

龙须菜的组培快繁技术研究

刘春颖,孙伯铮,冉学忠

(铁岭市农业科学院,辽宁 铁岭 112616)

摘要:以龙须菜带腋芽的茎段作为外植体,进行组培快繁研究。先筛选出 MS+6BA0.5+NAA0.5 的固体培养方法,提高芽增殖量。然后在培养基成份不变的情况下,采用先固体,后固体与液体相结合的培养方法,可以缩短继代时间 1/3 左右,繁殖速度提高 2~3 倍。

关键词:龙须菜;组织培养;液体培养基

中图分类号:S647.03

文献标识码:B

龙须菜学名鮎鱼须(*Smilax sieboldii* Miq)别名鞭杆子菜,龙须草等。分布辽宁、吉林两个省份。生长于林下、灌丛、山坡草丛中,是一种美味可口的山野菜。它的嫩茎叶富含蛋白质、胡萝卜素、维生素等多种营养物质,口感鲜美,食用、药用价值都很高。由于龙须菜以其营养丰富,绿色无公害,口味佳等特点而深受人们喜爱。许多农业技术发达的国家都已开展了分类、栽培、品种选育等研究,并开发出保鲜菜、菜干、菜罐头、菜汁、盐渍菜等深加工产品,经济效益显著。但近年来我国对龙须菜资源的开发利用尚处在一个较低的水平,基本上是自然生长和采收,量很少远远满足不了市场需求,只有少部分采用组培技术生产的龙须菜,但距离大面积推广还需一番努力。我们多年研究,总结出龙须菜组培快繁技术,可使龙须菜繁殖周期可缩短 1/3,且具有后代个体一致、变异小的特点。现将试验结果报告如下。

1 试验材料

1.1 外植体的选择与处理

选取当年新发的健壮枝条,用清水冲洗干净后去掉顶端幼嫩部分和叶片,剪成带腋芽的茎段放入三角瓶中。在超净工作台上用 75% 的酒精浸摇 30, 无菌水冲洗 1 次。0.1% 升汞灭菌 8 min, 无菌水冲洗 4~5 次,将外植体置于无菌过滤纸上吸干表面水分,切成带 1 个腋芽的小段,并立即接种到培养基上。

1.2 培养基的配制及培养条件

以 MS 配合为培养基的基本成分,选取不同成分和不同浓度的生长素及细胞分裂素进行调配,从中筛选出培养龙须菜在诱导分化、继代增殖、生根移栽三个时期最适宜的培养基配方。

培养的外部条件为:温度 24 ± 1 °C, 湿度 50%~60%, 每天光照时间 10~12 h, 光照强度 1 500~2 000 lx。

2 试验步骤与结果

2.1 龙须菜的诱导分化培养

外植体在诱导培养中,接种 7 d 后,腋芽开始萌动,继续培养 10 d 左右,在叶腋处长出幼芽切下放入固体培养基中,10 d 左右芽基部开始膨大,基部略有绿色愈伤组织形成,大约经过 30 d 左右开始从基部分化出浅绿色小芽点,并逐渐长成小芽丛。利用龙须菜带腋芽的茎段作为外植体进行愈伤组织诱导分化,在同样的时间内,对愈伤组织分化情况进行对比试验,经筛选龙须菜最适诱导培养基为⑤号 MS+6BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L+活性炭 0.5 g/L,琼脂浓度 7.0 g/L,pH 值 5.8,高温高压灭菌消毒。试验结果见表 1。

表 1 不同培养基配方对龙须菜诱导分化的影响

培养基配方组成 (mg/L)	调查瓶数 (个)	平均分化芽数 (个)	诱导率 (%)
①MS+6BA1.0+IBA0.1	10	15	30
②MS+6BA2.0+IBA0.2	10	68	136
③MS+6BA3.0+IBA0.3	10	75	150
④MS+6BA1.0+NAA0.1	10	120	240
⑤MS+6BA2.0+NAA0.2	10	145	290
⑥MS+6BA3.0+NAA0.3	10	36	72

注:每瓶接种 5 个芽

2.2 龙须菜的继代扩繁培养

将芽丛切成单个芽,再转接到继代培养基中进行扩繁培养。经过筛选龙须菜最适继代培养基为②号(MS+6BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+活性炭 0.5 g/L),琼脂浓度 7.0 g/L,pH 值 5.8,高温高压灭菌消毒。试验结果见表 2。

在上述培养继代过程中,我们感到在固体培养过程中,接种的愈伤组织增殖较慢,但增殖再生芽比较正常,

于是尝试用②号(即 MS+6BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L)培养基进行液体继代培养,液体培养基量不要太多,以不淹没放入的愈伤组织块为准,在液体培养过程中,再生芽数量比较多,生长比较正常,愈伤组织生长也比较迅速,但长时间(20 d 以上)在液体培养基中培养,愈伤组织颜色发黄,且有部分组织发黑,所以在液体培养基中培养后,我们将愈伤组织从液体培养基中取出,重新接入固体培养基中培养继代,然后再接入液体培养基中培养,如此固体、液体交叉循环培养,不但加快了培养速度,还缩短了培养时间。试验结果(表 3)。我们发现,采用固、液交叉循环培养的方法,可以较上两种培养方法单独使用在增殖数量上提高 3 倍,时间缩短三分之一。

2.3 龙须菜的生根培养

当愈伤组织诱导出的再生芽长到 1~2 cm 小苗时转入生根培养基中,见表 4。

经过筛选龙须菜生根培养基为③号(1/4MS+IBA

0.2 mg/L+IAA 0.3 mg/L+琼脂 5.0 g/L+活性炭 0.5 g/L),pH 值 5.8,高温高压灭菌消毒。10~15 d 可见根长出,根长 0.5~1 cm 时移栽温室。

表 2 不同培养基配方对龙须菜继代增殖的影响

培养基配方组成 (mg/L)	调查瓶数 (个)	平均形成的芽数 (个)	芽繁殖率 (%)
①MS+6BA2.0+IBA0.2	10	130	260
②MS+6BA0.5+NAA0.5	10	240	480
③液体 MS+6BA0.5+NAA0.5	10	85	170

注:每瓶接种 5 个芽或带芽愈伤组织

表 3 不同培养基方式对龙须菜继代增殖的影响

培养方式	调查瓶数(个)	培养天数	增殖株数
固体培养	10	30	330 株
液体培养	10	20	1020 株

注:每瓶接种 5 个芽或带芽愈伤组织

表 4 不同培养基配方对试管苗生根的影响

培养基配方组成(mg/L)	调查瓶数(个)	根长(cm)	根的形态	根的条数(个)
① 1/2MS+NAA0.5+IBA0.5	10	0.5	根短、粗、脆无须根	2~3
② 1/2MS+NAA0.6+IBA0.5	10	0.5~1	有须根、无侧根	3~4
③ 1/4MS+IBA0.2+IAA0.3	10	1.0~1.5	发育完整	4~5

注:每瓶接种 5 株小苗

3 龙须菜试管苗移栽与管理

当龙须菜的幼苗长到 3~4 cm 以上时,要进行移栽。具体做法是:将生根试管苗移至通风阴凉处,开瓶炼苗 1~2 d 后,取出小苗,洗去根部培养基,注意洗苗时手要轻,不要伤根和损伤叶片,移栽到温室装有蛭石和草炭基质(比例为 1:1)的穴盘中,扣上塑料薄膜保湿,加扣遮荫网。7~8 d 后逐渐通风,再炼苗 5 d 后,可完全放开。10 d 浇 1 次营养液,保证此期间的养分供应。成活率在 95% 以上。当穴盘内幼苗长到 5 cm 左右时,移至装有营养土的营养钵(8 cm×8 cm)内,营养土的构成为大田土、腐熟农家肥、腐殖土各占 1/3,并拌入防病菌的药剂,加扣遮荫网,浇透水,保持空气湿度 80% 左右。当营养钵内幼苗长至 15~20 cm 左右时,定植生产田。

4 结果讨论

4.1 本试验在进行扩繁时,选用了固体和液体培养基相结合的方法,克服了采取单独一种形式培养的褐化和增殖慢的缺点,不但培养状态好,提高了繁殖速度,还缩短了培养时间。另外液体培养基不加琼脂降低成本,易于清洗。由于液体培养的时间短,营养成份不会用尽,还可重复使用一次,节省了劳动力和成本,可谓一举多得。究其原因,我们认为主要有单独采用固体培养的方式,缺点是外植体或愈伤组织只有底部表面能接触培养基,吸收养分,上表面则不能,造成细胞各部分营养浓度差异,影响

生长浓度。同时,外植体插入培养基后,气体交换不畅及排泄物质(如单宁酸等)积累,影响组织吸收养分和造成毒害。另外,组织受光不均匀,细胞群生长就不一致。而单独采用液体培养的方式,虽说组织块定期交替地浸在液体里及暴露在空气中,有利于既吸收培养液又进行气体交换,但长时间在液体培养基中,易导致组织块褐化,外植体溢出的有毒物质就会长期滞留在液体培养基中,对外植体生长造成严重影响,只有不断变换培养条件,使外植体始终处于旺盛的生长状态,才可大大减轻褐化。更准确的说法还有待于进一步研究。

4.2 龙须菜的组培快繁,虽然已完成试验阶段,但距大面积开发还有一定距离,我们会在以后的工作中加强示范推广开发工作。

参考文献:

- [1] 曹汝义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996.
- [2] 李俊明,韩碧文.植物组织培养教程[M].北京:北京农业大学出版社,1992.
- [3] 孙清荣,孙洪雁,石荫坪,等.早熟杏幼胚子叶再生不定梢[J].植物生理学通讯,2002,(1):40~41.
- [4] 李顺宝.中药别名速查大词典[M].北京:学苑出版社,1997.
- [5] 王刚,龙春林.猫耳朵的组织培养[J].植物生理学通讯,2003,39(3):233.