

文章编号: 1001-3776 (2008) 05-0020-05

双色茉莉茎段离体培养再生植株的研究

王玲平¹, 魏海龙², 石大兴^{3*}, 王米力³

(1. 浙江省农业科学院蔬菜研究所, 浙江 杭州 310021; 2. 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023;
3. 四川农业大学, 四川 雅安 625014)

摘要: 以双色茉莉茎段为外植体, 探讨外植体取材季节和部位、基本培养基种类、植物生长调节剂组合、活性炭等对茎段器官发生和植株再生的影响。结果表明: 在4月和10月取材最好, 其诱导率分别达到了92.78%和84%, 污染率最低; 1/2MS + 0.01 mg/L NAA + 3.0 mg/L BA + 2.0 mg/L KT 培养基最适合不定芽的诱导分化, 不定芽分化率达到了88.34%; 在继代增殖培养中, 继代次数最好在6代以内, 否则增殖率下降, MS + 0.5 mg/L IBA + 3.0 mg/L BA + 0.2%活性炭培养基最适合不定芽的增殖(5.92)和大于2 cm芽的分化(47.16%)。不定芽可在1/2MS培养基中有效伸长, 适宜的生根培养基为1/2MS + 1.0 mg/L IBA + 0.2 mg/L BA, 生根率达到100%。

关键词: 双色茉莉; 茎段; 离体培养; 组织培养; 再生植株

中图分类号: S685.16

文献标识码: A

In Vitro Plant Regeneration From *Brunfelsia latifolia* Stem

WANG Ling-ping¹, WEI Hai-long², SHI Da-xing³, WANG Mi-li³

(1. Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021;
2. Zhejiang Forestry Academy Hangzhou 310023, Hangzhou; 3. Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Study was made on effect of stem collection season and part, basic medium, regulator combinations and activated carbon on in vitro plant regeneration of *Brunfelsia latifolia*. The result showed that shoot induction rate could reach 92.78% and 84% respectively with the lowest pollution rate by the stems collected for explant in April and October. 1/2MS + 0.01mg/L NAA + 3.0mg/L BA + 2.0mg/L KT was the optimum medium for adventitious bud induction, topping 88.34% of differentiation ratio. The optimum medium for bud proliferation and differentiation was MS+0.5mg/L IBA+3.0mg/L BA+0.2% + 0.2% activated carbon and subculture generation was six. Adventitious buds could effectively grow in 1/2MS medium. Rooting rate topped 100% with 1/2MS + 1mg/L IBA + 0.2mg/L BA.

Key words: *Brunfelsia latifolia*; stem; culture in vitro; plant regeneration

双色茉莉又名鸳鸯茉莉 (*Brunfelsia latifolia*), 属茄科 (Solanaceae) 鸳鸯茉莉属 (*Brunfelsia*), 原产美洲热带, 目前我国广泛栽培。常绿灌木, 株高1 m左右。叶互生, 全缘, 叶柄短, 叶片矩圆形, 先端圆形。花单生或数朵聚生, 初开时蓝紫色, 渐变为淡蓝色至白色。花冠筒细长, 花冠平展成高盆状, 花期4-10月。性喜温暖湿润气候, 不耐寒。要求肥沃疏松、排水良好的微酸性土壤。喜肥, 不耐涝, 不耐强光^[1,2]。

双色茉莉的常规繁殖可以采用有性繁殖和无性繁殖。但由于其只开花不结实或结实很少, 这限制了双色茉莉的有性繁殖及其发展规模。故双色茉莉在生产上多采用一般扦插和高空压条繁殖方法, 不但操作程序繁琐, 成本高且繁殖系数小, 生根率仅有8.9%, 且生根所需时间长, 扦插苗长势差, 成苗率低, 致使这一珍贵花卉,

收稿日期: 2008-04-22; 修回日期: 2008-08-10

作者简介: 王玲平 (1975-), 女, 山西洪洞人, 助理研究员, 博士, 从事植物分子生物学育种研究; *通讯作者。

不能大量发展^[3]。为了迅速发展这种色香俱全的珍贵花卉, 采用组织培养具有一定的理论和实践意义。

1 材料和方法

1.1 供试材料

以四川农业大学林木遗传实验室苗圃的 2~3 年生盆栽双色茉莉实生苗为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒方法和培养条件 将茎段用消洗灵漂洗 5 min, 经流水冲洗 1.5 h, 在超净工作台上用 75%酒精表面消毒 10 s, 0.1%HgCl₂ 浸泡 10 min, 用无菌水冲洗 4~5 次, 剪成 2 cm 左右长的茎段接种于预先准备好的培养基中。pH 值 5.8, 培养温度为 25℃±2℃, 每天光照 12 h, 光强 2 000 lx。

1.2.2 外植体的选择 分别在 4 月 15 日、6 月 15 日、7 月 15 日、8 月 15 日、10 月 15 日取材。接种于 MS 附加 BA2.0 mg/L、NAA 0.05 mg/L、糖 30 g/L、琼脂 7.0 g/L 的培养基上诱导不定芽, 每试管接 1 个茎段, 共接 50 管。

1.2.3 初代培养 将灭菌后长度 2 cm 的茎段, 置于不定芽诱导培养基上培养。以 1/2MS (MS 大量元素减半) 为基本培养基, 将不同浓度 NAA、BA 和 KT 组合后, 加入基本培养基中进行不定芽诱导, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 3 个, 重复 3 次。观察分化情况, 统计分化率。

1.2.4 继代增殖培养 当茎段分化的不定芽长至 3cm 以上时, 将其切下置于继代增殖培养基上培养。采用 4 因素 3 水平的正交设计 L₉ (3⁴) (表 1) 筛选培养基、激素对双色茉莉芽增殖的适用量。每处理接种 6 瓶, 每瓶接种 5 株芽苗, 重复 3 次。统计各处理换瓶时的总芽数、35 d 时的芽总数、大于 2 cm 的芽数。

1.2.5 生根培养 当在继代培养基上的茎芽高度达 3~5 cm 时, 从茎基部切下, 转接至生根培养基中进行生根诱导。基本培养基为 1/2MS、糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L, 将不同浓度 BA、NAA 和 IBA 组合后, 加入基本培养基中进行不定芽诱导。每处理接种 6 瓶, 每瓶接种 5 个, 重复 3 次。45 d 后, 统计各处理的生根率、平均根数, 测量各处理的平均根长。

1.2.6 试验数据的统计与分析 采用 SPSS for windows 10.0 统计软件对试验观察数据进行方差分析。污染率、诱导率、分化率、生根率、平均根数、平均根长、增值系数和大于 2 cm 芽数分化率分别按下式计算:

污染率 = 污染数/接种总数 × 100%

诱导率 = 未污染外植体启动数/未污染外植体总数 × 100%

分化率 = 未污染外植体分化数/未污染外植体总数 × 100%

生根率 = 未污染生根株数/未污染诱导培养株数 × 100%

平均根数 = 未污染生根总数/未污染生根株数 × 100%

平均根长 = 未污染生根单苗根总长/未污染生根单苗总根数 × 100%

增值系数 = 35d 时芽总数/换瓶时总芽数

大于 2 cm 芽数分化率 = 大于 2 cm 芽总数/35d 时芽总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同季节对双色茉莉茎段不定芽诱导和污染的影响 (图 1)

季节的变化对外植体再生的影响很大, 由图 1 可以看出, 双色茉莉在 4 月和 10 月取材都能达到较高的诱导率, 最高可达 92.78%, 并且污染率也较低; 6 月、7 月和 8 月的诱导率低于 70%, 但污染率较高, 尤其是 7 月其污染率最高达 60.05%。

表 1 因子水平

Table 1 Factors and levels of L₉(3⁴)

因素	水平		
	1	2	3
培养基	MS	改良 MS*	1/2MS
BA/mg · L ⁻¹	1	3.0	5.0
IBA/mg · L ⁻¹	0	0.5	1.0
活性炭/%	0	0.2	0.5

注: 改良 MS: 其他成分不变, Fe 加倍。

2.2 不同激素组合对双色茉莉茎段不定芽分化的影响 (表 2、表 3)

从表 2、表 3 可以看出,不同激素不同浓度对不定芽分化率影响差异较大,其中处理 10 的不定芽的分化率最高,为 90.24%,处理 14 的不定芽的分化率其次,为 88.34%,两种处理的芽诱导分化率仅相差 1.9%,表明两种细胞分裂素 BA 和 KT,以 BA 对双色茉莉的不定芽分化作用大,KT 仅起辅助作用,此结果与潭文澄多年的研究结果一致^[4]。方差分析也表明 BA、NAA 对不定芽的分化率有显著性影响,而 KT 对不定芽的分化率无显著性差异。因此,在本试验的 16 个处理中,以 1/2MS+0.01 mg/L NAA+3.0 mg/L BA+2.0 mg/L KT 或 1/2MS+0.01 mg/L NAA+2.0 mg/L BA 为最佳处理。

2.3 双色茉莉不定芽在不同处理培养基上的继代增殖效果 (表 4、表 5)

2.3.1 不同培养基、激素浓度与活性炭对双色茉莉不定芽增殖生长的影响 继代增殖培养是木本植物组织培养的最关键环节,芽的增殖是建立试管无性系的基本物质基础,但芽的增殖还要伴随芽的分化,才能保证有足够的有效苗繁殖成苗。从表 4、表 5 可以看出,不论是对于芽的增殖诱导还是对于大于 2 cm 芽的分化,BA 和 IBA 的效应都是显著的,以 3.0 mg/L BA、0.5 mg/L IBA 的效果最好;就芽的增殖诱导而言,培养基之间,差异显著,但活性炭之间差异不显著,而对于大于 2 cm 芽分化反之。在 9 个处理中,增殖系数最高的为处理 6,增殖系数 6.43,但大于 2 cm 芽分化率低,为 30.43%,处理 2 增殖系数次之,为 5.92,但大于 2 cm 芽分化率高,为 47.16%,因此,既有利于芽的增殖诱导,又能提高大于 2cm 芽的分化的培养基为处理 2。

2.3.2 双色茉莉不定芽的继代代数对增殖系数的影响 继代增殖周期为 35 d,观察发现 (图 2),最初继代时,生长缓慢,分化丛生芽较少,继代 2 代后,增殖率提高,当继代到第 6 代时,增殖率开始下降。这可能是由于

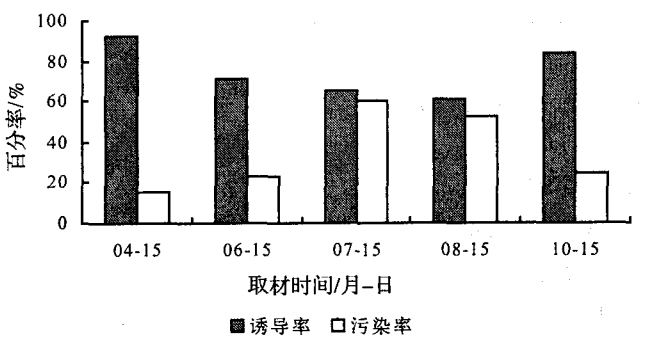


图 1 取材季节对外植体不定芽诱导率和污染率的影响
Figure 1 Effect of stem collection season on adventitious bud induction rate and contamination rate of *B. latifolia*

表 2 不同浓度 NAA、BA 和 KT 对双色茉莉茎段不定芽分化的影响
Table 2 Effect of NAA、BA and KT concentration on the adventitious bud induction from *B. latifolia* stem

处理	NAA /mg · L ⁻¹	BA /mg · L ⁻¹	KT /mg · L ⁻¹	分化率 /%
1	0	0	0	8.33
2	0.01	1	1	30.13
3	0.10	2	2	35.71
4	0.20	3	3	34.25
5	0	1	2	16.22
6	0.01	0	3	25.12
7	0.10	3	0	63.64
8	0.20	2	1	28.57
9	0	2	3	31.25
10	0.01	3	2	90.24
11	0.10	0	1	14.29
12	0.20	1	0	15.63
13	0	3	1	31.43
14	0.01	2	0	88.34
15	0.10	1	3	25.71
16	0.20	0	2	17.86

表 3 不同浓度 NAA、BA 和 KT 对双色茉莉茎段不定芽分化率的方差分析
Table 3 Variance analysis of NAA、BA and KT concentrations on adventitious bud induction from *B. latifolia* stem

变异来源	平方和	自由度	均方	F	Sig.
NAA	3 026.052	3	1 008.684	10.040	0.045
BA	3 972.393	3	1 324.131	13.179	0.031
KT	750.469	3	250.156	2.490	0.237
误差	301.414	3	100.471		
总变异	8 050.328	12			

表 4 不同培养基、激素浓度与活性炭对双色茉莉不定芽增殖生长的影响

Table 4 Effect of different medium, regulators and activated carbon on adventitious bud proliferation of *B. latifolia*

处理	培养基	BA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	活性炭 /%	增殖系数	大于 2 cm 芽 诱导率/%
1	MS	1	0	0	2.16	20.79
2	MS	3	0.50	0.20	5.92	47.16
3	MS	5	1.00	0.50	4.26	27.46
4	改良 MS	5	0.00	0.50	3.54	28.52
5	改良 MS	1	0.50	0.20	4.56	44.32
6	改良 MS	3	1.00	0.00	6.43	30.43
7	1/2MS	3	0	0.50	3.37	30.67
8	1/2MS	5	0.50	0.00	3.86	15.70
9	1/2MS	1	0	0.20	4.13	14.37

表 5 不同培养基、激素浓度与活性炭对双色茉莉不定芽增殖生长的方差分析
Table 5 Variance analysis of different medium, regulators and activated carbon on adventitious bud prliferation of *B. latifolia*

变异来源		平方和	自由度	均方	F 值	Sig.
增值系数	培养基	3.543	2	1.772	8.324	0.009
	BA	9.086	2	4.543	21.345	0.000
	IBA	3.892	2	1.946	9.143	0.007
	活性炭	1.017	2	0.509	2.389	0.147
	误差	1.916	9	0.213		
	总和	349.638	18			
大于 2cm 芽诱导率	培养基	270.254	2	135.127	3.544	0.073
	BA	321.373	2	160.687	4.215	0.050
	IBA	702.699	2	351.350	9.215	0.007
	活性炭	458.358	2	229.179	6.011	0.022
	误差	343.143	9	38.127		
	总和	15 205.044	18			

幼苗不适应继代初期较多的细胞分裂素, 导致其生长缓慢, 分化丛生芽较少; 在第 2 代时, 已适应了现有的组培环境条件, 而使增殖率提高; 到第 6 代时, 由于继代过程中有害物质的过多积累, 导致增殖率的下降。

2.4 不同激素对比对双色茉莉茎芽生根的诱导效果 (表 6)

由表 6 可以看出, 处理 1 无任何激素, 处理 5 仅使用 0.2 mg/L BA, 根的诱导效果均为零; 其它处理都有 IBA 和 NAA 参与, 其中含有 0.2 mg/L BA 的处理 6、7、8 培养基从生根率、平均根数、平均根长及芽苗生长发育状况来看, 都比不含细胞分裂素 BA 的处理 2、3、4 培养基好, 说明单一生长素虽可诱导生根, 但是分化率不高, 当与低浓度的 BA 配合使用时, 更有利于根的分化诱导; 比较 NAA 和 IBA 对根的分化诱导发现, IBA 比 NAA 的效果好, NAA 虽能促进根的生长, 生根率也高, 但形成的根往往短而细, 不正常, 并常在茎基部形成愈伤组织, 植株生长缓慢, 叶片微黄色。总体而言, 双色茉莉生根诱导的最适宜的培养基组合为处理 6 即 1/2MS + 1.0 mg/L IBA + 0.2 mg/L BA。

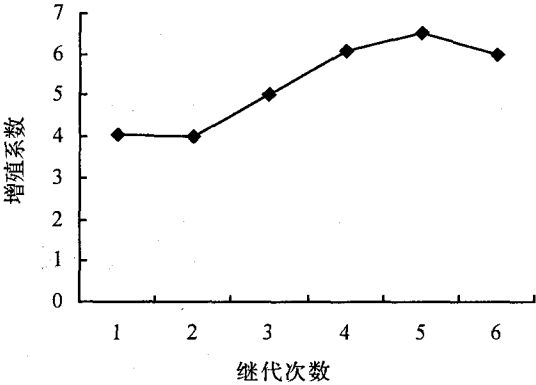


图 2 继代次数对双色茉莉不定芽增殖的影响
Figure 2 Effect subculture generations on the adventitious bud proliferation of *B. latifolia*

表 6 不同激素对比对双色茉莉根分化诱导与植株生长的影响
Table 6 Effect of different regulators on root induction and plant growth of *B. latifolia*

处理	BA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	生根率 /%	平均根数 /条	平均根长 /cm	植株生长状况
1	0	0	0	0	0	0	/
2	0	0	1	40.29	2.89	1.75	植株健康, 叶片鲜绿色
3	0	1	0	53.24	2.53	1.30	绿、有少量黄叶
4	0	1	1	50.37	3.20	2.38	植株健康, 叶片鲜绿色
5	0.2	0	0	0	0	0	/
6	0.2	0	1	100	4.96	3.05	植株粗壮, 叶片鲜绿色
7	0.2	1	0	94.27	5.30	1.62	生长缓慢, 叶片微黄色
8	0.2	1	1	70.46	3.57	2.24	植株健康, 叶片鲜绿色

3 结论与讨论

取材时间对组培苗的成败影响很大。尤其是木本植物的组织培养, 更需要考虑外植体的来源, 包括不同的个体, 不同的组织和器官以及在母株上的着生部位^[5]。双色茉莉组织培养外植体选取的试验证明在 4 月和 10 月取材芽的分化率最好, 分析其原因可能是 4 月和 10 月为春梢和秋梢萌发与旺盛生长期, 生理活性强, 所以不定芽诱导率高, 同时芽鳞随春梢或秋梢伸长脱落, 外植体表面带菌少, 故而污染率低; 6 月、7 月和 8 月双色茉莉不定芽诱导率不高, 可能是植物体内出现生长抑制剂或植物生长素、赤霉素和细胞分裂素等调节物质含量减少而致, 污染率高可能是外植体表面在生长季节中尘埃累积所致。

许多研究表明活性炭能明显促进根的伸长生长^[6,7]。但也有报道认为在增殖阶段活性炭可明显促新梢的形成

