

小玉竹组织培养及无性系的建立

张卓,姜巍,张巍巍,佟少明,姜长阳*

(辽宁师范大学生命科学院,辽宁大连 116029)

摘要:以小玉竹根茎为外植体,以MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA,2,4-D,IAA,NAA,诱导根茎形成愈伤组织,并使愈伤组织分化形成不定芽,培养成生根试管苗,建立起小玉竹无性系。结果表明,MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 1.0 mg/L是根茎愈伤组织诱导的理想培养基;MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L是愈伤组织和不定芽分化培养的理想培养基;1/3MS+IAA 0.4 mg/L是试管苗生根培养的理想培养基。

关键词:小玉竹;组织培养;愈伤组织;无性系

中图分类号: R282.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)03-0092-04

Tissue Culture and Establishment of Asexual System for *Polygonatum humile* Fisch

ZHANG Zhuo,JIANG Wei,ZHANG Wei-wei,TONG Shao-ming,JIANG Chang-yang*

(College of Life Science,Liaoning Normal University,Dalian 116029,China)

Abstract: In the study,the stems and roots of *Polygonatum humile* Fisch were used as explants for tissue culture in MS medium with different concentrations of 6-BA,2,4-D,IAA,NAA to induce calluses,differentiate adventitious buds and roots,and then establish the asexual system of *Polygonatum humile* Fisch. The results indicated that the ideal medium to induce calluses was MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 1.0 mg/L; The MS medium with 6-BA 0.2 mg/L and NAA 0.2 mg/L was suitable for formation of calluses and differentiation of adventitious buds; The medium of 1/3 MS+IAA 0.4 mg/L was proper for rooting of tube seedlings.

Key words: *Polygonatum humile* Fisch; Culture of tissue; Callus; Asexual system

小玉竹(*Polygonatum humile* Fisch),属于百合科、黄精属多年生草本植物^[1]。由于小玉竹的根茎具有养阴润燥、生津止渴等功效,能治口燥咽干、干咳少痰、心烦心悸、糖尿病等疾病。所以,近年来,辽宁南部地区很多人从山林中采挖小玉竹的根茎,作为滋补营养草药食服,致使本来分布量就较少的小玉竹野生资源遭到了破坏。为此,有人对小玉竹进行人工栽培,以期解决人们对小玉竹根茎的需求和野生资源的破坏问题。但是,由此又产生了小玉竹的种子不易收集、从山上挖取根茎作为种源又会

破坏环境等问题。为此,本研究以小玉竹的根茎为外植体,探讨了激素浓度对比对愈伤组织诱导、不定芽分化、试管苗生根的影响,以建立起小玉竹的根茎无性系,满足人们栽培的需要。

1 材料和方法

1.1 材料与灭菌

将从旅顺菜大岭上采挖的生长非常旺盛的小玉竹根茎,切成长5 cm左右的根茎段,放到300 mL的磨口广口瓶中,用自来水反复冲洗30 min左右,用

收稿日期:2007-08-23

基金项目:辽宁师范大学教学改革项目(20050101123)

作者简介:张卓(1986-),女,辽宁沈阳人,本科,主要从事植物生物技术研究。

通讯作者:姜长阳(1954-),男,辽宁大连人,教授,主要从事现代生物技术研究。

0.05%安利洗涤剂振荡洗涤约 10 min,再用自来水漂洗至泡沫消失时转移到超净工作台上,加 70%酒精灭菌 10~20 s,迅速倒入无菌水,洗涤 3 次,加 0.05% HgCl₂ 振荡灭菌 1 min 后,加入等体积无菌水,继续振荡灭菌 15 min,接着用无菌水振荡洗涤 5 次,即获得无菌材料。

1.2 培养条件

以 MS 或 1/3MS 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA, IAA, NAA 和 2,4-D。以 MS 为基本培养基加蔗糖 30 g/L,以 1/3MS 为基本培养基加蔗糖 15 g/L。培养基基力强度为 180 g/cm²[2], pH 为 5.8~6.0, 培养温度 15~25℃, 光照强度 2000~3000 lx, 光照时间 10 h/d。

1.2.1 愈伤组织的诱导培养 将无菌小玉竹根茎切成约 0.2 cm 的根茎块,接种到不同浓度激素配比的 MS 培养基中,在无光照的条件下诱导球茎愈伤组织,50 d 统计诱导率。

1.2.2 分化培养 将继代培养的愈伤组织接种到不同种类、不同浓度激素的 MS 培养基中,在光照条件下进行愈伤组织的分化培养。

1.2.3 试管苗生根培养 将继代培养生长旺盛的不定芽,从基部剪下,接种到附加不同浓度 IAA 或 NAA 的 1/3MS 基本培养基上,进行生根培养。25 d 时统计生根率。

1.2.4 试管苗的移栽与扦插 选择生根试管苗生长旺盛的培养瓶,将瓶塞打开,放于 4000 lx 左右的光照下炼苗 3~4 d 后,将试管苗从培养瓶中取出,立刻用净水洗去基部的培养基,然后移栽到铺有 5~7 cm 厚珍珠岩、草炭土、炉灰渣和肥沃园土 4 种不同基质的温室苗床上。在保持温度 20~28℃、湿度 90%以上,并且没有直射光照的条件下,移栽后 7~10 d 成活,15 d 左右开始正常生长。25 d 时观察统计成活率。

把试管苗从培养瓶中取出后,剪去根部,再剪成长 2 cm 左右、至少具有 2 个叶片的茎段,把下部切口浸入 70 mg/L 的 IAA 溶液中处理 4 min 左右,然后扦插到与移栽相同的 4 种基质中,在保持与移栽相同条件下,30 d 时统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对根茎愈伤组织诱导的影响

将根茎块接种在附加不同激素的 MS 培养基上暗培养,由于切口损伤部位直接接触到培养基,培养 20 d 左右,切口表面开裂,长出较为松散的淡黄色颗

粒状愈伤组织,继续培养到 50 d 左右,在含有 2,4-D 和 NAA 的培养基上都能逐渐形成愈伤组织。但培养基不同,所形成的愈伤组织不同。由表 1 可见,不同浓度 6-BA 分别与 2,4-D, NAA 配合使用都能诱导根茎产生愈伤组织,而在 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基上,不仅愈伤组织的诱导率较高,而且所形成的愈伤组织均为黄色的颗粒状,这种愈伤组织为具有分化力的愈伤组织^[3]。把这种愈伤组织在同一培养基上进行继代培养,连续继代培养 7 代,不仅愈伤组织的外部形态保持不变,而且继代培养周期缩短为 30 d,颗粒状愈伤组织的增殖率达到了 11.2 倍(表略)。这说明 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基是小玉竹根茎愈伤组织诱导的理想培养基。

表 1 不同激素配比对愈伤组织诱导的影响

激素及浓度(mg/L)			愈伤组织诱导数	诱导率 (%)
6-BA	NAA	2,4-D		
0.0	0.0	0.0	0	0.00
0.4			0	0.00
1.0			0	0.00
1.6			0	0.00
2.2			0	0.00
0.4	1.0		67	83.75
0.4	1.5		69	86.25
0.4		1.0	72	90.00
0.4		1.5	70	87.50
1.0	1.0		56	70.00
1.0	1.5		59	73.75
1.0		1.0	61	76.25
1.0		1.5	58	72.50
1.6	1.0		41	51.25
1.6	1.5		44	55.00
1.6		1.0	45	56.25
1.6		1.5	43	53.75
2.2	1.0		32	40.00
2.2	1.5		40	50.00
2.2		1.0	39	48.75
2.2		1.5	38	47.50

注:接种数量均为 80

2.2 不同激素配比对愈伤组织分化的影响

将在 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基上继代培养的根茎愈伤组织,接种到分化培养基中进行培养。接种后 25 d,有的培养基上可见分化出不定芽,45 d 时进行统计。表 2 表明,在 6-BA 为 0.2 mg/L, NAA 分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L 的培养基上,都能诱导愈伤组织分化。其中在 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上愈伤组织颗粒分化率达 94%。观察结果还表

明,在 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上不仅分化率高,而且分化的不定芽长势较旺盛。把在此培养基上由颗粒状愈伤组织分化的不定芽从基部剪下后,接种到相同培养基上,经过 40 d 培养,接种的不定芽就会分化出生长较为旺盛的丛生不定芽,平均单芽的增殖系数为 8.4 个/芽。经过连续 8 次的继代培养,其分化率和长势基本不变。这说明 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 是小玉竹愈伤组织分化不定芽的适宜培养基。

表 2 不同激素对比对愈伤组织分化的影响

激素及浓度 (mg/L)		分化颗粒数	分化率 (%)	长势
6-BA	NAA			
0.0	0.0	0	0	
0.2	0.1	58	58	++
0.2	0.2	94	94	++
0.2	0.5	36	36	+
0.2	1.0	20	20	+
0.5		0	0	
0.5	0.1	0	0	
0.5	0.2	0	0	
0.5	0.5	0	0	
0.5	1.0	0	0	
1.0		0	0	
1.0	0.1	0	0	
1.0	0.2	0	0	
1.0	0.5	0	0	
1.0	1.0	0	0	

注:接种颗粒数均为 100,++为长势好,+为长势一般

2.3 不同浓度和种类生长素对生根培养的影响

接种 7~10 d,有的培养基能形成可见根原基,25 d 时统计生根率,结果见表 3。

表 3 不同浓度和种类生长素对生根培养的影响

生长素及浓度 (mg/L)		生根株数	生根率 (%)	每株生根数
IAA	NAA			
0.0	0.0	0	0.0	0.0
0.2		18	30.0	5.6
0.4		58	96.7	8.2
0.6		39	65.0	8.5
0.8		37	61.7	4.3
1.0		21	35.0	1.5
	0.2	48	80.0	3.9
	0.4	35	58.3	4.5
	0.6	26	43.3	3.0
	0.8	19	31.7	3.3
	1.0	12	20.0	2.2

注:接种数量均为 60

由表 3 可见,在附加不同浓度 IAA 或 NAA 的 1/3MS 生根培养基上,均可诱导小玉竹不定芽生根。但是,在附加不同浓度 NAA 的生根培养基上,不仅诱导生根率较低、生根数较少,而且所生出的根多数是由基部愈伤组织发出的,在移栽中这样的根

都属于无效根^[4]。而在附加不同浓度 IAA 的生根培养基上,不仅诱导生根率较高、生根数较多,而且所生出的根多数是由基部茎发出的。尤其是在 IAA 0.4 mg/L 的生根培养基上,试管苗的生根率达到了 96.7%,每株生根数为 8.2 个,并且生根试管苗生长旺盛。把在这一培养基上培养的生根试管苗剪成长 1~1.5 cm、至少具有一个叶片的茎段,接种到相同的培养基上进行生根继代培养,经过 25 d 的培养,又可以培养成高 5 cm 左右、生长旺盛生根试管苗。利用这种生根继代的方法试管苗生长旺盛、几乎没有无效苗、25 d 的繁殖系数为 3.4。这说明 1/3MS+IAA 0.4 mg/L 培养基是小玉竹试管苗生根培养的理想培养基。

2.4 生根试管苗的移栽与扦插

移栽后 25 d 观察统计证明,移栽到以炉灰渣为基质的苗床上,不仅移栽成活率为 94%,而且试管苗生长旺盛整齐,根系发达。

扦插 30 d 时观察统计证明,以炉灰渣为基质,不仅扦插成活率为 91%,而且长势与移栽试管苗一致。移栽和扦插试验证明,炉灰渣是小玉竹试管苗移栽和扦插的理想基质。

5 月中旬把在温室中移栽和扦插成活的试管苗移栽到田间和山林下,到 10 月下旬,林下的试管苗长势旺盛,根茎上的须根比附近的野生植株增加 1.5 倍左右;栽培于田间的试管苗长势比根茎苗旺盛整齐,根茎的收获量比根茎苗高 11%。

3 结论与讨论

虽然目前已有百合科、黄精属植物组织培养及无性系建立的报道^[5~7],但迄今未见小玉竹组织培养及无性系建立的报道。小玉竹根茎组织培养的成功,不仅证明小玉竹的非分生细胞组织也具有全能性,而且也为此种植物转基因等研究奠定了技术基础。

小玉竹根茎愈伤组织继代增殖培养 30 d 可增殖 11.2 倍,按照这个速度计算,一年的增殖数为 11.2¹²;用不定芽分化的方法进行增殖,40 d 可增殖 8.4 倍。也就是说,用这种方法进行增殖培养,一年可繁殖约 8.4⁹ 个后代;用生根继代的方法进行增殖培养,25 d 的繁殖系数为 3.4 倍,按照这个速度,每年繁殖数约为 3.4¹⁴ 株。这说明不论采用哪种方法进行繁殖,其繁殖速度都可以满足生产上所需要的大量种苗。但是,由于从愈伤组织诱导分化出的不定芽长势较弱,而且还需要经过生根阶段才能用于

石榴黑斑病的发生与防治

李宗圈¹, 郝宏卿²

(1. 巩义市河洛镇农业服务中心, 河南 巩义 451251; 2. 巩义市孝义街道办事处农业办公室, 河南 巩义 451200)

中图分类号: S665.4 文献标识码: B 文章编号: 1004-3268(2008)03-0095-02

1 发生与危害

石榴黑斑病(*Cercospora punicae* P. Henn), 又名石榴褐斑病、角斑病。其主要危害石榴叶片和果实, 国内过去多报道南方石榴产区普遍发生, 而近年北方石榴产区也多有发生, 个别园地十分严重。据调查, 巩义产区个别未防治的石榴园病叶率达 86.6%~98.9%; 病果率 2004 年为 8.1%, 2005 年为 31.7%, 2006 年为 92.6%, 2007 年为 94.8%, 呈逐年加重的趋势。石榴树感病后, 造成树体早期落叶, 果实有黑斑, 树势衰弱, 产值低下, 损失严重。

2 感病症状

石榴叶片感病, 初期叶面上出现针眼状的黑褐色小斑点, 后逐渐扩大为圆形、方形、多角形等不规则斑块, 其大小为 0.3~0.5 mm×3.0 mm, 后期叶面病斑为灰褐色或深褐色至黑色边缘常呈黑线状,

通常情况 1 片叶上分散着数个黑斑, 严重时 1 片叶上达 10 多个病斑。

石榴果实感病, 病斑形状与叶片大体相似, 但病斑的大小却相差甚大, 小的病斑只有绿豆大小, 直径为 3~4 mm, 大的病斑 1~2 cm, 严重者病斑覆盖整个果面的 1/2 左右。病斑颜色为黑色, 呈微凹状, 着色品种病斑边缘呈浅黄色, 从树冠不同部位的感病程度来看, 以下部感病较重, 中部次之, 上部最轻, 这可能与下部叶果与果园地表残留病叶、病果接触最近而首先受到侵染且树冠下部的高温高湿有利于黑斑病菌侵染有关。

3 病原菌

石榴黑斑病的病原菌为石榴生尾孢霉菌(*Cercospora punicae* P. Henn), 属半知菌亚门, 丛梗孢目, 暗梗孢科, 尾孢菌属。病原子实层生于叶面, 呈微细黑点, 散生。子座深褐色, 球形至半球形, 直径

收稿日期: 2007-12-14

作者简介: 李宗圈(1952-), 男, 河南巩义人, 高级工程师, 主要从事林果育种和栽培技术研究工作。

生产, 而通过生根继代方法培养的生根试管苗根系发达、生长旺盛、没有无效苗。因此, 生产上应采用生根继代的方法进行快速繁殖。分化率达 94% 颗粒状愈伤组织, 也可以作为转基因研究材料。

栽培于林下的试管苗长势旺盛, 根茎上的须根比附近的野生植株增加 1.5 倍左右, 栽培于田间的试管苗长势比根茎苗旺盛整齐, 秋末根茎的收获量比直接来自山上的根茎苗高 11%, 这些小玉竹试管苗有利性状的出现, 一方面是由于所用试验材料是选择了生长非常旺盛的根茎, 另一方面是与在培养中使用了激素, 栽培于田间和山林下的试管苗体内的激素仍在发挥着后效作用有关。

参考文献:

[1] 李书心. 辽宁植物志(下册)[M]. 沈阳: 辽宁科学技术

出版社, 1991: 737-738.

- [2] 姜长阳. 培养基琼脂用量的商榷[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(2): 155.
- [3] 钟士传. 安祖花的繁殖技术[J]. 温室园艺, 2005(5): 56-57.
- [4] 安利佳, 姜长阳. 植物组织培养导论[M]. 大连: 辽宁师范大学出版社, 2003: 115-117.
- [5] 徐忠传, 何俊蓉, 郁达, 等. 多花黄精的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 78.
- [6] 徐忠传, 何俊蓉, 周静亚, 等. 6-BA 对离体多花黄精不定芽增殖的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(1): 105-107.
- [7] 徐红梅, 赵东利. 植物生长调节剂对多花黄精芽体外发生过程中性状的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32(1): 85-86.