

曹君迈,彭亚齐,唐世明,等. 勿忘我组培快繁技术的优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):77-81.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.021

勿忘我组培快繁技术的优化

曹君迈,彭亚齐,唐世明,陈淑媛,王彤彤,陈 星

(北方民族大学生物科学与工程学院,宁夏银川 750021)

摘要:以蓝色勿忘我种子为材料,发芽后取其幼苗茎尖、叶片和下胚轴为外植体,进行勿忘我组培快繁技术的优化试验。通过研究外植体、接种方式、培养基配方、光质对勿忘我不定芽形成、增殖、生根的影响,优化筛选出适宜勿忘我组培的最佳外植体为茎尖,其诱导率最高达 69.32%,其次为子叶,其诱导率为 18.06%;适宜茎尖诱导分化的培养基为 MS+0.9 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.2 mg/L KT,诱导率最高达 83.33%;适宜子叶诱导分化的培养基为 MS+0.7 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.2 mg/L KT,诱导率最高达 20.83%;适宜增殖培养的培养基为 1/2MS(不加肌醇,将维生素 B₁ 提高到 1 mg/L)+0.4 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.2 mg/L KT,增殖系数为 16.5;适宜生根的培养基为 1/2MS+0.4 mg/L NAA,采用温差培养法,生根率提高到 90%。适宜勿忘我增殖培养的光质为红光,之后转入白光进行培养。本试验的结果可为勿忘我组培快繁技术的应用提供一定的技术支撑。

关键词:勿忘我;外植体;增殖;生根;光质

中图分类号: S682.390.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0077-04

勿忘我(*Limonium sinuatum*)属补血草属植物,全世界植物资源有 300 种,我国有十七八种^[1],主要分布于西北、东北和华北,即新疆、甘肃、内蒙古和宁夏等省。补血草属多为耐盐抗旱的旱生植物,是我国优良的野生植物资源,具有很高的观赏价值、极高的药用价值;而其花多、花期长、泌蜜丰富,是重要的夏秋季蜜源植物;由于其耐盐、抗寒、抗旱性强、节水显著等特性,在防风固沙、生态恢复中具有重要的应用价值^[2]。随着人们对环境美化的需求和保健意识的增强,市场需求量快速发展,利用组培快繁技术,提高组培苗的增殖率及有效苗的数量和质量,解决市场需求,达到资源利用和保护的协调发展。

勿忘我是补血草中的一种,它具有大量的不孕枝和同型杂交不孕的特点,种子结实少,限制了它的规模化生产的发展^[3],此外,成本过高也是影响规模化、产业化生产的又一因素。有关勿忘我组织培养国内外已有许多报道^[4-9],近年来勿忘我采用组培快繁技术,不仅繁殖系数高,还可有效去除病毒,以确保遗传性状的稳定性和切花质量的改善。在勿忘我组培快繁的研究中,有许多关于诱导^[10]、增殖^[11]、生根及炼苗^[12-13]的研究报道,通过大量试验,究者们已经筛选出一些适宜的培养基配方及培养条件。在兼顾增殖率与组培苗质量的前提下,正在努力使勿忘我组培苗快速产业化,以满足市场的需求。本试验在确保组培苗增殖率和质量的前提下,以降低成本和加快繁殖速度为目标,研究组培快繁过程中各环节的关键影响因子,建立高效实用的勿忘我组培快繁技术体系,以期产业化开发提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蓝色勿忘我种子网购于浙江永康无市花之谷贸易有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基配方 试验培养基配方详见表 1。

1.2.2 光质条件 试验光质条件详见表 2。

1.2.3 试验设计方法 在诱导分化培养、增殖培养和生根培养阶段,针对各阶段的特点,分别对外植体、培养基配方采用单因素随机区组设计;在增殖培养条件的筛选中,采用单因素设计研究 7 种光质因子的影响。每个处理接种 8 瓶,每瓶内接入 4 个外植体。在试验过程中,对出愈率、诱导分化率、玻璃化率、增殖系数、生根率、叶片数、叶绿素含量等指标进行统计,记载时随机抽取 2 瓶,求其平均值作为 1 次重复,共重复 3 次,并对试验结果采用单因素统计学方法分析。

1.2.4 材料的处理 采用陈淑媛等的方法^[6]进行。

1.2.5 种子的萌发 将消毒灭菌后的种子接种到 MS+3%蔗糖+7%琼脂培养基上后,放置于黑暗处,(25±2)℃温度下,待发芽长出具有 2 张子叶的幼苗后置于光照下培养,子叶变绿后进行起始培养。统计每瓶 MS 培养基内接入的种子数和发芽种子数,计算其发芽率。

1.2.6 诱导分化培养 在超净工作台上,按无菌操作技术要求分别切取勿忘我的下胚轴(长 0.5 cm)、茎尖(长 0.5~1.0 cm)、子叶作为外植体,3 种外植体均接种到起始培养基 A1~A5 号上。下胚轴与茎尖的形态学下端插入培养基;子叶均匀划 3 刀,分正反(光照面朝上为正放,朝下为反放)接种于培养基内。

1.2.7 增殖培养 在超净工作台上,按无菌操作技术要求,切取同一种培养基中长势相似的勿忘我带芽幼苗茎尖(长 0.5~1.0 cm)为外植体,接种于增殖培养基 B1~B5 号上进

收稿日期:2015-07-05

基金项目:北方民族大学国家级创新创业训练计划项目(编号:201311407018)。

作者简介:曹君迈(1964—),女,宁夏银川人,教授,从事细胞工程和细胞生物教学与科研工作。E-mail:junmaicao@163.com。

表 1 培养基配方

类型	编号	配方	备注
诱导培养基	A1	MS + 0.6 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT	蔗糖 30 g/L
	A2	MS + 0.7 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT	琼脂 7 g/L
	A3	MS + 0.8 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT	pH 值 5.8 ~ 6.0
	A4	MS + 0.9 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT	
	A5	MS + 1.0 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT	
增殖培养基	B1	MS	蔗糖 30 g/L
	B2	MS + 0.4 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT	琼脂 7 g/L
	B3	MS(不加肌醇,将维生素 B ₁ 提高到 1 mg/L)pH 值 5.8 ~ 6.0 + 0.4 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT	
	B4	1/2 MS(不加肌醇,将维生素 B ₁ 提高到 1 mg/L) + 0.4 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT	
	B5	MS + 0.2 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT	
生根培养基	C1	1/2 MS	蔗糖 15 g/L
	C2	1/2 MS + 0.2 mg/L NAA	琼脂 7 g/L
	C3	1/2 MS + 0.3 mg/L NAA	pH 值 5.8 ~ 6.0
	C4	1/2 MS + 0.4 mg/L NAA	
	C5	1/2 MS + 0.5 mg/L NAA	

表 2 光质条件

编号	光质	波长 (nm)
1	自然光	200 ~ 760
2	黑暗	
3	白光	390 ~ 780
4	红光	630 ± 5
5	绿光	510 ± 5
6	黄光	546 ± 5
7	蓝光	492 ± 5

行丛生芽诱导的培养。

1.2.8 生根培养 在超净工作台上,按无菌操作技术要求,取同一种培养基中大小相似、具 3 ~ 5 张叶的、高大于 2.0 cm 的无根苗,分成单株接种于生根培养基 C1 ~ C5 号中,采用变温培养法培养。

1.2.9 光质对勿忘我组培苗增殖的影响 在超净工作台上,按无菌操作技术要求,切取同一种培养基中长势相似的勿忘我带芽幼苗茎尖(长 0.5 ~ 1.0 cm)为外植体,接种于增殖培养基 B2 号 (MS + 0.4 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT)上进行丛生芽诱导的培养。

1.2.10 叶绿素含量的测定 离体法萃取叶绿素及分光光度计法测定步骤:取适量新鲜叶片→吸水纸擦干净→去主脉→剪成小于 1 mm² 的小块,混匀→称取 0.2 g 至研钵中→加入 5 mL 95% 乙醇、少量碳酸钙粉末,研磨至叶片组织变白→静置 3 ~ 5 min→过滤至烧杯中→定容至 25 mL 容量瓶中→652 nm 下测 *D* 值,95% 乙醇调零。

叶绿素总含量 (mg/g) = (*D*_{652 nm} × *V*) / (34.5 × *m*)。
式中:*V* 为提取液总量, mL, 如果比色前进行稀释, 则应乘以稀释倍数; *m* 为称取叶片质量, g。

1.3 培养条件

诱导分化培养、增殖培养置于 PGX - 1000B 型光照培养箱中暗培养, 温度为 (25 ± 2) °C。5 d 后, 设置光照度为 2 500 lx, 光照时间为 12 h/d, 温度为 (25 ± 2) °C 进行光照培养。生根培养置于光照培养箱中, 光照度为 2 500 lx, 光照时间为 12 h/d, 光照下温度为 (28 ± 2) °C, 黑暗下温度为 (22 ±

2) °C。光质试验置于 7 种不同光质处理下培养, 光照度为 2 500 lx, 光照时间为 12 h/d, 温度为 (25 ± 2) °C。

1.4 指标记录

7 d 后, 每天观察记录每种培养基内组培苗的生长状况, 30 d 后调查其愈伤组织数、玻璃化苗数和正常小苗数、增殖芽数、生根数。

在光质试验中, 于 30 d 后调查其增殖数、叶片数、茎长, 测定叶绿素的含量, 计算其增殖系数、平均叶片数、平均茎长、叶绿素含量。

1.5 统计分析

发芽率 = (发芽总数 / 种子总数) × 100%;
诱导分化率 = (诱导分化苗数 / 接种苗数) × 100%;
增殖系数 = 增殖苗数 / 接种苗数;
生根率 = (生根苗数 / 接种苗数) × 100%;
玻璃化率 = (玻璃化苗数 / 接种苗数) × 100%;
出愈率 = (愈伤组织数 / 接种苗数) × 100%;
平均叶片数 (张) = 叶片数 / 增殖苗数;
叶绿素含量 (mg/g) = (*D*_{652 nm} × *V*) / (34.5 × *m*)。

将试验所得各项指标的各重复的均值采用 Excel 2003 录入并整理后, 用 SPSS 17.0 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 种子萌发的调查

接入种子总数为 199 粒, 发芽总数为 128 粒, 发芽率为 64.32%。勿忘我种子灭菌后影响了发芽率, 可适当缩短 NaClO 灭菌的时间。

2.2 诱导分化培养的研究

2.2.1 外植体对不定芽形成的影响 从表 3 可以看出, 不同外植体间, 不定芽的形成存在显著差异, 茎尖的出愈率、玻璃化率和诱导分化率均显著高于子叶和下胚轴; 子叶显著高于下胚轴。由此可见, 外植体诱导不定芽能力从大到小为茎尖 > 子叶 > 下胚轴。

2.2.2 不同培养基配方对茎尖不定芽诱导的影响 接种后茎尖下端开始膨大, 继而出现浅绿色颗粒状突起, 约 3 周后,

表 3 外植体对不定芽形成的影响 %

外植体	出愈率	玻璃化率	分化率
茎尖	73.86a	27.87a	69.32a
子叶	59.72b	20.08b	18.06b
下胚轴	0.00c	0.00c	8.33c

注:同列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。表 2 至表 10 同。

这些突起继续生长成淡绿色小芽。对表 4 结果经统计学分析,不同培养基对茎尖的出愈率、玻璃化率、诱导率具有明显的影响。A3、A4 的出愈率显著高于 A1、A2 和 A5;A2、A5 显著高于 A1。A2 的玻璃化率显著低于 A1、A3、A4 和 A5;A3、A4 的玻璃化率显著低于 A1 和 A5;A5 的玻璃化率显著低于 A1。A1、A4 的诱导率显著高于 A2、A3 和 A5;A2、A3 的诱导率显著高于 A5。综合分析以上结果,A4 培养基的出愈率和诱导率高,玻璃化率低,培养效果最好。由此得出,在茎尖不定芽的诱导中,筛选的最佳诱导分化培养基为 A4,即 MS + 0.9 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT。

表 4 不同培养基配方对茎尖不定芽诱导的影响

编号	愈伤组织数(块)	玻璃化苗数(株)	绿苗数(株)	出愈率(%)	玻璃化率(%)	诱导率(%)
A1	10	8	6	62.50c	57.14a	87.50a
A2	9	0	8	75.00b	0.00d	66.67b
A3	13	2	9	81.25a	18.18c	68.75b
A4	19	4	16	79.17a	20.00c	83.33a
A5	14	3	5	70.00b	37.50b	40.00c

2.2.3 不同培养基配方对子叶不定芽诱导的影响 子叶接种到培养基上后,伤口处膨大形成愈伤组织,形成少量不定芽。对表 5 数据进行统计学分析,培养基间对茎尖的出愈率、玻璃化率、诱导率的影响达到显著水平。其中,A5 的出愈率显著高于 A1、A2、A3 和 A4;A1、A2 的出愈率显著高于 A3、A4。A4 的玻璃化率显著低于 A1、A2、A3 和 A5;A3 的玻璃化率显著低于 A1、A2 和 A5;A1、A2 的玻璃化率显著低于 A5。A5 的诱导率显著高于 A1、A2、A3 和 A4;A2、A3 的诱导率显著高于 A1 和 A4;A1 的诱导率显著高于 A4。A5 培养基的出愈率和诱导率虽然在所有培养基中最高,但其玻璃化率也最高,对后期的繁殖生长不利。综合考虑,A2 培养基的效果最好,出愈率和诱导率适中,玻璃化率低。所以在子叶不定芽的诱导中,筛选的最佳诱导分化培养基为 A2,即 MS + 0.7 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT。

表 5 不同培养基配方对子叶不定芽诱导的影响 %

编号	出愈率	玻璃化率	诱导率
A1	63.89b	20.00b	13.89c
A2	62.50b	20.00b	20.83b
A3	53.13c	16.67c	18.75b
A4	50.00c	0.00d	3.57d
A5	70.83a	33.30a	37.50a

2.2.4 子叶正反放置方式对其不定芽诱导的影响 子叶接种到培养基上后在伤口处膨大形成愈伤组织,经过 40 d 左右培养形成少量不定芽。由表 6 可知,子叶正、反面放置方式对其不定芽诱导影响显著,正面放置的出愈率、诱导率均显著高于反面放置的,但 2 种放置方式间的玻璃化率差异不显著。由

表 6 不同放置方式对子叶不定芽诱导的影响 %

放置方式	出愈率	玻璃化率	诱导率
正面放置	67.09a	13.75a	23.33a
反面放置	45.67b	15.00a	9.83b

此可见,在子叶诱导不定芽中,正面放置有利于诱导不定芽。2.2.5 不同培养基配方对下胚轴不定芽诱导的影响 下胚轴在不定芽诱导过程中,虽然下端膨大,但没有产生愈伤组织,随着时间的推移发生褐化而死,最终仅有极少数不定芽产生。通过对表 7 数据进行统计学分析得出,不同培养基配方对下胚轴不定芽诱导的影响显著。5 个处理间的出愈率、玻璃化率差异不显著,而诱导率差异显著。A1、A5 的诱导率显著高于 A3、A4;A1、A2、A5 之间的诱导率差异不显著;A2、A3、A4 之间的诱导率差异不显著。综合来看,A2 的诱导率适中,而其成本低于 A3、A4 培养基,所以筛选的最佳诱导分化培养基为 A2,即 MS + 0.7 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT。

表 7 不同培养基配方对下胚轴不定芽诱导的影响

编号	愈伤组织数(块)	玻璃化苗数(株)	绿苗数(株)	出愈率(%)	玻璃化率(%)	诱导率(%)
A1	0	0	3	0	0	12.50a
A2	0	0	2	0	0	8.33ab
A3	0	0	1	0	0	4.17b
A4	0	0	0	0	0	0.00b
A5	0	0	3	0	0	12.50a

2.3 增殖培养的研究

接种后茎尖下端边缘开始膨大,继而出现浅绿色颗粒状突起,约 3 周后,这些突起生长成淡绿色小芽。由表 8 可知,勿忘我 5 个处理间丛生芽的平均增殖系数差异显著。B2、B3 的增殖系数显著高于 B1、B5;B2、B3、B4 的增殖系数之间差异不显著;B4、B1、B5 的增殖系数之间差异不显著。综合考虑,B4 的增殖系数适中,而其成本低于 B3、B2 培养基,所以筛选的最佳增殖培养基为 B4,即 1/2MS(不加肌醇,将维生素 B₁ 提高到 1 mg/L) + 0.4 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT。

表 8 不同激素组合对勿忘我组培苗增殖的影响

编号	丛生芽诱导数(个)						增殖系数(倍)
	1	2	3	4	5	6	
B1	9	15	13	29	8	12	11.00 ± 2.76b
B2	26	28	17	16	20	16	20.50 ± 5.28a
B3	25	21	17	16	22	31	22.00 ± 5.51a
B4	17	18	10	24	16	14	16.50 ± 4.46ab
B5	14	15	12	16	7	17	13.50 ± 3.62b

2.4 生根培养

从表 9 可以看出,5 个处理之间的生根率差异显著。在 C4 培养基中勿忘我组培苗生根率最高,达 90%,芽苗健壮;不使用 NAA 生根率最低,达 35%,但使用过低和过高均会降低生根率。因此,筛选的最佳生根培养基为 C4,即 1/2MS + 0.4 mg/L NAA。

2.5 光质对勿忘我组培苗增殖的影响

由表 10 可知,光质间对组培苗诱导率、增殖系数、茎长、

表 9 不同浓度的 NAA 对勿忘我组培苗生根的影响

编号	NAA 浓度 (mg/L)	接种数 (个)	生根数 (条)	生根率 (%)
C1	0	20	7	35e
C2	0.2	20	13	65d
C3	0.3	20	16	80b
C4	0.4	20	18	90a
C5	0.5	20	14	70c

叶片数、叶绿素含量的影响均达显著水平 ($P < 0.05$)。红光的增殖系数显著高于黑暗、白光、绿光和蓝光;自然光、红光和黄光的增殖系数差异不显著;自然光、黑暗、白光、黄光和蓝光的增殖系数差异不显著。蓝光的茎长显著高于自然光、白光、红光、绿光和黄光;绿光的茎长显著高于自然光、白光、红光、

表 10 光质对勿忘我组培苗增殖的影响

编号	光质	增殖系数(倍)	茎长(cm)	叶片数(张)	叶绿素含量($D_{652\text{ nm}}$)
1	自然光	15.33 ± 1.53ab	2.30 ± 1.15c	6.54 ± 1.21bc	0.053 ± 0.009d
2	黑暗	8.00 ± 2.00b	4.63 ± 1.02ab	8.14 ± 3.55ab	0.004 ± 0.002e
3	白光	10.33 ± 4.51b	3.10 ± 0.40c	5.02 ± 1.23c	0.146 ± 0.007a
4	红光	20.67 ± 10.60a	2.90 ± 0.87c	5.91 ± 0.97bc	0.118 ± 0.011b
5	绿光	9.33 ± 1.53b	3.73 ± 0.61b	7.39 ± 0.92abc	0.072 ± 0.012cd
6	黄光	13.33 ± 0.58ab	2.87 ± 0.50c	7.37 ± 0.53abc	0.073 ± 0.014c
7	蓝光	7.00 ± 1.00b	5.23 ± 0.67a	10.04 ± 0.54a	0.066 ± 0.014cd

3 结论与讨论

3.1 讨论

本试验是在实验室前期研究的基础上^[6],针对试验方法和培养条件进一步深入研究探索,优化勿忘我组培快繁技术条件。前期研究中只采用茎尖诱导分化,而本次试验在诱导分化培养阶段也利用子叶和下胚轴进行不定芽的诱导,这增加了快繁诱导途径。结果表明,茎尖为诱导分化培养的最优外植体,这与王淑敏的试验结果^[12]相符,但其诱导分化培养成分相同,但 6-BA 激素用量降低了 0.1 mg/L。

本试验在研究子叶诱导不定芽过程中,研究正面反面放置 2 种接种方式对子叶不定芽诱导的影响,这是前人还没有研究过的。

本试验在增殖阶段对培养基进行改良,筛选出的最优增殖培养基大量元素减半、不加肌醇,且将维生素 B₁ 提高到 1 mg/L,增殖系数较陈淑媛等的^[6]高,这与朱至清的研究结果^[14]相吻合。与冯晓英的增殖培养研究^[15]比,筛选的增殖培养基减少了营养成分,降低了生产成本,有利于组培工厂化生产的节体增效。

而在生根培养阶段,使用的生根培养基与陈淑媛等的^[6]一样,但是利用温差培养法生根率提高了 10%。这可能是因为在变温培养中,白天积累有机物,晚上减少有机物的消耗,使得勿忘我组培苗的有机物得以积累得更多,从而根粗苗壮。因此,可以在勿忘我组培快繁生根过程中将恒温培养法改为变温培养法。

在组织培养的微环境中,光是一个重要的因素,前人已经研究了光照时间、光照度对勿忘我组培苗生长的影响^[16]。而光质对勿忘我增殖的影响目前还没有人研究,本试验中红光有利于勿忘我组培苗的增殖,再转入白光下培养进行壮苗,更有利于组培苗的生长。

绿光和黄光;黑暗的茎长与绿光、蓝光无差异不显著。蓝光的叶片数显著高于自然光、白光、红光;黑暗、绿光、黄光和蓝光的叶片数差异不显著;自然光、黑暗、红光、绿光和黄光的叶片数差异不显著。白光的叶绿素含量显著高于自然光、黑暗、红光、绿光、黄光和蓝光;红光的叶绿素含量显著高于自然光、黑暗、绿光、黄光和蓝光;黄光的叶绿素含量显著高于自然光和黑暗;自然光、绿光和蓝光的叶绿素含量显著高于黑暗;绿光、黄光和蓝光的叶绿素含量差异不显著;自然光、黄光和蓝光的叶绿素含量差异不显著。综合考虑,红光条件下组培苗生长最好,诱导率和增殖系数最高,叶片数和叶绿素含量适中。因此,适宜勿忘我增殖培养的光质为红光。

而组培过程中的三大问题之一的玻璃苗,在本试验中也有出现。今后可以在预防和解决玻璃苗出现这一方面加大研究,以提高勿忘我组培苗的质量,为勿忘我的组培工厂化生产增产增效。

3.2 结论

不定芽诱导过程中,外植体的筛选至关重要。勿忘我出芽情况以茎尖诱导率最高,而下胚轴和子叶则只能诱导少量不定芽。其诱导不定芽能力从大到小为茎尖 > 子叶 > 下胚轴。因此,诱导不定芽最佳的外植体为茎尖。

勿忘我茎尖不定芽的诱导培养阶段,在蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L、pH 值为 5.8 ~ 6.0 条件下,筛选出的最佳诱导分化培养基为 MS + 0.9 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT。

在勿忘我子叶诱导不定芽的培养中,子叶正面放置有利于诱导不定芽,在蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L、pH 值为 5.8 ~ 6.0 条件下,筛选的最佳诱导分化培养基为 MS + 0.7 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT。

在勿忘我组培苗增殖过程中,以茎尖为外植体,在蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L、pH 值为 5.8 ~ 6.0 条件下,筛选出的最佳增殖培养基为 1/2MS (不加肌醇,将维生素 B₁ 提高到 1 mg/L) + 0.4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT。在蔗糖 15 g/L、琼脂 7 g/L、pH 值为 5.8 ~ 6.0、变温培养条件下,筛选的最佳生根培养基为 1/2 MS + 0.4 mg/L NAA。

适宜勿忘我增殖培养的光质条件为红光。因此,可以先将勿忘我组培苗置于红光条件下进行增殖培养,之后再转入白光条件下进行正常培养,促进壮苗,且能提高勿忘我组培苗的增殖系数。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第六十卷第一分册[M]. 北京:科学出版社,1987.

方中明,于恒,白根祥,等. 香水百合组织培养和快速繁殖条件的优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):81-85.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.022

香水百合组织培养和快速繁殖条件的优化

方中明^{1,2}, 于恒¹, 白根祥¹, 黄玮婷¹, 曾宋君³

(1. 武汉生物工程学院生命科学与技术学院,湖北武汉 430415; 2. 华中农业大学生命科学技术学院,湖北武汉 430070;
3. 中国科学院华南植物园,广东广州 510650)

摘要:以香水百合无菌试管苗小鳞茎作为外植体,从外植物体创伤、基本培养基、植物生长调节剂的配比以及培养基的物理状态等几个方面研究了百合鳞茎增殖的最优条件,并对百合组培苗的生根条件进行了优化。结果表明,一定的外植体创伤处理、氮元素含量较高的基本培养基和合适的植物生长调节剂浓度组合有利于鳞茎的增殖,香水百合鳞茎最佳增殖培养基配方为 $N6 + 0.2 \text{ mg/L NAA} + 2.0 \text{ mg/L 6-BA}$;在 $MS + 1.5 \text{ mg/L 6-BA} + 0.4 \text{ mg/L NAA}$ 培养基中,液体培养的鳞茎增殖倍数极显著高于固体培养;香水百合小苗的最佳生根培养基配方为 $1/2MS + 0.2 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L IBA}$ 。

关键词:百合;增殖;创伤;液体培养;培养条件;植物生长调节剂

中图分类号: 682.2⁺90.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0081-05

百合(*Lilium* spp.)是指百合科百合属多年生球根花卉,其花色鲜艳、花姿雅致,具有较高的观赏价值和药用价值。香水百合是百合中的“女王”,因其花大、芳香宜人、清雅脱俗而深受欢迎,主要做切花观赏制成花束和花篮^[1]。目前,中国香水百合的种球主要依赖进口,百合新品种的选育和商品种球的供应已成为制约我国百合产业发展的“瓶颈”问题,实现优质百合种球的国产化具有重要的现实意义,而国内的种苗繁殖方法以分球繁殖为主,有时也采用鳞片扦插,但以小鳞茎

分株法及鳞片扦插法繁殖,繁殖率低,且长期的营养繁殖易使其感染病毒而降低花的质量,应用组培方法实现百合工业化生产是解决这一问题的有效途径。目前,我国学者对香水百合的组织培养进行了相关研究,但主要集中在鳞片、叶片、花器官等为外植体的固体培养基诱导再生植株上^[2-9]。本研究以香水百合无菌试管苗鳞茎为外植体,探讨外植体创伤、基本培养基、植物生长调节剂的配比以及培养基的物理状态探究对小鳞茎增殖的影响,筛选出最适宜培养基配方、培养方式以及生根培养基配方,以期对香水百合组培苗的工厂化大生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

香水百合无菌试管苗由武汉生物工程学院细胞工程实验室提供。

收稿日期:2015-06-27

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301250);湖北省教育厅科学技术研究项目(编号:B2015394)。

作者简介:方中明(1984—),男,安徽黄山人,博士,讲师,主要从事植物生物技术研究,E-mail:zmfang@mail.hzau.edu.cn。

通信作者:曾宋君,博士,研究员,主要从事植物生物技术研究。
E-mail:zengsongjun@scib.ac.cn。

[2] 田福平,时永杰,陈子萱. 我国补血草属野生植物资源的分布及研究现状[J]. 草业与畜牧,2010(3):49-52.

[3] 刘斌心,杨喜林,姚育英. 中国沙漠植物志[M]. 北京:科学出版社,1992:15-27.

[4] 王家福,齐永鑫. “勿忘我”的组织培养研究[J]. 中国农学通报,2005,21(6):102-106.

[5] 陆玲丽,李枝林,姜勤,等. 勿忘我组织培养技术研究[J]. 江西农业学报,2009,21(6):40-42.

[6] 陈淑媛,曹君迈,陈星,等. 勿忘我组织培养繁殖技术的研究[J]. 种子,2015(2):115-120.

[7] Seelye J F, Maddocks D J, Burge G K, et al. Shoot regeneration from leaf discs of *Limonium perigrinum* using thidiazuron[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1994, 22(1):23-29.

[8] Huang C L, Hsieh M T, Hsieh W C, et al. In vitro propagation of *Limonium wrightii* (Hance) Ktze. (Plumbaginaceae), an ethnomedicinal plant, from shoot-tip, leaf-and inflorescence-node explants[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2000, 36

(3):220-224.

[9] NaiWen H, TsuHwie L, ChaoLang H, et al. The micropropagation of *Limonium wrightii* (Hance) O. Kuntze[J]. Journal of the Chinese Society for Horticultural Science, 2000, 46(3):277-286.

[10] 温银元,冯文新,尹美强,等. 不同激素对补血草器官分化的影响[J]. 山西农业科学,2013(2):115-118.

[11] 杨春梅,孟金贵,张丽琴,等. 勿忘我组培苗增殖研究[J]. 云南农业科技,2009(2):9-11.

[12] 王淑敏,高永闯,李晓云. “勿忘我”丛生芽诱导及植株再生[J]. 安徽农业科学,2014,42(31):10842-10844.

[13] 黄玉玲. 勿忘我组培苗出瓶移栽炼苗技术[J]. 云南农业科技,2012(2):41.

[14] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003:34-38.

[15] 冯晓英. 勿忘我组织培养快速繁殖研究[J]. 贵州农业科学,2002(1):9-13.

[16] 吴杰. 深波叶补血草的离体快繁与产业化技术研究[D]. 南京:南京农业大学,2005.