

锥花福禄考根段的组织培养

贾东坡¹, 李庆伟¹, 冯林剑¹, 韩富根²

(¹河南农业职业学院, 河南中牟 451450; ²河南农业大学农学院, 河南郑州; 450002)

摘要:以锥花福禄考根段为外植体, 对影响其再生的主要因素激素和光照进行了试验, 结果表明, 每天光照 12~14h, 在培养基 MS+6-BA1.5mg/L+NAA0.5mg/L 可以直接获得再生植株, 且诱导效果最好。

关键词:锥花福禄考; 根段; 植株再生

中图分类号:Q949.777.2; S604.3 **文献标识码:**A

Tissue Culture of the Root Segment of *Phloxpanicula-ta*

Jia Dongpo¹, Li Qingwei¹, Feng Linjian¹, Han Fugen²

(¹Henan Vacation College of Agriculture Henan zhongmu 451450;

²Agronomy College of Henna Agriculture university Henan zhengzhou 450002)

Abstract: Taking root segment of *phloxpanicula-ta* as explants, affecting central factors, exogenous hormones and light, for the plantlet regeneration were tested. The experimental results showed that root Segment were cultured at a photoperiod of 14 hours daily with medium MS+6-BA1.5mg/L+NAA0.5mg/L for Plantlet Regeneration .

Key words: *Phloxpanicula-ta*, Root Segment, Plantlet Regeneration

近年来,随着生物技术应用的迅猛发展,为植物的遗传转化和产业化开辟了广阔前景。组织培养是生物技术应用最广泛的新领域,在植物组织培养研究中,离体根的培养在研究高等植物根系的营养需求、次生根系的发生与根系维管组织的形成,以及植物根瘤形成机理等诸方面有重要意义,在无地上部分供给有机营养的条件下生长的根系无性系,可以用来精确地研究根系合成的植物有机物种类、数量等生理生化问题,具有重要的理论意义和实践意义。根的离体培养将成为商业化生产并提取某些植物成分的重要手段。自 White 首次成功地进行了番茄的根尖培养之后,根培养已在许多植物上取得成功^[1-3]。培养离体根段在研究器官建成、品种改良方面也有极其重要的应用价值,它有助于优良无性系的建立,从而缩短育种年限。然而,离体根的培养难度较大,迄今仅在果树上报道,有关锥花福禄考(*phloxpanicula-ta*)离体根培养方面的研究还未见有报道。为了进一步扩大锥花福禄考材料的试验范围,探讨其根脱分化能力和植株再生的基本规律,

用根段进行培养并直接分化出芽获得植株,建立锥花福禄考根段离体培养新体系,为以后的规模化生产和品种改良奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于 2005 年 3 月至翌年 6 月在河南农业职业学院生物技术中心实验室进行,材料为粉红色锥花福禄考组培苗。

1.2 方法

将有完整根的组培苗从培养瓶中取出,用剪刀剪根成 2~3cm 的根段,接种到再生诱导培养基上。根系再生诱导培养基以 MS 为基本培养基,附加不同浓度 6-BA、NAA 及 2,4-D。按 L₉(3⁴) 正交设计(见表 1),安排 9 组处理,每组处理接种 30 个根段(1 个/瓶)。分别置于光照 12h/d 和黑暗状态下进行培养。培养基附加有质量浓度 3% 的蔗糖和 0.7% 的琼脂, pH 5.5~6.0, 121~123℃ 高温湿热灭菌 20min。在接种后 50d 统计再生率,再生率 = 再生芽数 / 接种根段数 ×

第一作者简介:贾东坡,男,1957 年出生,河南鄢陵县人,本科学历,副教授。主要从事园艺作物生理教学及科研工作。通信地址:451450 河南中牟河南农业职业学院植物科学系, Tel: 0371-62183383。

通讯作者:李庆伟,河南封丘县人,主要从事植物组织培养教学与科研工作,在各类核心期刊上共发表专业学术论文 8 篇,参与河南省科技攻关项目一项,获得科技成果一项。通信地址:451450 河南中牟河南农业职业学院植物科学系, E-mail: liqingwei2003@163.com。

收稿日期:2006-12-06, 修回日期:2006-12-19。

表 1 L₉(3⁴) 因子水平表

水平	A	B	C
	6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)	2,4-D(mg/L)
1	0.5	0.5	0
2	1.0	1.0	0.5
3	1.5	1.5	1.0

100%。根段诱导出的在再生芽苗, 参孙元峰等^[4]进行继代培养。

2 结果与分析

2.1 再生诱导情况

第 1 组处理, 在接种后 15d 开始从根中部萌生白色根, 30d 后萌发形成一条约 4cm 左右的暗培养下形

成透明状根(光处理下呈中间绿色, 边缘透明), 此根继续生长, 不发生侧根只在表面形成许多白色根毛, 没有芽和愈伤组织的分化。第 2、3 组处理, 在接种后 8d, 接种根段上萌生出白色根尖, 并对外生长, 15d 时, 长至 4cm 左右, 并开始分生侧根, 30d 时, 第 2 组处理萌生 5 条根(含侧根), 主根长 8cm 左右, 侧根长 3~5cm; 第 3 组处理形成 6 条根, 主根约 7 厘米, 其余根长度在 4cm 左右, 以后连续分生侧根, 45d, 两组根系布满培养瓶, 仍没有芽的分化(图 1)。第 4、6 组处理, 在接种后 15d, 根短变粗, 在表面形成一层愈伤组织, 并从愈伤组织上萌生根, 30d 观察, 两组各形成 4 条根, 长度基本一致, 并开始形成侧根, 从接种根段愈伤组织上萌生的根不

表 2 不同激素组合对锥花福祿考(*phloxpannicula-ta*)根系再生的影响

处理	因子代号						再生芽数(个)		再生率(%)		
	A		B		C		光	暗	光	暗	
	光	暗	光	暗	光	暗					
1	0.5(1)		0.5(1)		0(1)			0	0	0	0
2	0.5(1)		1.0(2)		0.5(2)			2	3	13.3	20
3	0.5(1)		1.5(3)		1.0(3)			1	3	6.7	20
4	1.0(2)		0.5(1)		0.5(2)			78	83	520	553.3
5	1.0(2)		1.0(2)		1.0(3)			34	40	226.7	266.7
6	1.0(2)		1.5(3)		0(1)			86	92	573.3	613.3
7	1.5(3)		0.5(1)		1.0(3)			45	48	300	320
8	1.5(3)		1.0(2)		0(1)			0	0	0	0
9	1.5(3)		1.5(3)		0.5(2)			0	0	0	0
	光	暗	光	暗	光	暗					
K ₁	6.67	13.3	273.3	291.1	191.1	204.4					
K ₂	440	477.8	80	95.6	177.8	191.1					
K ₃	100	106.7	193.3	211.1	177.6	202.2					
R	433.3	464.5	193.3	195.5	13.5	13.3					

断增粗, 并由白色转变为黄绿色, 在增粗的根上长出芽(图 2)。第 5、7 组处理, 根段在接种一周后开始形成少量愈伤组织, 并继续生长, 形成明显的愈伤组织团块, 以后从愈伤组织团块上萌发少量芽。第 8、9 组处理, 根

段自接种后开始形成愈伤组织, 并在愈伤组织表面萌发根尖, 但萌发的根表层均形成一层愈伤组织, 未分化形成芽。

2.2 不同光照处理根系再生的情况

表 3 L₉(4³) 试验结果的方差分析

变异因子		SS	DF	MS	F
A	光	312088.9	2	156044.4	8.535*
	暗	362124.6	2	181062.3	9.147*
B	光	56622.2	2	28311.1	1.548
	暗	57981.2	2	28990.6	1.464
C	光	354.6	2	177.3	0.008
	暗	306.6	2	153.3	0.009
误差	光	73132	4	36566	
	暗	79175.8	4	39587.9	
总变异	光	441843.1	8		
	暗	499281.7	8		

注: 1、因 $SSc < SS_e$, 故误差 $SS = SS_c + SS_e$, $df = 4$ 2、 $F(2,4) = 6.94$, $F(2,4) = 18.0$

表 4 不同光照时间对锥花福禄考根系再生的影响

组合编号	光照时间	根系再生情况	接种数 (个)	再生芽数 (个)	再生率 (%)
1	0	萌生根白色, 表层形成浅黄色愈伤, 愈伤较松散, 芽纤维玻璃化。	15	98	653.3
2	4	萌生根中部绿色, 边缘透明, 根表层形成少量淡黄色愈伤, 愈伤较紧实, 芽弱。	15	94	626.7
3	8	萌生根绿色, 仅根表层少透明, 根增粗伴有少量愈伤出现, 芽较壮。	15	94	626.7
4	12	萌生根绿色, 根增粗肿胀无愈伤出现, 芽健壮。	15	91	606.7
5	16	萌生根绿色, 根肿胀较快, 芽萌生较早。	15	92	613.3
6	20	萌生根深绿色, 根肿胀快, 表层变厚形成保护组织。芽萌生较晚。	15	61	406.7
7	24	萌生根深绿色, 根肿胀表皮变厚, 芽不易萌生。	15	53	353.3

表 2 为 50d 各组的统计结果。从表 2 中可以发现暗培养的各组再生率略高于光培养下的各组, 但在试验中, 暗培养条件下的各组在前期培养时, 萌生根系生长速度明显快于光培养条件下的对应组, 经过一个月后, 生长速度减慢, 萌生根系均呈透明状, 没有发生转绿现象; 而在光培养条件下, 虽前期生长速度慢, 但萌生的根系呈透明状, 几天后就转为绿色, 且根的直径明显比暗培养条件下大。从根段上再生的苗来看, 暗培养条件下, 再生苗瘦弱变黄, 并伴有玻璃化现象发生, 而在光培养下没有发生这种情况。

2.3 不同激素对根系再生的影响

从表 2 的水平和水平均值可以看出, 不同的激素组合及激素种类, 锥花福禄考根系再生率有明显差异。在选择 3 个因子中, 随着 A 因子 (6-BA) 含量水平的上升, 再生率呈先升后降趋势, 且差异明显, 以 A2 为最高; 随着 B 因子 (NAA) 含量水平的上升, 再生率呈先降后升趋势, 各水平差异明显; C 因子 (2,4-D) 随着含量水平的递增, 再生率总体递减, 三个水平差异不明显。从表 2 还可以看出, A 因子极差最大, B 因子次之, C 因子极差最小, 说明对再生率影响顺序是 A>B>C,

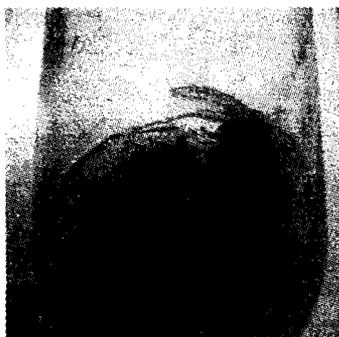


图 1 根群布满培养瓶, 未形成再生苗



图 2 从根部膨大肿胀部位萌生幼苗



图 3 根系再生

最优的激素组合为 A2B1C1。对表 2 结果进行方差分析 (见表 3) 表明, A 因素对试验结果的影响达显著水平 ($p \leq 0.05$), B、C 则没有, 和直观分析结果基本吻合。

2.4 最佳激素含量组合及光培养效果的验证

因激素含量组合 A2B1C1 没有出现在表 2 中, 需要进一步验证。笔者在初步试验中只研究了两种黑暗状态和每天光照 12h 对根系再生的影响, 也要对不同光照时间对再生的影响进行研究, 故再进行验证时结合不同光照时间, 来观察根系再生情况。

通过对比不同光照培养时间对锥花福禄考根系再生影响可以看出, 随着光照培养时间的递增, 萌生的根系呈现不同的变化, 由最初在根表层形成愈伤组织到没有愈伤组织产生, 根肿胀增粗, 再生芽率总体呈递减状态, 但植株长势越来越好, 说明光照时间对根系的再

生具影响较大。通过表 4 可以看出, 在 12-14h/d 的情况下, 根系不但有较高的再生率, 而且再生苗生长健壮; 虽然光照培养时间短时再生率高, 但苗长势弱; 光照时间长时, 苗长势好, 但再生率低, 试验表明, 光照 12~14h/d 与组合 A2B1C (MS+6-BA1.5mg/L+NAA 0.5mg/L) 是锥花福禄考根系再生的最适宜的培养条件 (图 3)。

3 讨论

许多研究者在研究根系再生时基本都是通过愈伤组织阶段成功获得再生植株^[2,5-6], 何玉科等^[7]利用甘蓝和花椰菜根段成功地直接诱导再生幼苗, 并指出从根段上再生幼苗有可能不经愈伤组织阶段, 可以防止脱分化或再分化过程中引起的不良变异, 从而保持遗传材料的稳定性。但在植物组织培养中, 根段直接诱导不

定芽受多种因子的影响,植物激素是影响不定芽诱导的主要因子^[7],何玉科等^[8]在甘蓝和花椰菜诱导中发现KT是诱发根段生苗的主要因素,单独使用就能产生较好的效果,添加低浓度的生长素只能在有限的范围内增强幼苗效果。顾淑荣等^[9]在烟草根段培养时也指出高浓度的KT能直接诱发幼苗产生,但低浓度可以从愈伤组织上诱导出幼苗。笔者在试验中同样发现,高浓度的细胞分裂素可以直接诱导出幼苗,随着添加生长素浓度的增加,反而不利于幼苗的产生;低浓度的生长素可以经过愈伤组织阶段诱导分化形成幼苗,和许多学者研究的基本一致。

光照是植物生长发育的重要调节因子,它对植物根系的生长发育具有调节作用,关于光照对植物离体根生长发育、形态建成的影响,国内外有不同程度的报道^[1,9-10]。韩献忠等^[11]在研究条叶龙胆离体根培养时指出,光照抑制根的生长;梁伯璠等^[12]在萝卜离体根形态建成研究中也同样发现光抑制萝卜根的生长。笔者在研究过程中观察到,在暗培养下,根系生长速度比在光照培养下略快,但没有韩献忠、梁伯璠等指出的明显。关于不同光照培养时间对植物材料离体根再生的影响,目前国内外没有报道,所报道的基本都集中在内部解剖及生理生化研究上,在锥花福禄考根系再生过程中,笔者研究了不同光照时间下离体根的分化过程,发现暗培养状态有利于愈伤组织的产生,但愈伤组织较松散且呈现浅黄色,光培养时,萌生根成绿色,易于诱导幼苗。童哲^[10]在研究不同植物离体根光形态建成时,指出黄瓜在光下根系产生叶绿素,根系短而粗壮,暗培养下部产生叶绿素,根系细长;而白芥没有叶绿素合成。梁伯璠^[12]在研究萝卜离体根形态建成时指出,在光照条件下萝卜离体根内没有检测到叶绿素的合成。锥花福禄考根系光培养时萌生绿色根,是否含有叶绿素有待于进一步研究。在本试验中还发现幼苗的产生多是发生在根肿胀粗大部位,这可能是在芽的形成过程中,原形成层不同部位加速分裂使根尖膨大成半球形、球形或梭形,并在膨大区进行维管组织的转变,向外形成“突起”即分生细胞团,每个“突起”发育为1个芽原基^[13]。

4 结论

4.1 锥花福禄考(*phloxpanicula-ta*)离体根再生时,在培

养基 MS+6-BA1.5mg/L+NAA0.5mg/L 能直接诱导产生不定芽,但不同得光照时间对诱导的再生率不同,以每天光照 12~14h 的条件下,不定芽的诱导率高,再生幼苗质量好。

4.2 在锥花福禄考(*phloxpanicula-ta*)离体根再生培养时,在暗培养条件下,根系呈明显无色或白色,光培养下萌生绿色根,根系中是否含有叶绿素,以及叶绿素的变化有待于作进一步研究。

参考文献

- [1] Feledman L J. Regulation of root development [J]. Ann Rew Plant Physiol 1984,35:223-242.
- [2] 王桂兰,陈超,李朝霞,等.红掌气生根根段再生快繁体系的建立[J].植物生理学通讯,2005,41(3):297-301.
- [3] 何玉科,巩振辉,王飞,等.用甘蓝和花椰菜幼苗根段诱导再生植株[J].园艺学报,1992,19(1):85-86.
- [4] 孙元峰,李庆伟,申顺先,等.锥花福禄考叶片愈伤组织诱导与植株再生[J].中国农学通报,2005,21(11):208-210.
- [5] 李毅,王慧春,张怀刚,等.水母雪莲的幼根培养及植株再生[J].植物生理学通讯,2001,37(1):39-40.
- [6] 李进进,廖俊杰,柯丽婉,等.蝴蝶兰根段的组织培养[J].植物生理学通讯,2000,36(1):37.
- [7] Haque M S, Wada T, Hattori K. High frequency shoot regeneration and formation from root tip of garlic [J].Plant Cell Tiss Orgcult, 1997,50:83-89.
- [8] 顾淑荣,桂耀林,徐廷玉.烟草根培养的植株再生[J].植物学通报,1985,3(4):48-49.
- [9] Funya M J, Torrey G. The rever sible inhibition by red and far rendlight of auxininduced lateral root initiation in isolatrd pea roots[J]. plant Physiol, 1964,39:987-991.
- [10] 童哲,连汉平,段静霞,等.植物离体根的光形态建成[J].植物学报,1987,29(1):59-66.
- [11] 韩献忠,张治国,刘骅,等.条叶龙胆离体根培养条件的初步研究[J].植物学通报,1990,7(3):49-51.
- [12] 梁伯璠,周毓君.不同光质对萝卜离体根形态建成的影响[J].河北大学学报(自然科学版),1999,19(4):369-371.
- [13] 陈惠.栝楼不定根尖分化不定芽过程中的细胞组织学研究[J].云南植物研究,2001,23(4):488-492.

(责任编辑:秦守亮)