

长寿花叶片愈伤组织培养及植株再生的研究

关艳清¹, 柳玉晶², 张秀丽²

(1. 盖州市风景园林管理处, 辽宁 营口 115200; 2 辽宁农业职业技术学院, 辽宁 营口 115009)

摘要:以长寿花幼嫩叶片为材料,以2,4-D,6-BA,NAA为主要研究因子,研究不同激素配比对长寿花愈伤组织生长、分化及其芽增殖情况的影响。试验表明,当叶片在MS+2,4-D2mg/L+6-BA0.2mg/L的培养基中培养,有利于愈伤组织的形成,在MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1mg/L的培养基中培养利于愈伤组织的分化和芽的增殖,1/2MS+IBA0.2mg/L培养基利于生根。

关键词:长寿花; 叶片; 愈伤; 组织培养; 再生

中图分类号:Q 943.1

文献标识码:B

文章编号:1671-0517(2008)03-0020-03

长寿花(Kalanchoe blossfeldiana CV. Tom Thumb)别名:矮生伽蓝菜、圣诞伽蓝菜、寿星花,属景天科、伽蓝菜属。长寿花花朵紧密,花色艳丽,观赏效果极佳,适逢元旦、圣诞节、春节等重大节日,有较高的生产价值,是优良的室内观叶植物。在长寿花生产栽培过程中,通常采用扦插繁殖,这种繁殖方法会引起病毒的积累,观赏品质会降低,而且繁殖系数低,繁殖量小,因此长寿花生产中,寻找一种快速而且高效的繁殖方法,是广大生产者亟待解决的问题。国内外不少人先后对长寿花进行组织培养快速繁殖的研究,但是培养时间长,成本高,给长寿花组织培养快速繁殖的应用及推广带来一定的困难。

本试验研究的目的在于找出表面灭菌的最佳时间,缩短培养周期,筛选出最佳的培养基配方,降低成本,扩大繁殖系数,以便生产者参考,促进长寿花组织培养技术的应用和推广。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

本试验所采用的材料为健康无病虫害的长寿花幼嫩叶片。

1.2 培养基

以MS为基础的固体培养基,附加不同浓度的2,4-D,6-BA,NAA组成各种培养基,pH值均调至5.8,加入蔗糖30g/L,琼脂6g/L,121℃高压灭菌15min。

1.3 方法

1.3.1 长寿花叶片的处理

从实生苗上取下叶片,经流水冲洗后,用70%酒精表面灭菌消毒30s,45s,60s,用无菌水冲洗3~4次后,然后5%次氯酸钠溶液分别浸泡10min,15min,20min(如表1)。用无菌水冲洗3~4次后将叶片切成0.5cm×0.5cm方块接种于培养基中,每瓶4个外植体。培养条件为:温度23~26℃,光照12h·d⁻¹,光照度1000lx左右,接种7d后统计污染率,30d后统计褐化率,从而选择出酒精和次氯酸钠的最佳时间配比。

表1 外植体消毒时间处理

处理	消毒时间配比
A	酒精 30s 次氯酸钠 10min
B	酒精 30s 次氯酸钠 15min
C	酒精 30s 次氯酸钠 20min
D	酒精 45s 次氯酸钠 10min
E	酒精 45s 次氯酸钠 15min
F	酒精 45s 次氯酸钠 20min
G	酒精 60s 次氯酸钠 10min
H	酒精 60s 次氯酸钠 15min
I	酒精 60s 次氯酸钠 20min

1.3.2 初代培养

将外植体在相同条件下接种于添加不同浓度的2,4-D,6-BA培养基中(如表2)观察并记录外植体愈伤生长状况,并选择适宜的激素配比。

表2 不同初代培养基配方

处理	培养基
A	MS+2,4-D1mg/L+6-BA0.2mg/L
B	MS+2,4-D2mg/L+6-BA0.2mg/L
C	MS+2,4-D2mg/L+6-BA0.5mg/L
D	MS+2,4-D3mg/L+6-BA0.5mg/L
E	MS+2,4-D4mg/L+6-BA0.5mg/L

1.3.3 继代培养

将初代培养所得的愈伤组织转接到相应的培养基上(如表3)观察并记录外植体分化及芽的生长状况,并选择出适宜的培养基配方。

表3 不同继代培养基配方

处理	培养基
A	MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.1mg/L
B	MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.2mg/L
C	MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1mg/L
D	MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.2mg/L

1.3.4 生根培养

将继代培养中分化得到的无根苗接种到MS,1/2MS,MS+IBA0.2,1/2MS+IBA0.2培养基中进行培养,筛选出最佳生根培养基配方,并记录生长状况。

1.3.5 试验程序

外植体——愈伤组织的诱导——愈伤组织的分化和芽

收稿日期:2008-04-26

作者简介:吴艳清(1972-),女,辽宁盖州人,工程师。

增殖——根的诱导——再生植株

2 结果与分析

2.1 酒精和次氯酸钠的不同时间对外植体的影响

以MS为培养基,以长寿花叶片为外植体,经7d培养后统计污染率(见表4),30d后统计褐化率(见表5),结果表明随着酒精和次氯酸钠的消毒时间的延长,外植体的污染率有所下降,但褐化率明显提高,其中以酒精30s,次氯酸钠10min效果最好,既能有效降低污染率又能有效控制褐化率。

表4 酒精和次氯酸钠不同消毒时间对外植体污染率的影响

处 理	外植体数 (个)	污染个数 (个)	污染率 (%)
酒精30s次氯酸钠10min	60	10	16.7
酒精30s次氯酸钠15min	60	8	13.3
酒精30s次氯酸钠20min	60	7	11.7
酒精45s次氯酸钠10min	60	9	15.0
酒精45s次氯酸钠15min	60	7	11.7
酒精45s次氯酸钠20min	60	5	8.33
酒精60s次氯酸钠10min	60	7	11.7
酒精60s次氯酸钠15min	60	4	6.67
酒精60s次氯酸钠20min	60	2	3.33

表5 酒精和次氯酸钠不同消毒时间对外植体褐化率的影响

处 理	外植体数 (个)	褐化个数 (个)	褐化率 (%)
酒精30s次氯酸钠10min	60	4	6.67
酒精30s次氯酸钠15min	60	7	11.7
酒精30s次氯酸钠20min	60	9	15.0
酒精45s次氯酸钠10min	60	12	20.0
酒精45s次氯酸钠15min	60	14	23.3
酒精45s次氯酸钠20min	60	17	28.3
酒精60s次氯酸钠10min	60	22	36.7
酒精60s次氯酸钠15min	60	26	43.3
酒精60s次氯酸钠20min	60	34	56.7

2.2 不同激素处理对外植体愈伤及分化的影响

2.2.1 不同激素处理对外植体诱导愈伤的影响

以MS为基本培养基添加不同浓度的2-4D,6-BA,经过30d左右的培养,叶片边缘开始出现淡绿色颗粒状突起,然后形成愈伤组织块,观察各激素配比的愈伤组织生长状况(见表6),试验结果表明:MS+2,4-D 2mg/L+6-BA0.2mg/L为适合长寿花叶片愈伤组织的诱导最佳激素配比。

表6 不同激素处理对愈伤组织的诱导情况

处 理	培 养 基	愈伤组织生长情况
A	MS+2,4-D1mg/L+6-BA0.2mg/L	产生少量愈伤组织
B	MS+2,4-D 2mg/L+6-BA0.2mg/L	产生大量愈伤组织
C	MS+2,4-D 2mg/L+6-BA0.5mg/L	基部产生大量愈伤组织
D	MS+2,4-D 3mg/L+6-BA0.5mg/L	基部产生少量愈伤组织
E	MS+2,4-D 4mg/L+6-BA0.5mg/L	产生少量愈伤组织

2.2.2 不同激素处理对外植体愈伤组织的分化和芽增殖的

影响

以MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA,NAA,将愈伤组织接种到继代分化培养基上,15d后发现愈伤组织明显转绿和增大,50d左右开始产生绿色芽点并陆续分化成芽,分化率80%以上。观察各激素配比愈伤组织的分化和芽的增殖情况(见表6)。试验结果表明:MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1mg/L为适合长寿花叶片愈伤组织分化和芽增殖的最佳培养基激素配比。

表7 不同激素处理对愈伤组织的分化和芽增殖情况

处 理	培 养 基	接种数 (个)	出芽率 (%)	每块外植体 产生芽数(个)
A	MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.1mg/L	60	83.3	1.67
B	MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.2mg/L	60	85.0	2.33
C	MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1mg/L	60	88.3	2.67
D	MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.2mg/L	60	81.6	1.33

注:以上数据均为三次试验重复所得的平均数据。

2.3 生根培养

将分化的无根苗接种到MS、1/2MS、MS+IBA0.2mg/L、1/2MS+IBA0.2mg/L培养基中,7d后基部长出白色不定根,生根率达85%以上,观察各生根培养基配方生根情况(见表8)。试验结果表明:1/2MS+IBA0.2mg/L为最佳生根培养基配方。

表8 不同生根培养基生根情况

处 理	培 养 基	接种数 (个)	生根率 (%)	每块外植体平均 产生根数(个)
A	MS	45	86.7	7.33
B	1/2MS	45	88.9	8.67
C	MS+IBA0.2mg/L	45	91.1	10.33
D	1/2MS+IBA0.2mg/L	45	95.5	11.67

注:以上数据均为三次试验重复所得的平均数据。

2.4 移栽生长情况

将已生根的苗在培养室中打开盖后进行炼苗4d,然后用自来水冲净根部残留的培养基,然后移入泥炭土:珍珠岩:腐叶土(1:1:2)组成的培养土中,隐蔽度为90%,每天向叶片喷洒少量的水,保持高湿度,适当遮光培养,10d左右长出新叶,移栽成活率达到80%以上。

3 讨论

(1)能否有效控制污染是植物组织培养是否成功的关键之一。在组织培养中污染可分为外植体、培养基和无菌操作等三方面。其中外植体方面污染最为复杂,也最难控制。这可能是真菌引起的,也可能是细菌引起的。灭菌时间长短会导致污染率高低,理论上灭菌时间越长越好,但是时间越长会导致褐化率高,因此要掌握好最佳灭菌时间。

(2)在初代培养中得到两类愈伤组织,一类是绿色的颗粒状突起,然后形成致密的愈伤组织块;另一类是白色粉末

状愈伤,采用前者进行继代培养植株分化和芽增值率高,达到快繁目的,这一结论还要在以后的学习试验过程中进行验证。

(3)在继代培养中,愈伤组织可生成试管苗,但是愈伤组织作为继代材料时试验周期长。

4 结论

(1)长寿花叶片组织培养过程中,使用 70% 酒精进行外植体灭菌 30s,5% 次氯酸钠浸泡 10min,这种外植体灭菌方法大大提高了无菌外植体建立的成功率,但必须严格控制消毒时间,消毒时间过长,使外植体受到伤害,而影响其发育。

(2)在 MS 培养基中添加 2,4-D2mg/L 和 6-BA0.2mg/L,对于长寿花叶片愈伤组织的诱导效果极佳,生长状况较好。

(3)在 MS 培养基中添加 6-BA1mg/L 和 NAA0.1mg/L 时,对于长寿花叶片愈伤组织的分化和芽的增殖效果最好,生长状况非常好。

(4)长寿花试管苗生根较容易,在 1/2MSIBA0.2mg/L 培养基中可得到较好的生根效果。

(5)长寿花花期很长,叶片较多,这为取得足够的外植体提供了充分条件,同时以叶片作为外植体,取材方便,并且不伤母株,采用叶片进行组织培养,能够大大提高长寿花繁殖系数,降低繁殖成本,利于进行大规模的工厂化生产。

参考文献:

- [1] 谭文澄、戴策刚. 观赏植物组织培养技术. 中国林业出版社,1997.
- [2] 韦三立. 花卉组织培养. 北京:中国林业出版社,2001.
- [3] 洪军孟. 长寿花快速繁殖技术. 农业科技通讯,2001,(11):15.
- [4] 吴丽芳、屈云慧. 长寿花组培快繁. 云南农业科技,2001(4):21.
- [5] 陈利萍、汪炳良. 长寿花叶片愈伤组织的诱导和植株再生. 植物生理学通讯,1999,35(6):471.
- [6] 崔广荣、王彦. 长寿花组织培养的研究. 河南职业技术师范学院学报,2003,31(1).
- [7] 王桂兰、陈超、田立民、崔瑞生. 长寿花组织培养与人工种子的研究. 北京农学院学报,2003,18(4).

(上接第 19 页)

表 2 经济效益分析

地点	处理	肥料名称	用量 (kg/667 m ²)	肥料价格 (元/t)	投入 (元/667 m ²)	产量 (kg/667 m ²)	产品价格 (元/kg)	产值 (元/667 m ²)	产投比	纯效益 (元/667 m ²)
义县	I	复合肥	25	1900	47.5	3779.7	1.60	6047.5	29.1	5840.0
		盛凯华	100	1600	160					
	II	复合肥	25	1900	47.5	3684.4		5895.0	50.2	5777.5
		尿素	40	1750	70					
北宁	I	复合肥	25	1900	47.5	4408	1.2	5289.6	25.5	5082.1
		盛凯华	100	1600	160					
	II	复合肥	25	1900	47.5	4209		5050.8	43.0	4933.3
		尿素	40	1750	70					
凌海	I	复合肥	25	1800	45	4422.4	1.0	4422.4	21.6	4217.4
		盛凯华	100	1600	160					
	II	复合肥	25	1800	45	3630.1		3630.1	33.3	3521.1
		尿素	40	1600	64					
III	不施肥				2871.7		2871.7		2871.7	

从表 2 中可以看出,施用盛凯华冲施肥及常规施肥与对照相比,经济效益明显增加,667 m² 最高收入可达 5840.0 元,纯效益分别增加 481.1 ~ 1345.7 元和 418.6 ~ 963.7 元,采用复合肥 + 盛凯华牌冲施肥与常规施肥相比,虽然产投比降低,但 667 m² 纯效益却增加 62.5 ~ 696.3 元。可见采用复合肥 + 盛凯华牌冲施肥对黄瓜有显著的增产作用且经济效益显著。

3 结论

本试验从施用盛凯华冲施肥对黄瓜生育性状、产量和经济效益三方面进行了研究,结果表明:采用复合肥 + 盛凯华牌冲施肥对黄瓜增加株高、改善叶色、提高果数和单果重都具有很好的效果;盛凯华牌冲施肥能明显提高作物产量;从经济效益方面分析采用复合肥 + 盛凯华牌冲施肥也明显优于常规施肥。因此,盛凯华牌冲施肥在改善黄瓜生长状况、提高

黄瓜产量方面都有明显的效果,对于提高菜农经济收入具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 努尔比燕. 保护地蔬菜冲施肥技术. 西北园艺[J],2007(5):42.
- [2] 许宏寿,许金霞,徐霞. 不同品种冲施肥在青菜上的肥效试验. 安徽农业科学[J],2006(J):(187,175).
- [3] 周建群,覃桂聪. 冲施肥对蔬菜增产效果. 广西热带农业[J],2007(3):27.
- [4] 周建群,覃桂聪. 甘蔗冲施肥肥效初报. 广西蔗糖[J],2007(4):18-20.
- [5] 张建平,高雪玲,吕明杰等. 一冲旺冲施肥在春茬蔬菜上的应用. 陕西农业科学[J],2007(3):107-108.