

# 苧麻茎尖的组织培养及其诱导植株的再生

郭运玲<sup>1,2</sup> 郭安平<sup>1,2\*</sup> 刘恩平<sup>1,2</sup> 孔 华<sup>1,2</sup> 贺立卡<sup>1,2</sup>

1 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101  
2 中国热带农业科学院热带生物技术研究所

**摘 要** 对苧麻 50 号品系的茎尖进行组织培养并诱导植株再生。结果表明:最适茎尖转绿和分化的培养基是 1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L+CH 300 mg/L 的液体培养基,茎尖分化率为 100%。最适成苗培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L+CH 300 mg/L,成苗率是 53.3%。扩繁培养基为 MS+6-BA 0.3~1.0 mg/L,繁殖系数达 6.7。适宜生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.01 mg/L。最佳茎尖剥取材料是无菌试管苗,茎尖长以 0.3 mm 带 1~2 个叶原基为宜。从茎尖接种培养成苗到移栽需 4 个月左右。

**关键词** 苧麻 茎尖 培养基 植株再生

**中图分类号** S563.1 Q813.12

苧麻 [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.] 属荨麻科苧麻属多年生草本纤维植物,原产热带和亚热带,是我国重要的纺织原料作物。由于苧麻是杂合体,遗传背景复杂,种子繁殖易发生性状分离,在生产和种质资源保存利用上常采用无性繁殖来保持种性,致使苧麻花叶病(病毒病)越来越严重<sup>[1]</sup>。自 1952 年 G. Morel 等将感染病毒的大丽花茎尖切离培养,获得了去病毒植株以来,茎尖脱毒组织培养技术已经在许多作物上得到广泛应用<sup>[2]</sup>。从此,利用茎尖培养脱毒苗成为防治植物病毒病最有效的方法。到目前为止已从主要粮食作物(如甘薯、马铃薯)、到花卉观赏植物(如康乃馨、大丽菊),果树(如苹果、梨)等 600 多种植物能够借助组织培养手段进行脱毒快繁,获得了无病毒植株,成为农业上应用最广泛的生物技术之一<sup>[2,5]</sup>。如马铃薯脱毒苗已进入工厂化生产,在农业生产上已发挥了显著的增产、增质的效果。但苧麻茎尖组织培养方面的研究未见报道,因此笔者通过对苧麻茎尖进行组织培养并诱导植株再生,旨在为苧麻进一步脱毒培养和良种快繁及种质资源保存打下基础,为苧麻的育种工作拓宽研究领域。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

在 5~8 月,苧麻品系 50 号各生长旺盛阶段,取其幼嫩茎段 10~20 cm 长,剪去叶片和顶梢,取茎段培养或直接取顶梢消毒后<sup>[3,4]</sup>剥取茎尖培养。

### 1.2 方 法

**1.2.1 取材方法** 茎尖剥取方法设 2 个处理:(1)直接取室外材料带顶端用体积分数 70% 的酒精浸泡 30 s,体积分数 0.1% 氯化汞液浸泡 7~8 min,无菌水冲洗 3~4 次,在解剖镜下剥去外包叶和分化的叶片至茎尖;取不同长度茎尖;(2)取茎段培养成无菌试管苗直接剥取茎尖;接种于初代培养基上,置 (25±2) °C,光照强度 2 000 lx,每天光照时间 12 h 培养。3~4 d 后定期观察统计转绿、分化和成苗情况。茎尖转绿以肉眼几乎看不见的淡黄到可见的绿色为准,分化以外植体长出第 1 片可见小叶为准,成苗以长成完整小植株为准。

**1.2.2 茎尖培养** 茎尖长度设 3 个水平,分别为 0.2, 0.3 和 0.5 mm (均带 1~2 个叶原基),将茎尖接种到初代培养基上,1 个月后将分化的茎尖转接到成苗培养基上,50 d 后调查其分化率和成苗率。

**1.2.3 初代培养** (1) 固体培养方式,即在加琼脂的基本培养基上接种茎尖;(2) 液体培养方式,即不加琼脂以脱脂棉作支撑物加入培养液,将茎尖接种于脱脂棉上。2 种培养方式的其他条件均相同。

郭运玲 女,1966 年生,硕士,副研究员。研究方向:作物遗传育种。E-mail: hk\_gyl@sina.com

\* 通讯作者,1962 年生,博士,研究员,博士生导师。研究方向:作物遗传育种。电话:0898-66960170, E-mail: gap211@126.com

收稿日期:2005-05-11

### 1.3 培养基

初代培养基:1/2 MS 基本培养基加不同激素配比组合(见表1);分化茎尖成苗培养基:MS 基本培养基加不同激素配比(见表1);扩繁培养基:MS+6-BA 0.3~1.0 mg/L;生根培养基 1/2 MS+NAA 0.01~0.05 mg/L 或 IAA 0.1~1.0 mg/L。

## 2 结果与分析

### 2.1 2种外植体茎尖培养比较

每个处理接种 10 个长为 0.3 mm 的茎尖, 结果表明:(1)从室外取材剥取茎尖时发现褐色物质分泌较多, 接种后很难分化, 而且消毒时间难掌握, 时间短污染严重, 时间长褐化现象严重, 无分化成苗;(2)无菌试管苗剥取茎尖相对较易, 表现为:首先不需要消毒, 减少污染;其次剥茎尖时褐色物质分泌少, 对茎尖生长有利, 还不受时间和季节的限制, 分化成苗多且容易。造成这些差异的原因主要是无菌试管苗的生长环境和室外材料的生长环境不一样。

### 2.2 茎尖长度对分化成苗率的影响

结果发现 3 种长度的茎尖在培养 1 周左右均有膨大、转绿现象, 但分化和成苗率差别较大(见表2)。从表2可以看出茎尖无论在那个激素配比下均可分化, 相对而言, 以茎尖长为 0.5 mm 的分化率和成苗率均较高;茎尖长为 0.2 mm 的虽然分化率不低, 但成苗率为 0;茎尖长为 0.3 mm 的分化率和成苗率比 0.5 mm 的虽然低, 但从脱毒的效果考虑, 一般在保证成苗的条件下, 尽可能切取小的茎尖来培养, 以利于脱除病毒, 提高脱毒效果。因为对大部分作物而言, 茎尖长为 0.3 mm 时即可达到脱除病毒的效果。而苎麻茎尖长为 0.3 mm 时接种到该培养基上分化以及后续在 M11 上的成苗率均较高。M4 的成苗率虽也达到 50%, 但在分化和成苗培养时愈伤组织多, 说明 6-BA 1.0 mg/L 浓度过高。因此选择 M1 而不选择 M4 为茎尖培养适宜的培养基。茎尖长以 0.3 mm 为宜, 培养基以 1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L + CH 300 mg/L 初代培养配合 MS+6-BA 0.5 mg/L + IAA 0.1 mg/L + CH 300 mg/L 成苗培养效果较好。从表2还可以看出, 6-BA 对茎尖的分化和生长起关键性的作用, 而其他激素如 GA<sub>3</sub>, IAA, NAA, 对茎尖的分化没有促进作用, 加入适量 IAA 对分化的茎尖成苗有促进作用。

### 2.3 茎尖培养方式的比较

2种培养方式的试验结果(见表3)表明, 液体培养方式比固体培养方式好, 50号材料在最适培养基上, 采用液体培养的方式, 分化率达 100%(见表

表1 培养基激素配比 /mg·L<sup>-1</sup>

培养基	6-BA	GA <sub>3</sub>	NAA	IAA	CH
M1	0.5				300
M2	0.5	0.1			300
M3	0.5		0.01		300
M4	1.0				300
M5	1.0		0.01		300
M6	1.0			0.5	300
M7	1.0			1.0	300
M8				1.0	300
M9					300
M10	0.3			0.1	300
M11	0.5			0.1	300
M12	0.5			1.0	300
M13	1.0			0.5	300

表2 50号材料茎尖在各培养基上分化成苗情况调查(接种50d后调查)

培养基	茎尖长度					
	0.2 mm		0.3 mm		0.5 mm	
	分化率 /%	成苗率 /%	分化率 /%	成苗率 /%	分化率 /%	成苗率 /%
M1	40	0	100	53.3	100	75
M2	55	0	100	33.3	100	75
M3	32	0	83.3	16.7	75	50
M4	20	0	83.3	50	100	60
M5	35	0	55.6	33.3	75	75
M6	21.5	0	66.7	29	75	25
M7	12.5	0	14.3	0	60	0
M8	0	0	0	0	0	0
M9	0	0	0	0	0	0

说明:培养方式为液体培养法。

表3 固体和液体培养对茎尖成苗的影响(茎尖长0.3 mm)

培养基	固体培养			液体培养		
	接种数	成苗率 /%	成苗数	接种数	成苗率 /%	成苗数
M1	30	0	0	30	53.3	16
M2	30	0	0	30	33.3	10
M3	30	0	0	30	16.7	5
M4	30	0	0	30	50	15
M5	30	16.7	5	30	43.0	13
M6	30	16.7	5	30	29.0	9
M7	30	0	0	30	0	0
M8	30	0	0	30	0	0
M9	30	0	0	30	0	0

2,3),成苗率达 53.3%。这可能是由于茎尖在液体培养基上生长时,一方面营养物质容易流动,便于吸收;另一方面茎尖分化生长过程中产生的有害酚类物质易溶于培养液中,便于扩散,不会对茎尖造成毒害。因此茎尖分化培养时,以在液体培养基上培养较适宜。

#### 2.4 扩繁和生根培养

茎尖成苗后迅速转到扩繁培养基上进行扩大快繁,试验结果表明,以 MS+6-BA 0.3~1.0 mg/L 培养基为宜,繁殖系数达 5.1~8,平均达 6.7。一般 1~2 次继代繁殖时,可用 6-BA 1.0 mg/L,随着继代次数的增加,6-BA 的浓度要逐渐减少,否则,愈伤组织太多,影响扩繁效果。扩繁的同时,将带顶苗接种到 1/2 MS + NAA 0.01 mg/L 生根培养基上为宜,添加 NAA 0.01 mg/L,3~4 d 开始长出粗壮的根系,而 NAA 浓度增加到 0.05 mg/L,长出的根细而长,所以以加入 NAA 0.01 mg/L 为宜。待苗高 3~4 cm 时(一般 10 d 左右),开瓶炼苗 1~2 d,洗净根上的培养基,移栽到温室的钵钵中(基质为椰糠:细沙土=1:3,v:v),注意保湿,成活率可达 90%以上。

### 3 讨论

#### 3.1 茎尖长度与植株再生和脱毒效果

茎尖培养之所以能获得脱毒苗,是由于病毒在植株体内分布不均一,即老的成熟器官中病毒含量高,幼嫩未成熟的器官中病毒含量较低,而茎尖的分生组织,在细胞没有充分分化之前不受侵染,故很少带病毒。病毒侵染植株后,通过胞间连丝转移到其他细胞中,或依靠筛管进行转移。分生组织中没有维管束存在,病毒只有靠细胞之间的胞间连丝移动,这种移动速度很慢,难以追上生长活跃的分生组织。另外,分生组织中旺盛的分裂细胞,又有很强的代谢活性,使病毒难以复制。不同病毒在感病株上的分布不同,因而进行茎尖脱毒培养所用材料也各不相同,有的是顶端分生组织,有的则是茎尖,顶端分生组织,一般是指幼小叶原基以上的部分,最大长度只有 250  $\mu\text{m}$  左右。在培养过程中,由于取材过小很难剥离,即使剥离成功也很难培养存活。茎尖则是由顶端分生组织及其下方的 1~3 个叶原基构成,一般长度在 0.1~1 mm 之间,剥离与培养均比顶端分生组织容易。目前大多脱毒培养所用的茎尖长在 0.1~1 mm 之间。

在苎麻茎尖组织培养和植株再生的研究中,尽管茎尖长度与成苗率成正比,但是,茎尖培养的目的是为脱毒培养打基础,所以茎尖长度与脱毒效果成反比。据大量文献报道<sup>[6-8]</sup>,一般作物茎尖培养时,茎尖长为 0.3 mm 时既可达到脱除病毒病的效果。本研究中虽然取 0.5 mm 长的成苗率要比长为 0.3 mm 的高,但从脱毒的角度考虑,还是以 0.3 mm 长的茎尖带 1~2 个叶原基为宜。

#### 3.2 茎尖分化成苗的影响因素

苎麻茎尖在离体培养时,其分化成苗受许多因素的影响,其中最重要的是培养基中的附加成分,尤其是 6-BA 对茎尖的分化影响最大。其次是培养方式,即初代培养时采用液体培养要比固体培养好,主要原因是苎麻茎尖在组织培养过程中,分泌大量的酚类等有害物质,聚集于茎尖周围,固体培养基不利于酚类物质的扩散,造成毒害,而液体培养基有利于酚类等有害物质扩散,不会对茎尖造成毒害,同时还有利于茎尖对营养物质的吸收,所以,液体培养方式比固体培养的好。

#### 参 考 文 献

- 1 梁雪妮,刘飞虎. 苎麻花叶病的研究[J]. 江西农业大学学报,1994,16(4):355~361
- 2 徐启江,陈典. 茎尖分生组织在植物病毒防治中的应用[J]. 生物学教学,2001,26(9):4~5
- 3 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海:上海科技出版社,1990.56~70
- 4 周朴华,李宗道,徐桥生. 苎麻组织培养简报[J]. 中国麻作,1980,(1):31~32
- 5 Barlass M, Skene K G M, Woodham R C, et al., Regeneration of virus-free grapevines using in vitro spical culture [J]. Annu Appl Biol, 1982 (101),291~295
- 6 崔德才,徐培文,植物组织培养与工厂化育苗[M]. 化学工业出版社,2003.136~145
- 7 黄华康,袁照年,甘薯茎尖培养的适宜培养基筛选[J]. 杂粮作物,2002,(22):141~143
- 8 陆关成,李方,余姚. 大蒜组织培养脱毒的研究[J]. 浙江农业学报,1991,3(3):133~137

## Shoot Tip Culture and Plantlet Regeneration in Ramie

Guo Yunling Guo Anping Liu Enping Kong Hua He Lika

State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology/Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology,  
Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences Haikou 571101 China

**Abstract** Line 50 of ramie [*Boehmeria nivea* (L.)Gaud] was used as a sample to study its shoot-tip culture and plantlet regeneration. The results showed that the liquid medium MS+6-BA 1.0 mg/L+CH 300 mg/L was best for greening and differentiation of explants *in vitro* with a 0.3 mm long shoot tip having 1-2 leaf primordia. The best medium for plantlet regeneration was MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L+CH 300 mg/L with an efficiency of 53.3%. For rapid propagation the medium used was MS+6-BA 0.3-1.0 mg/L with a multiplication rate of 6.7. The suitable rooting medium was 1/2 MS+NAA 0.01 mg/L. It took about 4 months for the shoot tip to develop into rooted plantlets.

**Key words** ramie shoot tips medium plantlet regeneration