维普资讯 http://www.cqvip.com

香石竹茎尖分生组织培养的研究

孙振雷,魏健,李秀岩　(长春师范学院生命科学学院,吉林长春 130032)

摘要　对香石竹(*Dianthus caryophyllus*)进行了茎尖分生组织快速繁殖培养及其影响因素的研究。结果表明,大花香石竹比散枝香石竹接种成活率高,且以顶芽为外植体,在MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.4 mg/L上培养的丛芽分化率最高,达到87.5%。将顶芽、带腋芽的茎节、不带腋芽的茎节或茎段分别接种在MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.4 mg/L上培养,顶芽分化的芽数最多。光照12 h/d对香石竹丛芽生长有利。

关键词　香石竹(*Dianthus caryophyllus*);外植体;茎尖分生组织;组织培养;培养基
中图分类号　Q943.1　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　0517-6611(2006)23-6126-02

香石竹(*Dianthus caryophyllus*)又名康乃馨、荷兰石竹、麝香石竹、母亲花,属石竹科石竹属,多年生草本植物,茎叶清秀,花朵雍容富丽,花色娇艳且具芳香,具有极高的观赏价值。香石竹单朵花期长,耐瓶插,主要用于切花,是世界上最重要也是应用最普遍的四大切花之一。

香石竹,若一旦侵染病毒,代代相传,体内不断积累,严重影响产量和切花质量。危害香石竹的病毒已发现有数种,如香石竹斑驳病毒(CarMV)、香石竹脉斑驳病毒(CarVMV)、香石竹潜隐病毒(CLV)、香石竹坏死斑点病毒(CarNFV)和香石竹蚀环病毒(CarERV)等。采用组织培养快速繁殖香石竹,可有效去除病毒,增加繁殖数,确保遗传性状的稳定,提高切花质量。笔者对香石竹进行了茎尖分生组织快速繁殖培养及其影响因素的研究,以期为香石竹快速繁殖培养及规模化生产提供技术依据。

1　材料与方法

1.1　试验用具

1.1.1　培养基配制用具。烧杯、容量瓶、量筒、刻度移液管、吸管、高压蒸汽灭菌锅、玻璃棒、分析天平、药物天平、精密pH试纸、硫酸纸。

1.1.2　培养用具。三角瓶、封口用品(耐高温透明塑料纸)。

1.1.3　接种用具。剪刀、解剖刀、镊子、三角瓶、酒精灯、手持喷雾器、接种针、载玻片。

1.1.4　试剂。75%酒精、0.1%升汞、75%酒精棉球、无菌水、蒸馏水、MS基本培养基各种贮备液、NAA(萘乙酸)、6-BA等。

1.2　培养基

1.2.1　贮备液(母液)的配制和保存。在制备贮备液和培养基的时候,应当使用蒸馏水或无离子水,以及高纯度的化学试剂。

1.2.2　培养基的制备。①制备1 L培养基,取50 ml贮备液Ⅰ(大量元素),5 ml贮备液Ⅱ(微量元素),5 ml贮备液Ⅲ(微量元素)和5 ml贮备液Ⅳ(有机元素),再称取30 g蔗糖和13 g琼脂置于1 L的烧杯中,加水至烧杯最终容积的3/4,加热使之溶解均匀。②将加热溶解均匀的培养基迅速倒入1 L的三角瓶中,按照步骤①制备并标为1、2、3、4号瓶。③在1号瓶中不加植物生长激素,记为培养基⓪;2号瓶中加6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L,记为培养基①;3号瓶中加6-BA 0.5 mg/L、NAA 0.4 mg/L,记为培养基②;4号瓶中加6-BA 2.0 mg/L、NAA 0.3 mg/L,记为培养基③。④每瓶充分混合之后,用0.1 mol/L NaOH或0.1 mol/L HCl调节pH值均为5.8。⑤分别在1、2、3、4号瓶中加蒸馏水至三角瓶的最终容积(1 L)。⑥用耐高温透明塑料纸,或包在纱布中的棉塞或盖封严瓶口后,再用牛皮纸封住瓶口待用。⑦将组织培养需用的三角瓶用自来水清洗干净,并将瓶内的水吸干,用专用封口膜封严瓶口,再用牛皮纸封住瓶口;把接种时所用的镊子、解剖刀、剪刀、接种针等用牛皮纸包裹好,放入高压蒸汽灭菌锅内灭菌,高压灭菌时一般在121 ℃(1.06 kg/cm^{2}或0.105 MPa)保持20 min。⑧将取出的灭菌物迅速送至无菌操作室中,在室温下等培养基冷却至70 ℃左右,在超净工作台上应尽快将其分装入100 ml(150 ml)的三角瓶中,培养基量一般以占三角瓶的1/4~1/3为宜。在分装的同时作好培养基标记,置冰箱中4 ℃下保存待备用。

1.3　外植体培养

1.3.1　外植体的准备。利用茎尖分生进行组织培养,外植体选用市面上出售的大花香石竹和散枝香石竹鲜花药,侧枝上带有较多的小侧芽。

1.3.2　外植体消毒。使用药剂表面消毒。使用的药剂种类、浓度和处理时间因不同材料对药剂的敏感性而异。常用的消毒剂有漂白粉(1%~10%的滤液)、次氯酸钠(0.5%~10%)、升汞(0.1%~10%)、酒精(75%)、双氧水(3%~10%)等。取香石竹带有较多小侧芽的茎段(3~5 cm枝端),先用自来水冲洗2~3次,用滤纸吸干水分,然后将材料转入到高压消毒的烧杯中,在超净工作台上先用75%酒精浸泡杀菌30 s,去除酒精,用无菌水漂洗3~4次,迅速加入0.1%升汞液(可加入适量的吐温)浸泡杀菌8~10 min,浸泡过程中经常摇动烧杯。倒掉升汞液,用无菌水冲洗4~5次,最后用无菌水浸泡备用。

1.3.3　外植体接种。在无菌操纵室的超净工作台上将备用嫩茎切成0.8~1.0 cm小段,分别接种到培养基:⓪MS;①MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;②MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.4 mg/L;③MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 4种培养基上。每个100 ml(150 ml)三脚瓶中接种5~6个小茎段,用封口膜封好瓶口,放入培养室内培养。经初代培养22 d后获得的芽分别转接到培养基①、②、③上进行继代培养16 d。

2　结果与分析

2.1　继代培养　培养物经一段时间培养后,为防止细胞团的老化或培养基养分用完而造成营养不良及代谢物积累毒害等的影响,应及时将其转移至新鲜培养基,进行继代培养。经初代培养22 d后获得的芽切取下来对应地接种到培养基①、②、③上进行继代培养,经16 d培养,观察比较丛芽

作者简介　孙振雷(1950-　),男,吉林长春人,教授,从事植物种质遗传的教学与研究工作。
收稿日期　2006-08-29

维普资讯 http://www.cqvip.com

的生长和分化情况，发现培养物长势良好，颜色正常，基本没有污染。

表1　不同品种的外植体表面消毒的接种成功率

品种	接种瓶数	无污染瓶数	接种成功率//%
大花香石竹	13	11	84.6
散枝香石竹	14	8	57.1

2.2　不同品种的外植体表面消毒的接种成功率　由表1可见，将2种不同品种的带腋芽的茎节接种到培养基①上培养1个月，大花香石竹的接种成功率较高(表2)。

表2　不同浓度激素对香石竹丛生芽继代培养的影响

培养基	接种瓶数	污染瓶数	污染率%	分化芽数	分化率%	生长状况
①	11	7	63.6	20	71.42	株高2 cm，植株细长，叶色淡绿，叶片5片
②	6	2	33.3	28	87.50	株高3 cm，植株细长，叶色淡绿，叶片7片
③	7	6	85.7	14	57.14	株高2 cm，植株细长，叶色淡绿，叶片4片

2.3　不同浓度激素对香石竹丛生芽继代培养的影响　由表2可见，将经初代培养获得的芽切取下来对应地接种到培养基①、②、③上经16 d培养，结果表明：培养基②上的丛生芽分化效果最好，芽分化率为87.50%，株高平均达3 cm，植株粗壮，叶片数达7片。与其他2种培养基相比，该培养基中NAA和6-BA的含量较高。有关研究表明，香石竹对NAA和6-BA的浓度适应范围较广，在6-BA质量浓度2.0~10 mg/L和NAA质量浓度0.2~2.0 mg/L范围内，均能诱导出相当数量的芽。当6-BA 0.5 mg/L、NAA 0.4 mg/L时效果较好。此外，芽分化率高与6-BA和NAA的比例也有关，6-BA能促进细胞分裂，诱导芽的分化，使愈伤组织或器官分化出不定芽；生长素则诱导细胞分裂。到组织内时，细胞分裂素起主导作用，诱导芽的分化促进侧芽的萌发，因而培养基①、②上丛生芽分化率较高，说明培养基①、②中生长素与细胞分裂素的配比适宜诱导香石竹从芽的分化，但培养基①生长素和细胞分裂素的用量不如培养基②。培养基③上分化的不定芽少，分化率仅为57.14%，植株不高，有玻璃化现象。因此，培养基①用于壮苗较佳；培养基②则适合于做继代培养。

2.4　外植体切取部位对芽生长的影响　由表3可见，将带腋芽和不带腋芽茎节的茎段分别接种到培养基②上培养20 d，带腋芽茎节的分化率最高，达66.7%，苗高0.5 cm，无玻璃化苗产生。

表3　不同外植体切取部位对芽生长的影响

切取部位	接种瓶数	玻璃苗瓶数	苗高cm	瓶均芽数	分化率//%
带腋芽的茎节	6	0	0.3	4	66.7
不带腋芽的茎节	6	6		0	0
顶芽	4	0	0.5	3	75.0

2.5　光照时间对芽生长的影响　由表4可见，将顶芽接种在培养基②上，在光照10、12 h/d的条件下培养1个月，结果表明，光照12 h/d对丛生芽较有利，接种15瓶，丛生芽生长良好的9瓶，植株粗壮，叶片深绿色；而光照10 h/d则会出现大量的“玻璃苗”，接种15瓶，10瓶出现玻璃化苗，叶片白化，植株细弱。香石竹性喜光，较强的光照有利于生长。香石竹经初代培养获得的丛生芽转入继代培养中培养，对光照的要求较为严格，而光照时间少，温度过高，会导致“玻璃苗”的发生。因此采用延长光照时间，加强光照，降低培养温度有助于克服“玻璃苗”。

表4　光照时间对香石竹丛生芽生长的影响

光照时间//h/d	接种瓶数	生长良好瓶数	生长细弱瓶数	玻璃苗瓶数
10	15	2	3	10
12	15	9	2	4

3　小结

香石竹，若一旦侵染病毒，代代相传，体内不断积累，严重影响植株的生育，而香石竹长期的营养繁殖使病毒危害严重，切花质量变劣，产花量降低。采用组织培养快速繁殖香石竹，可有效去除病毒，增加繁殖数，确保遗传性状的稳定，进而提高切花质量。试验结果表明，在其组织培养中，大花香石竹比散枝香石竹接种成活率更高；选择顶芽作为外植体，丛生芽的分化率高；培养基MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.4 mg/L继代培养较好，MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L诱导丛芽更佳；选择适宜的培养温度(25 ℃)，延长光照时间，可以较好地防止玻璃苗。

参考文献

[1] 吴殿星，胡繁荣.植物组织培养[M].上海：上海交通大学出版社，2004.
[2] 潘瑞炽.植物组织培养[M].广州：广东高等教育出版社，2001.
[3] 刘庆昌，吴国良.植物细胞组织培养[M].3版.北京：中国农业大学出版社，2005.
[4] 周丽华，吕华飞，吴键字，等.茎尖分生组织获得无病毒康乃馨植株的研究[J].云南农业大学学报，1994(4)：32-35.
[5] 王莲英，朱秀珍，虞佩珍，等.中国名贵花卉鉴赏与栽培[M].合肥：安徽科学技术出版社，1997.
[6] 曹孜义.现代植物组织培养技术[M].兰州：甘肃科学技术出版社，2003.
[7] 崔德才，徐培文.植物组织培养与工厂化育苗[M].北京：化学工业出版社，2003.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、*CV*(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对生长率)，单位名缩略语IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时)，则可取各主要词首字母写成缩写，但需在第一次出现处写出全称，表及图中则用注解形式在下方注明，以便读者理解。