

陆玉建,王书平,王宁宁,等. 小麦愈伤组织的诱导和再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):67-71.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.019

# 小麦愈伤组织的诱导和再生体系的建立

陆玉建<sup>1,2,3</sup>, 王书平<sup>1</sup>, 王宁宁<sup>1</sup>, 刘俊华<sup>1</sup>, 高春明<sup>1</sup>

(1. 滨州学院生命科学系/山东省黄河三角洲野生植物资源开发利用工程技术研究中心, 山东滨州 256603;

2. 山东省滨州畜牧兽医研究院博士后科研工作站, 山东滨州 256600; 3. 吉林大学博士后科研流动站, 吉林长春 130062)

**摘要:**以普通小麦的成熟胚为试验材料,研究不同激素组合对小麦愈伤组织诱导和植株再生的影响。结果表明,小麦愈伤组织诱导效果最好的培养基为 W5[MS + 0.5 g/L 水解酪蛋白(CH) + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.15 g/L 天冬酰胺(Asn)],在此培养基中,成熟胚产生的愈伤组织质量最好,诱导率最高。对于不定芽诱导,最适培养基为 WF8(MS + 0.5 g/L CH + 4.0 mg/L KT + 0.3 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA),在此培养基中,愈伤组织分化产生的不定芽数量最多,速度最快,分化率最高。比较适宜诱导生根的培养基为 WR4(1/2MS + 0.5 g/L CH + 0.5 mg/L NAA),在此培养基中,不定芽生根速度最快,数量最多,并且较为粗壮。本试验旨在探索小麦组织培养的最适条件,为今后通过基因工程手段改良小麦的品质奠定基础。

**关键词:**小麦;成熟胚;愈伤组织;不定芽;再生体系

**中图分类号:** S512.104.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0067-04

小麦为禾本科小麦属植物,是世界上最早栽培的重要农作物之一<sup>[1]</sup>。小麦品质的改良是提高小麦产量的主要措施,而稳定的组织培养体系的建立则是小麦育种的重要基础和保证<sup>[2]</sup>。目前,有关小麦愈伤组织的诱导、分化和再生已有不少的报道,但小麦植株再生率低,建立稳定的再生体系比较困难<sup>[2-6]</sup>。影响小麦再生的因素有很多,包括外植体来源、基因型、生理状态和培养条件等<sup>[3,5-8]</sup>。建立高效的植株再生体系需要良好的外植体来源。小麦幼胚是公认的最好的外植体来源,其愈伤组织诱导效果好,植株再生能力强,且以幼胚为转化受体,已成功获得转基因植株<sup>[2,6,9]</sup>。虽然小麦幼胚再生能力强,但取材受时间和空间限制,适宜转化的生理状态难以掌握,转化周期也比较长;而成熟胚取材方便、生理状态一致、不受生长季节限制,是组织培养和遗传转化理想的外植体<sup>[7,10-12]</sup>。现阶段,虽然有关小麦成熟胚离体培养方面的研究较多,但稳定的高频率植株再生体系仍未建立,因此本试验以黄河流域广泛种植的普通小麦豫宝 1 号成熟胚为外植体,研究不同激素组合对小麦愈伤组织诱导和不定芽分化的影响,进而获得比较适合成熟胚高效再生的培养基类型。通过探索小麦组织培养的最适条件,为今后小麦遗传转化体系的建立和品质的改良奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试材料为普通小麦种子(豫保 1 号),由滨州学院生命科学系基因工程实验室提供。

收稿日期:2015-07-29

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2012CL14);滨州学院博士基金(编号:2010Y08)。

作者简介:陆玉建(1979—),男,河南南阳人,博士,讲师,研究方向为植物生物技术。E-mail:luyujian79@163.com。

### 1.2 方法

1.2.1 MS 基本培养基的制备 在小麦组织培养过程中,采用 MS 或 1/2MS 作为基本培养基,培养基中均添加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂,pH 值为 5.8。

1.2.2 愈伤组织诱导培养基的配制 以 MS 为基本培养基,添加一定浓度的水解酪蛋白(CH)、2,4-D、NAA、天冬酰胺(Asn)或谷氨酰胺(Gln),配制小麦愈伤组织诱导培养基(表 1)。

表 1 诱导小麦愈伤组织的培养基

培养基类型	各激素浓度				
	CH (g/L)	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	Asn (g/L)	Gln (g/L)
W1	0.5	2.0			
W2	0.5	2.0	0.5		
W3	1.0	2.0			
W4	1.0	2.0	0.5		
W5	0.5	2.0		0.15	
W6	0.5	2.0			0.2
W7	1.0	2.0		0.15	
W8	1.0	2.0			0.2
W9	0.5	2.0		0.15	0.2
W10	1.0	2.0		0.15	0.2
W11	0.5	2.0	0.5	0.15	0.2
W12	1.0	2.0	0.5	0.15	0.2

1.2.3 分化培养基的配制 在基本培养基的基础上,配制诱导小麦分化的培养基(表 2)。

1.2.4 生根培养基的配制 以 1/2MS 为基本培养基,配制诱导小麦生根培养基(表 3)。

1.2.5 小麦种子的消毒及成熟胚的剥离 挑取籽粒饱满的小麦种子,用水浸泡,26℃处理 24 h 左右,70% 乙醇消毒 5 min,HgCl<sub>2</sub> 处理 15 min,无菌水冲洗 5~6 次,剥胚,然后接种到愈伤组织诱导培养基中,26℃暗培养 15 d。

1.2.6 愈伤组织的增殖培养 选取生长良好的愈伤组织,除

表 2 诱导小麦不定芽分化的培养基

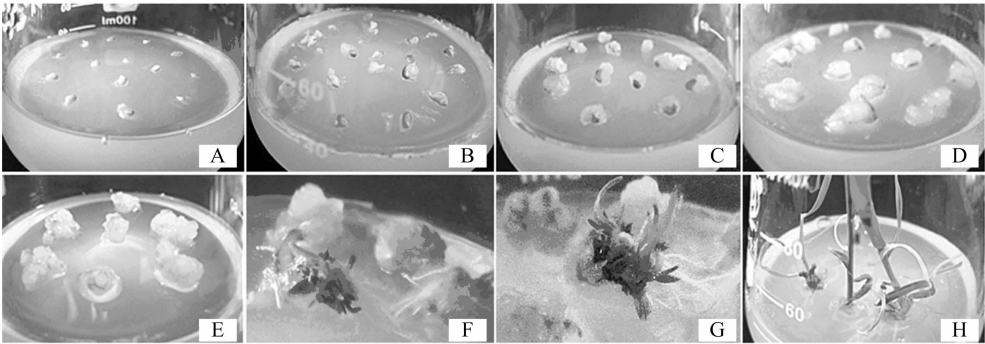
培养基类型	各激素浓度			
	CH (g/L)	KT (mg/L)	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)
WF1	0.5	1.0		
WF2	0.5	2.0		
WF3	0.5	3.0		
WF4	0.5	4.0		
WF5	0.5	1.0	0.3	1.0
WF6	0.5	2.0	0.3	1.0
WF7	0.5	3.0	0.3	1.0
WF8	0.5	4.0	0.3	1.0

表 3 诱导小麦生根的培养基

培养基类型	基本培养基	各激素浓度		
		CH (g/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)
WR1	1/2MS	0.5		
WR2	1/2MS	0.5	0.1	
WR3	1/2MS	0.5	0.3	
WR4	1/2MS	0.5	0.5	
WR5	1/2MS	0.5		0.3
WR6	1/2MS	0.5		0.5

胚,将愈伤组织接种到增殖培养基中,26℃暗培养2周;选择生长效果较好的愈伤组织继续进行增殖培养,培养基的类型和培养条件不变。

1.2.7 不定芽的诱导 选取增殖效果比较好的愈伤组织,接种到不定芽诱导培养基中,放入光照培养箱中培养30d左右。



A—接种在愈伤组织诱导培养基中的小麦成熟胚;B—培养7d后小麦胚上产生的愈伤组织;C—培养15d后小麦胚上产生的愈伤组织;D—初次增殖培养2周后小麦的愈伤组织;E—第2次增殖培养2周后小麦的愈伤组织;F—分化培养2周后愈伤组织上产生的不定芽;G—分化培养30d后愈伤组织上产生的不定芽;H—生根诱导30d后获得的小麦试管苗

图1 小麦再生体系的建立

2.2 愈伤组织的继代增殖

挑取生长良好的小麦愈伤组织,接种到增殖培养基(W5)中,26℃暗培养2周后观察愈伤组织的生长情况(图1-D),由此可以看到愈伤组织细胞分裂旺盛,体积明显增大,但结构还不够致密;将愈伤组织再次继代培养2周,愈伤组织的团块继续增大,细胞排列更加紧密,适合不定芽的诱导培养(图1-E)。

2.3 不定芽的形成

将继代培养后的小麦愈伤组织接种到分化培养基中进行不定芽诱导,于26℃下光照培养。愈伤组织接种2d后,可

1.2.8 生根诱导 当不定芽的长度5~6cm时,切取生长较为健壮的不定芽,接种到生根培养基中,诱导不定芽生根。

1.3 结果观测与统计

成熟胚接种到愈伤组织诱导培养基中,15d后进行第1次继代培养,统计愈伤组织诱导率;愈伤组织经过2次继代培养,然后进行不定芽诱导,分别于接种后15、30d统计不定芽分化率;不定芽接种到生根培养基中30d后统计生根率。有关计算公式如下:出愈率=产生愈伤组织的外植体数/接种的外植体数×100%;分化率=产生不定芽的外植体数/接种的外植体数×100%;生根率=产生不定根的外植体数/接种的外植体数×100%。

1.4 数据处理

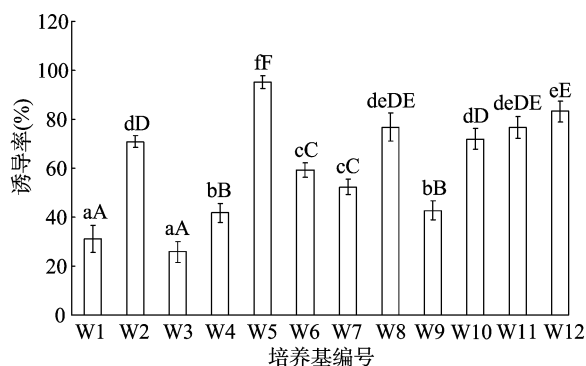
数据采用 Excel、SPSS 17.0 软件进行方差分析及 Duncan's 多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

根据前期预试验的结果,选取12种培养基进行小麦愈伤组织的诱导。采用微损法将消毒后的小麦剥胚,接种到愈伤组织诱导培养基中(图1-A),26℃暗培养约1周,可以观察到胚上已有明显的白色透明的愈伤组织产生(图1-B);继续培养15d,愈伤组织体积明显增大,形成蓬松的球形(图1-C),统计愈伤组织诱导率并进行继代增殖。图2表明,在W1~W12这12种愈伤组织诱导培养基中,W5的诱导效果最好,愈伤组织诱导率超过90%,差异极显著(P<0.01)。通过分析愈伤组织的诱导情况,初步获得比较适合愈伤组织诱导的培养基类型。

以观察到部分愈伤组织的颜色开始变绿,出现少量的深绿色芽点;分化培养2周左右即可清楚地看到愈伤组织块上长出成簇的不定芽(图1-F)。继续培养30d左右,产生不定芽的愈伤组织增多,不定芽生长旺盛(图1-G)。对统计数据发现(图3),在愈伤组织分化诱导后15d,不定芽分化率较低,最高在15%左右;当分化诱导30d时,不定芽分化率迅速提高,最高达到60%。显著性分析表明,在WF1~WF8这8种不定芽诱导培养基中,WF5~WF8的诱导效果较好,和WF1~WF4之间存在极显著差异。在WF5~WF8这4种培养基中,WF8诱导愈伤组织分化的效果则最好。此外,通过



不同小写、大写字母分别表示在 0.05、0.01 水平上差异显著。下同。

图2 不同愈伤组织诱导培养基小麦成熟胚愈伤组织诱导率的影响

观察愈伤组织的分化情况,发现愈伤组织在 WF1 ~ WF4 这 4 种培养基中主要分化产生大量的不定根,而不定芽则极少。通过分析愈伤组织不定芽的诱导情况,初步获得比较适合愈伤组织分化的培养基类型。

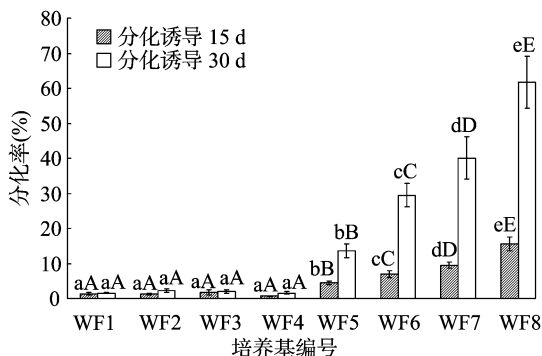


图3 不同分化培养基对小麦愈伤组织不定芽诱导率的影响

#### 2.4 生根诱导

切取生长健壮的不定芽,接种到生根诱导培养基 WR1 ~ WR6 中进行生根诱导,诱导培养 30 d 后,即可获得试管苗 (图 1-H)。在这 6 种生根培养基中,不定芽均可诱导产生根,且在 WR4 中不定芽产生根的效果最好,生根率超过 50% (图 4)。显著性分析表明,WR4 和其他 5 种生根培养基之间存在极显著差异。

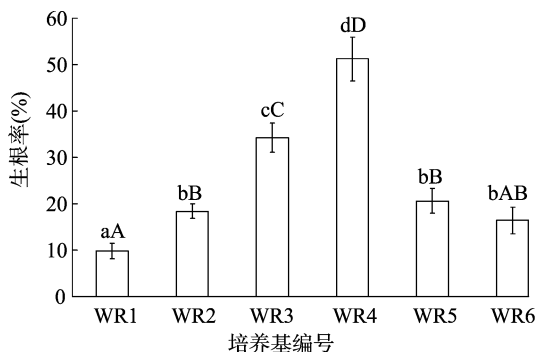


图4 不同生根培养基对小麦不定芽生根率的影响

### 3 结论与讨论

小麦在长期种植的过程中,由于受到诸多因素的影响,其产量及品质不断下降,利用基因工程技术是提高小麦产量和

改良小麦品质的有效途径。虽然目前有关小麦遗传转化的研究较多,但效果不佳,其中限制因素之一就是小麦植株的再生频率低,建立稳定的再生体系比较困难。因此,如何建立起高效的小麦再生体系是提高小麦产量和品质面临的重要问题。本试验以小麦成熟胚为外植体,通过研究不同激素组合对小麦愈伤组织诱导、分化以及植株再生的影响,以此探索小麦组织培养的最适条件。与幼胚相比,成熟胚的取材方便容易,不受季节限制,因此逐渐成为小麦组织培养的首选材料。在小麦无性系建立的过程中,乙醇和  $\text{HgCl}_2$  处理种子的时间要适度,70% 乙醇消毒 5 min,  $\text{HgCl}_2$  处理 15 min 效果较好。时间太短,消毒不彻底,污染率较高;时间过长,影响胚的活性,愈伤组织的能力下降。成熟胚的剥离是一个重要环节,剥胚前,须先将种子浸泡,再于 26 °C 下处理 24 h 左右,为的是使种子膨胀疏松,从而利于剥胚,其中浸泡的时间不宜过长,否则造成种子腐烂,胚易破碎且活力下降,愈伤组织诱导率下降;浸泡的时间也不宜过短,否则种子比较坚硬,胚难剥离。CH 营养丰富,是多种氨基酸混合物,对胚状体、不定芽的分化具有良好的促进作用。在小麦成熟胚培养过程中,培养基中添加 0.5 g/L CH 有利于愈伤组织诱导和不定芽分化。生长素的主要作用为诱导愈伤组织的形成和根的分化,促进根、茎、芽的生长。2,4-D 可以促进细胞脱分化,产生愈伤组织,因此是愈伤组织诱导过程中比较常用的生长素类似物。通过比较小麦愈伤组织的诱导情况可以看出,2.0 mg/L 2,4-D 对于小麦成熟胚愈伤组织的形成非常重要,而 NAA 的效果似乎并不明显。Asn 或 Gln 是培养基中重要的有机氮源,在培养基中添加一定浓度的 Asn 或 Gln 有助于小麦愈伤组织的诱导。Asn 和 Gln 相比,0.15 g/L Asn 对小麦愈伤组织诱导的促进作用更明显。因此,在小麦成熟胚诱导过程中,可在添加 2,4-D 和 CH 的基础上,在培养基中附加一定含量的 Asn 或 Gln,从而能够获得质量较高的愈伤组织,这对于随后进行的愈伤组织分化培养很有必要。如果直接将小麦的愈伤组织进行分化诱导,往往不能产生不定芽,可能是因为初期产生的愈伤组织结构疏松,主要为非胚性愈伤组织,但通过 2 次继代培养,可以使愈伤组织的结构变得更为致密,胚性愈伤组织的比例大大提高,从而有利于不定芽的诱导。在小麦愈伤组织的分化诱导过程中,WF8 的效果最好,愈伤组织的分化率最高,不定芽产生的速度快、数量多,但不定根的产生则不明显。在前 4 种分化培养基中,愈伤组织产生不定芽的速度要慢得多,数量极少,并且有大量的不定根形成。对照各培养基的成分发现,在 KT 浓度为 1.0 ~ 4.0 mg/L 时,其含量的变化对不定芽的诱导率影响不大,但在培养基中加入 NAA 和 6-BA 后,不定芽的诱导率明显提高,说明 NAA 和 6-BA 对不定芽诱导影响较大,是愈伤组织分化过程中起关键作用的激素。而培养基中包含 NAA 和 6-BA 的前提下,KT 浓度达到 4.0 mg/L 时,不定芽的分化率显著提高,可见只有在合适种类和浓度激素的协同作用下,小麦愈伤组织的分化方可达到比较理想的效果。对于小麦生根诱导,应用 1/2MS 作为基本培养基,附加一定浓度 NAA 和 IBA 均可促进根的生成,但 NAA 的效果要优于 IBA,其中比较适宜的 NAA 浓度为 0.5 mg/L,在此浓度下,不定芽生根速度快,数量多,根系较为发达。

何碧珠,杨超,朱萍,等.金线莲多倍体诱导研究[J].江苏农业科学,2016,44(9):70-74.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.020

# 金线莲多倍体诱导研究

何碧珠<sup>1</sup>,杨超<sup>1</sup>,朱萍<sup>1</sup>,蒋继宏<sup>2</sup>

(1. 福建农林大学园艺学院,福建福州 350002; 2. 江苏师范大学/江苏省药食植物生物技术国家重点实验室培育点,江苏徐州 221116)

**摘要:**采用秋水仙素溶液浸泡法、涂抹法、加入培养基法诱导金线莲多倍体,研究不同秋水仙素浓度、处理时间、处理方式金线莲多倍体的诱导效果,并将诱变植株进行繁殖。结果表明:以 700 mg/L 秋水仙素加入培养基处理 15 h 诱变率最高,达 53.00%;以 500 mg/L 浸泡法处理 24 h,诱导效果最佳,诱变率为 51.67%;以 700 mg/L 涂抹法涂抹在金线莲茎节处诱导效果较好,诱变率为 35.00%;3 种多倍体诱导的效果顺序为加入培养基法 > 浸泡法 > 涂抹法。

**关键词:**金线莲;多倍体;秋水仙素;诱变率

**中图分类号:** S567.23<sup>+</sup>9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0070-05

金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)是我国传统珍贵药材,属兰科(Orchidaceae)开唇兰属(*Anoectochilus*)植物<sup>[1]</sup>。由于人为掠夺性采挖,金线莲生境遭受严重破坏,加上金线莲自身繁殖特性,种子细小,发育不完全,自然状态下萌发率和繁殖率低等特点,野生金线莲存量已越来越少<sup>[2-5]</sup>。多倍体植物具有营养器官大、抗逆性强、药用活性成分含量高等特性<sup>[6]</sup>。金线莲组织培养方面报道虽多<sup>[7-13]</sup>,但尚未见将一次性成苗培养技术应用于多倍体植株诱导方面应用的报道。本研究运用秋水仙素对一次性成苗培养植株进行多倍体诱导,

以期多倍体金线莲工厂化生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

将在福建省永泰藤山自然保护区赤壁景区内采集的野生苗一次性成苗培养的第二代瓶苗作为试验材料,选择生长一致、茎部粗壮的植株进行试验处理。

### 1.2 方法

采用 3 种方法进行多倍体诱导试验,每种方法均设置若干组处理时间和浓度梯度,研究不同取材部位(茎段、茎尖)、处理方法、秋水仙素浓度及处理时间对多倍体诱变率的影响。  
1.2.1 秋水仙素溶液浸泡法 选取生长一致、茎节粗壮组培瓶苗,在无菌条件下将瓶苗植株切成长 1~2 cm 的带节茎段,放入经过高压灭菌浓度为 300、500、700 mg/L 的秋水仙素溶液分别浸泡 10、20、30、40、50、60 h,每个处理重复 3 次,以无菌水浸泡处理材料为对照(CK)。将各处理后材料在超净工

收稿日期:2016-03-29

基金项目:中央财政林业科技推广示范项目(编号:[2014]YC14号)。

作者简介:何碧珠(1960—),女,福建福州人,高级实验师,主要从事园艺植物生物技术及遗传资源研究。E-mail:954196684@qq.com。

通信作者:蒋继宏,教授,主要从事药食植物生物技术研究。Tel:(0516)83403515;E-mail:jhjiang@jsnu.edu.cn。

在小麦组织培养过程中,不同种类和含量的激素组合在愈伤组织诱导和再生植株的获得方面具有不同的效果。本研究通过探索小麦组织培养的最适条件,并初步建立起较为稳定的小麦再生体系,本试验结果对于今后小麦遗传转化体系的建立和品质的改良具有重要的理论和现实意义。

## 参考文献:

- [1] Chin J C, Scott K J. Studies on the formation of roots and shoots in wheat callus cultures[J]. Ann Bot, 1997, 41: 473-481.
- [2] 覃建兵,何光源. 不同小麦基因型及其不同外植体离体培养研究初探[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(6): 522-527.
- [3] 李娜,焦滨,谷运红,等. 小麦组织培养研究进展[J]. 河南农业科学, 2005(8): 11-15.
- [4] Delporte F, Mostade O, Jacquemin J M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2001, 67: 73-80.
- [5] 李根英,黄承彦,隋新霞,等. 小麦不同外植体的组织培养效果研究[J]. 麦类作物学报, 2006, 26(1): 21-25.
- [6] 何勇刚,林刚,刘曼西,等. 小麦不同生理状态的幼穗和幼胚盾

- 片与诱导分化能力关系的研究[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(5): 363-368.
- [7] 李新玲,曲敏,闫玉清,等. 影响小麦成熟胚培养及植株再生因素的研究[J]. 植物研究, 2005, 1(1): 49-52.
- [8] Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T, et al. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1998, 53: 67-74.
- [9] He G Y, Rooke L, Cannell M, et al. Current status of transformation in bread and durum wheats and modifications of gluten quality[J]. Acta Agronomica Hungarica, 1998, 46(4): 449-462.
- [10] 毕瑞明,王洪刚. 小麦成熟胚的组织培养[J]. 中国农学通报, 2007, 23(2): 53-57.
- [11] 陶丽莉,殷桂香,叶兴国. 小麦成熟胚组织培养及遗传转化研究进展[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(4): 713-718.
- [12] Patnaik D, Khurana P. Genetic transformation of Indian bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli[J]. BMC Plant Biology, 2003, 3(5): 1-11.

作台上用无菌水冲 3~4 遍后,接种在一次性成苗培养基 MS + 1 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L NAA + 150 g/L 土豆 + 3% 蔗糖 + 0.65% 琼脂 + 0.2% 活性炭上培养,将茎节和顶芽分开培养。培养条件:温度( $23 \pm 2$ ) °C,光照强度 1 000~1 500 lx,光照时间 10 h/d。每瓶接种 4 个茎段或 4 个顶芽,每个处理接种 5 瓶,每个处理重复 3 次。

**1.2.2 培养基添加** 选取生长一致、茎节粗壮组培瓶苗,在无菌条件下将瓶苗切成长 1~2 cm 的带节茎段,接种到分别添加 300、500、700 mg/L 秋水仙素溶液的上述一次性成苗培养基上培养的植株,培养时间分别为 5、10、15、20、25、30 d,以不加秋水仙素培养基为对照(CK),将处理后的材料转入不含秋水仙素的培养基中继续培养,将茎节和顶芽分开培养,培养条件同“1.2.1”节。每瓶接种 4 个茎段或 4 个顶芽,每个处理接种 5 瓶、重复 3 次。

**1.2.3 秋水仙素蘸在材料处** 选取生长一致、茎节粗壮组培瓶苗,在无菌条件下将瓶苗切成长 1~2 cm 的带节茎段,在超净工作台用无菌棉签蘸上经高压灭菌的秋水仙素溶液,涂抹在茎节处,再将涂抹过秋水仙素的材料接种到“1.2.1”节所述一次性成苗培养基上培养的植株,将茎节和顶芽分开培养,秋水仙素溶液浓度分别为 300、500、700 mg/L,共 3 个处理。每瓶接种 4 个茎段或 4 个顶芽,每个处理接种 5 瓶、重复 3 次,以无菌水处理材料为对照(CK)。

### 1.3 多倍体鉴定

**1.3.1 形态学观察** 从植株大小以及叶片大小、颜色、厚度等形态特征上比较经过秋水仙素处理的植株与对照植株的差异,从而初步筛选出诱导植株。分别测量培养 3、5 个月二倍体苗和四倍体苗叶长、叶宽、叶厚、茎直径、株高。

选择生长一致的诱导植株和对照植株,分别撕取叶片下表皮,置于载玻片上制成临时装片,在日本产 Olympus 倒置式生物显微镜下观察。在 10×10 倍镜下,随机选择 10 个视野,

计算每个视野中的气孔数目;在 10×40 倍镜下,随机选择 10 个视野,测量视野中的气孔长度、宽度。

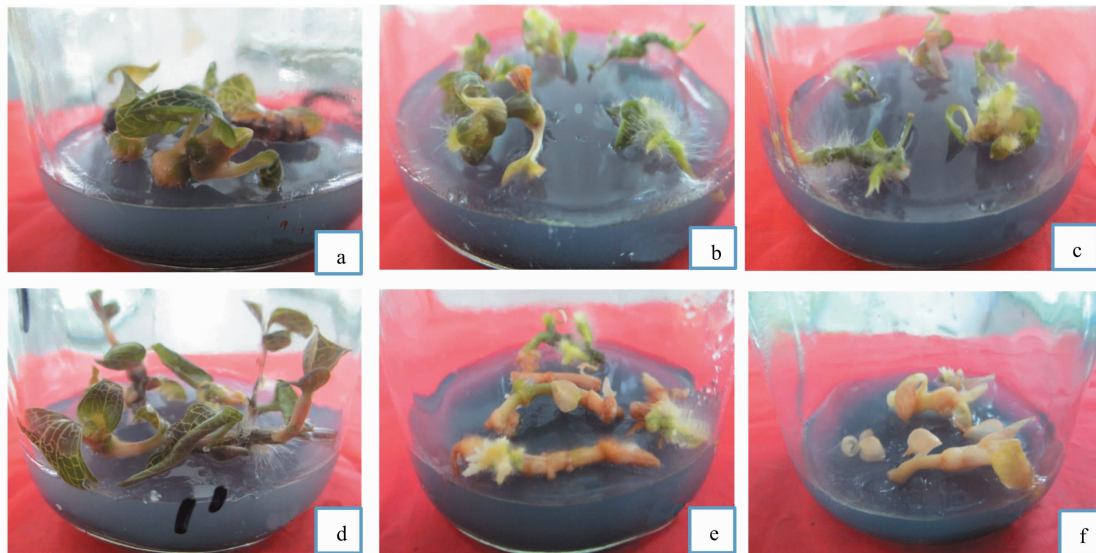
**1.3.2 染色体观察** 对外部形态和气孔明显变大的植株,采用改良苯酚品红染色法进行根尖染色体鉴定。在 08:00—10:00 切取植株根尖,先置于 4 °C 冰箱中预处理 8 h,后用卡诺固定液(冰乙酸:乙醇=1:3,V:V)在室温下固定 18 h,蒸馏水漂洗 2~3 次后,用 90%、80%、70% 乙醇溶液各浸泡 30 min,再用蒸馏水漂洗 2~3 次,用 1 mol/L HCl 溶液在 60 °C 水浴中解离处理 30 min,解离好的根尖用蒸馏水洗净并吸干水分,用改良苯酚品红溶液染色 5 min 压片,将压片置于显微镜下镜检观察染色条数。

## 2 结果与分析

### 2.1 金线莲多倍体诱导研究

**2.1.1 浸泡处理对金线莲多倍体离体诱导效果** 不同浓度秋水仙素溶液浸泡处理后培养 1 个月时,茎节处未出现芽萌动现象,顶芽没有伸长生长。培养 2 个月后,40% 茎节间开始膨胀,腋芽发白,逐渐突起并伸长,抽出主芽,随后分化出二级、三级侧芽;5% 生长出畸形芽;一部分出现褐化现象;一部分出现玻璃化现象;一部分刚开始有芽分化出来,随后逐渐萎蔫死亡。与对照相比,处理 2、12 h 对材料抑制作用不明显,芽长势好,侧芽多,部分处理长出丛生芽;处理 24、36、48、60 h 对材料生长抑制作用明显,茎段芽萌动缓慢,生长慢,侧芽较少。

比较秋水仙素溶液对茎节、顶芽生长的影响,茎节较顶芽容易分化出侧芽,顶芽未分化出芽,主要表现为伸长生长,生长较快。试验发现,秋水仙素对顶芽毒害作用比对茎节严重,顶芽生长受到明显抑制,顶芽膨大后,部分生长停止并逐渐死亡,相同秋水仙素溶液浓度、相同处理时间下,顶芽成活率明显低于茎节(图 1)。



a—茎段培养 15 d; b—顶芽培养 15 d; c—茎段培养 30 d; d—顶芽培养 30 d; e—茎段培养死亡情况; f—顶芽培养死亡情况

图1 秋水仙素处理下金线莲茎段、顶芽生长情况

由表 1 可知,材料成活率随着秋水仙素溶液浓度升高、处理时间延长而逐渐降低,尤其以 700 mg/L 秋水仙素溶液处理 60 h 下,材料成活率最低,仅为 13.33%。相同秋水仙素浓度

下,随着处理时间延长,材料成活率也逐渐降低,300 mg/L 秋水仙素溶液处理 2 h 下材料成活率为 96.67%,而处理 60 h 时材料成活率降至 35.00%;500 mg/L 秋水仙素溶液处理 2 h