

文章编号:1006-0464(2008)01-0059-03

金边瑞香茎尖脱毒及快繁技术

江洪如,余发新,刘腾云,朱 祺,高 柱,王碧琴,周 华,王小玲

(江西省科学院,江西 南昌 330029)

摘 要:报道了金边瑞香顶芽在 MS + 0.05 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 培养基中预培养 20 d, 再在 34 ℃ (11 h) + 23 ℃ (13 h) 的昼夜温度交替下处理 30 d 后, 剥离 0.2 ~ 0.3 mm 大小的茎尖在 MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 培养基中的诱导成活率为 80.0%, 并获得脱毒苗。继代和增殖培养基为 MS + 0.5 ~ 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, 增殖系数 4.1。试管苗在适宜培养条件下平均生根率为 82.6%, 在珍珠岩:泥炭 = 2:1 基质中生根苗移栽成活率达到 96.46%。

关键词:金边瑞香;茎尖脱毒;快速繁殖;组织培养

中图分类号:S644.103.6

文献标识码:A

金边瑞香 (*Daphne odora* var. *naginata* Mak) 是瑞香科常绿小灌木, 叶缘金黄色, 花蕾红色, 极香, 花期 1 ~ 2 月, 是我国重要的年宵花卉之一, 深受人们喜爱。“金边瑞香之乡”的大余县将金边瑞香花卉业作为支柱产业来发展, 并取得了巨大的经济效益。由于金边瑞香长期扦插繁殖, 而导致金边瑞香种性退化、病害严重, 尤其是病毒病通过扦插繁殖代代相传, 致使植株生长不好, 叶片皱缩不平, 无光泽, 失去了原有的品质, 观赏价值和商品价值下降, 给主产区造成的经济损失非常大。目前既能达到种性提纯复壮又能消除病毒病的最好方法, 就是采用茎尖脱毒组培快繁技术。笔者通过金边瑞香茎尖脱毒及规模化组培技术研究, 所繁殖的脱毒金边瑞香恢复了原有的性状, 其叶、花更大、更美, 抗性增强, 极大地提高了金边瑞香的观赏价值和商品价值, 解决了大余金边瑞香主产区对优质种苗的需求。有关金边瑞香组织培养国内虽有报道^[1-4], 但关于金边瑞香茎尖脱毒及规模化组培技术研究, 国内外均未见报道。有关金边瑞香规模化组培中的一些问题及其解决的措施已进行了报道^[6], 本文报道的是金边瑞香的茎尖脱毒、培养及移栽技术, 旨在为金边瑞香脱毒苗的工厂化生产打下基础, 也可为名、特、优经济植物的脱毒快繁及生产应用提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

取江西大余盆栽金边瑞香的嫩枝。

1.2 试验地点

江西省科学院植物良种繁育基地(高安祥符)。

1.3 试验方法

1.3.1 外植体的处理 将金边瑞香的嫩芽在自来水下洗净, 用 0.1% 升汞溶液浸泡 12 min, 无菌水冲洗 4 ~ 5 次, 无菌滤纸吸干水分, 切下顶芽分别接入 (1) 未添加任何激素的 MS 培养基中; (2) MS + 0.1 mg/L NAA + 0.05 mg/L 6-BA 培养基中; 均预培养 20 d 后, 将未污染的材料在原培养基中进行温度的交替处理 30 d, 即 34 ℃ (11 h) + 23 ℃ (13 h); 然后在超净台中, 双筒显微镜下剥离 0.2 ~ 0.3 mm 的茎尖, 接种到预先准备好的诱导培养基中。每瓶接种 3 个, 每组处理 5 瓶。

1.3.2 培养基种类 基本培养基为 MS; 添加于培养基中的不同激素种类有 6-BA、KT、NAA、IBA、IAA; 食用白砂糖 (广西柳州生产), 45 g/L, 琼脂条 0.6%; pH 值调至 5.7 ~ 5.8; 增殖、继代培养每瓶接种 8 个, 生根每瓶接种 6 株, 每组处理 5 瓶, 重复 3 次。

1.3.3 温度和光照 培养温度为 (23 ~ 25) ± 1 ℃; 光照时间 11 h/d; 光照强度 1 500 Lx。

1.3.4 移栽 移栽前将生根苗移至自然室温下开盖炼苗 1 ~ 2 d, 然后取出苗, 将苗根部琼脂洗去, 移植到盛有基质的 8 × 8 cm 营养钵中, 移栽基质为蛭石、珍珠岩、泥炭、河沙、田土、砻糠灰及其配比; 移栽期间注意保湿保温。

收稿日期:2007-06-03

基金项目:国家科技部农业转化资金资助项目(05EFN213600143), 江西省农业重点资助项目(赣科鉴字[2005]16号)

作者简介:江洪如(1948-), 女, 研究员. E-mail: jhr586@126.com.

2 结果与分析

2.1 不同预处理及不同激素水平对茎尖诱导生长的影响

经预培养的顶芽在显微镜下,将其茎尖生长点剥离迅速接入以 MS + 6 - BA 0.05 ~ 0.5 mg/L + NAA 0.05 ~ 0.2 mg/L 的培养基上,15 ~ 30 d 后可见茎尖生长点的启动,45 ~ 60 d 不同培养基上的茎尖有不同程度的变化,其中以 2 号培养基最好,茎尖生长较明显,而 4、5 号培养基中的茎尖开始伸长,但随后愈伤化较重,茎尖生长受抑制;1 号培养基中茎尖生长缓慢,随着时间的延长,有些材料逐渐褐化。试验表明,浓度为 0.1 mg/L 的 NAA 对茎尖生长点的启动、生长起着关键的作用,同时,附加适宜浓度的 6 - BA 可起到促进茎尖生长的作用。在茎尖诱导生长中,6 - BA 的浓度不宜过高,以 0.1 ~ 0.2 mg/L 较好,其茎尖诱导率分别为 80.0% 和 60.0% (见表 1)。此外,在茎尖剥离试验中发现,茎尖经 0.05 ~ 0.1 mg/LNAA 预培养后,茎尖生长点有一定的突起,生长较为活跃,利于茎尖的剥离和诱导,减少了死亡褐化率,大大提高了茎尖诱导成苗率。同时茎尖剥离前清除了污染的外植体,可减少茎尖培养时由外植体带来的污染。茎尖经培养 90 d 左右,可长成 1 ~ 2 cm 高的小苗。试管苗经国家质量检疫部门采用生物学、血清学和电镜检测,结果表明已脱去金边瑞香上的 5 种病毒(附“检测报告”),获得的脱毒苗即可进行增殖培养。

表 1 不同预处理及不同激素水平对茎尖诱导生长的影响

序号	激素水平/mg · L ⁻³ 诱导			生长情况
	6 - BA	NAA	率/%	
1(1)	0.05	0.05	20.0	
1(2)	0.05	0.05	26.7	1(1)、(2)生长点伸长缓慢、愈伤较少,易褐化
2(1)	0.1	0.1	73.3	
2(2)	0.1	0.1	80.0	2(1)、(2)生长点伸长较快、愈伤少
3(1)	0.2	0.1	46.7	3(1)、(2)生长一般,有愈伤
3(2)	0.2	0.1	60.0	4(1)、(2)生长较快,但芽易发生水渍状,愈伤组织生长快
4(1)	0.5	0.1	20.0	
4(2)	0.5	0.1	20.0	5(1)、(2)茎尖启动较快,但愈伤组织生长快,抑制了茎尖生长
5(1)	0.1	0.2	26.7	
5(2)	0.1	0.2	26.7	

注(1)为顶芽在未加激素的培养基中已预处理;(2)为顶芽在加有激素的培养基中已预处理

2.2 激素对试管苗增殖的影响

在继代增殖培养中,不同的激素浓度组合对试管苗的增殖有影响。以 MS 为基本培养基,激素种

类和浓度的组合见表 2,接种材料为顶芽。结果表明,第 1 组的增殖效果最好;第 5 组培养基未加任何激素,顶芽生长缓慢且 not 增殖;而 1、2 组及 3、4 组的对照显示,BA 对苗的增殖效果明显高于 KT。同时,试验表明每代培养时间为 50 ~ 60 d 较好,这时苗高 3.5 ~ 4.5 cm,节间长度 0.5 cm 左右,苗较健壮,其无论是作为生根还是繁苗的材料,效果都很好。若培养 30 ~ 40 d 的苗,茎苗矮小;而培养时间超过 60 d 以上,茎苗易产生徒长,节间长,茎干纤细、叶片小。这两种时间的苗作为转代材料,增殖效果都不太好。

表 2 不同培养基对试管苗增殖的影响

项目 序号	激素/mg · L ⁻³			增殖 系数	茎苗生 长状况
	6 - BA	KT	NAA		
1	0.5 - 1.0		0.1	4.1	正常
2		0.5 - 1.0	0.1 - 0.2	2.7	正常
3	1.5 - 2.0		0.1 - 0.25	3.0	苗矮小、茎杆细
4		1.5 - 2.0	0.1 - 0.25	2.3	苗矮小、茎杆细
5	0	0	0	0	生长缓慢、苗正常

注:增殖系数 = 增殖茎苗数/原茎苗数

2.3 激素对试管苗生根的影响

生长至 50 ~ 60 d 高约 3.5 cm 以上的健壮苗,即可切下 1.5 cm 左右的顶梢转入生根培养基中。在 $\frac{1}{2}$ MS 培养基中,不同的激素种类、浓度及其配比对试管苗生根率有很大的影响。从表 3 可以看到,低浓度的 NAA、IBA 和 IAA 都能使金边瑞香试管苗生根,但不同种类及浓度均对其生根影响大。在浓度为 0.1 ~ 0.5 mg/L 的范围内,单独使用 IAA 以 0.5 mg/L 效果好,生根率为 55%,而 IBA 和 NAA 单独使用以 0.1 ~ 0.2 mg/L 效果较好,生根率分别为 38.3% 和 30%,但试验结果证明,IAA 与 IBA 或 NAA 混合使用,只要浓度适宜,即可收到很好的效果,生根率平均可达到 82.6% 和 80.6% (见表 3)。

表 3 不同培养基对试管苗生根的影响

序号	激素/mg · L ⁻³			接种 数/株	生根 数/株	生根 率/%
	NAA	IBA	IAA			
1	0.1 - 0.2			60	18	30.0
2	0.5			60	5	8.3
3		0.1 - 0.2		60	23	38.3
4		0.5		60	7	11.7
5			0.1 - 0.2	60	15	25.0
6			0.5	60	33	55.0
7	0.01 - 0.05		0.1 - 0.5	150	121	80.6
8		0.01 - 0.05	0.1 - 0.5	150	124	82.6

在生根培养中,苗的生根时间,自接种以后,20 d 左右开始出根,30 d 出齐根,根均从基部发生,愈伤组织极少。

2.4 生根苗的移栽

培养 30~35 d 的生根苗,根系生命力较旺盛,每株苗根数最多有 8~9 条,一般多为 4~5 条,根长 2.5 cm 左右,这时,即可进行移栽。在移栽过程中,移栽基质对苗移栽成活率有影响。

从表 4 可以看到不同基质及其对比对生根苗移栽有一定的影响。B、C、D 的移栽效果最好,移栽成活率均在 95% 以上;而掺有黄土的混合基质 E、F,移栽成活率较低,可能是黄土具粘性不利于苗的根系透气而影响了苗的成活。

表 4 不同基质对生根苗的移栽成活率的影响

序号	基质及配比	移栽苗数/株	成活数/株	成活率/%
A	珍珠岩:沙=1:1	116	104	89.7
B	珍珠岩:沙=3:1	201	191	95.0
C	珍珠岩:泥炭=2:1	565	545	96.5
D	珍珠岩:泥炭:沙=2:1:1	561	535	95.4
E	珍珠岩:沙:黄土=3:1:1	108	80	74.1
F	岩棉灰:沙:黄土=3:1:1	125	89	71.2
G	蛭石	135	122	90.4

当在基质中生长 30 d 左右的移栽苗有新根生长时,即可移入钵钵中。将红壤土:岩棉灰:河沙:珍珠岩=3:1.5:0.5:0.5 及 800 倍液多菌灵按量混匀后,装入 14×16 cm 的营养钵中,然后将长有新根的移栽苗栽入钵内,轻浇水。栽苗 20~30 d 后可喷 0.2% 磷酸二氢钾一次,以后每月施以 20 倍水稀释过的腐熟枯饼水溶液 1 次,每年抽枝前施复合肥 1~2 次,每亩 2.5~3.0 kg。当小苗长至 10 cm 高时,即可打顶定干。生长 1 年的苗可长成具 2~4 个侧枝、高 20 cm 的植株。

3 讨论与结论

植物组织中的病毒粒子如果在高于正常的温度下,其组织中的很多病毒可被部分地或完全钝化,有利于提高脱毒效果,但却容易伤害植物组织^[5]。因此,热处理温度和时间对于钝化效果及茎尖诱导成苗率较为关键,应针对不同种类的植物对于耐热程

度而采取不同的热处理方法。根据金边瑞香不耐高温的特点,采用了昼夜高低温度交替连续处理 30 d,再结合 0.2~0.3 mm 大小的茎尖生长点培养,获得了完全脱去金边瑞香上的 5 种病毒,即瑞香花叶病毒、马铃薯 S 病毒、苜蓿花叶病毒、番茄黑环斑病毒和黄瓜花叶病毒。此外,本试验先将顶芽外植体在低浓度的 6-BA 和 NAA 培养基中预培养 20 d 后,再进行热处理,除了可以减少剥离操作的污染外,更重要的是低浓度的激素在一定程度上促进了茎尖生长活性,对茎尖的诱导起到了明显的促进作用。

金边瑞香的组织培养自 20 世纪 90 年代初以来,国内陆续有不少关于这方面工作的报道,也取得了较大进展,但研究仍停留在初步探讨及小试中,其重要原因之一就是金边瑞香的生根和移栽较难,影响了其规模生产的发展。笔者经多年试验结果表明,在金边瑞香生根和移栽的研究中取得了较好的效果,健壮苗的平均生根率为 82.6%;生根苗根系发达、健壮,同时制定了一套移栽管理操作规程,提高并规范了操作工的技能,选择到了 3 种适宜的移栽基质,平均移栽成活率达到 95.0% 以上,这些是本项研究能达到中试阶段的关键技术之一,为进一步扩大生产金边瑞香脱毒种苗规模打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] 缪雄平,李惠荣.金边瑞香的快速芽增殖和发根[J].宁德师专学报(自然科学版),1994,6(1):32-36,44.
- [2] 洪军孟.金边瑞香玻璃苗和生根问题探讨[J].浙江万里学院学报,2001,14(1):40-41.
- [3] 周南镛,洪军孟.金边瑞香组织培养和快速繁殖技术[J].农业科技通讯,2000(12):18-19.
- [4] 赵 绮,周冬法,周能辉,等.金边瑞香离体培养中芽和愈伤组织诱导初步研究[J].浙江林业科技,2003,23(6):20-25.
- [5] 李浚明,编译.植物组织培养教程(-2 版)[M].北京:中国农业大学出版社,2002:6-234,244.
- [6] 江洪如,余发新,朱 祺,等.影响金边瑞香脱毒苗继代增殖及生根的因素[J].江西科学,2007(5):560-562;610.

(下转第 65 页)

- 276.
- [2] Vicent C M, Delseny M. Isolation of Total RNA from Arabidopsis, Thalian Seeds [J]. AnaBiochem, 1999, 268: 412-413.
- [3] 李 宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策 [J]. 生物技术通报, 1999, 15(1): 36-39.
- [4] Wan C Y, Wilkins TA A. Modified Hot Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality RNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Analytical Biochem, 1994, 223: 7-12.
- [5] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1995: 74-92.
- [6] Sambrook L J, Maniatis T, Fritsch E F. Molecular Cloning EM. A laboratory manual (2nd) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 39: 343-361.
- [7] 赵双宜, 吴耀荣, 夏光敏. 介绍一种简单高效的植物总 RNA 提取方法 [J]. 遗传 HEREDITAS, 2002, 24(3): 337-338.
- [8] Wall C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yields of high quality RNA from cotton [J]. Anal Biochem, 1994, 223: 7-12.
- [5] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作

Comparison and Improvement of the Methods for Total RNA Isolation from the Petals of *Rhododendron molle*

WANG Yan, WANG Man-ying, LI Si-guang

(1. College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China;

2. Key Laboratory of Jiangxi Subtropical Plant Resources Protection and Utilization, Nanchang 330022, China)

Abstract: The appropriate methods are not always same because of the difference in isolating RNA from diverse plants and tissues. In this paper, four methods of total RNA isolation from the petals of *Rhododendron molle* were discussed, including method of hot phenol, hot borate, guanidinium thiocyanate and modified guanidinium thiocyanate. The RNAs isolated with method of modified guanidinium thiocyanate were proved to have good quality, purity and integrity, and can be used in cDNA library construction, northern blotting, mRNA DDRT-PCR and so on.

Key words: RNA Isolation; the petals of *Rhododendron molle*; method of guanidinium thiocyanate; modification

(上接第 61 页)

In Vitro Propagation of Virus-free by Shoot-tip of *Daphne Odora* var. *naginata* Mak

JIANG Hong-ru, YU Fa-xin, LIU Teng-yun, ZHU Qi, GAO Zhu, WANG Bi-qin, ZHOU Hua, WANG Xiao-ling

(Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330029, China)

Abstract: The following experimental results have been obtained: the terminal buds of *Daphne odora* var. *naginata* Mak were first cultured on MS + 0.05 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA for 20 days then in the condition of day and night with 34 °C (11 h) + 23 °C (13 h) For 30 days. The survival ratio with shoot-tip of 0.2 ~ 0.3 mm was 80.0% on MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA. The virus-free seedlings were obtained. The terminal buds differentiated a numbers of young buds on MS medium containing 6-BA 0.5 ~ 1.0 mg/L and NAA 0.1 mg/L. On this medium shoot multiplication occurred at a 4.1-fold rate. The average ratio of rooting of the high-quality seedling was 82.6% in the suitable condition of culture. The survival ratio of transplanting reached 96.5% in the medium (perlite: peaty soil = 2:1).

Key words: *Daphne odora* var. *naginata* Mak; virus-free by shoot-tip; in vitro propagation; tissue culture