

小苍兰“上农金黄后”球茎组织培养的初步研究

钱虹妹¹,张华林¹,高 强²,杨 晖¹,唐东芹¹

(1.上海交通大学 农业与生物学院,上海 201101;2.上海交通大学 生命科学与技术学院,上海 200030)

摘 要:以小苍兰优良品种“上农金黄后”的小籽球为外植体,研究了植物生长调节剂对其球茎离体培养及植株再生的影响。结果表明,植物生长调节剂对小苍兰“上农金黄后”小球茎离体培养有着较明显作用,生长素 NAA 与 2,4-D 对愈伤组织及不定芽的诱导作用相近,以较低浓度与 BA 组合诱导效果良好。最佳诱导培养基为 MS+BA 2.0mg·L⁻¹(单位下同,略)+NAA 0.2~0.5;最佳生根培养基为 MS+NAA 0.2+0.25 %活性炭。

关键词:小苍兰;球茎;组织培养

中图分类号:S682.19

文献标识码:B

Study on *In Vitro* Culture of Bulblets from *Freesia refracta* ‘Shangnongjinghuanghou’

QIAN Hong-mei¹, ZHANG Hua-lin¹, GAO Qiang², YANG Hui¹, TANG Dong-qin¹

(1.School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101;

2.School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: Using bulblets of *Freesia refracta* ‘Shangnongjinghuanghou’ as explants, the influence of plant hormone to its in vitro culture and plant regeneration was studied in this paper. The results showed that plant hormones played an obvious role in tissue culture of the bulblet of *Freesia refracta*. It's better for induction callus and shoot of *Freesia refracta* using MS basic medium with BA and lower concentration of NAA or 2,4-D. The best medium for induction callus and shoot of *Freesia refracta* was MS with BA 2.0mg·L⁻¹(the same unit as below, omission) and NAA 0.2~0.5, and the best medium for rooting was MS with NAA 0.2 and 0.25 % active carbon.

Key words: *Freesia refracta*; bulb; tissue culture

小苍兰(*Freesia refracta*),又名香雪兰、洋晚香玉,是鸢尾科香雪兰属多年生球茎类草本植物。其花色彩丰富,花香清幽怡人,观赏价值很高,备受人们青睐,被广泛应用于切花生产中,被誉为世界十大功夫花之一。原上海农学院经过20多年的潜心研究,培育出了10多个小苍兰新品种(系)^[1]。然而,由于多年来采用球茎无性繁殖,受土壤病原菌的感染及其本身品种发生的变异等,近年来有部分品种出现退化现象,如花枝变矮,花香变淡等。大量研究表明,组织培养是种苗脱毒和工厂化生产的良好途径,同时也可作为分子育种等研究奠定基础。从现在文献资料来看,有关小苍兰的组织培养国内外已有不少研究,如利用小苍兰的茎尖、球茎、叶、花序、子房为外植体进行离体培养^[2-5],这为小苍兰上农优良品种组织培养体系的建立提供了一定研究基础。为了更好地保存原上海农学院培育的小苍兰优良种质并进一步推广利用,本文选择了上农小苍兰优良品系中最负盛名的“上农金黄后”作为研究对象,以其小籽球为外植体进行离体培养,旨在建立稳定高效的离体再生体系,为今后进行脱毒、分子育种等方面的研究奠定基础。

收稿日期:2006-05-28

基金项目:上海市农委科技攻关项目(沪农科攻字(2005)第1-1-9号)及本校青年教师科研启动基金资助

作者简介:钱虹妹(1978-),女,上海市闵行区人,硕士,助理研究员,研究方向:球根花卉种质资源的收集和遗传转化;唐东芹为本文通讯

作者, E-mail: dqtang@sjtu.edu.cn

1 材料及方法

1.1 实验材料

小苍兰栽培品种“上农金黄后”^[1],以一年生健康小籽球作为外植体。

1.2 培养基与培养条件

基本培养基选择 MS 培养基,附加不同种类及浓度的植物生长调节剂(包括 BA, NAA, 2,4-D),每升加琼脂粉 7 g,蔗糖 30 g,pH 值调至 5.8。将经表面消毒好的外植体切成厚约 1~2 mm 的小块接种到不同培养基上,将接种好的材料放入组培室中的光温调控培养架上进行光培养,温度为 23±2℃,光强 1000~1200 lx,光照时间为 12~14 h·d⁻¹。试验重复 3 次,每次每组接种 30 个外植体。

培养基配方如下:

1.2.1 愈伤组织及不定芽诱导培养基 1 号 MS+BA 1.0 +NAA 0.2 ;2 号 MS+BA 2.0 +NAA 0.2 ;3 号 MS+BA 3.0 +NAA 0.2 ;4 号 MS+BA 1.0 +NAA 0.5 ;5 号 MS+BA 2.0 +NAA 0.5 ;6 号 MS+BA 3.0 +NAA 0.5 ;7 号 MS+BA 1.0 +2,4-D 0.2 ;8 号 MS+BA 2.0 +2,4-D 0.2 ;9 号 MS+BA 3.0 +2,4-D 0.2 。

1.2.2 生根培养基 10 号 MS+NAA 0.2 ;11 号 1/2 MS+NAA 0.2 ;12 号 MS+NAA 0.2 +0.25%活性炭;13 号 1/2 MS+NAA 0.2 +0.25%活性炭。

1.3 实验方法

1.3.1 球茎的选择及处理 选择球体饱满、无病斑、不腐烂的当年生小籽球,剥去外膜表皮备用。清水冲洗干净后用饱和洗衣粉液浸泡 10 min,转移至无菌台进行消毒操作。将去皮小籽球放入无菌容器中,先用 75%酒精预消毒 30 s,弃液后用无菌水冲洗 3 次;然后用有效浓度为 1.5%~2.5%的次氯酸钠溶液消毒 10~25 min,弃液后用无菌水冲洗 6 次,最后用无菌吸水纸吸干水分备用。

1.3.2 接种 将灭菌后的小籽球切成厚 1~2 mm 的小块接种到诱导培养基上,6 周后统计愈伤组织诱导率及不定芽诱导率。当诱导出的不定芽长到 2~3 cm 时将其从基部切下分别转入到生根培养基进行生根诱导,4 周后统计生根情况。

2 结果及讨论

2.1 不同消毒方法对控制球茎污染的影响

将灭菌后的小苍兰球茎组织块接种到培养基后,出现大量的污染情况,大部分表现为菌丝体(真菌污染);少量出现脓状物(细菌污染)。本文采用次氯酸钠作为消毒剂,设计了不同时间及不同浓度的次氯酸钠溶液,旨在摸索合适的消毒方法。

由表 1 可知,消毒时间过短或者次氯酸钠浓度太低均不易达到消毒目的,而消毒时间过长和次氯酸钠浓度过高都会造成外植体的损伤。

综合来看,在次氯酸钠的有效浓度为 2.0%、消毒 15 min 的条件下效果较好,既能保证良好的消毒效果而又不至于使外植体受到很大的损伤,对小苍兰球茎离体培养是一种较为合适的表面消毒方法。

2.2 愈伤组织及不定芽诱导

据文献报导,植物生长调节物质中 BA 及 NAA 对小苍兰离体培养中作用较为突出^[6-8],同时考虑到

表 1 次氯酸钠溶液的浓度及消毒时间对消毒效果的影响

Table 1 The effect of NaClO concentrations and the time of disinfection			
有效浓度/%	消毒时间/min	污染程度	外植体状况
1.5	10	严重	正常
1.5	15	严重	正常
1.5	20	严重	正常
1.5	25	较严重	少量外植体伤口呈白色
2.0	10	中等	正常
2.0	15	轻微	正常
2.0	20	轻微	少量外植体伤口呈白色
2.0	25	轻微	部分外植体伤口呈白色
2.5	10	轻微	少量外植体伤口呈白色
2.5	15	轻微	部分外植体伤口呈白色
2.5	20	轻微	外植体软化
2.5	25	轻微	外植体被杀死

注:污染程度中严重指 50%以上被污染,较严重指 30%~50%被污染,中等指 10%~30%被污染,轻微指 10%以下被污染。

2,4-D 在不少球根花卉组织培养中的作用,本文以这三种生长调节物质设置了 9 个组合进行诱导试验。

将经表面消毒的外植体接种到诱导培养基上,1~2 周后外植体开始膨大,同时表面逐渐变绿。3 周后,部分培养基上的外植体开始形成愈伤组织,并继续膨大,1 个月后部分外植体上陆续出现少量绿色的不定芽(如图 1 所示)。诱导出的愈伤组织从形态上看为白色的瘤状组织,质地比较致密(图 1 中)。6 周后统计愈伤组织诱导率及不定芽诱导率(表 2)。

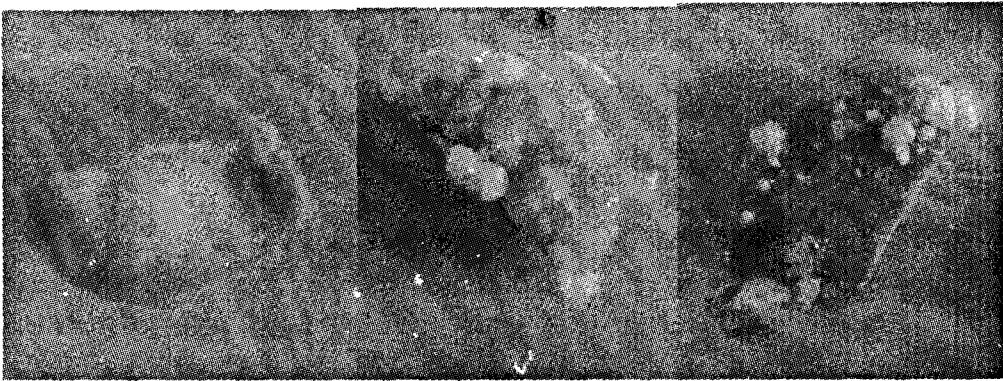


图 1 愈伤组织和不定芽的诱导过程
(从左到右分别为接种后 7d、20d、30d)

Fig.1 The procession of callus and shoot induction of *Freesia refracta*
(From left to right: explants after being cultured 7d, 20d, 30d)

从表 2 可知,在所有培养基组合上,外植体都能顺利诱导出愈伤组织,而且诱导率都比较高,说明小苍兰“上农金黄后”小球茎诱导愈伤组织的能力较强,对所试验的三种植物生长调节物质不是特别敏感。其中 5 号、2 号及 8 号培养基愈伤组织的诱导率最高。而且从实验结果来看,生长素 NAA 及 2,4-D 对小苍兰“上农金黄后”球茎的诱导作用相近,以较低浓度与 BA 组合在一起诱导效果良好,两者可以相互替代使用。适当提高生长素浓度可增加愈伤组织诱导率,但不存在明显差异。但在诱导初期,不定芽的诱导效果在所有培养基上都不是非常明显,总体诱导率较低。而且 NAA 及 2,4-D 对不定芽的诱导同样也没有明显差异,可以互相替代使用。

将诱导效果较好的 2 号、5 号及 8 号培养基上经前期培养诱导出愈伤组织或少量不定芽的外植体取出,继续转入相应新鲜培养基上继代培养并观察其生长情况。结果发现,随着培养时间的增加,外植体继续膨大,愈伤组织也继续增殖。同时,不定芽的形成量也逐渐增多,在不同培养基组合上表现出一定的差异。10 周后统计不同培养基上不定芽诱导率和外植体上不定芽的平均发生数(表 3)。

由表 3 可知,经 2 号、

表 2 不同植物生长调节物质对诱导愈伤组织及不定芽的影响

Table 2 The effect of media supplemented different hormones on induction callus and shoot of *Freesia refracta*

培养基序号	平均污染数±SE	愈伤组织诱导率(%±SE)	不定芽诱导率±SE
1	3±0.58b	56.8±1.6a	23.5±1.3bcd
2	2.67±0.33ab	91.5±3.3c	36.6±0.4f
3	3±0.58b	61.7±2.0ab	28.4±0.8d
4	2±0.58ab	58.3±1.5ab	12.8±1.2a
5	2.67±0b	95.1±0c	28.0±0cd
6	2.33±0.25ab	63.9±7.3b	18.1±3.8cd
7	1.33±0.33a	50.0±1.8a	16.3±1.0ab
8	3±0b	88.9±3.7c	23.5±3.3bcd
9	1.67±0.33ab	60.0±2.8ab	20.0±1.1bc

注:统计方法采用 Duncan's New Multiple Range Test,水平为 $P=0.05$

表 3 10 周后的不定芽诱导率及增殖系数

Table 3 The rates of shoot-induction and shoot-multiplication after ten weeks

培养基序号	接种的外植体数	形成不定芽的外植体数	不定芽诱导率/%	平均不定芽发生数
2	82	82	100	17
5	82	71	86.6	10
8	81	79	97.5	14

5号及8号培养基诱导的外植体分化不定芽的能力很强,平均不定芽发生数都很高,10周后每块外植体平均能产生10~17个的不定芽(如图4),继续继代培养则会有更多的不定芽产生。但随着培养时间的进一步增加,愈伤组织的增殖能力下降,而且将不定芽切离后,可能由于本身细胞内源激素平衡关系发生变化,而导致大量不定根的发生(如图4下右)。因此,笔者认为在诱导培养基中不能培养时间过长。

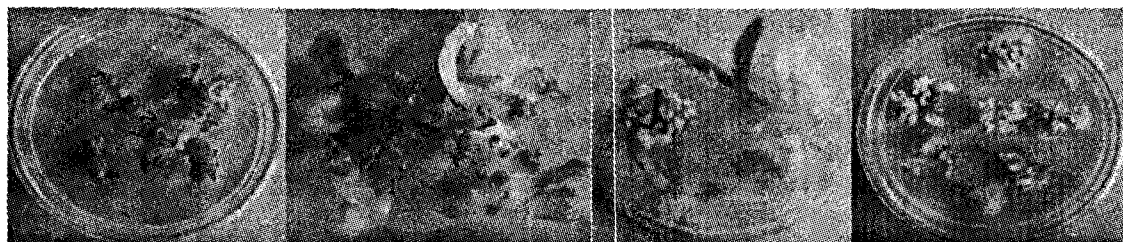


图4 不定芽诱导情况

Fig.4 The induction of shoot

2.3 生根诱导

当不定芽长到2~3 cm长时,将其从基部切下转移到生根培养基(10~14号)中,约半个月后开始有白色的不定根形成。4周后统计生根率及不定根生长情况(表4)。

由上表可知,诱导出的不

表4 不同生根培养基对试管苗生根的影响

Table 4 The effect for the rooting of different mediums

培养基序号	接种的不定芽数	形成不定根的芽数	生根率/%	平均生根数	不定根状况
10	60	59	98.3	7.5	根多而粗壮
11	60	54	90	6	根较少而较弱
12	60	60	100	7.8	根多而粗壮
13	60	57	95	6.4	根较少而较粗壮

定芽在附加低浓度生长素的培养基中生根能力强,生根率可达90%以上。在所试验的四种培养中以MS为基本培养基的要优于1/2MS,形成的不定根质量好、数量多,说明其生根过程中需要较富集的营养。添加少量的活性炭对不定根的诱导也有一定促进作用,可能是因为活性炭具吸附作用,能够吸收活体材料代谢过程中产生的有害物质,同时创造出较暗的局部环境也有利于不定根的生长。

3 结论

综合以上研究结果可知,植物生长调节剂对小苍兰球茎离体培养及植株再生有着较为明显的作用。小苍兰球茎诱导愈伤组织的能力很强,而且对BA、NAA与2,4-D等三种植物生长调节物质不是特别敏感。同时,生长素NAA与2,4-D对小苍兰球茎愈伤组织及不定芽的诱导作用相近,以较低浓度与BA组合诱导效果良好。此外,经球茎诱导出的不定芽生根能力强,MS要优于1/2MS,而适当添加活性炭对不定根的诱导有促进作用。以上研究为进一步利用分子育种手段改良其农艺学性状及脱毒等提供了一定基础。

参考文献:

- [1] 秦文英,林源祥.小苍兰研究[M].上海:上海科技出版社,1995.
- [2] 陈杨春,鲁雪华.小苍兰的离体培养[J].植物生理学通讯,1985,(2):43-44.
- [3] 黄敏玲,陈诗林.小苍兰试管球茎的低温诱导[J].植物生理学通讯,1994,30(2):117-118.
- [4] 黄敏玲,陈诗林.小苍兰试管球茎诱导及开花研究[J].亚热带植物通讯,1994,23(1):30-34.
- [5] Wang, L. et al., Somatic embryogenesis and its hormonal regulation in tissue cultures of *Freesia refracta* [J]. Annals of Botany, 1991, (65):271-276.
- [6] 王丽,邹明谦,王晓光.香雪兰种子胚的组织培养和植株再生[J].园艺学报,1996,23(3):281-284.
- [7] 车生泉,盛月英,秦文英.光质对小苍兰茎尖试管培养的影响,园艺学报,1997,24(3):269-273.
- [8] 车生泉,秦文英.光质对小苍兰茎尖试管成球的影响[J].上海农学院学报,1998,16(2):121-123.