

贾思振,王媛花,颜志明,等. 火焰南天竹叶片不定芽再生研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):73-75.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.020

火焰南天竹叶片不定芽再生研究

贾思振^{1,2}, 王媛花^{1,2}, 颜志明^{1,2}, 刘 丹¹

(1. 江苏农林职业技术学院, 江苏句容 212400; 2. 江苏现代园艺工程技术中心, 江苏句容 212400)

摘要:以火焰南天竹组培苗叶片为外植体,研究不同植物生长调节剂、不同营养物质、暗培养时间、接种方式对其不定芽再生的影响。结果表明:继代 30~35 d 的火焰南天竹组培苗叶片适用于叶片不定芽再生;外植体在添加 1.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上暗培养 14 d,再生率可达 80.6%,平均每张叶片的再生芽数达到 3.1 个,且玻璃化现象较少,为最佳组合;生根试验表明,再生芽在 1/2MS+0.4 mg/L NAA 的生根培养基上生根效果最好,生根率可达 76.3%。

关键词:火焰南天竹;叶片再生;不定芽;生根

中图分类号:S687.904+.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)02-0073-03

火焰南天竹(*Nandina domestica* ‘Fire power’)是一种新兴的园艺品种,从国外引入我国栽培,现在大量用于园林景观中。火焰南天竹耐寒常绿,叶片椭圆或卵圆形,与原种披针形叶有明显区别,这是优于原种的重要性状^[1]。火焰南天竹到每年秋天遇到冷空气,叶色便由绿色转为鲜红色,叶片颜色能够持续到第二年初春,因此在南方地区具有极佳的观赏效果。在园林绿化中,火焰南天竹可与山茶同时培植于树坛中,也适宜种植在植物群落下层,丰富景观层次。同时,火焰南天竹又是一种具有良好发展前途的盆栽植物,并有较高的药用价值^[2]。

目前关于火焰南天竹组织培养快繁的研究比较多,但是关于再生植株方面的报道很少。黄一青等虽通过诱导不定芽获得再生植株,但继代培养时间需 45 d,芽的增殖系数仅 2.5 倍^[3],同时也未见有关生根率的报道,这样在一定程度上限制了火焰南天竹试管苗的大面积推广^[1]。为了使火焰南天竹进行大面积推广,增加繁殖速度,就需要对火焰南天竹进一步研究。随着目前分子生物学的发展,基因改良是一个重要方向,因此研究火焰南天竹的基因改良也是今后的重要研究方向^[4]。火焰南天竹抗寒性弱,是抑制其在北方推广的重要因素,亟待利用转基因技术对其进行遗传改良,而稳定的基因转化有赖于良好的再生体系^[5]。目前有关火焰南天竹叶盘再生不定芽的研究很少,可借鉴的方法也非常少,本研究建立了火焰南天竹稳定高效的再生体系,再生率高达 97.6%,为火焰南天竹的遗传改良奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料准备

以火焰南天竹生长健壮的枝条上饱满的顶芽为外植体,用流水冲洗 3 h,氯化汞杀菌 8 min 后用无菌水冲洗 6~8 次,

接取种到 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA 的分化培养基上,暗培养 5 d 以后光下培养。接种 15 d 左右芽开始萌发,40 d 后分化成为 2~3 cm 高的植株。将分化的小苗接种于 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的继代培养基中,每 35 d 继代 1 次。

培养基中附加 30 g/L 蔗糖、6.0 g/L 琼脂,pH 值为 5.8。培养基在 121 ℃ 条件下灭菌 20 min。培养温度为 (25±2) ℃,光照度为 25 μmol/(m²·s),光周期为 16 h 光照+8 h 暗培养。MS1 培养基用 6.5 g/L 硫酸铵代替 MS 培养基中的硝酸铵配成。

1.2 火焰南天竹叶片不定芽分化

取 30~35 d 叶龄的组培苗上嫩绿、平展的叶片,剪去叶尖、叶缘,剪成大小为 3 mm² 均匀的叶块,分别作以下处理:(1)将剪好的叶块接种于附加不同浓度 TDZ、6-BA、NAA、2,4-D、IAA 的培养基上,培养 35 d 以后,观察叶片的生长状态,分析不同的植物生长调节剂,以及植物生长调节剂的浓度比例对火焰南天竹叶片不定芽再生的影响;(2)将剪好的叶块分别接种于附加 2.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基和硫酸铵代替硝酸铵的 MS1 培养基上暗培养 14 d,研究不同营养源对不定芽再生的影响;(3)将外植体分别接种于附加 2.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上,分别进行不暗培养、暗培养 7 d、暗培养 14 d、暗培养 21 d 的处理,分析暗培养时间长短对火焰南天竹叶片不定芽再生造成的影响;(4)将叶片以近轴面贴近培养基(正放)、远轴面贴近培养基(反放)2 种放置方式接种于附加 2.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2,4-D 的 MS 再生培养基上,分析研究不同的叶片放置方式对火焰南天竹不定芽再生的影响。

将外植体均接种于 250 mL 广口玻璃瓶中,每个处理 5 瓶,重复 3 次。

1.3 火焰南天竹再生不定芽的新梢伸长

再生 45 d 以后,火焰南天竹的不定芽一般长至 1 cm 左右,将这种不定芽接种到 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的芽伸长培养基中,不定芽进行大约 30 d 的伸长生长,长成株高约 3 cm 的植株。

收稿日期:2015-07-24

基金项目:江苏农林职业技术学院科研项目(编号:110751038)。

作者简介:贾思振(1982—),男,山东济南人,硕士,讲师,从事花卉栽培生理方面的研究。E-mail:93327862@qq.com。

1.4 火焰南天竹再生不定芽生根培养

经过伸长生长的植株,把新梢剪成 1.0 ~ 1.5 cm 长的茎段进行生根培养,基本培养基选用 MS、1/2MS,培养基中分别添加不同浓度比例的 IBA、NAA,每个处理 5 瓶,每瓶 5 个植株,培养 45 d 后统计生根率。

1.5 评价指标与数据调查

调查获得的数据用 SPSS 软件进行统计分析,平均值进行 Duncan's 测验,得出显著性差异。基本数据按照以下公式计算:

火焰南天竹不定芽再生率 = (再生不定芽叶片总数/接种叶片总数) × 100% ;

火焰南天竹平均每外植体再生芽数 = 叶片再生不定芽总数/再生不定芽叶片数;

火焰南天竹再生不定芽生根率 = (所有生根再生不定芽数/所有接种的再生不定芽数) × 100% 。

2 结果与分析

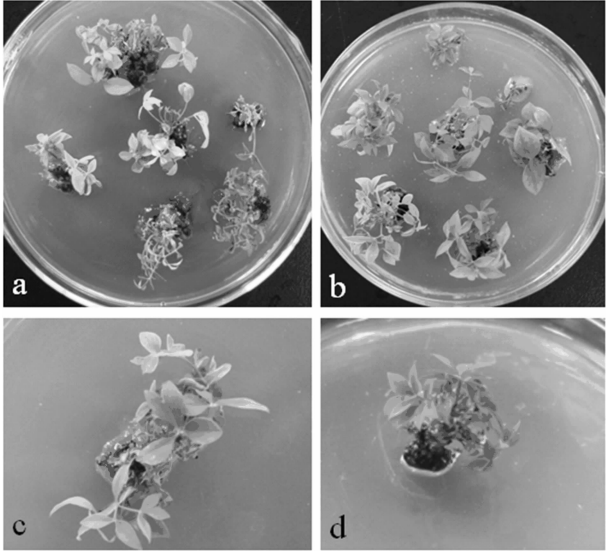
2.1 不同植物生长调节剂以及浓度对比对火焰南天竹不定芽再生的影响

由表 1、图 1 可见,不同植物生长调节剂种类以及浓度对比对火焰南天竹叶片不定芽分化有重要影响。结果表明,TDZ 比 6-BA 更适于不定芽再生;TDZ 与 2,4-D 组合对火焰南天竹不定芽的诱导效果要好于 TDZ 与 NAA、IAA 的组合。用 2.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2,4-D 的组合最适于火焰南天竹叶片不定芽分化,再生率可达 97.6%,平均每块叶片外植体再生芽数也较多(图 1-a、图 1-c)。但是试验中发现,这个激素的浓度会造成部分芽玻璃化,玻璃化芽不能够生根,因此不能够用于后续试验。

表 1 植物生长调节剂对火焰南天竹叶片不定芽再生的影响						
植物生长调节剂浓度(mg/L)					不定芽再 生率(%)	叶片再生 芽数(个/块)
6-BA	TDZ	2,4-D	NAA	IAA		
2.0		0.2			68.6	2.2
2.0			0.2		22.1	1.6
2.0				0.2	30.9	1.4
4.0		0.2			23.6	1.2
4.0			0.2		11.6	1.0
4.0				0.2	5.7	1.0
6.0		0.2			9.3	1.0
6.0			0.2		7.3	1.0
6.0				0.2	5.0	1.0
	1.5	0.2			80.6	3.1
	1.5		0.2		42.1	1.9
	1.5			0.2	56.5	2.2
	2.5	0.2			97.6	3.4
	2.5		0.2		71.2	2.5
	2.5			0.2	52.1	1.4
	4.0	0.2			17.9	2.5
	4.0		0.2		11.6	1.8
	4.0			0.2	64.7	2.0

当 TDZ 浓度达到 1.5 mg/L 时,与 0.2 mg/L 2,4-D 配合使用不定芽再生率可以达到 80.6%,而且在这个激素浓度的培养基中玻璃化芽明显减少。因此在试验过程中,实际选择

这个培养基浓度来进行火焰南天竹的不定芽再生,虽然再生率有一定程度的降低,但是再生芽不发生玻璃化现象,而且平均每块叶片再生芽数也能达到 3.1 个(图 1-b、图 1-d)。TDZ 浓度达到 4.0 mg/L 时,不定芽再生率显著降低,而且玻璃化芽明显增多。试验结果表明,6-BA 不适于火焰南天竹再生,添加 6-BA 的培养基中火焰南天竹叶片不定芽再生率、平均每块叶片再生芽数都显著低于添加 TDZ 的培养基。



a—添加2.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2, 4-D 的培养基中叶片再生情况; b—添加1.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2, 4-D 的培养基中叶片再生情况; c—添加2.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2, 4-D 的培养基中平均每叶片再生芽数; d—添加1.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2, 4-D 的培养基中平均每叶片再生芽数

图1 植物生长调节剂种类和浓度比例对火焰南天竹叶片不定芽再生的影响

2.2 不同营养源对火焰南天竹不定芽再生的影响

用 6.5 g/L 的硫酸铵代替 MS 培养基中的硝酸铵,不定芽再生率显著降低,说明培养基中的营养物质对不定芽再生影响极大(表 2)。有研究报道用硫酸铵代替硝酸铵继代火焰南天竹,继代苗生长正常,而本研究的再生试验表明,此培养基不适于火焰南天竹再生。硝酸铵是培养基中氮元素的主要来源,用硫酸铵代替硝酸铵后,氮元素含量减少,再生率显著降低,因此可见,氮元素在火焰南天竹不定芽再生中起重要作用。

表 2 不同营养元素对火焰南天竹叶片不定芽再生的影响		
培养基	不定芽再生率(%)	平均每外植体再生芽数(个)
MS	91.5	3.2
MS1	19.6	1.0

2.3 暗培养时间对火焰南天竹不定芽再生的影响

暗培养时间的长短对火焰南天竹不定芽的再生有显著影响。不暗培养时不定芽再生率为 0,暗培养时间短,不定芽再生率低,暗培养时间过长,不定芽再生率也会降低,最适的不定芽再生的暗培养时间为 14 d,不定芽再生率可达 82.1%(表 3)。

2.4 叶片放置方式对火焰南天竹不定芽再生的影响

叶片以正放、反放2种不同接种方式下的不定芽再生率

表 3 暗培养时间对火焰南天竹叶片不定芽再生的影响

暗培养时间 (d)	不定芽再生率 (%)	平均每外植体再生芽数 (个)
0	0.0d	0.0c
7	16.5c	1.0b
14	82.1a	3.3a
21	76.0b	3.2a

注:同列数据后的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。表 4、表 5 同。

没有显著差异,说明叶片不同的放置方式对火焰南天竹不定芽的再生没有影响(表 4)。

2.5 不同生长调节剂对火焰南天竹离体新梢生根的影响

离体新梢生根试验表明,生长调节剂能明显促进茎段不

表 5 不同生长调节剂对火焰南天竹离体新梢生根的影响

植物生长调节剂组合	生根率(%)		平均根数(条)	
	MS 培养基	1/2MS 培养基	MS 培养基	1/2MS 培养基
0.4 mg/L IBA	16.7±0.4f	33.7±1.2f	5.0±0.3g	6.0±0.1f
0.6 mg/L IBA	11.4±0.5g	13.3±1.1g	3.2±0.1h	5.5±0.2f
0.4 mg/L NAA	50.0±0.6b	100.0±0.0a	20.5±0.4a	41.3±0.1a
0.6 mg/L NAA	33.3±0.7d	86.4±0.8b	12.3±0.2d	26.3±0.2b
0.2 mg/L IBA+0.2 mg/L NAA	27.3±1.3e	68.7±0.5d	8.0±0.2f	17.4±0.2de
0.2 mg/L IBA+0.4 mg/L NAA	66.7±0.8a	56.5±0.5e	13.5±0.2c	16.5±0.2e
0.4 mg/L IBA+0.2 mg/L NAA	18.2±0.7f	76.3±0.8c	17.2±0.3b	18.3±0.6d
0.4 mg/L INA+0.4 mg/L NAA	45.5±0.6c	85.6±1.4b	10.5±0.6e	19.5±0.9c

3 结论与讨论

目前关于火焰南天竹离体叶片再生的研究很少,由于火焰南天竹的再生受基因型、环境条件的限制,因此其再生率很难达到很高的水平^[6]。在现有的报道中,大多数仍然集中于研究火焰南天竹的快繁,很少有再生研究的相关内容。本研究表明,影响火焰南天竹叶片再生的因素很多,包括植物生长调节剂、暗培养时间、培养基的营养物质等,这些条件对火焰南天竹离体器官的再生都起着决定性的作用,任何一个条件发生变化,都可能造成火焰南天竹再生率的下降或者完全不再生。

在添加 1.5 mg/L TDZ、0.2 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上,火焰南天竹再生率可达到 80.6%,每块叶片外植体再生芽数达到 3.1 个,而且玻璃化现象较少。植物再生过程中,不但要选择合适的植物生长调节剂,而且浓度比例也非常重要,一般植物再生中的细胞分裂素、生长素的浓度比例需要控制在一个合理范围^[7]。本研究也选取了多种细胞分裂素、生长素,对其浓度比例进行了多次尝试,最终确定 TDZ 与 2,4-D 的浓度比例为 12.5:1 时再生率最高。

暗培养是影响不定芽分化的一个重要因素。一些研究表明暗培养可能促进不定芽的再生^[7]。本试验结果表明,火焰南天竹必须暗培养 14 d 才能获得较高的再生率。

营养元素对火焰南天竹不定芽再生有显著影响,以硫酸铵代替硝酸铵的培养基可以用来继代草莓、葡萄,在这个条件下的组培苗均能正常生长^[8]。而在本试验中,硫酸铵代替硝酸铵对火焰南天竹的再生有极大影响,原因有待于进一步研究。叶片接种方式对再生不定芽的影响因植物种类和品种的不同而异,有些植物的再生不受叶片放置方式的影响,而有些

表 4 叶片不同放置方式对火焰南天竹不定芽再生的影响

叶片放置方式	不定芽再生率 (%)	平均每外植体再生芽数 (个)
正放	85.4a	3.2a
反放	86.8a	3.3a

定根的形成。火焰南天竹在添加 0.4 mg/L NAA 的培养基中生根最早,接种后 20 d 基部开始形成不定根;在添加 IBA 的培养基中根部形成大量愈伤,不易生根,说明 NAA 比 IBA 更适合火焰南天竹诱导不定根;基本培养基对生根也有明显的影响,表 5 结果表明,1/2MS 培养基有利于火焰南天竹生根。因此,适合火焰南天竹离体新梢生根的培养基为 1/2MS+0.4 mg/L NAA。

则影响较大^[9]。本试验发现火焰南天竹叶片接种方式对叶片再生无显著影响。

本试验获得的火焰南天竹再生率高达 97.6%,在目前能够查到的火焰南天竹再生的报道中最高。这说明,尽管火焰南天竹叶片不定芽分化再生困难,但只要有合适的培养条件,可以进一步提高叶片不定芽的再生率,克服火焰南天竹离体再生困难的问题。

参考文献:

[1]李 慧. 彩叶树种火焰南天竹的离体快繁研究[J]. 江苏农业科学,2010(1):74-76.

[2]杜永芹,倪林娟,王玉勤. 耐寒彩叶树种火焰南天竹的快繁技术研究[J]. 上海农业学报,2004,20(4):1-4.

[3]周南钊,黄一青,王青华. 火焰南天竹的组织培养[J]. 农业科技通讯,2002(11):17.

[4]王 蒂. 植物组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2004:301.

[5]张丽丽,张明明. 木本植物组织培养技术在林业科研与生产中的应用与局限[J]. 北京农业,2015,30(9):74-74,75.

[6]曹 昆,李 霞. 木本植物组织培养不定芽诱导研究进展[J]. 江苏林业科技,2008,35(5):43-48.

[7]韩小娇,杨洪强,由淑贞,等. 平邑甜茶叶片不定芽再生及 NO 的效应[J]. 园艺学报,2008,35(3):419-422.

[8]魏国芹,梁美霞,李鼎立,等. 平邑甜茶与 M7 离体叶片不定芽再生的研究[J]. 青岛农业大学学报:自然科学版,2009,26(2):103-108.

[9]王媛花,齐娟红,范艳珍,等. 硫酸铵或尿素代替硝酸铵的 MS 培养基对苹果、草莓和葡萄组培苗继代的效应[J]. 植物生理学通讯,2009,45(7):702-704.