文章编号:1001-7380(2015)06-0019-04

紫娇花组织培养中愈伤组织的诱导及植株再生

何月秋[1,2],黄 艾[1],李 波[2]

(1.宁波城市职业技术学院,浙江 宁波 315100;2.江苏碧云天科技有限公司,江苏 丹阳 212300)

摘要:紫娇花种子经灭菌处理后,于试管内培养基中萌发,取幼苗的下胚轴、子叶,进行愈伤组织的诱导、不定芽的分化及试管苗生根技术的研究。结果显示,紫娇花种子最佳灭菌方式为0.1%升汞浸泡10 min,污染率可控制在37.0%,萌芽率达到86.3%;愈伤组织最适诱导部位为下胚轴,愈伤组织诱导最佳培养基为MS+0.2 mg/L 6-BA+2.0 mg/L 2,4-D,诱导率达到83.7%;紫娇花不定芽分化的最适培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA +0.2 mg/L NAA,不定芽分化率为48.0%;最适生根培养基为1/4 MS+0.1 mg/L NAA +0.5% AC,生根率可接近100%。

关键词:紫娇花;种子;下胚轴;子叶;愈伤组织;诱导;植株再生

中图分类号:Q949.71+8.25 **文献标志码**:A **doi**:10.3969/j.issn.1001-7380.2015.06.005

Callus induction and plant regeneration in *Tulbaghia violacea* in vitro culture

HE Yue-qiu[1,2],HUANG Ai[1],LI Bo[2]

(1.Ningbo College of Vocational Technology,Ningbo 315100,China;
2.Jiangsu Biyuntian Science & Technology Limited Company,Danyang 212300,China)

Abstract:Taking the hypocotyl and cotyledon excised from the aseptic plantlets of *Tulbaghia violacea* as explants, a plant regeneration protocol was developed about callus induction, adventitious bud differentiation, root formation. The results showed that the optimal sterilization method was 0.1% $HgCl_2$ treatment for 10 min, with 37.0% pollution rate and 86.3% germination rate. For hypocotyl as optimal explant, the optimal callus inducing medium was MS with 2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA, with 83.7% induction rate. Adventitious buds were effectively generated on MS with 1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, with 48.0% differentiation rate. Roots were formed from the shoots on 1/4 MS supplemented with 0.1 mg/L NAA after 20 d, with the rooting rate almost reaching 100%.

Key words:*Tulbaghia violacea*; Seed; Hypocotyl; Cotyledon; Callus; Induction; Plant regeneration

紫娇花(*Tulbaghia violacea*)是一种重要的地被植物,别名野蒜或非洲小百合,原产地为南非,为石蒜科紫娇花属多年生常绿草本植物。紫娇花花紫色,观赏价值高,同时紫娇花对土壤要求不高,耐热,耐贫瘠,易于栽培管理,近年来在园林绿化中应用广泛。紫娇花以分株繁殖和播种繁殖方式为主,但其增殖系数低,增殖周期长,难以满足生产需求。植物织培养技术是大量快速繁殖紫娇花的有效途径,紫娇花的组织培养研究较少,何月秋等[1]以花蕾为外植体,通过诱导小鳞球进而获得了紫娇花的试管苗,但实验中发现,最佳诱导期的花蕾难以采集,且花蕾的诱期需要3个月,因此,为了拓展外植体来源,建立高效的紫娇花组织培养体系。本试验研究了种子灭菌、芽诱导与生根等培养条件,建立了紫娇花完整的植株再生体系,大大缩短了培养时间,降低了成本,为紫娇花规模化生产提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为采自宁波城市职业技术学院溪口校区的紫娇花当年生自然风干种子,无菌下胚轴、子叶取自种子萌发出的无菌苗。

收稿日期:2015-08-14;**修回日期**:2015-08-28

基金项目:浙江省宁波科技局双创项目(2012C91027);江苏省丹阳市高层次创新人才引进项目

作者简介:何月秋(1975-),女,四川大邑人,副教授,研究方向:植物组织培养。E-mail:heyueqiu@nbcc.cn。

1.2 方法

1.2.1 种子灭菌 挑选发育成熟健康的种子,纱布包裹用洗涤精搓洗干净,自来水清洗,置于超净工作台上,用75%乙醇浸泡并振荡30 s,并用无菌水冲洗3次后,0.1% $HgCl_2$ 分别振荡灭菌5,8,10,12 min,每次灭菌后均用无菌水冲洗3~5遍。将灭菌处理后的种子接种于不添加植物生长调节剂的1/2 MS培养基上,处理30粒种子,重复3次。30 d后统计污染率和萌发率。

1.2.2 愈伤组织诱导 将种子萌发的无菌胚轴、子叶剪成5 mm×5 mm左右小块,接种于6-BA(0.1,0.2,0.5 mg/L)、2,4-D(1.0,1.5,2.0 mg/L)的2因素3水平完全试验培养基中。每处理20个外植体,重复3次。30 d后统计2种外植体愈伤组织的诱导率。

1.2.3 不定芽分化与增殖 诱导出的愈伤组织转接到添加了6-BA(0.5, 1.0, 2.0 mg/L)、NAA(0.1, 0.2, 0.3 mg/L)的2因素3水平完全试验培养基中。每处理20个外植体,重复3次。30 d后观察生长情况。

1.2.4 生根培养及移栽 丛生芽长到高2~3 cm时将其切成单芽转接到添加有0.5%AC,基本培养基为1/2 MS, 1/4 MS, 1/8 MS,NAA(0, 0.05, 0.1 mg/L)的生根培养基上培养,待炼苗后进行驯化移栽。

1.3 培养条件

以上培养基中除生根阶段蔗糖浓度为1.5%外,其他阶段蔗糖均为3%,琼脂为0.7%,pH值调制5.8。培养室内控制恒温(25±1) ℃,光照为40 μmol/(m^2·s),光照时间为每天14 h。

1.4 数据采集与分析方法

污染率=污染种子数/种子总数×100%;萌发率=萌发种子数/种子总数×100%;诱导率=诱导出愈伤组织的外植体数/外植体总数×100%;不定芽分化系数=诱导出的丛生芽数/外植体总数×100%;有效芽长>1.0 cm。数据采用平均值±标准差(SD)表示,采用SPSS17.0统计软件对数据进行统计和单因子方差分析,配方之间培养结果采用Duncan's新复极差方法(SSR, $P<0.05$)测验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方式对紫娇花种子萌发率与污染率的影响

灭菌后的种子接种于1/2 MS培养基上,3 d后开始出现污染,15 d后不再有污染出现。种子接种20 d开始萌发,萌发时间主要集中在接种后的20~30 d。培养30 d统计的污染率和萌发率见表1。可以看出,不同处理之间差异显著,污染率随着处理时间的增长而下降,而种子萌发率则呈下降趋势。$HgCl_2$处理5 min萌发率最高,达到93.3%,但污染率也最高,达到66.0%;处理12 min污染率最低,为19.0%,萌发率仅有76.7%。进一步分析表明,$HgCl_2$处理5~10 min,紫娇花种子萌发率差异不显著,但污染率差异显著。综合考虑污染率和萌发率,$HgCl_2$处理10 min是最佳的灭菌时间。

表1 不同灭菌方法对外植体的影响

消毒时间/min	接种粒数/颗	污染率/%	萌发率/%
5	30	66.0±3.6 a	93.3±3.8 a
8	30	48.3±5.0 b	89.7±2.5 ab
10	30	37.0±4.0 c	86.3±1.5 b
12	30	19.0±2.6 d	76.7±1.5 c

同列不同字母代表处理间存在显著性差异($P<0.05$)。

2.2 不同植物生长调节剂配比对愈伤组织诱导的影响

待紫娇花种子萌发后,截取下胚轴和子叶接种到愈伤组织诱导培养基中。接种20 d后大部分胚轴开始褪绿,切口处膨大增厚,30 d开始脱分化形成乳白色的愈伤组织。少部分子叶在接种20 d左右开始膨大,少量子叶产生绿色颗粒状组织,但无进一步分化。由表2可知,紫娇花子叶愈伤组织诱导率很低,最高只有9.6%,且9个配方中差异不明显,这说明紫娇花子叶非常难脱分化;以下胚轴为外植体材料较易诱导愈伤组织的形成,在试验组合9种配方中最低诱导率为38.0%,最高可达到85.0%,诱导率随着植物生长调节剂的用量逐渐升高。其中,配方MS+2 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA,MS+2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA诱导率最高,分别为83.7%和85.0%,进一步数据分析表明,2者无显著性差异,考虑植物生长调节剂用量的控制,MS+2 mg/L 2,4-D +0.2 mg/L 6-BA是紫娇花下胚轴愈伤组织诱导较佳的配方。

2.3 不同植物生长调节剂配比对不定芽分化的影响

紫娇花愈伤组织在原来培养基中只能继续增殖,不能进一步分化,需改变培养条件。将诱导形成的愈伤组织转移至添加有NAA和6-BA的MS培养基中进行不定芽的分化培养。10 d后愈伤组织逐渐变绿,并形成圆球状,20 d后先长出1片子叶再逐渐形成不定芽。试验用9种培养基中,不定芽的

分化率最高为 48.0%,最低也可达到 13.0%。由表 3 可知,不定芽的分化率随着 6-BA 用量的增加而有所升高,进一步分析表明 MS+0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA 不定芽分化率最高,与其他配方有显著差异($P<0.05$)。该配方诱导形成的不定芽叶色嫩绿,生长旺盛,结合不定芽的生长情况,MS+0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA 是较为适宜的不定芽分化培养基。

表 2　不同外源激素配比对愈伤组织诱导的影响

组合	2,4-D/(mg/L)	6-BA/(mg/L)	子叶诱导率/%	胚轴诱导率/%
1	1.0	0.1	1.3±0.25 e	38.0±2.6 e
2	1.0	0.2	2.4±0.32 ef	39.7±2.5 e
3	1.0	0.5	3.2±0.25 d	52.7±2.5 d
4	1.5	0.1	2.1±0.20 ef	62.7±3.1 c
5	1.5	0.2	5.0±0.45 c	64.7±4.2 c
6	1.5	0.5	6.3±0.45 b	66.0±3.6 c
7	2.0	0.1	5.1±0.36 c	74.3±3.8 b
8	2.0	0.2	9.2±1.45 a	83.7±3.2 a
9	2.0	0.5	9.6±1.04 a	85.0±5.0 a

同列不同字母代表处理间存在显著性差异($P<0.05$)。

表 3　不同外源激素配比对不定芽分化的影响

组合	NAA/(mg/L)	6-BA/(mg/L)	分化率/%
1	0.1	0.5	13.0±2.0 g
2	0.1	1.0	16.7±1.2 f
3	0.1	2.0	48.0±4.4 a
4	0.2	0.5	30.0±2.0 c
5	0.2	1.0	43.04±2.6 b
6	0.2	2.0	33.0±1.0 c
7	0.3	0.5	26.0±1.0 d
8	0.3	1.0	21.0±1.0 e
9	0.3	2.0	21.7±1.5 e

同列不同字母代表处理间存在显著性差异($P<0.05$)。

2.4　紫娇花组培苗的生根培养

选取生长健壮,株高 2.5~3 cm 的紫娇花组培进行生根培养。由表 4 可知,紫娇花组培苗在无外源植物生长调节剂的培养基中生根率即可达到 50%,单独添加 NAA 后其生根率明显上升,生根率均超过 90%,且当 NAA 质量浓度为 0.1 mg/L时紫娇花组培苗的生根率可达 100%。统计分析表明,当 NAA 为 0.1 mg/L 时,尽管基本培养基不相同但其生根率无显著差异($P<0.05$)。观察表明,紫娇花组培苗在 1/2 MS, 1/4 MS 基本培养基中可形成健壮的再生植株,而 1/8 MS 基本培养基中再生植株则比较细弱。综合考虑,1/4 MS+0.1 mg/L NAA 时生根诱导率可达 99.2%,为最佳的生根诱导培养基。

表 4　基本培养基和 NAA 对紫娇花不定芽生根的影响

组合	基本培养基	NAA/(mg/L)	生根率/%	根生长情况
1	1/2 MS	0.0	50.2±0.8 d	苗壮,根粗
2	1/2 MS	0.05	91.0±2.0 c	苗壮,根粗
3	1/2 MS	0.1	99.5±0.5 a	苗壮,根粗
4	1/4 MS	0.0	51.2±0.8 d	苗壮,根粗
5	1/4 MS	0.05	95.2±3.9 b	苗壮,根粗
6	1/4 MS	0.1	99.2±0.7 a	苗壮,根粗
7	1/8 MS	0.0	51.8±1.4 d	苗细弱,根细长
8	1/8 MS	0.05	94.5±1.0 b	苗细弱,根细长
9	1/8 MS	0.1	99.5±0.6 a	苗细弱,根细长

同列不同字母代表处理间存在显著性差异($P<0.05$)。

3　结论与讨论

3.1　紫娇花种子灭菌

无菌体系的建立是植物组织培养成功的关键。其中,外植体种类、取材部位和灭菌方法是影响无菌体系建立的重要因素。自然条件下,植物外植体带有较多的细菌和真菌,进行组织培养时需对其进行灭菌,但要求尽量保持组织材料完好无损保持生活力,使其在适宜的条件下迅速生长和增殖[2-3]。一般而言,不同的植物材料或同一植物材料的不同部位灭菌的方法差异很大。要想获得满意的无菌材料,需要根据实际的情况采用相应的药剂和处理时间。对于种子的灭菌方式,戴萍等[4]用 0.1%的 $HgCl_2$ 浸泡中国石蒜的种子 15 min 污染率只有 5%,且可达到 85%的存活率;赵健等[5]用 75%乙醇浸泡华北落叶松种子 3 min后,转入 0.1%的 $HgCl_2$ 浸泡 10 min 为最佳方式;宁梦雅等[6]用 5%次氯酸钠珍珠菜种子 10 min 时其污染率只有 7.5%,但萌发率只有 15%。本试实验采用 75%乙醇浸泡 30 s 和 0.1%$HgCl_2$ 浸泡 10 min 的方法,既可以较好的控制紫娇花种子的污染也可以保证较高的萌发率。

3.2　紫娇花愈伤组织诱导

愈伤组织是指人工培养基上由外植体脱分化形成的一团无序生长的薄壁细胞,在适当培养条件下可分化形成不定芽,也可形成体胚。大量研究表明,植物组织培养中愈伤组织的诱导与植物生长调节剂的种类、浓度、相关配比和处理时间关系密切。下胚轴将来发育成根茎的部位,分化程度低[7],通常难以形成愈伤组织。2,4-D 或 NAA 常常用来诱导外植体的愈伤组织,应用广泛[8],同时多数需要与 6-BA 配合。百脉根[9]、萝卜[10]、甜瓜“黄醉仙”[11]、西洋参[12]、北柴胡[13]等植物的下胚轴在一定质量浓度的 2,4-D 或 NAA 与一定质量浓度的 6-BA 或 KT 的配合下诱导

出高频率的愈伤组织。本试验采用 MS+0.2 mg/L 6-BA +2.0 mg/L 2,4-D,可以获得下胚轴 83.7%,而子叶能获得的愈伤组织更低,最高只有 9.4%,且很难分化成不定芽,这说明搞清紫娇花子叶脱分化条件还需要更深入的研究。

3.3 紫娇花不定芽的分化

组织培养中生长素配合细胞分裂素能诱导不定芽的分化。愈伤组织不定芽分化培养中,不同植物生长调节剂质量浓度组合作用不同,其比例尤为重要。牡丹愈伤组织分化在 6-BA/NAA 质量浓度比例为 2∶1时分化比例达到最大值(4.7%),而比例为 10∶1则不能分化,换为 0.25 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L TDZ,其最高诱导率可达到 30.5%[14];而单独添加 8 mg/L 6-BA则可使红掌叶片愈伤组织则分化出不定芽[15]。本试验中,紫娇花下胚轴愈伤组织在 1.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 作用下可分化出不定芽。

3.4 紫娇花组培苗生根

生根是组织培养的重要环节,高质量的根系是高移栽成活率的保证。一般在生根阶段需要调整基本培养基并添加生长素 NAA 或 IBA。不同植物组织培养苗生根的难易不一,蓝靛果组织培养苗在单独添加 1.0 mg/L IBA 的改良 MS 培养基中生根率可达到 100%[16];在红掌组织培养苗生根培养中,IBA 是重要的影响因子[17],本试验中 1/4 MS+0.1 mg/L NAA + 0.5%AC 可以获得近 100%的生根率。

参考文献:

[1] 何月秋,祝志勇,章丰涛.紫娇花花蕾离体培养及再生系的建立[J].北方园艺,2010(16):151-154.

[2] 张东方.植物组织培养技术[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,2004.

[3] 王玉英,高新一.植物组织培养技术手册[M].北京:金盾出版社,2006.

[4] 戴 萍,张春霞,张 智,等.中国石蒜的组织培养和快速繁殖[J].北方园艺,2012(22):95-98.

[5] 赵 健,李 旦,张金凤.华北落叶松成熟合子胚不定芽诱导及伸长研究[J].中国农学通报, 2014,30(16):12-17.

[6] 宁梦雅,殷芳芳,胡丽鹏,等.珍珠菜组培快繁体系研究[J].江苏农业科学,2014,42(10):45-49.

[7] 宋松泉,程红焱,龙春林,等.种子生物学[M].北京:科学出版社,2008.

[8] 王小菁,陈 刚,李明军,等.植物生产调节剂在植物组织培养中的应用[M].北京:化学工业出版社,2010.

[9] 韩 阳,卢福荣,崔智昕,等.百脉根植株高频再生体系的建立[J].辽宁大学学报:自然科学版,2014,41(2):152-156.

[10] 李媛媛,王冰林,韩 佳,等.萝卜下胚轴高效再生体系的建立[J].江苏农业科学,2014,42(1):58-60.

[11] 王爱玲,张 敏,廖新福,等.甜瓜“黄醉仙”下胚轴再生体系的初步建立[J].北方园艺,2013(12):100-103.

[12] 胡选萍.西洋参胚轴愈伤组织诱导培养条件研究[J].北方园艺 2013(11):97-100.

[13] 徐丽霞.北柴胡幼根、子叶和下胚轴组织培养研究[J].山西农业科学,2012,40(11):1139-1140,1159.

[14] 王军娥,巩振辉,李新风.牡丹愈伤组织诱导与分化技术的优化研究[J].西北农业学报,2008,17(5):282-286.

[15] 吕复兵,王碧青,廖飞雄,等.红掌叶片离体培养与植株再生研究[J].广东农学科学,2002(6):24-25.

[16] 英 男,曹后男,宗成文,等.蓝靛果组培苗生根以及炼苗移栽的研究[J].辽宁林业科技,2014(4):27-29.

[17] 牛瑞鹤,王 晶,郑必平,等.红掌组培苗生根培养基的优化[J].安徽农业科学, 2014,42(29):10088-10090,10101.