

枝干番杏组织培养技术

张淑红, 吕聪真, 石林成, 高金红, 贾方方, 马 丽
(商丘师范学院 生物与食品学院, 河南 商丘 476000)

摘要:以枝干番杏的带叶茎段为外植体,比较不同灭菌方法的灭菌效果,及不同激素浓度对丛生芽诱导及生根的影响。结果表明:本研究中枝干番杏组织培养不经过愈伤组织阶段,芽诱导最适宜的培养基为 MS+6-BA 8.325 mg·L⁻¹+NAA 16.65 mg·L⁻¹。芽丛生继代最适培养基为 MS+6-BA 2.4 mg·L⁻¹+NAA 9.6 mg·L⁻¹,根诱导最适培养基为 1/2 MS+6-BA 1.2 mg·L⁻¹+NAA 4.8 mg·L⁻¹。枝干番杏的离体快繁体系有望用在番杏科其他植物的组培中。

关键词:枝干番杏;组织培养;带叶茎段;芽诱导;根诱导

多肉植物,也称为肉质植物或多浆植物,是具有肥厚多浆汁肉质器官植物的总称。常见的有景天科植物和仙人掌科植物,此外还有番杏科、龙舌兰科、大戟科、百合科、菊科等^[1]。其中番杏科是多肉植物中最大也是最重要的科。有关番杏科植物组织培养研究对象有生石花、露草、照波、风铃玉、心叶日中花、龙须海棠。范丽楠等^[2]采用不同浓度的 MS 培养基,研究其对生石花种子萌芽率及幼苗生长情况的影响。结果表明,1/2MS 培养基最适合生石花种子萌发及幼苗生长。另外,0.1 mg·mL⁻¹的 GA 浸泡种子 4 h 对生石花种子萌发效果最佳。该研究为后续生石花组培快繁技术奠定了前期的研究基础。牟豪杰等^[3]以消毒种子萌发获得的无菌幼苗为外植体,通过愈伤组织诱导及再分化形成了试管苗。陈香波等^[4]采用露草种子萌发苗的顶芽作为外植体,通过愈伤组织途径诱导出了试管苗。周静等^[5]和吴正景等^[6]分别以照波茎段和风铃玉叶片为外植体,研究出了愈伤组织诱导、芽分化、根形成等阶段的最佳激素配比。王小红等^[7]以心叶日中花的带节茎段为外植体,不经过愈伤组织,直接通过不定芽和生根的过程,获得了组培苗。刘红美等^[8]以龙须海棠的种子获得的无菌实生苗茎段作为外植体,也是不经过愈伤组织阶段,通过丛生芽和根的诱导 2 个过程,获得了无菌苗,而且试管苗还具有试管内开花现象。

枝干番杏,被子植物门双子叶植物纲石竹目

番杏科植物,叶排列形似兔耳朵,而且叶子因有一层透明反光的隆起,所以呈半透明富有颗粒感,非常可爱。然而,枝干番杏在养殖过程中容易在夏季发生烂根、冬季出现冻伤死亡等,因此其繁殖并不容易。而且枝干番杏苗越小越容易造型,成为大众喜欢的萌兔。但是如果植株接着生长下去,即使生长条件非常优越,也会出现“女大十八变”,随后很难再看到萌兔造型。枝干番杏传统的繁殖方式有播种和扦插。繁殖速度很慢,成本高、效率低,不能满足国内观赏市场的需求,而植物组培快繁技术是解决此类问题的最有效途径。利用组织培养技术能够在较短时间内生产大量花卉种苗,使花卉育苗过程不受季节、环境等条件的限制。

本试验以枝干番杏带叶茎段为外植体,研究外植体的不同灭菌方法有何不同的灭菌效果;同时研究不同激素浓度对丛生芽诱导及生根的影响。本研究为快速而大量获得易造型的枝干番杏提供理论基础和研究依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验选用生长健壮的盆栽枝干番杏(*Dicrocaulon ramulosum* (L. Bolus) Ihlenf.),材料由生物与食品学院温室提供。

1.2 方 法

1.2.1 外植体的选取与采集 以枝干番杏叶腋间的幼嫩叶芽作为外植体。本试验采样时间为 2017 年 5-6 月。在晴天,早上 8:00 将温室的盆栽枝干番杏移出,经太阳光照射 1~4 h,用灭菌剪刀剪取带叶茎段,置于保鲜袋内,立即带回实验室。

1.2.2 外植体灭菌过程 将准备好的枝干番杏

收稿日期:2018-09-28
基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(162102110092, 182102110130)。
第一作者简介:张淑红(1977-),女,博士,教授,从事植物组织培养教学工作。E-mail:shuhongzhang_2013@163.com。

带叶茎段置于灭菌烧杯,用灭菌的纱布包裹在烧杯口,于自来水下冲洗 30 min。把冲洗后的外植体放入 42℃热水中处理 1 h。把外植体拿到超净工作台中,用 70%酒精处理 40 s,无菌水冲洗 3 遍。再用 0.1%的升汞处理 6、8、10、12 min 四个时间梯度,无菌水冲洗 6 遍,每个升汞处理时间设置 5 个重复。

1.2.3 培养基配方 丛生芽诱导培养基:MS+6-BA 8.325 mg·L⁻¹+NAA 16.65 mg·L⁻¹。

丛生芽增殖培养基:MS 添加不同浓度的 6-BA和 NAA。

生根培养基:1/2 MS+6-BA 1.2 mg·L⁻¹+NAA 4.8 mg·L⁻¹;1/2 MS+6-BA 2.4 mg·L⁻¹+NAA 9.6 mg·L⁻¹。

1.2.4 培养条件 将组培瓶置于光照培养箱,温度 25℃,光照 1 600 lx,光照时间 16 h。

2 结果与分析

2.1 HgCl₂不同处理时间对外植体灭菌情况的影响

由表 1 可知,HgCl₂处理 6 min,5 瓶有 3 瓶被

霉菌污染,污染率为 60%;处理 8 min,5 瓶有 2 瓶被霉菌污染,污染率为 40%;处理 10 min 无污染;处理 12 min 污染 1 瓶,为细菌污染,污染率为 20%。综上所述,外植体灭菌方法以 HgCl₂处理 10 min 效果最好。

表 1 不同 HgCl₂处理时间对外植体污染率的影响

0.1%HgCl ₂ 处理时间/min Treating time of 0.1%HgCl ₂	污染率/% Contamination rate	菌种污染种类 Contaminated microorganisms
6	60	霉菌
8	40	霉菌
10	0	/
12	20	细菌

2.2 枝干番杏芽分化

由表 2 可知,当 6-BA 和 NAA 浓度分别为 2.4 和 9.6 mg·L⁻¹时,丛生芽继代效果最好,有新的芽长出。

表 2 丛生芽增殖培养基激素浓度及增殖情况

培养基编号 Number of culture media	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	接种数/发芽数 Inoculation number/ germination number	丛生芽增殖情况 Proliferation of cluster buds
1	4.2	21.0	6/0	正常,但未有新芽长出
2	4.2	16.8	6/0	正常,但未有新芽长出
3	2.4	12.0	6/0	生长缓慢,仅有少量新芽长出
4	2.4	9.6	6/4	正常,苗健壮,并有小芽长出
5	2.4	7.2	6/1	正常,开始发芽
6	1.2	4.8	6/2	正常,苗健壮

2.3 枝干番杏生根培养

外植体发芽后 7 d 左右开始长根。当 6-BA:NAA=1.2 mg·L⁻¹:4.8 mg·L⁻¹=1:4,生根数量比较少,仅为 35 根,但根比较粗。而 6-BA 和 NAA 的浓度同时提高 1 倍,即 6-BA:NAA=2.4 mg·L⁻¹:9.6 mg·L⁻¹,生根数量比较多,为 113 根,但根比较细。因此,从炼苗的难易度来说,适当降低 6-BA 和 NAA 的浓度,有利于组培苗最终的成活。

对上述组培过程进行总结,从外植体接种到诱导生根的整个过程如图 1。具体过程及培养基配方为 A 外植体接种:MS+6-BA 8.325 mg·L⁻¹+

NAA 16.65 mg·L⁻¹;B 不定芽始发生:MS+6-BA 8.325 mg·L⁻¹+NAA 16.65 mg·L⁻¹;C 不定芽丛生状:MS+6-BA2.4 mg·L⁻¹+NAA9.6 mg·L⁻¹;D 不定芽生根:MS+6-BA2.4 mg·L⁻¹+NAA 9.6 mg·L⁻¹。灭菌条件:121℃,20 min。枝干番杏外植体接种后(图 A),没有经过愈伤组织,10 d 左右开始生芽(图 B),用同样的培养基转接后芽很短,不能向上生长,后转接到丛生芽诱导培养基时,丛生芽生长最好(图 C),有茎、芽向上生长,同时有少量根生长。转接到最适生根培养基后 7 d 左右,生根数量达到 113 根左右(图 D)。

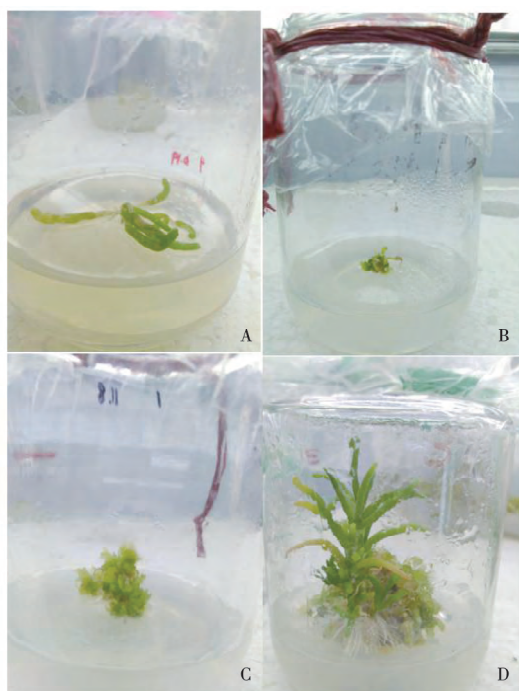


图 1 枝干番杏组培苗诱导过程
A:外植体接种; B:不定芽始发生; C:不定芽丛生状; D:不定芽生根。
A:Inoculated explants; B:Primary buds; C:Clustered buds; D:Inducted roots from clustered buds.

图 1 枝干番杏组培苗诱导过程

Fig. 1 Induction process of plantlet from *Dicrocaulon ramulosum* (L. Bolus) Ihlenf

3 结论与讨论

由于枝干番杏体表不光滑,对于外植体的灭菌过程,本研究进行了热处理。枝干番杏组培苗的诱导过程没有经过愈伤组织阶段,直接由带节茎段发育出丛生芽。番杏科的龙须海棠也没经过愈伤组织阶段^[8]。这可能与本研究未使用 2,4-D 有关。不经过愈伤组织的诱导过程可增加组培苗的遗传稳定性。

本试验中,在长出芽后不久,未更换培养基的情况下也能在芽分化培养基上长出少量的根。分化培养基和根诱导培养基相一致的现象在多肉植物景天科的桃美人组培中也有报道^[9]。但是把芽转接到根诱导的 1/2MS 培养基上之后,可以诱导出更多的根。这和常规的研究相一致^[6-8],即矿物元素的减少,有利于根的生长。

有关番杏科植物的组培研究中,无论是愈伤

组织的诱导,还是芽的分化,所用 6-BA 浓度均高于 NAA 或者与 NAA 相等。而本研究所用 NAA 浓度是 6-BA 的 2 倍。李春娟等^[10]在花生胚小叶外植体组织培养及快速繁殖中发现,6-BA 与 NAA 的比值与愈伤组织诱导、生芽的数量以及速度关系十分密切,发芽势强的花生品种宜用低 6-BA/NAA 比值的 MS 培养基,发芽势弱的品种则适宜用 6-BA/NAA 比值较高的 MS 培养基。这说明,本研究选用的枝干番杏的发芽能力比较强,或者说其体内可能已经有了高浓度的细胞分裂素,因此,外源加入的浓度就应该比较低。虽然 NAA 等生长素是组培过程中生根所需的,但生长素也能诱导细胞分裂、伸长,尤其是向阳性的植物。本研究所选的枝干番杏为喜阳植物。

枝干番杏的组培在本研究中不经过愈伤组织阶段而直接以芽分化和根诱导而长成组培苗。在这 2 个阶段,所用 NAA 浓度始终高于 6-BA。这与常规的组培苗的高浓度的 6-BA,低浓度的 NAA 不一致。本研究也用该浓度的激素诱导出了心叶日中花的愈伤组织,但不像枝干番杏那样,跳跃过愈伤组织的阶段。至于该配方是否也能用于其他番杏科的植物,还需进一步的研究。

参考文献:

- [1] 何启平,苏伟祺. 多肉植物的种类及应用价值探析[J]. 园艺与种苗,2016(1):8-11.
- [2] 范丽楠,张宗申,刘平武. 生石花种子萌发及幼苗生长最优条件的筛选[J]. 安徽农业科学,2016(18): 123-126.
- [3] 牟豪杰,王燕,吕永平,等. 生石花植株离体再生及组培快繁研究[J]. 安徽农业科学,2016(33): 143-144,181.
- [4] 陈香波,罗玉兰,田旗,等. 露草的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯,2004(1): 63.
- [5] 周静,杨苏文,方小波,等. 照波的植物组织培养研究[J]. 贵州科学,2016,34(6): 13-17.
- [6] 吴正景,黄雪娇,王柏,等. 风铃玉的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2015,51(11): 2013-2016.
- [7] 王小红,毕锦华,陆智伟,等. 心叶日中花的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2009,45(8): 800.
- [8] 刘红美,方小波,杨苏文,等. 龙须海棠组织培养与试管内开花[J]. 植物生理学通讯,2009,45(7): 692.
- [9] 赵海乐,孙国庆,冯凯,等. 桃美人景天的组织培养与快速繁殖[J]. 吉林化工学院学报,2016,33(1): 54-60.
- [10] 李春娟,单世华,万书波,等. 花生胚小叶外植体再生影响因素研究简报[J]. 花生学报,2005,34(4): 36-38.

Techniques of Tissue Culture with *Dicrocaulon ramulosum* (L. Bolus) Ihlenf

ZHANG Shu-hong, LYU Cong-zhen, SHI Lin-cheng, GAO Jin-hong, JIA Fang-fang, MA Li
(College of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China)

陕西石蒜染色体核型分析

张鹏翀¹, 鲍淳松¹, 吴恩南², 高淑莹³

(1. 杭州植物园, 浙江 杭州 310013; 2. 浙江西城工程设计有限公司, 浙江 杭州 310000; 3. 杭州西湖风景名胜区钱江管理处, 浙江 杭州 310013)

摘要:为推断陕西石蒜的杂交起源和石蒜属种间及系统进化的关系, 本文对野外采集的 3 个居群陕西石蒜的染色体核型进行了研究。结果表明: 陕西石蒜的染色体核型为 $2n=30=3m+5st+22t$, 其中包含了 3 个中间着丝点染色体、5 个近端着丝点染色体和 22 个末端着丝点染色体, 这与江苏石蒜和香石蒜的染色体核型类似, 表明陕西石蒜也为一个杂交起源种。根据染色体核型和野生群体分布种类的情况, 推测陕西石蒜可能是中国石蒜与未减数分裂或四倍体石蒜的杂交后代。

关键词:石蒜属; 陕西石蒜; 染色体核型

石蒜属(*Lycoris* Herb.) 隶属于石蒜科(Amaryllidaceae), 全世界共包含 20 种左右, 其中 15 种为中国特有种; 分布于从中国至日本和韩国的温带和亚热带地区, 少数种类可以分布至印度北部和尼泊尔^[1]。众所周知, 石蒜属所有的种类都是先花后叶型的^[2], 而且在自然状态下很容易相互杂交, 目前分类学上确定的一些种为杂交起源种。

从 20 世纪 20 年代起, 为了研究石蒜属植物染色体核型的进化趋势和系统发育学, 绝大多数种的染色体核型已被研究并报道。换锦花(*L. sprengeri*) 的染色体核型为 $2n=22A=22^{[3-4]}$, 红蓝石蒜(*L. haywardii*) 的染色体核型为 $2n=22A=22^{[4-5]}$, 鹿葱(*L. quamigera*) 的染色体核型为 $2n=6M+10T+11A=27^{[3-4]}$, 香石蒜(*L. incarnata*) 的染色体核型为 $2n=4M+3T+$

$22A+1m=30^{[3]}$, 安徽石蒜(*L. anhuiensis*) 的染色体核型为 $2n=6M+10T=16^{[6]}$, 长筒石蒜(*L. longituba*) 的染色体核型为 $2n=6M+10T=16^{[4]}$, 短蕊石蒜(*L. caldwellii*) 的染色体核型为 $2n=6M+10T+11A=27^{[4,7]}$, 中国石蒜(*L. chinensis*) 的染色体核型为 $2n=6M+10T=16^{[4,8-9]}$, $3n=9M+11t+4T=24^{[10]}$, 忽地笑(*L. aurea*) 的染色体核型为 $2n=10M+2T=12^{[11]}$, $2n=9M+4T=13^{[12]}$, $2n=8M+6T=14^{[4]}$, $2n=7M+8T=15^{[12]}$, $2n=7M+1A+7T=15^{[3]}$ 和 $2n=6M+10T=16^{[4]}$, 乳白石蒜(*L. albiflora*) 的染色体核型为 $2n=5M+1T+11A=17^{[3,8]}$ 和 $2n=5M+1T+11A+1m=18^{[3]}$, 江苏石蒜(*L. houdyshelii*) 的染色体核型为 $2n=3M+6T+21A=30^{[7]}$ 和 $2n=3M+5T+22A=30^{[3]}$, 石蒜(*L. radiata*) 的染色体核型为 $2n=22A=22^{[3,4,13-18]}$, $2n=33A=33^{[3,4,12,14-16,19-24]}$, $2n=1M+31A+1m=33^{[3,25]}$ 和 $2n=31A+1M'=32^{[3]}$, 玫瑰石蒜(*L. rosea*) 的染色体核型为 $2n=22A=22^{[4,26]}$ 。时至今日, 一些石蒜属植物的染色体核型由于模式标本和野生个体的缺失仍然未见报道, 尤其是陕西石蒜和广西石蒜。

收稿日期: 2018-09-20

基金项目: 杭州市科技发展计划项目(20152231E02); 杭州西湖风景名胜区(市园文局)科技发展计划项目(2014-002)。
第一作者简介: 张鹏翀(1982-), 男, 硕士, 高级工程师, 从事石蒜属植物种质资源收集和育种、栽培等研究工作。E-mail: zhang-pengchong@163.com.

Abstract: The leaf stems of *Dicrocaulon ramulosum* (L. Bolus) Ihlenf were used as explants to compare the effects of different sterilization methods, as well as the effects of different hormone concentrations on the induction of shoots and roots. The results showed that the tissue culture did not pass through the callus stage. The optimal medium for shoot induction, bud subculture and root induction was MS+6-BA 8.325 mg·L⁻¹+NAA 16.65 mg·L⁻¹, MS+6-BA 2.4 mg·L⁻¹+NAA 9.6 mg·L⁻¹, and 1/2 MS+6-BA 1.2 mg·L⁻¹+NAA 4.8 mg·L⁻¹, respectively. The in vitro rapid propagation system of *Dicrocaulon ramulosum* (L. Bolus) Ihlenf was expected to be used in the tissue culture of other plants within the Aizoaceae family.

Keywords: *Dicrocaulon ramulosum* (L. Bolus) Ihlenf; tissue culture; stem; bud induction; root induction