

文章编号:1007-4961(2006)02-0124-03

地被石竹组织培养再生体系的研究

金万梅^{1,2}, 尹淑萍¹, 鲁韧强¹, 潘青华¹, 董 静¹, 张玉平¹

(1 北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093; 2 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要: 为建立地被石竹组织培养再生技术体系, 以地被石竹的叶片和茎段为外植体, MS 为基本培养基, 对影响再生的生长调节物质进行了研究。结果表明, 茎段比叶片易诱导不定芽; 叶片在 6-BA 2.0 mg/L 上不定芽的再生频率较高; 茎段在 MS+6-BA 5.0mg/L、MS+6-BA 5.0mg/L+IBA 0.1mg/L 和 MS+6-BA 5.0mg/L+IAA 0.1mg/L 上再生频率较高, 分别达 75.6%、65.0% 和 68.5%。

关键词: 地被石竹; 组织培养; 再生

中图分类号: S 681.5

文献标识码: A

Establishment of regeneration system for *Dianthus chinensis* in vitro

JIN Wan-mei^{1,2}, YIN Shu-ping¹, LU Ren-qiang¹,PAN Qing-hua¹, DONG Jing¹, ZHANG Yu-ping¹

(1 Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing, 100093, China; 2 College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing, 100094, China)

Abstract: Using leaf and stem of *Dianthus chinensis* as experimental plant tissues, MS as basal medium, regeneration system was studied. The results showed that efficiency of adventitious shoots induction from stem was higher than that from leaf; among all tests, leaf obtained the highest regeneration rate in the treatment of MS+6-BA 2.0 mg/L; the optimum medium for stem culture was MS+6-BA 5.0 mg/L, MS+6-BA 5.0 mg/L+IBA 0.1mg/L and MS+6-BA 5.0mg/L+IAA 0.1mg/L.

Key words: *Dianthus chinensis*; tissue culture; regeneration

植物组织培养是很重要的生物技术手段。植物的细胞、茎段、叶片等均可以培养。取植物的细胞、器官和组织, 置入适当培养基的容器中, 在一定的培养条件下, 可分化形成完整植株。作为生物技术有力手段的组织培养, 日益受到重视, 在农林作物的脱毒快繁、突变诱发、细胞工程和基因工程等方面都发挥着重要作用。地被石竹 (*Dianthus chinensis*) 又称常夏石竹, 是石竹科石竹属多年生草本花卉植物; 原产于西伯利亚高寒地区, 具有较强的抗干旱耐贫瘠的特点, 在各类型土壤上种植均可成活。在我国华北、东北、西北寒冷、高寒等地也易栽培。其植株丛生, 匍匐状, 植株低矮, 株高自然控制在 8~10 cm 之间, 整体外观感如早熟禾类草坪, 四季常绿, 耐低

温, 园林效果非常好, 适合栽种在大型绿地、公园、屋顶绿化、道路庭院等。关于地被石竹的组织培养, 国内外报道很少, 主要研究了地被石竹的离体成花^[1]。

植物再生是外植体和培养条件共同作用的结果, 植物生长调节物质对于植物离体再生的调节作用非常明显, 作用也最显著, 影响着离体材料的组织器官建成^[2]。本研究以地被石竹的叶片和茎段为外植体, 通过对影响再生的主要因素生长调节物质进行研究, 以建立地被石竹组织培养再生技术体系。

1 材料和方法

1.1 材料

地被石竹采自北京市农林科学院林业果树研究所

收稿日期: 2005-07-30

作者简介: 金万梅 (1971-), 女, 甘肃靖远人, 在读博士, 主要从事林果类植物基因工程研究。

苗圃内。采当年生带腋芽茎段,经流水冲洗后,用饱和的洗涤剂水浸泡3 h,无菌水冲洗后用0.1%的升汞消毒5~7 min,无菌水冲洗3次,每次5 min,接种于初代培养基(MS)上,建立试管苗无性繁殖系。选取继代25~30 d的试管苗,叶片剪去顶端和基部;取无腋芽的茎段,长约0.5 cm,作为再生的外植体。

BA、IAA、IBA、2,4-D 和 NAA 为 Sigma 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。MS 为基本培养基。

1.2 方法

1.2.1 地被石竹的离体再生研究 在预备试验的基础上,进行以下处理:

地被石竹的外植体,接种在含不同生长调节物质的培养基上,在光周期为14 h/d,光照度2 000~3 000 lx,温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的条件下进行培养,45 d后统计外植体再生芽数、不定芽再生频率。

不定芽再生频率 = 再生不定芽的外植体数/接种的总外植体数

1.2.2 不定芽的扩繁和移栽 不定芽继代培养基 MS + 6-BA 5.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L,生根和壮苗培养基为 MS + IBA 0.2 mg/L,移栽的营养土配方为土:蛭石:草木炭 = 1:1:1。

2 研究结果

2.1 不同 BA 浓度对地被石竹叶片再生不定芽的影响

表1 不同 BA 浓度对地被石竹的叶片和茎段再生不定芽的影响

Table 1 Effect of different BA concentration on shoot regeneration from leaf and stem of *Dianthus chinensis*

6-BA/ mg·L ⁻¹	再生频率/% Regeneration rate	
	叶片 Leaf	茎段 Stem
0	0b	0b
0.5	12.0 a	12.0 d
1.0	15.5 a	15.5 d
2.0	16.3 a	46.3 c
3.0	14.4 a	45.1 c
4.0	12.9 a	52.7 b
5.0	13.6 a	75.6 a
10.0	12.2 a	68.2 a
15.0	13.0 a	53.0 b
20.0	10.8 a	58.8 b

不同字母表示 $P \leq 0.05$ ($n = 45$) 显著性差异。

地被石竹的叶盘和茎段,接种在含不同浓度细胞分裂素6-BA的培养基上,开始切口褐化,经过7 d的培养,褐化逐渐减轻。10 d后切口膨大,出现绿色或黄绿色愈伤组织(图1),继续培养,部分外植体

分化出不定芽。不定芽大量发生的时间为接种后25~35 d。叶盘不定芽(图2)再生频率在0.5~20.0的各个处理上变化不大,为10.8~16.3之间。但对茎段而言,不定芽(图3)再生频率变化较大,为12.0~75.6之间。从表1可以看出,在不同浓度的细胞

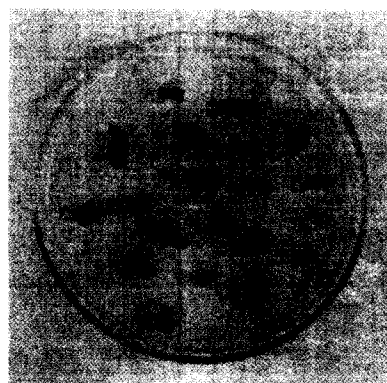


图1 叶片愈伤组织的诱导

Fig. 1 Callus induction with leaf of *Dianthus chinensis*

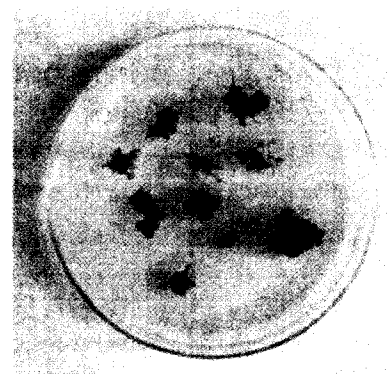


图2 叶片不定芽的诱导

Fig. 2 Induction of adventitious bud with leaf of *Dianthus chinensis*

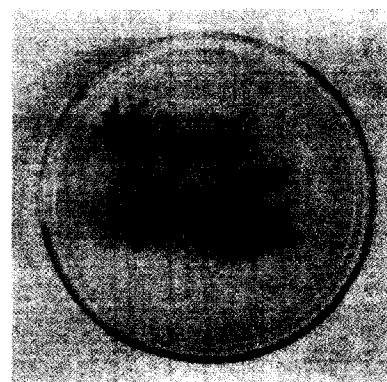


图3 茎段不定芽的诱导

Fig. 3 Induction of adventitious bud with stem of *Dianthus chinensis* 分裂素的处理中,叶片较适再生不定芽的培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L,而茎段在 MS + 6-BA 5.0 mg/L 再生频率最高,并且高浓度(5~10 mg/L)的6-BA有利于茎段再生。总的来说,叶片比茎段再生困难。

2.2 BA与不同生长素配比对地被石竹外植体再生不定芽的影响

在大量试验的基础上,将6-BA 2.0 mg/L(叶片)和5.0 mg/L(茎段)分别与4种浓度0.1、0.5、1.0、1.5 mg/L的生长素2,4-D、NAA、IBA、IAA相组合,观察其对地被石竹外植体再生不定芽的影响。由表2可看出,随2,4-D浓度的增大,在0.5、1.0、1.5 mg/L处理上,其叶片和茎段难以再生不定芽,当2,4-D为0.1 mg/L时,叶盘和茎段的再生频率分别为11.0%和16.8%;在BA和NAA的组合中,在NAA浓度为0.1和0.5 mg/L时,可以再生出不定芽,但叶盘和茎段不定芽再生频率不高,分别为9.4%、3.0%和16.8%、8.3%,NAA浓度为1.0、1.5 mg/L时、叶盘和茎段无不定芽产生;在BA和IBA、IAA的组合中,叶盘和茎段均可以再生出不定芽,总的趋势随着IBA浓度的增加,不定芽再生频率下降。但BA在IBA和IAA组合中,茎段再生频率达到较高的水平。

表2 BA与不同浓度的生长素对地被石竹叶片和茎段再生不定芽的影响

Table 2 Effect of BA and auxin at different concentrations on shoot regeneration from leaf and stem of *Dianthus chinensis*

生长素/(mg·L ⁻¹) Growth regulator	再生频率/% Regeneration rate	
	叶片 Leaf disk	茎段 Stem
2,4-D 0.1	11.0 a	18.5 d
2,4-D 0.5	0 c	0 f
2,4-D 1.0	0 c	0 f
2,4-D 1.5	0 c	0 f
NAA 0.1	9.4 ab	16.8 d
NAA 0.5	3.0 b	8.3 e
NAA 1.0	0 c	0 f
NAA 1.5	0 c	0 f
IBA 0.1	12.6 a	65.0 a
IBA 0.5	10.8 a	58.2 a
IBA 1.0	5.5 b	33.7 c
IBA 1.5	4.7 b	30.6 c
IAA 0.1	13.2 a	68.5 a
IAA 0.5	12.3 a	60.1 a
IAA 1.0	6.9 b	46.9 b
IAA 1.5	5.6 b	35.5 c

不同字母表示 $P \leq 0.05$ ($n = 45$) 显著性差异。

由此可见,低浓度的生长素对地被石竹外植体不定芽分化比较有利,高浓度的生长素则不利于不定芽的分化。4种不同的生长素与BA的组合,2,4-D和NAA不利于地被石竹不定芽的再生,而IBA和IAA则对不定芽分化较好。

综合以上研究发现,叶片在MS+6-BA 2.0 mg/L

上不定芽的再生频率较高;茎段在MS+6-BA 5.0 mg/L、MS+6-BA 5.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L和MS+6-BA 5.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L上再生频率较高,分别达75.6%、65.0%和68.5%。

2.3 地被石竹不定芽的继代和生根移栽

将地被石竹的丛生芽分割成单芽,接种在MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L培养基上,7 d以后开始增殖,1个月后,各瓶均可形成满瓶丛生芽。将丛生芽的单芽接种在MS+IBA 0.2 mg/L,10 d后开始生根,20 d后90%的植株生根。生根苗在温室中炼苗3~5 d,采用消毒处理的土:蛭石:草木炭=1:1:1配方营养土,将生根苗移栽,成活率达95%。

3 讨论

外植体是影响植物离体高频再生体系的主要因素之一。外植体的类型、取材时间、年龄、极性,都是其再生的限制因素。许多研究结果表明,对某一种特定的植物来说,采用一定的外植体类型,容易再生出小植株。本试验以地被石竹的叶片和茎段为外植体,发现茎段比叶片容易再生不定芽。

植物生长调节物质,对于植物离体再生的调节作用非常明显,作用也最显著。使用得最普遍的是生长素类物质和细胞分裂素类物质。在植物离体再生过程中,常用的生长素类物质有2,4-D、NAA、IBA、IAA等,其生理活性强弱顺序为2,4-D>NAA>IBA>IAA。植物离体再生,是外植体内激素与体外环境中生长调节物质的共同作用的结果,生长调节物质调节着植物离体再生的方向^[3]。在本试验中发现,在细胞分裂素浓度较高时,易形成黄绿色颗粒状紧凑的愈伤组织,这种愈伤组织容易分化出不定芽;而在BA浓度一定,2,4-D浓度较高时,易形成白色疏松状的愈伤组织,这种愈伤组织经过一定的诱导可以形成胚状体。对地被石竹而言,寻求合适的激素组成和配比,对提高离体再生频率尤为重要。较高浓度的细胞分裂素,有利于地被石竹茎段不定芽的诱导,与生长素IBA和IAA配合使用,效果也不错。

参考文献:

- [1] 李明. 中国石竹离体成花[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(5): 423.
- [2] 谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(3): 238-244.
- [3] 曹政义, 刘国民. 植物组织培养教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996.

(编辑 杨华生)