

洋桔梗离体快繁技术研究

龚明霞^{1,2,3}, 陈小凤^{1,2,3}, 陈丽梅^{1*}, 罗坤², 李昆志¹, 方锋学³ (1. 云南省昆明理工大学生物工程技术研究中心, 云南昆明 650224; 2. 云南昆明味知农产品开发有限公司, 云南昆明 650011; 3. 广西农业科学院蔬菜研究中心, 广西南宁 530007)

摘要 [目的] 建立洋桔梗高效的快速繁殖体系, 为工厂化生产提供可行的操作程序。[方法] 以国外进口的洋桔梗 F1 代种子(品种名称为 Polestar yellow) 无菌苗的叶片为外植体, 对不定芽的诱导、单芽增殖、无菌苗生根等进行了研究。[结果] 结果表明: 6-BA 和 IBA 组合对洋桔梗叶片不定芽的诱导效果较 6-BA 和 NAA 组合好, 叶片最佳的分化培养基为 MS + 6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.04 mg/L, 1 个月内正常芽平均分化数为 8.3; 最佳的单芽增殖培养基为 MS + 6-BA 0.8 mg/L + NAA 0.04 mg/L, 1 个月内正常芽的增殖倍数为 7.4; 无菌苗在含有 IBA 0.25 mg/L 的 1/2 MS 培养基上, 生根率、平均每苗的根数均最大。[结论] 该结果为洋桔梗的工厂化生产奠定了基础。

关键词 洋桔梗; 种子; 叶片; 离体培养

中图分类号 S682.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)29-12582-03

Study on Rapid Propagation Technology of *Eustoma grandiflorum* in vitro

GONG Ming-xia et al (Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract [Objective] This study aimed to establish a feasible manipulation procedure for rapid propagation of a new *Eustoma grandiflorum* species in a factory. [Method] Using the aseptic seedling leaves of a newly imported *Eustoma grandiflorum* species (Polestar yellow) as explants, induction of the adventitious buds, proliferation of single buds and root regeneration of seedlings were studied. [Result] The results showed that, for the induction effect of the adventitious buds from leaves, the combination of 6-BA and IBA was better than that of 6-BA and NAA. The best bud induction medium for Polestar yellow was MS + 6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.04 mg/L, and the mean number of the normal induced buds was 8.3 per month. The best proliferation medium was MS + 6-BA 0.8 mg/L + NAA 0.04 mg/L, and the proliferation multiple of the normal buds was 7.4 per month. On 1/2 MS medium with IBA 0.25 mg/L, both the root regeneration rate and the mean root number of the plantlets were highest. [Conclusion] These results established a basis for factory production of the new *Eustoma grandiflorum* species, Polestar yellow

Key words *Eustoma grandiflorum*; Seed; Leaf; In vitro culture

洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)是龙胆科、龙胆属草本花卉。洋桔梗原是一种普通的野花, 经过漫长的演变, 现已成为一种妩媚多姿的花卉, 已经跻身于荷兰花卉拍卖市场十大切花之列。我国栽培的洋桔梗种源均是进口的 F₁ 代杂交种子, 价格十分昂贵, 种子萌发十分缓慢, 幼苗期对环境要求严格, 且幼苗又有 4~6 个月的停滞期, 导致洋桔梗种苗生产成本较高。利用组织培养技术不但可以节约生产成本, 而且可以使洋桔梗种苗的生长、发育避免受到外界环境的影响。国内已有用茎段、侧芽、种子、试管苗等进行洋桔梗组织培养的报道^[1-2], 但以叶片为材料进行组培快繁技术的研究尚不详细^[3-4], 限制了组培快繁技术在洋桔梗种苗生产上的应用。为此, 笔者以洋桔梗的叶片为材料, 研究并建立其再生体系, 旨在为洋桔梗快速繁殖的工厂化生产提供技术资料, 以满足市场对洋桔梗种苗的需求。

1 材料与方法

1.1 材料 从国外进口的洋桔梗 F₁ 代种子, 品种名称为“Polestar yellow”。

1.2 方法 洋桔梗种子的 3 种消毒方法分别为 I: 75% 乙醇浸泡 30 s 后, 用 0.1% HgCl₂ 浸泡 6 min, 无菌水洗涤 5~6 次; II: 用稀释 200 倍的除菌剂 Sporetexnase 浸泡过夜后, 用 1% SDS + 5% NaClO 消毒液浸泡 30 min; III: 75% 乙醇浸泡 30 s

后, 用 1% 十二烷基磺酸钠(SDS) + 5% NaClO 浸泡 30 min。洋桔梗种子经不同的方法消毒后, 接种至 MS 培养基上进行无菌萌发, 获得无菌苗。切取无菌苗从顶端往下数的第 2 对叶, 由叶中央的主脉纵向切成 2 半, 每半再横向 4 等分切开, 然后正面朝上接进各种诱导分化培养基中。每瓶培养基接 1 片叶(8 小块), 每种培养基接种 4 瓶。诱导分化出的芽在 MS 上壮苗, 从中挑选具 3~4 对叶的单芽, 接进各种增殖培养基, 每瓶接种 4 株。从 MS 壮苗培养的苗中, 选取大小相对一致的无根苗, 接种至各种生根培养基中, 每瓶 5~6 株。叶片诱导和单芽增殖培养以 MS 为基本培养基, 附加 3% 蔗糖; 生根以 1/2MS 为基本培养基, 附加 2% 蔗糖, 另外添加 1% 琼脂, pH 值为 6.1, 温度为 (20 ± 1)℃, 光强为 20~25 μmol/(m² · s), 光照时间为 12 h。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法的效果比较 消毒后的洋桔梗种子在 15 d 后大部分都能萌发(图 1), 30 d 后观察消毒结果, 如表 1 所示。从表 1 可以看出, 用这 3 种消毒方法处理洋桔梗种子,

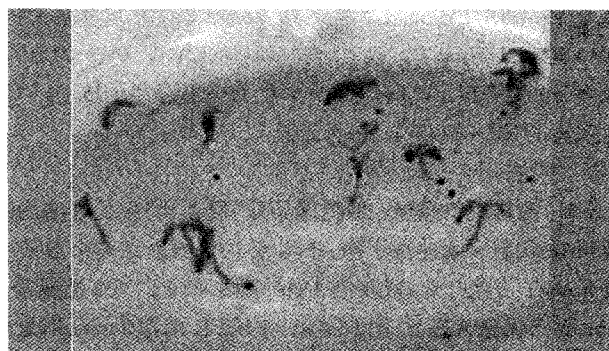


图 1 无菌萌发的种子

Fig. 1 The germinating aseptic seeds

基金项目 国家自然科学基金项目(30670163); 教育部留学回国人员科研启动基金(2005.55); 云南省中青年学术与技术带头人培养费(2004PY01.5); 昆明理工大学人才培养费; 云南昆明味知农产品开发有限公司资助。

作者简介 龚明霞(1979-), 女, 湖北黄冈人, 硕士, 实习研究员, 从事植物组织培养方面的研究。* 通讯作者, 教授, E-mail: chenlimeikm@yahoo.com.cn。

鸣谢 感谢昆明理工大学生物工程技术研究中心的陈红梅和何毅敏同学在培养基配制和植物组织培养过程中所给予的帮助。

收稿日期 2008-07-28

表 1 3 种消毒方法的消毒效果比较

Table 1 Comparison of the disinfection effects of three sterilization methods

消毒方法	播种粒数	萌发粒数	萌发率//%	污染率//%
Sterilization method	Sowing seeds	Number of germinating seeds	Germination rate	Contamination rate
I	60	1	1.67	0
II	60	48	80.00	0
III	58	46	79.31	0

注:萌发率(%) = 萌发粒数/播种粒数 × 100。
Note: Germination rate(%) = number of germinating seeds / sowing seeds × 100。
污染率都为 0,说明 3 种方法消毒都很彻底。但种子的萌发率却有所不同,用方法 I 消毒,洋桔梗种子的萌发率最低,为

1.67%,而用方法 II、III 消毒,种子的萌发率都较高,且两者之间的差异不大。因此综合考虑,方法 III 应该是洋桔梗种子消毒的最经济、最方便的方法。

2.2 不同种类激素组合对叶片不定芽诱导的影响

2.2.1 6-BA 和 NAA 组合对叶片不定芽诱导的影响。在 6-BA 和 NAA 各种组合的诱导分化培养基上,10 d 后叶片切口边缘膨大,有的形成肉眼可见的黄绿色的愈伤组织,19 d 后长出不定芽,有的直接从叶片边缘冒出芽点,不形成愈伤组织也没诱导出芽的叶块在统计时已变黄死亡。30 d 后统计的诱导结果如表 2 所示。从表 2 可以看出,洋桔梗叶片在含 6-BA 0.8 mg/L + NAA 0.04 mg/L 的 MS 培养基上正常芽平均分化数最高,为 5.1 个/块,但芽诱导率为 56.25%,玻璃化率为 4.17%。

表 2 6-BA 和 NAA 组合对叶片不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of 6-BA and NAA combinations on the induction of adventitious buds from leaves

激素 Hormone//mg/L		芽诱导率//%	平均芽分化数//个/块	正常芽平均分化数//个/块	玻璃化率//%
6-BA	NAA	Inducing rate of buds	Average number of differentiated buds	Average number of normal differentiated buds	Rate of vitrification buds
0.3	0.04	28.13	1.0	1.0	0
0.3	0.10	9.38	2.0	1.7	16.67
0.6	0.04	62.50	3.5	3.4	1.45
0.6	0.10	75.00	3.0	2.5	18.06
0.8	0.04	56.25	5.3	5.1	4.17
0.8	0.10	78.13	4.9	3.2	35.77

注:芽诱导率(%) = 有芽的叶块数/总叶块数 × 100;平均芽分化数 = 总芽数/有芽的叶块数;正常芽平均分化数 = (总芽数 - 玻璃化芽数)/有芽的叶块数;玻璃化率(%) = 玻璃化芽数/总芽数 × 100。表 3 同。
Note: Inducing rate of buds(%) = number of leaf pieces with buds / total number of leaf pieces × 100, average number of differentiated buds = total bud number / number of leaf pieces with buds, average number of normal differentiated buds = (total bud number - number of vitrification buds) / number of leaf pieces with buds, rate of vitrification buds(%) = number of vitrification buds / total bud number × 100. The same as Table 3.

2.2.2 6-BA 和 IBA 组合对叶片不定芽诱导的影响。在 6-BA 和 IBA 组合的培养基上,洋桔梗叶块在培养 12 d 时变厚(图 2),18 d 时大部分叶片在上、下横向切口处形成不定芽(图 3),30 d 后统计不定芽诱导结果,如表 3 所示,从表 3 可



图 2 诱导过程中的叶块
Fig. 2 Leaf pieces during induction

以看出,在含 6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.04 mg/L 的 MS 培养基上正常芽平均分化数最高,为 8.3 个/块,芽诱导率为 78.13%,诱导不定芽分化的效果最好,且诱导出的不定芽嫩绿色,叶片自然舒展,形态端正,芽与芽之间较稀疏,易于分离接种。

无论是在添加 6-BA 和 NAA 组合还是在添加 6-BA 和 IBA 组合的培养基上,洋桔梗叶片均随着 6-BA 浓度的升高不定芽分化频率逐渐增大,平均芽分化数也增大,玻璃化程

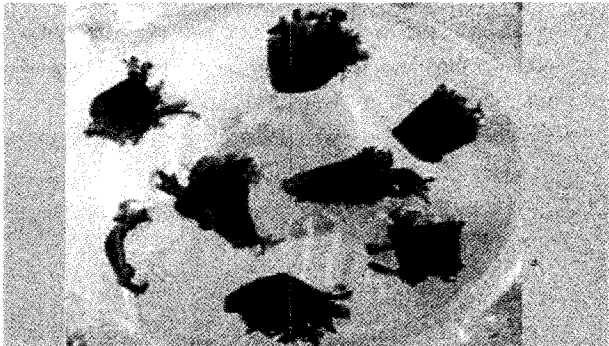


图 3 从叶块上诱导出的不定芽
Fig. 3 Adventitious buds induced from leaf pieces

度也愈严重,说明 6-BA 具有促进叶片不定芽分化和导致不定芽玻璃化的双重作用。但是洋桔梗易发生玻璃化,即使在低浓度 6-BA 的培养基上,也有少量的愈伤组织呈水浸状,同时分化出呈玻璃化的不定芽。

2.3 6-BA 和 NAA 组合对单芽增殖的影响 将洋桔梗单芽在 MS 基本培养基上进行壮苗培养后,再进行增殖培养,培养 30 d 后统计和观察增殖结果(图 4)。在各种增殖培养基上洋桔梗单芽的叶腋处产生新芽,且单芽的基部膨大形成愈伤组织,从其上能分化出不定芽,有的还能分化出不定根。从表 4 可以看出,洋桔梗单芽在含 6-BA 0.6 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基上,芽增殖倍数最大,为 8.7 倍,但由于发生较严重的玻璃化,最后正常芽增殖倍数为 6.1 倍;而在

表3 6-BA 和 IBA 组合对叶片诱导不定芽的影响
Table 3 Effects of 6-BA and IBA combinations on the induction of adventitious buds from leaves

激素 Hormone//mg/L		芽诱导率//%	平均芽分化数//个/块	正常芽平均分化数//个/块	玻璃化率//%
6-BA	IBA	Inducing rate of buds	Average number of differentiated buds	Average number of normal differentiated buds	Rate of vitrification buds
0.3	0.04	56.25	2.3	2.0	12.20
0.3	0.10	59.38	6.5	5.3	18.70
0.6	0.04	78.13	10.1	8.3	18.18
0.6	0.10	75.00	8.2	6.0	26.90
0.8	0.04	78.13	8.5	5.8	31.13
0.8	0.10	87.50	7.8	3.8	51.38

6-BA 0.8 mg/L + NAA 0.04 mg/L 的以培养基上的正常芽增殖倍数最大,为 7.4。所以后者为洋桔梗单芽增殖最适宜的培养基。另外,在所有的培养基上,洋桔梗都发生不同程度的玻璃化。

表4 6-BA 和 NAA 组合对单芽增殖的影响
Table 4 Effects of 6-BA and NAA combinations on proliferations of the single bud

激素//mg/L Hormone		总增殖倍数//倍 Total proliferation multiples	正常芽增殖倍数//倍 Proliferation multiples of normal buds	玻璃化率//% Rate of vitrification
6-BA	NAA			
0.3	0.04	6.2	5.3	14.29
0.3	0.10	5.0	3.6	28.89
0.6	0.04	6.5	4.9	24.36
0.6	0.10	8.7	6.1	29.49
0.8	0.04	8.3	7.4	10.61
0.8	0.10	6.2	4.4	28.57

注:总增殖倍数=增殖后的总芽数/增殖前总芽数;正常芽增殖倍数=(增殖后总芽数-玻璃化芽数)/增殖前总芽数。

Note:Total proliferation multiples = number of total buds after proliferation / number of total buds before proliferation, proliferation multiple of normal buds = (number of total buds after proliferation - number of vitrification buds) / number of total buds before proliferation.



图4 增殖中的单芽
Fig.4 Single buds during proliferation

2.4 IBA 和 NAA 组合对无菌苗生根的影响 将洋桔梗无根植株接进 6 种生根培养基中,8 d 后都能生根,培养 20 d 后最长的根达 1 cm(图 5),统计生根结果如表 5 所示。从表 5 可以看出,幼苗在不含激素的 1/2 MS 培养基(对照)上能生根,但生根率低,根数量少。在含 IBA 0.25 mg/L 的 1/2 MS 培养基上,洋桔梗的生根效果最好,生根率最高,为 70.83%,平均每苗的根数为 5.40 根,且根黄绿色,根长而粗壮,侧根的数量多,而对照的根则细长,说明 IBA 0.25 mg/L 是洋桔梗

较适宜的生根培养基。

表5 培养基对无菌苗生根的影响
Table 5 Effects of culture mediums on rooting of the aseptic seedling

激素 Hormone//mg/L		生根率//%	平均根数//条/株
IBA	NAA	Rooting rate	Average number of roots
0	0	41.67	3.4
0.25	0	89.50	5.4
0.25	0.08	56.67	5.8
0.50	0	62.50	3.8
0.50	0.08	48.00	3.8
1.00	0.08	65.00	3.8
1.00	0.08	52.00	3.6

注:生根率(%)=生根苗数/无菌苗总数×100;平均根数=总根数/生根苗数。

Note:Rooting rate(%) = rooting seedlings / total number of aseptic seedlings ×100;average number of roots = number of total roots / rooting seedlings.



图5 生根的无菌苗
Fig.5 Rooting aseptic seedlings

2.5 试管苗的移栽结果 将带 5~6 片叶的生根试管苗取出培养瓶,洗净基部的培养基,移栽至腐殖土:珍珠岩=1:1 的基质中,用塑料薄膜覆盖 1 周左右,然后逐渐揭去薄膜,定期肥水管理,长势良好,成活率可达 95% 以上。

3 结论与讨论

以洋桔梗种子无菌苗叶片为材料建立的再生体系,由于取材范围广泛且方便,繁殖系数大大提高,是洋桔梗工厂化快速繁殖的有效途径。洋桔梗叶片不定芽的诱导与细胞分裂素和生长素的种类、浓度及两者之间的配比有关。该研究表明,6-BA 与 IBA 组合对叶片不定芽的诱导效果优于 6-BA 与 NAA 组合,这与毛元荣等^[4]的研究结果一致。由于洋桔

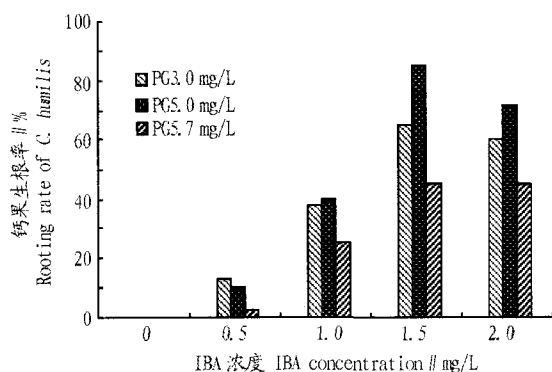


图2 PG和IBA对钙果生根的影响

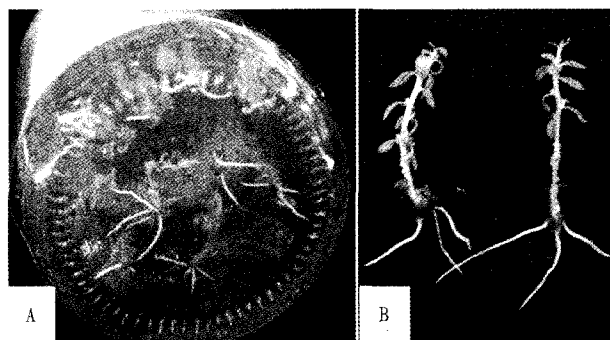
Fig. 2 Effects of PG and IBA on the rooting of *C. humilis*

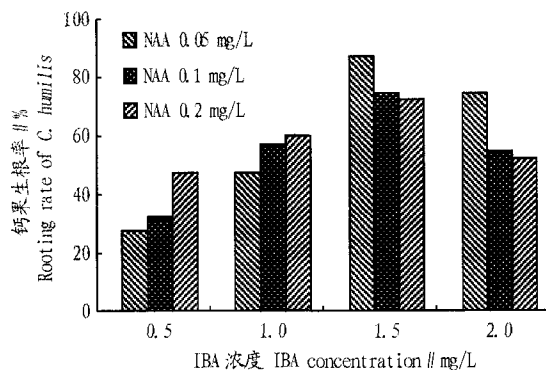
图3 钙果不定芽生根情况

Fig. 3 Adventitious bud rooting of *C. humilis*

2.3 PG、IBA 和 NAA 互作对钙果生根的影响 利用 5.0 mg/L 的 PG, 再添加不同浓度的 IBA 和 NAA, 钙果的生根率较没有添加 PG 时明显提高, 以 1/2 MS + PG 5.0 mg/L + IBA 1.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L 培养基生根率最高, 为 87.5% (图 4), 但与不添加 NAA 的培养基相比, 生根苗基部愈伤组织较多, 根系基部偶有肿胀现象。

3 结论与讨论

有关钙果生根的报道均利用 IBA 或 NAA 诱导。国外利用 1/2 MS 固体培养基添加不同浓度的 IBA 或 NAA, 诱导不同品种欧李的生根率最高, 可达 88.0%^[5-6,8]。王德政等利用 2/3 MS + IAA 0.5 mg/L 诱导欧李的生根率为 72.0%^[9]; 张志勇等利用 1/2 MS + IBA 1.0 mg/L 诱导钙果的生根率为 89.3%^[3]。孙新政等研究发现, 1/2 MS + IBA 1.0 mg/L + KT 0.02 mg/L 培养基可使钙果 4 号的生根率达 100.0%^[4]。笔者利用 1/2 MS 培养基添加不同浓度的 IBA 或 NAA 均未获



注: 各处理均加入 PG 5.0 mg/L。

Note: PG 5.0 mg/L was added into each treatment.

图4 PG、IBA 和 NAA 对钙果生根的影响

Fig. 4 Effects of PG, IBA and NAA on the rooting of *C. humilis*

得理想的生根效果, 可能与品种有关^[10]。适宜浓度的 PG 配合 IBA 和 NAA 使用, 则使钙果的生根率明显增加, 其中以 1/2 MS + PG 5.0 mg/L + IBA 1.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L 培养基生根效果最好。

参考文献

- [1] 刘琳, 钟士传. 外源植物激素对钙果繁殖系数的影响[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(3): 428.
- [2] 刘琳. 钙果初代组织培养技术研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(2): 247.
- [3] 张志勇, 张守琪, 王吉, 等. 钙果组织培养技术研究[J]. 甘肃农业科技, 2006(8): 27-29.
- [4] 孙新政, 申顺先, 李庆伟, 等. 钙果 4 号欧李组织培养技术研究[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 80-83.
- [5] TANG H, REN Z, REUSTLE G, et al. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars[J]. Scientia Horticulturae, 2002, 93: 235-244.
- [6] CHANNUNTAIPAT C, SEDGLEY M, COLLINS G. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock Titan × Nemaguard[J]. Scientia Horticulturae, 2003, 98: 473-484.
- [7] FORD Y Y, TAYLOR J M, BLAKE P S, et al. Gibberellin A₃ stimulates adventitious rooting of cuttings from cherry (*Prunus avium*) [J]. Plant Growth Regulation, 2002, 37: 127-133.
- [8] KRIS W P, TINA L, TESS A, et al. Micropropagation of chokecherry and pincherry cultivars[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 63: 93-100.
- [9] 王正德, 庞发虎. 欧李茎尖分生组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 河南农业科学, 2006(9): 97-99.
- [10] CABONI E, TONELLI M G, LAURI P, et al. Biochemical aspects of almond microcuttings related to *in vitro* rooting ability[J]. Biologia Plantarum, 1997, 39: 91-97.

(上接第 12584 页)

梗莲座化产生的内在机制到目前还没有弄清楚, 从已经发生莲座化的植株叶片再生出来的组织苗是否能解除莲座化有待于进一步研究。在洋桔梗的组织培养繁殖技术研究中, 最主要的问题是再生芽的玻璃化。从该试验结果中分析其主要原因是洋桔梗对培养基中的 6-BA 太敏感, 即使是在很低浓度的 6-BA 培养基上, 也有少量玻璃化苗的出现, 这与达克东等^[5]的研究结果相似; 其次是光照强度不够, 通过增强自然光照可以减轻玻璃化现象。另外, 在洋桔梗的组织培养研究中还发现, 洋桔梗再生植株常出现叶片形态的变异, 且玻璃化植株较正常植株更易发生这种变异, 这也可能与培养基中

的 6-BA 浓度有关。所以要实现洋桔梗组培苗的工厂化生产, 还有许多实际的问题需要解决。

参考文献

- [1] 杨霞, 徐康. 洋桔梗的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(6): 435-438.
- [2] 张淑娟, 刘与明. 洋桔梗 F₁ 无菌播种和试管苗的快速繁殖[J]. 亚热带植物通讯, 1996, 25(2): 13-16.
- [3] 李群, 刘光勇, 王丽. 激素对洋桔梗植株再生的影响及生根培养的研究[J]. 广西植物, 2004, 24(1): 40-42.
- [4] 毛元荣, 刘茜, 周根余. 洋桔梗叶片再生体系的建立[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2004, 33(1): 92-96.
- [5] 达克东, 张松, 臧运祥, 等. 洋桔梗叶片培养不定芽发生和微繁殖研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2003, 34(4): 494-498.