长1.5 cm左右的茎段后,把下部切口置于浓度为100的 IAA 溶液中处理3min,扦插到事先已经浇透水并打上了深约1cm小孔的、其他与移栽条件相同的温室苗床中,并按照与移栽试管苗相同的条件进行管理。20d后成活并正常生长。由表4可见,以河沙、炉灰渣为移栽、扦插基质成活率较高,且长势较好。观察还表明,以炉灰渣为移栽扦插基质时,不仅成活率最高,而且成活苗长势也最好。这说明炉灰渣是落葵试管苗移栽和扦插的理想基质。

把移栽和扦插成活并正常生长落葵试管苗,于5月上旬移植到田间中,移植的成活率几乎为100%。与于4月份播种的实生苗相比,试管苗具有生长非常旺盛、整齐、秋天枯萎时间延长20d左右、根系相当于实生苗2倍的特点。

表4 试管苗的移栽和扦插

基质	移栽数 (扦插数)	成活数 (扦插成活数)	成活率 扦插(%)
园土	30(30)	0(0)	0(0)
炉灰渣	30(30)	26(21)	86.7(72.4)
河砂	30(30)	25(23)	83.3(76.7)
1/2 河砂+1/2 园土	30(30)	2(1)	7(3.3)
1/2 炉灰渣+1/2 园土	30(30)	3(1)	10(3.3)

3 讨论

到目前为止,虽然已有落葵组织培养的报道,但未见对落葵嫩茎愈伤组织高效无性系建立的报道。本研究以落葵嫩茎为外植诱导形成愈伤组织分化的方法,且能以较高分化率分化出不定芽证明,作为非分生组织的落葵嫩茎,在离体条件下仍具有很强的分化能力,这说明落葵非

分生组织也具有较强的全能性。

用生根继代培养方法对落葵进行繁殖,25 d时繁殖系数为3.4,按照这个速度对落葵进行繁殖,每年可繁殖出3.4棵植株,完全达到建立起高效再生体系、满足人们工厂化育苗的需要。

把移栽和扦插试管苗与实生苗相比,具有生长非常旺盛、整齐、秋天枯萎时间延长20d左右、根系相当于实生苗2倍的特点。这一方面与研究所用的材料是生长非常旺盛的植株有关,另一方面还与培养过程中使用了生长素,在田间栽培中生长素仍在发挥着后效作用有关。

参考文献

- [1]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第二十六卷)[M]. 北京:科学出版社,1996. 44
- [2]中国科学院植物研究所主编. 中国高等植物图鉴(第一册)[M]. 北京:科学出版社,1972. 618
- [3]江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997. 2322
- [4]郑汉臣主编. 中国食用本草[M]. 上海:上海辞书出版社,2003. 46-47
- [5]姜长阳. 植物组织培养培养基琼脂用量的商榷[J]. 上海:植物生理学通讯,1994,28(4):56
- [6]安利佳,姜长阳. 植物组织培养导论[M]. 大连,辽宁师范大学出版社,1996:68-72
- [7]胡尚连,王丹. 植物生物技术[M]. 西安:西安交通大学出版社,2004:35-40
- [8]郭得平,徐斌. 落葵的组织培养与植株再生[J]. 杭州:浙江农业大学学报,2001,13(1):16-18
- [9]贺红. 落葵的组织培养与植株再生[J]. 芜湖:现代中药研究与实践,2003,17(1):11-12
- [10]宋明,宋洪元,郭余龙. 落葵组织培养研究[J]. 西南农业大学学报,1997,19(2):118-120

(责编:周敏)

(上接174页)植保、种子包衣以及专项的管理上,形成一整套的高产优质栽培技术模式,并对各个技术模块进行配套集成,取得了成功的生产经验。

2.3 充分利用科技优势,不断培育新的生长点,使优质麦走向可持续发展道路 根据国内外的小麦育种动态,丰富优质麦的基因库,为下一世纪培育新一代高产、优质、多抗、高效的小麦品种做好了亲源、技术上的准备工作。同时注意培育和提高农民的科技意识及生产技术,这是优质麦生产的基础。

2.4 利用网络信息优势,培育优质麦产、加、销的市场体系 调整种植结构,发展订单农业,核心问题是供求信息。只有充分了解和掌握大量的优质麦供求信息,才能有效地实施基地建设,以销定产,发挥龙头企业的作用,进行深加工,实现优质麦产品的优化升级,进而提高市场竞争力,真正实现优质麦的产业化,促进本地区经济的协调发展。依据市场要求进行品种的优化布局,不但要从横向上考虑各种不同用途专用麦的品种分布结构(以适应性好的地产优质麦为主,以外引优质麦为辅较稳妥),又要从纵向上注重

同类品种搞好熟期搭配,做到同类品质的小麦种植在相同(相似)的生态区内,并进行大规模的集约化生产,提高规模效益。

综上所述,黑龙江省春小麦优质高效生产势在必行,而早熟高产优质是优质高效必由之路,品质改良是首要任务。高产优质必须早熟,否则无优质高效可言。同时,为有效地解决本地区的小麦优质产业化问题,必须发挥自身的优势,吸收国内外先进的生产、管理经验,因地制宜地创建自己的品牌,方能收到社会和经济效益俱佳的效果,从根本上解决今后一定时期内小麦品质问题。

参考文献

- [1]黄佩民. 小麦生产要走高产、优质、高效之路. 第八次全国小麦高产栽培研讨会论文(山东),1998
- [2]章练红等. 小麦品质生态研究概述与展望. 国外农学—麦类作物,1996(6):42-44
- [3]曹广才,王绍中. 小麦品质生态. 北京:中国科学技术出版社,1994

(责编:周敏)