

## 激素对洋桔梗植株再生的影响 及生根培养的研究

李 群<sup>1</sup>, 刘光勇<sup>2</sup>, 王 丽<sup>3\*</sup>

(1. 四川师范大学化学与生命科学学院, 四川成都 610066; 2. 成都市猛追湾中学,  
四川成都 610051; 3. 四川大学生命科学学院, 四川成都 610064)

**摘要:** 以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA、KT、NAA 和 IBA 诱导洋桔梗叶片外植体的再生植株。结果表明: MS+6-BA 0.5~1.0 mg/L(单位下同)+NAA 0.2 和 MS+6-BA 0.5~1.0+IBA 0.2 培养基都能诱导外植体产生愈伤组织, 但 6-BA 的浓度必须小于 1.0 mg/L, 否则会导致组织的严重玻璃化; MS+KT 1.0~2.0+NAA 0.2 或 MS+KT 1.0~2.0+IBA 0.2 培养基也能诱导外植体产生愈伤组织, 愈伤组织出现的时间较早且质地较好, 适合分化。继代培养时, MS 培养基中仅加 6-BA 0.5 mg/L 或 KT 0.5 mg/L, 即能获得较高的分化率。生根培养研究中, 培养液为 1/2 MS+50 g/L 糖+IBA 2 mg/L 的前处理, 生根效果较好, 生根率接近基质生根培养的生根率。

**关键词:** 洋桔梗; 激素; 植株再生

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2004)01-0040-03

## Effect of hormone on plantlet regeneration and studies of root regeneration culture of *Eustoma* sp.

LI Qun<sup>1</sup>, LIU Guang-yong<sup>2</sup>, WANG Li<sup>3\*</sup>

(1. College of Chemistry and Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610066, China;  
2. Chengdu Mengzhuiwan Middle School, Chengdu 610051, China; 3. College of  
Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** The leaves explants from *Eustoma* sp. were cultured on MS medium supplemented with 6-BA, KT, NAA and IBA of different densities to induce regeneration plants. The results indicated that the callus can be induced on all medium of MS+6-BA 0.5~1.0 mg/L (Unit is the same as follows)+NAA 0.2 and MS+6-BA 0.5~1.0+IBA 0.2, but the density of 6-BA can not exceed 1.0 mg/L, otherwise, it will cause serious vitrification; At the same time, on these medium of MS+KT 1.0~2.0+NAA 0.2 or MS+KT 1.0~2.0+IBA 0.2, callus can also be induced early and its texture is better for differentiation. When subculturing, MS medium only supplemented with 6-BA 0.5 or KT 0.5 can obtain higher frequency of differentiation. When studying root regeneration culture, the explants that has been pretreated with culture liquid of 1/2 MS+50 g/L sucrose+IBA 2 mg/L had better root regeneration and root regeneration frequency was close to medium culture's.

**Key words:** *Eustoma* sp.; hormone; plant regeneration

收稿日期: 2002-12-09 修订日期: 2003-02-18

基金项目: 四川省教育厅青年基金项目

作者简介: 李 群(1971-), 女, 重庆秀山县人, 在读博士, 讲师, 主要从事植物生物技术和植物保护等研究。\* 为通讯联系人

洋桔梗为龙胆科(Gentianaceae)观赏植物,原产于北美洲,其花型美丽,花色品种多,茎杆叶片光洁动人,是近年来国际上流行的一种高档切花,目前已跻身荷兰鲜花拍卖市场十大切花之一,其种苗市场需求量越来越大。但因洋桔梗种子细小,其种源多数依赖于国外进口的 F<sub>1</sub> 代杂种,价格十分昂贵,加之种子萌发缓慢及幼苗有 4~6 个月的停滞期,使其种苗的供应很受限制。在这种前提下,考虑用离体培养(颜昌敬,1990)来解决这一问题已十分必要。有关该属其它品种的离体培养,曾使用过带腋芽茎段、顶芽、侧芽、种子播种获无菌苗作外植体(杨霞等,1997;张淑娟等,1996),叶片作外植体的研究报道极少(杨永刚等,2001),同时在培养过程中仅考虑 6-BA 和 NAA 的组合,没考虑其它激素及组合。本文针对这些问题,使用叶片作外植体,并对洋桔梗离体培养的激素种类及组合作了一定探索。另外,在实验中发现洋桔梗的基质生根非常容易,因此研究

了更为简洁且节约成本的生根方式。这些研究结果的成功无疑为洋桔梗离体快繁提供了更多更好的途径,为其商业化生产打下坚实基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

供试材料为盆栽的洋桔梗(*Eustoma* sp.)叶片。

### 1.2 实验方法

选取植株新近长出的幼嫩无病虫叶片,即顶芽下面的第一、第二对叶,自来水冲洗干净后用适量洗衣粉浸泡 15 min,流水冲洗 30 min,纱布吸干水分后于超净工作台上用 75%酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 2 次,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 2 min,无菌水冲洗 2 次,然后在滤纸上用解剖刀将叶片切成 0.5 cm × 1.0 cm 左右大小,接种于含各种不同激素配比的 MS 培养基上(表 1)。另外,为了研究无根苗生根的

表 1 不同激素组合对洋桔梗叶片愈伤组织发生的影响(28 d)

Table 1 Effects of different hormone combinations on the callus organogenesis of *Eustoma* sp.

6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	愈伤组织诱导率 Callus inducing percentage(%)	愈伤组织玻化率 Callus vitrification percentage(%)	愈伤组织颜色、质地 Color and texture of callus
1.0	0	0.2	0	100	50.7	绿色、质地疏松,一半呈水浸状
0.5	0	0.2	0	93.3	0	绿色、颗粒状,质地适合分化
0	2.0	0	0.2	100	1.3	绿色略带黄、较致密的颗粒状
0	1.0	0	0.2	81.6	0	绿色、致密颗粒状
1.0	0	0	0.2	100	51.3	绿色、质地疏松,一半呈水浸状
0.5	0	0	0.2	100	9.5	绿色、质地较疏松,少部分水浸状
0	2.0	0.2	0	96.7	2.0	绿色、质地适中
0	1.0	0.2	0	80	0	绿色、质地致密

情况,在超净工作台上剪取 1.5~2.5 cm 的带 3~5 个叶片的无根苗,一部分直接接种在生根培养基上;一部分放在表 2 的各处理液中浸泡 2 h(仅浸泡基部)后捞出,放到容量为 350 mL 的带盖的经灭菌的空塑料瓶中。塑料瓶内放一张经高温高压消毒的滤纸,接种前向瓶内滴几滴无菌水,以浸透滤纸为度(冯学赞等,2002)。外植体诱导中每组合接种外植体 20 个,每次实验重复 3 次;无根苗生根培养中,每个培养瓶接种 10 根苗,每个处理用 2 个培养瓶。培养条件为:光照强度 2 000 lx,光照时间 16 h,培养室温度 25±20 °C。

## 2 结果与分析

洋桔梗叶片外植体经 4 周培养后,观察并统计

愈伤组织发生情况。结果见表 1。

### 2.1 不同激素组合对叶片愈伤组织发生的影响

由表 1 可看出,不同种类和浓度的细胞分裂素和生长素的结合大部分都能使外植体脱分化,产生不同质地的愈伤组织,且愈伤组织的发生都源于部分切口上(图版 I:①)。但发现,如果 BA 的浓度为 1.0 mg/L 时,形成的愈伤组织有一半呈水浸状,玻化较为严重,表明 BA 或者不适合该组织或者浓度过高。而当其浓度为 0.5 mg/L,水浸状即消除,表明确实是浓度过高导致的玻化,因此,在洋桔梗离体繁殖的脱分化过程中,BA 浓度应小于 1.0 mg/L,而 KT 浓度为 2.0 mg/L,也会导致极少量的玻化。因此,为了诱导适合分化的愈伤组织,BA 与 NAA 或 IBA 结合或者 KT 与 NAA 或 IBA 结合都可以,但 BA 的浓度应小于 1.0 mg/L,KT 的浓度也

不能超过 2.0 mg/L。在实验中还发现 IBA 组合形成的愈伤组织比 NAA 出现得早,大约一周就陆续出现了,而 NAA 组合需要 20 d。

## 2.2 不同激素组合对叶片器官发生的影响

选择质地适中、颗粒状的愈伤组织分别接种到分化培养基上,分化培养基为:(1)MS+6-BA 1.0+NAA 0.08;(2)MS+6-BA 0.5;(3)MS+KT 1.0+IBA 0.5;(4)MS+KT 0.5。培养 15 d 左右,愈伤组织上陆续分化出了芽。但发现(1)号培养基上分化出的芽大部分玻璃化,特别是接近培养基的地方,且随着继代次数的增多,玻璃化加剧,即使增加琼脂浓度和光照强度都不能减弱这种趋势;而(2)(4)培养基上分化的苗正常,叶片浓绿肥大,经 7~8 代培养都未发现苗子的玻璃化,芽的增殖倍数达到 6~8 倍(图版 I:②);(3)培养基上分化的芽在开始 4 代内完全正常,增殖倍数为 8~10 倍,但随继代次数的增加,苗子的叶片逐渐变薄,颜色也逐渐变浅,有玻璃化的趋势,推测激素的浓度还是高了些。后来把这种苗子放在无激素的培养基上,苗子又恢复了正常。表明在分化培养中,BA 的浓度应在 0.5 mg/L 甚至更低的水平,KT 在 1.0 mg/L 以下,根据不同的需要作适当的调整。

表 2 不同培养液预处理对生根的影响(15 d)  
Table 2 Effects of pretreatment with different culture liquids on root regeneration

序号 No.	培养液 Culture liquid	生根率(%) Root regeneration percentage
1	0	60.3
2	1/2MS	72.1
3	1/2MS+50g/L 糖	89.2
4	1/2MS+50g/L 糖+NAA2mg/L	91.9
5	1/2MS+50g/L 糖+IBA2 mg/L	93.4

## 2.3 壮苗生根的研究

取 3~5 个叶片的无根壮苗分别接种于(5)1/2 MS+NAA 0.2 和(6)1/2 MS+IBA 0.5 中。20 d 左右观察,发现两种培养基上都长出了短而粗壮白色根,且根部及周围没有愈伤组织,表明根是直接诱导出来的,即根的维管束同苗的维管束是完全相通的,利于炼苗成功(图版 I:③)。30 d 左右,根变得更长,约 5~6 cm 时敞瓶炼苗 5 d,然后取出苗子,洗去根部培养基,移栽到腐殖土和蛭石 3:1 的花钵中,浇透水,一周内覆盖塑料薄膜保湿(薄膜上

有小孔),温度一直保持在 22 ℃左右。15 d 左右检查成活情况,得出成活率在 95%左右。

基于以上生根的研究,发现洋桔梗的生根较为容易,对激素的种类要求不严。由此考虑到更为简洁且节约成本的生根培养方式(表 2)。

由表 2 可得出,1 号对照能获得 60.3% 的生根率,表明洋桔梗苗子易生根。同时处理液中随着无机元素、糖及生长素的加入,生根率逐渐提高,特别是 5 号处理,其生根率大致和基质培养的生根率效果一样。表明苗子生根过程中,外源矿物质、糖及激素对它的重要性。但在实验中发现,培养液预处理生根和基质培养生根比较起来,根较细弱,须根较多,但根全呈绿色,看起来比较粗老(图版 I:④),即这些根较早地适应了以后的生长环境,为炼苗成功打下了基础。实践也证明,在腐殖土和蛭石 3:1 的花钵中炼苗,成活率达到了 81.4%,但需要更尽心地照料,同时提早施肥。值得注意的是,此种方法生根的时间不能太长,太长以后苗子因营养供应不上而黄化死去。可见,这一方法的成功实施将会节约很多成本,为以后的工厂化生产奠定了基础。

## 参考文献:

- 颜昌敬. 1990. 植物组织培养手册[M]. 上海:上海科学出版社.
- Feng XZ(冯学赞), An ZM(安忠民), Wang J(王静), et al. 2002. *In vitro* culture of mediumless of virus-free potato(脱毒马铃薯组培苗的无基质培养)[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 38(4):321-323.
- Yang X(杨霞), Xu K(徐康). 1997. Tissue culture and rapid propagation of *Eustoma grandiflorum*(洋桔梗的组织培养及快速繁殖)[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 33(6):435-438.
- Yang YG(杨永刚), Zhou GY(周根余). 2001. Regulation of hormone on *in vitro* regeneration system of the leaves of *Eustoma grandiflorum*(洋桔梗叶片体外再生系统的激素调控)[J]. *J of Shanghai Teachers Univ(Natural Sciences)*(上海师范大学学报(自然科学版)), 30(1):99-100.
- Zhang SJ(张淑娟), Liu YM(刘与明). 1996. Aseptic seeding and *in vitro* rapid propagation of *Eustoma russellianum* F<sub>1</sub>(洋桔梗 F<sub>1</sub> 无菌播种和试管苗的快速繁殖)[J]. *Subtrop Plant Res Commun*(亚热带植物通讯), 25(2):13-16.