

中华补血草的组织培养和快速繁殖体系的优化

陈世华, 张霞, 赵彦修, 张慧 (山东师范大学生命科学学院, 山东济南 250014)

摘要 以中华补血草为试材, 通过优化激素配比证明: 适宜补血草诱导植株再生的一次成芽培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L; 对诱导再生植株生根激素的筛选结果表明, 最适生根激素为 IBA, 其适宜浓度为 0.1 mg/L; 生根培养基为 MS + IBA 0.1 mg/L。

关键词 中华补血草; 叶片; 茎; 组织培养;

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)19-4885-02

Optimized System of Tissue Culture, Rapid Propagation of *Limonium sinense*

CHEN Shi-hua et al (College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014)

Abstract We optimized the tissue culture and rapid propagation system of *Limonium sinense*. The rapid propagation and large amount of adventitious buds from explants leaf or pedicels in a short period can be realized only in MS medium with 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA. The optimized medium for root induction was MS + 0.1 mg/L IBA.

Key words *Limonium sinense*; Optimization; Tissue culture

中华补血草 [*Limonium sinense* (Girard) Kuntze] 属蓝雪科、补血草属多年生草本植物。该植物耐盐、耐湿、耐干旱、耐瘠薄, 可在沙壤地、盐碱地和滨海滩涂等盐渍化程度较高的土壤中生长。既可用作鲜切花同时又是理想的天然干花材料。中华补血草还是药用植物, 具有祛湿、清热、止血、温中健脾、滋补强壮之功效。研究中华补血草组织培养技术, 有助于建立适宜于药用、干鲜切花等不同用途的优良品种培育及再生快繁体系, 也可在此基础上建立补血草的遗传转化技术平台, 为利用补血草进行植物耐盐基础研究奠定基础。补血草属的个别物种的组织培养虽有报道^[1-3], 但尚未见到关于中华补血草的报道。并且已有的报道中, 多选用幼嫩花序、种子或茎(带腋芽的)为培养材料, 有较大的局限性, 芽分化效率也并不理想。笔者对该植物的组织培养进行了优化。

1 材料与方

1.1 培养条件 温度 20~25℃, 开始诱导愈伤组织时暗培养; 诱导不定芽分化初期光照 8 h/d, 光照强度 1 000~1 500 lx; 不定芽分化时光照 12 h/d, 光照强度 2 000~3 000 lx。培养基中琼脂 8 g/L, 糖 30 g/L, pH 值 5.8。

1.2 外植体材料的灭菌^[4-6] 选取中华补血草幼嫩的地上部叶片或茎为材料, 自来水流水冲洗 5 min, 用 70% 酒精消毒 30 s, 0.1% 升汞溶液消毒 7~10 min, 无菌水冲洗 4~5 次。

1.3 芽的诱导 灭菌处理的外植体材料在无菌条件下将叶片切成长 1.0~1.5 cm 的小段, 接种于含激素的 MS 芽诱导培养基中, 芽诱导培养基设不同种类的生长素、细胞分裂素的组合及不同的生长素、细胞分裂素浓度组合(表 1)。实验中, 50 块实验材料(外植体块)为 1 个处理, 接种到含不同激素的芽诱导培养基中。

1.4 不定芽的生根诱导 在 1/2MS、MS 基本培养基分别添加不同浓度的 IBA、IAA 或 NAA, 探讨对中华补血草不定芽生根的影响。实验处理组合见表 2。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合及浓度对诱导不定芽分化的影响 实验结果表明(表 1): MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L 培养基上

芽诱导效果最佳。该实验组中, 外植体平均分化率为 94%, 培养至 6 d, 叶片或茎段两端开始产生愈伤膨大, 多数培养材料第 10 天开始出现具有致密芽点的浅黄绿色粒状愈伤组织, 15 d 左右出现不定芽, 20 d 后逐渐分化出长出叶片的小芽, 30 d 左右每块叶片或茎段外植体可产生大量的丛生芽, 最少的可产生 60 多个不定芽, 多者达 200 个不定芽, 平均出芽率为每块培养材料 110 株(图 1)。

表 1 各处理对中华补血草外植体分化不定芽的影响

6-BA mg/L	生长素	浓度 mg/L	外植体 分化不		芽生长状况
			分化数 %	定芽数 个	
0.5	IAA	0	30	6.3	绿、正常
		0.1	56	28	绿、健壮
		0.2	66	34	绿、健壮
		0.3	60	59	绿、生长迟缓
		0.4	60	55	绿、生长迟缓
	NAA	0.5	56	36	黄、弱、多枯死
		0	36	15	绿、健壮
		0.1	86	78	绿、健壮同时出现不定根的分化
		0.2	88	76	绿、健壮同时出现不定根的分化
		0.3	76	60	绿、生长迟缓同时出现不定根的分化
IBA		0.4	74	56	绿、生长迟缓同时出现不定根的分化
		0.5	68	40	绿、生长迟缓同时出现不定根的分化
		0	38	12.5	黄、弱、多枯死
		0.1	94	110	绿、健壮
		0.2	90	85	绿、健壮
		0.3	87	80	绿、健壮
		0.4	87	80	绿、健壮
		0.5	79	60	绿、健壮

2.2 不定芽增殖 在 MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L 芽诱导培养基上, 可一次性诱导产生不定芽, 不需要愈伤组织诱导、不定芽诱导和不同培养基的培养过程。不定芽分化过程中外植体只出现较短时间愈伤阶段, 随后很快分化出芽点。从外植体诱导出愈伤组织到不定芽分化形成小植株只有 20 d 左右。外植体培养 25 d 左右即可发育形成大量带有 2~4 片叶的不定芽, 且不定芽生长健壮。将丛生的不定芽小心分开转到生根培养基上壮苗培养 10~15 d 即可获得大量健壮小苗, 切剩下的较小的不定芽和未分化好的微小不定芽可转接到新的不定芽诱导培养基上继续用于不定芽的分

化扩繁。



注:A培养30 d的外植体上分化的不定芽;B培养5 d的外植体愈伤分化情况;C、D示腐殖土和沙培介质中移栽组培苗的生长情况;左侧分别为腐殖土中移栽组培苗地上和地下部分的生长情况,右侧是沙培介质中移栽组培苗生长情况。

图1 优化培养基上不定芽的分化及不同的移栽介质对组培苗生长的影响

2.3 植物生长素对诱导不定芽生根的影响 选用1/2MS、MS基本培养基分别添加IBA、IAA或NAA,对3种激素的不同浓度进行生根比较,实验表明,MS培养基较1/2MS培养基更利于不定芽的生根。表2列出了不定芽在MS基本培养基分别添加IBA、IAA或NAA的生根情况,由表2可看出:植物激素的种类和浓度对中华补血草不定芽的生根影响很大。3种激素中IAA对再生苗的生根诱导速率最高,生根速度较其他2种快2~4 d,生根率高达97%(生根培养22 d统计结果),最适宜浓度为0.3 mg/L;但生长后期不定根上产生侧根的数量少于添加同浓度的IBA的生根培养基上的再生苗,苗的长势也弱于在含IBA的生根培养基上生长的再生苗。3种生长素中以NAA的生根效果最差。

2.4 试管苗移栽及管理 生根培养25 d左右,多数试管苗可长到4~6片叶,具有10~20条根。此时,可将瓶口绑扎物除去并逐步打开瓶口,置于常温下(冬季15℃以上)炼苗2~3 d。此后,取出苗小心洗净根部的培养基,移栽到细河沙土中,移栽初期,光线不要太强,3~5 d后移到光线充足之处。1周后小苗生长加快,没有缓苗期。此后可视培养介质的湿度浇灌Hogland,河砂介质同土壤或其他介质相比可较好地避

免育苗初期易出现的霉菌引起的烂苗现象。移栽苗成活率显著提高,可达93%以上。

表2 不同处理对中华补血草不定芽生根的影响

生长素	浓度 mg/L	不定根诱导率 %	不定根数量 个	侧根数量 个	生根天数 d
IAA	0.1	18	*		7
	0.2	64	**	*	7
	0.3	86	***	*	7
	0.4	78	**	*	7
IBA	0.1	86	*	*	9
	0.2	76	***	**	9
	0.3	74	****	***	9
	0.4	68	***	**	9
NAA	0.1	74	*		11
	0.2	64	**	*	11
	0.3	64	**	*	11
	0.4	58	*		11

注:每种处理的生根苗为50株;不定根诱导率为生根培养15 d统计值;侧根数指不定根上产生的侧根数;不定根诱导率=生根苗数/总苗数(%);生根天数,从开始生根统计的天数;*示偶有根发生,数量极少;**1~5条,数量少;***5~10条,数量较大;****10~20条,数量很大。

3 结论与讨论

通过优化激素配比证明适宜补血草诱导植株再生的一次成芽培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L;再生苗生根诱导培养基的筛选结果表明:最适生根激素为IBA,其适宜浓度为0.1 mg/L;生根培养基为MS+IBA 0.1 mg/L。中华补血草组织培养和快速繁殖体系的建立和优化,可实现丛芽大量增殖,短期内即可得到大量再生植株,为快繁及遗传转化奠定了基础。

参考文献

- [1] 那淑芝,李云祥,甄占萱,等.二色补血草的组织培养与快速繁殖[J].承德民族师专学报,2003,23(2):79-80.
- [2] 陈佳瀛,杜秀达.补血草的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2002,38(6):594.
- [3] 李凤琴.黄花补血草的组织培养技术[J].中国沙漠,1995,15(2):198-200.
- [4] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科技出版社,1996:45-67.
- [5] 张献龙,唐克轩.植物生物技术[M].北京:科学出版社,2004:178-179.
- [6] HS查夫拉.植物生物技术导论[M].许亦农,麻密,译.北京:化学工业出版社,2005:38-52.

(上接第4880页)

mg/ml 2,4-D处理的黄瓜种子(图3)茎部形成环状畸形细胞,有明显的刺激生长的作用。2.278 mg/ml 2,4-D处理的黄瓜种子(图4)较为瘦小发黄,有明显的抑制生长作用。

3 讨论

该实验是将黄瓜种子浸泡于药液当中,故测定结果比田间实际抑制作用要强,仅供室内测定参考。

试验结果表明,2,4-D对黄瓜种子鲜种的抑制作用随浓度的增加而逐渐增强,浓度为0.133 mg/ml时对种子的刺激

生长作用最大,且引起明显的茎部畸形。也就是说,如果土壤中2,4-D的浓度在0.133 mg/ml左右,不但对黄瓜种子的发芽没有抑制作用,反而会有增重和致畸作用。

参考文献

- [1] 李明.农药商品管理与应用[M].北京:中国农业出版社,2002.
- [2] 慕立义.植物化学保护研究方法[M].北京:中国农业出版社,1994.
- [3] 马式廉,袁树忠.黄瓜种子芽长对6种酰胺类除草剂敏感性测定[J].杂草科学,1994(1):8.
- [4] 李永红,刘斌.除草活性筛选方法规范化研究(II)——油菜平皿法[J].浙江化工,2000(31):105-107.

本刊提示 来稿请用国家统一的法定计量单位的名称和符号,不要使用国家已废除了的单位。如面积用 hm^2 (公顷)、 m^2 (平方米),不用亩、尺2等;质量用t(吨)、kg(千克)、mg(毫克),不再用担等;表示浓度的ppm一律改用 mg/kg 、 mg/L 或 $\mu\text{L/L}$ 。