

金鱼草嫩茎组织培养及无性系建立的研究

谷旭, 刘洋, 高迎秋, 曲长庆, 姜长阳*

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

摘要:以金鱼草变异植株的嫩茎为外植体,采用不同培养基对其愈伤组织的诱导与分化、不定芽生根、试管苗移栽和扦插等进行研究,以建立金鱼草变异植株的无性系。试验结果表明:MS+6-BA 0.8mg/L+IBA 0.1mg/L+2,4-D 0.5mg/L+蔗糖 30g/L 是诱导金鱼草嫩茎愈伤组织的理想培养基,MS+AgNO₃ 0.6mg/L+6-BA 0.2mg/L+NAA 0.1mg/L+蔗糖 30g/L 是诱导愈伤组织和不定芽分化的理想培养基,1/3MS+IAA 0.6mg/L+蔗糖 10g/L 是金鱼草试管苗生根培养和生根继代培养的理想培养基;炉灰渣是试管苗移栽扦插的最适合基质,移栽成活率为96%,扦插成活率为93%。移植于花坛的试管苗具有保持有利变异的特点。

关键词:金鱼草;愈伤组织;无性系;快速繁殖

中图分类号:S681.903⁺.53

文献标识码:A

文章编号:1002-8161(2008)05-0569-04

Tissue culture and regeneration clone for young stem of *Antirrhinum majus*

GU Xu, LIU Yang, GAO Ying-qiu, QU Chang-qing, JIANG Chang-yang*

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China)

Abstract: The tender stem of mutation *Antirrhinum majus* was used as explants, the induction and differentiation of callus, rooting of adventitious bud in different culture medium, and the transplantation and graftage of plantlet were studied to establish the regeneration clone for mutation of *Antirrhinum majus*. The results showed that the optimum culture medium for callus induction was MS+6-BA 0.8mg/L+IBA 0.1mg/L+2,4-D 0.5mg/L, culture medium MS+AgNO₃ 0.6mg/L+6-BA 0.2mg/L+NAA 0.1mg/L+sugar 30g/L was suitable for differentiation of callus and adventitious bud; culture medium 1/3MS+IAA 0.6mg/L+sugar 10g/L was ideal for rooting of seedling and subculture. When cinder was used as the best matrix for transplantation and graftage of plantlet, the survival rate of transplantation could reach 96% and that of graftage was 93%. The trasplanting plantlet to flower bed could keep favorable variation.

Key words: *Antirrhinum majus*; callus; clone; rapid propagation

金鱼草(*Antirrhinum majus*)又称龙头花、狮子花,属于玄参科金鱼草属一年或二年生盆栽或陆地栽培草本花卉,也有逸为野生^[1,2]。全草可入药,具有清热凉血、消肿解毒等功效,能治痈疮肿毒、跌打损伤等疾病^[2,3]。金鱼草花色多、鲜艳且美丽、花期长,现在已被广泛地用于观赏栽培^[2,4]。在用中矮型重瓣品种进行花坛栽培时,偶尔会出现株高不过20cm、观赏效果非常好的金鱼草变异植株。但是具有这种

有利变异的植株不易获得种子,即使能获得种子,其实生苗也不能保持有利变异性状。用扦插的方法对金鱼草进行繁殖,一年只能繁殖十几株,无法满足生产和人们观赏的需要。为此,2004年,当我们再次发现这种有利变异植株时,通过扦插方法获得11株种苗后,对其进行组织培养和无性系建立的研究,以期获得大量的种苗,满足人们观赏栽培的需要,现将试验结果报道如下。

收稿日期:2008-08-30

基金项目:辽宁师范大学开放实验室项目(200700354003)

作者简介:谷旭(1987-),女,辽宁盘锦人,在读本科生,主要从事植物技术研究。*为通讯作者,E-mail:changyangjiang@126.com。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及灭菌

将在花坛上生长旺盛的变异金鱼草嫩茎采回,切去叶片后放到250mL磨口广口瓶中,用自来水冲洗20min左右,用0.05%安利洗涤液振荡洗涤约20min,用自来水洗至没有泡沫时置于超净工作台上;用75%乙醇灭菌10s后,迅速用无菌水洗涤3次,接着用0.1%HgCl₂溶液振荡灭菌1min,再加入等体积无菌水,使HgCl₂的浓度降低为0.05%后,继续振荡灭菌15min。最后用无菌水振荡洗涤6次,即获得无菌材料。

1.2 试验方法

以MS、1/2MS和1/3MS为基本培养基,附加不同浓度的细胞分裂素6-BA和生长素IAA、NAA、2,4-D。以MS为基本培养基时,加蔗糖30g/L;以1/2MS为基本培养基时,加蔗糖15g/L;以1/3MS为基本培养基时,加蔗糖10g/L。培养基胍力强度为180g/cm²[5],pH5.8~6.0,培养条件:温度18~26℃,光照时间10h/d,光照强度3000lx。

1.2.1 不同激素配比对愈伤组织诱导的影响

将无菌嫩茎切成厚约0.1cm的茎片后,接种于以MS+6-BA0.8mg/L+蔗糖30g/L为基本培养基、附加不同浓度IBA(0.1、0.5、1.0mg/L)和2,4-D(0.1、0.5、1.0mg/L)的培养基上,进行愈伤组织的诱导培养。培养前20d进行暗培养,当培养20d开始形成愈伤组织时,进行光照培养,60d时观察统计形成的愈伤组织。

1.2.2 不同激素配比对愈伤组织与不定芽分化的影响

把继代培养获得的颗粒状愈伤组织分成独立颗粒后,接种到以MS+AgNO₃0.6mg/L+蔗糖30g/L为基本培养基、附加不同浓度的6-BA(0.2、0.6、1.0mg/L)、NAA(0.1、0.2、0.4、0.8mg/L)的培养基上进行分化培养,每种培养基接种100个愈伤组织颗粒。培养20d左右,在有的培养基上可见诱导分化出不定芽,60d时观察统计分化率等。

1.2.3 不同激素配比对不定芽生根的影响

将继代分化培养的不定芽从基部剪下,每个处理接种50个到以1/2MS和1/3MS为基本培养基、分别附加0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/L IAA、NAA和2,4-D的生根培养基上进行生根培养。培养到10d时,有的培养基上形成根原基;培养到25d时观察统

计生根率等。

1.2.4 不同基质对移栽培养的效果

将生根苗培养瓶瓶塞打开,置于光照约5000lx、温度20℃以上的条件下炼苗3d后,用镊子取出洗去基部培养基,移栽到上层覆盖5~6cm厚园土、河沙、炉灰渣和珍珠岩4种不同基质的温室苗床上。在保持没有直射光、湿度90%以上、温度20℃以上的条件下,移栽后14d时可见苗成活并开始生长,25d时观察统计成活率等。

把生根试管苗剪成长2cm左右,至少具有2个生长点的茎段后,把下部切口在90mg/L IAA溶液中浸泡3min后,扦插到以炉灰渣为基质的温室苗床中。

把在温室内移栽成活的试管苗,于5月上旬移植到花坛上。两年进行4次小批量的移植试验。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对愈伤组织诱导的影响

由表1可见,不同浓度IBA和2,4-D配合使用都能诱导金鱼草嫩茎形成愈伤组织。当IBA为0.1~1.0mg/L而2,4-D浓度为0.1mg/L时,愈伤组织诱导率均很低;但随着2,4-D浓度的增加,愈伤组织诱导率不断增加,其中以0.1mg/L IBA与0.5~1.0mg/L 2,4-D配合使用时,愈伤组织诱导率最高,达100%;从愈伤组织形态看,以0.1mg/L IBA与0.5mg/L 2,4-D的组合效果较好,所诱导的愈伤组织为浅绿色颗粒状,这种愈伤组织具有分化能力[6,7]。将这些绿色颗粒状愈伤组织再接种到相同培养基上,进行继代增殖培养。经过7代增殖培养证明,50d继代增殖培养一代,每代的增殖系数为29.8,所培养的愈伤组织长势和形态保持不变。因

表1 不同激素配比对愈伤组织的诱导效果

Table 1 The effects of different hormone combinations on the induction of callus

激素 Hormone		接种数 Inoculation number(个)	愈伤组织数 Callus number(块)	诱导率 Induction rate (%)
IBA	2,4-D			
0.1	0.1	50	13	16
0.1	0.5	50	50	100
0.1	1.0	50	50	100
0.5	0.1	50	8	16
0.5	0.5	50	21	42
0.5	1.0	50	32	64
1.0	0.1	50	6	12
1.0	0.5	50	11	22
1.0	1.0	50	20	40

此,MS+6-BA 0.8mg/L+IBA 0.1mg/L+2,4-D 0.5mg/L+蔗糖30g/L培养基是诱导金鱼草嫩茎愈伤组织的理想培养基。

2.2 愈伤组织与不定芽的分化培养

由表2可见,愈伤组织的分化率均随着6-BA或NAA浓度的提高而逐渐降低,当6-BA浓度为0.6mg/L以上时,金鱼草愈伤组织不分化或分化率很低;当6-BA为0.2mg/L、NAA为0.1~0.8mg/L时,颗粒状愈伤组织分化率较高。但从愈伤组织的分化率及分化不定芽的长势看,在MS+AgNO₃ 0.6mg/L+6-BA 0.2mg/L+NAA 0.1mg/L+蔗糖30g/L的培养基上,颗粒状愈伤组织分化率达到100%,分化不定芽长势也好。此外,当在上述培养基上继续分化培养50d左右,有不定芽的基部又可分化出3~5个不定芽,使之形成丛生不定芽。把不定芽从基部切下,接种到相同的培养基上进行不定芽的继代分化培养,经过9代的继代分化培养,每个继代培养周期为50d,每个不定芽平均能分化出8.2个不定芽,分化芽呈嫩绿色丛生状、高在0.5cm以上,长势良好。这说明MS+AgNO₃ 0.6mg/L+6-BA 0.2mg/L+NAA 0.1mg/L+蔗糖30g/L是诱导金鱼草愈伤组织与不定芽分化的理想培养基。

2.3 不定芽的生根培养

由表3可见,添加不同浓度2,4-D的生根培养

表2 不同激素对比对愈伤组织与不定芽分化的影响

Table 2 The effects of different hormone combinations on the differentiation of callus and adventitious bud

激素组合 Hormone combination		分化数(个) Differentiation number	分化率(%) Differentiation rate	长势 Growth vigor
6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)			
0.2	0.1	100	100	++
0.2	0.2	94	94	++
0.2	0.4	89	89	+
0.2	0.8	63	63	+
0.6	0.1	9	9	+
0.6	0.2	12	12	+
0.6	0.4	3	3	+
0.6	0.8	7	7	+
1.0	0.1	3	3	+
1.0	0.2	2	2	+
1.0	0.4	0	0	
1.0	0.8	0	0	

基均不能诱导不定芽生根,添加不同浓度NAA的生根培养基中不定芽的生根率也较低,根系长势较差。添加不同浓度IAA均可以诱导不定芽生根,其中以添加0.6~0.8mg/L的生根效果较好;尤其是在1/3MS生根培养基上添加IAA 0.6mg/L,生根率达到100%,单株生根数也达到7.2条,而且生根试管苗长势旺盛;当IAA浓度达1.0mg/L时,则难以诱导生根,生根率很低,仅为8%。4次重复生根试验结果表明,在添加IAA 0.6mg/L的1/3MS生根培养基上培养10d后,随着根系的形成和生长,试管苗

表3 不同激素对不定芽生根的影响

Table 3 The effects of different hormones on the rooting of adventitious bud

IAA (mg/L)	NAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	生根数(个) Rooting number	生根率(%) Rooting rate	平均根数(条) Average rooting number	长势 Growth vigor
0	0	0	0/0	0/0	0/0	
0.2	0	0	28/29	56/58	1.8/2.4	+/+/++
0.4	0	0	39/38	78/76	3.6/3.2	+/+/+++
0.6	0	0	46/50	92/100	6.4/7.2	+/+/++++
0.8	0	0	45/46	90/92	4.4/4.4	+/+/++++
1.0	0	0	4/4	8/8	1.5/2.4	+/+
0	0.2	0	13/14	26/28	1.5/2.0	+/+
0	0.4	0	17/19	34/38	2.5/2.7	+/+
0	0.6	0	11/15	22/30	3.1/1.8	+/+
0	0.8	0	7/9	14/19	2.3/2.2	+/+
0	1.0	0	5/5	10/10	1.0/1.6	+/+
0	0	0.2	0/0	0/0	0/0	
0	0	0.4	0/0	0/0	0/0	
0	0	0.6	0/0	0/0	0/0	
0	0	0.8	0/0	0/0	0/0	
0	0	1.0	0/0	0/0	0/0	

注:(1)"/"前为1/2MS,后为1/3MS;(2)+++好,++一般,+较差

Note: (1) On the left of sprit was 1/2MS culture medium, and on the right was 1/3MS culture medium; (2) +++ represents better growth vigor, ++ represents a common growth vigor, + represents worse.

迅速生长;培养到25d时,生根苗就可长高4.5cm以上、生长非常旺盛的试管苗。把生根试管苗剪成至少具有一个生长点、长1cm以上的茎段,接种到相同的培养基上进行生根继代培养。经过10次生根培养,证明在这一培养基上进行生根继代培养,不仅试管苗的生根率、单株生根数、长势保持不变,而且试管苗生长旺盛,没有无效苗;22d可完成1次继代培养,平均每代的繁殖系数为3.3。因此,1/3MS+IAA 0.6mg/L+蔗糖10g/L是金鱼草试管苗生根培养和生根继代培养的理想培养基。

2.4 试管苗移栽、扦插与移植

观察统计证明,不同移栽基质中,以炉灰渣为移栽基质的试管苗平均移栽成活率最高为96%,成活苗长势较好,生长旺盛,说明炉灰渣是金鱼草试管苗移栽的理想基质。在保持与移栽相同条件下,6次试管苗茎段扦插的平均成活率为93%,扦插苗与移栽苗长势一致。

经过两年4次小批量试验,结果表明,定植于花坛的试管苗成活率几乎为100%,除了前一个月左右长得较慢外,后期长势与用常规扦插的变异植株一致,但试管苗具有植株生长整齐、叶色浓绿、根系增加约1倍、秋天枯萎时间延迟10d左右的特点。

3 结论与讨论

虽然目前已有许多关于金鱼草植物组织培养的报道^[8~13],但所用研究材料都是以下胚轴、子叶和茎尖等分生组织作为材料,迄今未见以非分生组织为材料进行组织培养及无性系建立的报道。本研究以变异金鱼草嫩茎为外植体,进行愈伤组织诱导、愈伤组织与不定芽分化、试管苗生根与继代培养、试管苗移栽与扦插的研究,建立了金鱼草的无性系繁殖体系。试验证明金鱼草嫩茎细胞和组织在离体条件下仍具有全能性,采用组织培养的方法能使在大批栽培中偶尔发生的有利变异植株得到保存,并为优良变异品系保存和应用提供了可能。

采用不定芽继代分化培养方法,50d的分化系数为8.2,按照这个增殖速度,年增殖率为 $8.2^{7.2}$ 。用生根继代培养方法进行增殖培养,22d的增殖系数为3.3,按照这个速度,年增殖率为 $3.3^{16.6}$ 。这说明,不论采用哪种方法进行快速繁殖,一年内均可增殖出大量的变异金鱼草试管苗。但是,从试管苗的长势和有效苗比率的角度看,以生根继代培养方法进行

繁殖更有利于生产。用这种方法繁殖的试管苗不仅具有没有无效苗、试管苗生长旺盛的特点,还具有防止发生性状分离、能保留优良性状不变的优点。在花坛上进行变异金鱼草试管苗小批量栽培试验也完全证明了这一点。因此,用这种方法繁殖的金鱼草优良变异植株,能够进行工厂化育苗,可满足生产上对优良金鱼草种苗的需求。

在移栽扦插试验中,炉灰渣为理想的移栽基质,这是因为炉灰渣为黑色物质,具有很好的吸光作用,有利于增温,为幼苗生长提供较高温度,并且炉灰渣是经高温炼烧后所得余渣,所带杂菌少,来源较广。因此,炉灰渣是变异金鱼草试管苗理移栽的理想基质。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第四册)[M]. 北京:科学出版社,1972:32.
- [2] 李书心. 辽宁植物志(下册)[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1991:308-309.
- [3] 冉先德. 中华药海[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,1993:1114-1115.
- [4] 北京林业大学园林系花卉教研组. 花卉学[M]. 北京:中国林业出版社,1993:192-194.
- [5] 姜长阳. 培养基琼脂用量的商榷[J]. 植物生理学通讯,1990,26(2):53-54.
- [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] 姜维梅,梁海曼,钟华鑫. 金鱼草下胚轴不同部位切段形态发生能力的研究[J]. 植物生理学通讯,1990,26(2):53-54.
- [9] 沈洁明,孙君亮,杨维东. 金鱼草的组织培养[J]. 植物生理学通讯,1990,26(1):51.
- [10] 余迪求,邓庆丽,沈亚楠. 金鱼草下胚轴组织培养的研究[J]. 园艺学报,1996,23(1):99-100.
- [11] 李竹英,钱艳红,毛绍春. 不同激素对金鱼草茎尖培养培养效果初报[J]. 北方园艺,2006,(3):130-131.
- [12] 黄俊轩,李双跃,李建科,刘艳军,杨静慧. 金鱼草高效植株再生体系的建立[J]. 安徽农业科学,2007,(20):6039-6040.
- [13] 张效芳,辛雅芬,刘宏伟. 金鱼草茎尖培养与植株再生[J]. 东北林业大学学报,1997,7(4):42-47.

(责任编辑 韦莉萍)