

文章编号:1003-8701(2009)02-0010-04

甘露子的组织培养与植株再生

徐 梦,孔祥慧,高迎秋,李铁松,姜长阳 *

(辽宁师范大学生命科学学院,辽宁 大连 116029)

摘 要:本研究以甘露子嫩茎为材料,进行了愈伤组织的诱导、分化,试管苗的生根、移栽、扦插,以及试管苗移植的研究,并建立起甘露子优良变异植株的无性系,达到了快速繁殖的目的。结果证明:诱导嫩茎愈伤组织的理想培养基是 $1/2MS+BA0.5\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+2,4-D1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;愈伤组织分化的理想培养基是 $MS+BA1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;生根的理想培养基是 $1/2MS+IAA0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;以炉灰渣为试管苗的移栽扦插基质,试管苗移栽成活率为97%,扦插成活率为92%。移植的试管苗具有长势非常旺盛,秋天块茎收获量增产18%、根系增加1~2倍、入冬前枯萎时间晚7d的特点。

关键词:甘露子 愈伤组织 无性系 快速繁殖

中图分类号:S567.2

文献标识码:A

Studies on Tissue Culture and Plant Regeneration of *Stachys siebordii* Miq

XU Meng, KONG Xiang-hui, GAO Ying-qiu, LI Tie-song, JIANG Chang-yang

(College of Biological Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: Callus induction and differentiation were studied using young stem of *Stachys siebordii* Miq as explant and then the rooting, cutting and transplanting of tube seedling were also studied. The asexual line and rapid propagation technique of *Stachys siebordii* Miq were established. The results showed that the best medium for callus induction and differentiation of young stem was $1/2MS + 0.5-1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}BA + 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}2,4-D$ and $MS + 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}BA + 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}NAA$, individually. The ideal medium of rooting was $1/2MS + 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}IAA + 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}NAA$. With cinder used as the medium, survival percent of 97% for transplantation and 92% for cutting were observed. Transplanted tube seedling was vigorous and yield of cubes increased by 18%. Root system was enlarged by 1-2 times and it wilted 7 days later in the late fall.

Key words: *Stachys siebordii* Miq.; Callus; Clone; Rapid propagation

甘露子(*Stachys siebordii* Miq.)是唇形科水苏属植物^[1-2],又称地蚕、地灵、草食蚕、土蛹、螺丝菜、宝塔菜等。其块茎含蛋白质、碳水化合物、多种维生素、铁、氨基酸等成分;其中铁的含量极为丰富,是缺铁性贫血患者的理想食疗补品。其根茎既可作水果生食,蒸煮食之,又可盐渍为咸菜,具有生津止渴、润肠通便之疗效。对胃热呕吐、咳嗽、脓痰、老年习惯性便秘尤为适宜^[3]。全株含有水苏碱、胆碱、水苏糖及胡卢巴碱等,其中的水苏

碱等对于KCN所引起的缺氧症具有一定的疗效,此外它还有望发展成一种有效的抗肾炎药物。甘露子生长于湿润地或近水边,对气候和海拔要求不严,在稍凉爽的条件下生长较好。近年来大连地区农民在小批量的栽培中,发现了一株长势非常旺盛,块茎产量高的有利变异植株。农民试图以这株有利变异植株为种源进行规模栽培。但由于甘露子在北方难以形成种子,即使形成了种子在土中的发芽率也非常低,并且用种子进行繁殖的后代因分离作用难以保持其优良性状。因此,农民只能采用有限的块茎进行繁殖,从而极大地限制了这种优良种系的规模生产。为了满足人们生产上的需求和研究上的需要,本次试验对具有有利变

收稿日期:2008-09-24

作者简介:徐 梦(1986-),女,学士,从事植物组织培养研究。

通讯作者:姜长阳,男,教授,E-mail: changyangjiang@126.com

异的甘露子进行了组织培养和快速繁殖的研究。

1 材料与方法

1.1 材料灭菌

将具有变异性状的甘露子嫩茎剪下，放到 500 mL 的磨口广口瓶中，用自来水振荡洗涤约 20 min 后，用 0.05% 安利洗涤剂振荡洗涤约 10~15 min，再用无菌水冲洗到完全无泡沫时移至超净工作台上，倒入 70%~75% 乙醇振荡灭菌 10 s 左右，接着用无菌水振荡洗涤 2 次，再用 0.05% HgCl₂ 溶液振荡灭菌 4 min 后，向 0.05% HgCl₂ 溶液中加入等量无菌水，使 HgCl₂ 溶液的浓度变成 0.025% 后，继续灭菌 12 min，接着用无菌水振荡

洗涤 5 次，再将无菌嫩茎切成 0.5 cm 左右的茎段，接种到相应的固体培养基上进行培养，并定期观察统计。

1.2 培养条件

培养基以 MS 和 1/2MS 为基本培养基，附加不同浓度的细胞分裂素和生长素。以 MS 为基本培养基时，加蔗糖 30 mg·L⁻¹；以 1/2MS 为基本培养基时，加蔗糖 15 mg·L⁻¹。培养基胼力强度为 180 g·cm^{-2[4]}、培养基 pH 5.8~6.0，培养温度 18~20℃，光照 12 h·d⁻¹，光照强度 2 000~4 000 lx。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

表 1 不同浓度激素对甘露子愈伤组织诱导的影响					
BA(mg·L ⁻¹)	2,4- D(mg·L ⁻¹)	IAA (mg·L ⁻¹)	诱导愈伤组织数	愈伤组织诱导率(%)	长势
0.5	0	0	0	0	
1.0	0	0	0	0	
1.5	0	0	0	0	
2.0	0	0	0	0	
0.5	0.5	0	73	73	+
1.0	0.5	0	89	89	++
1.5	0.5	0	39	39	+
2.0	0.5	0	40	40	+
0.5	0	0.5	0	0	
1.0	0	0.5	0	0	
1.5	0	0.5	0	0	
2.0	0	0.5	0	0	
0.5	1.0	0	100	100	+++
1.0	1.0	0	100	100	+++
1.5	1.0	0	86	86	++
2.0	1.0	0	76	76	+
0.5	0	1.0	0	0	
1.0	0	1.0	0	0	
1.5	0	1.0	0	0	
2.0	0	1.0	0	0	

注：+++ 为长势最好，++ 为长势较好，+ 为长势一般。

将无菌嫩茎用解剖刀切成 0.2 cm 左右的茎段，接种到以 1/2MS 为基本培养基，附加不同浓度的 BA、2,4- D 和 IAA 的培养基上，进行愈伤组织的诱导培养。进行 4 次重复试验，每个处理接种 100 个材料。接种 10 d 后有的培养基上开始形成愈伤组织，50 d 观察统计。由表 1 可见，BA 浓度分别为 0.5 mg·L⁻¹、1.0 mg·L⁻¹、1.5 mg·L⁻¹、2.0 mg·L⁻¹ 单独使用和与不同浓度的 IAA 配合使用时不能诱导形成愈伤组织；而不同浓度的 BA 与浓度为 0.5 mg·L⁻¹、1.0 mg·L⁻¹ 的 2,4- D 配合使用时，几乎都能够诱导形成愈伤组织。但愈伤组织的诱导率、生长速度及外部形态却差异较大。其中浓度为 0.5 mg·L⁻¹ 和 1.0 mg·L⁻¹ 的 BA 与浓度为 1.0 mg·L⁻¹ 的 2,4- D 配合使用时，不仅愈伤组织的诱导率达 100%，愈伤组织的生长速度快，而且愈伤组织的外观呈浅绿色的颗粒状，质地疏松。一般认为，这种愈

伤组织为具有分化能力的愈伤组织^[5]。除了 1/2MS+BA0.5~1.0 mg·L⁻¹+2,4-D1.0 mg·L⁻¹ 这一培养基外，在其他培养基上诱导的愈伤组织从形态、结构、颜色和质地等性状上看，均为没有分化能力的愈伤组织或分化能力差的愈伤组织。将上述培养基上诱导的愈伤组织，在同一培养基上连续继代培养 5 代，形成的愈伤组织仍为具有分化能力的愈伤组织。这说明，1/2MS+BA0.5~1.0 mg·L⁻¹+2,4- D1.0 mg·L⁻¹ 为甘露子嫩茎诱导愈伤组织的理想培养基。

2.2 愈伤组织的分化

把上述继代培养的浅绿色颗粒状愈伤组织接种到以 MS 为基本培养基，附加不同浓度的 BA、IAA 和 NAA 的培养基上进行分化培养，13 d 时开始分化，45 d 时观察统计。由表 2 可见，在 BA 与 NAA 配合使用和 BA 与 IAA 配合使用的培养基上愈伤组

织能分化出不定芽。但从愈伤组织的分化率及分化不定芽的长势看,在MS+BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹的培养基上,不仅颗粒状愈伤组织分化率达到了 97%,平均每块愈伤组织分化的不定芽数达 8.6 个,而且分化苗长势也较好。观察还表明,

在这一培养基上诱导 45 d 时,分化的不定芽呈嫩绿色丛生状,株高多在 0.5 cm 以上。把在这一培养基上分化的不定芽进行继代培养,连续培养 3 代,不定芽以每 40 d 5.6 个的速度进行分化。这说明,MS+BA1.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹ 是诱导甘

表 2 不同浓度激素对甘露子愈伤组织分化的影响							
BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	IAA (mg·L ⁻¹)	接种颗粒数	分化数(个)	分化率(%)	平均每个颗粒分化芽数(个)	分化苗长势
0	0	0	30	0	0	0	
0.5	0.1	0	30	16	53	2.5	++
0.5	0.2	0	30	10	33	1.9	+
0.5	0.3	0	30	15	50	1.7	+
0.5	0.5	0	30	8	27	2.0	+
0.5	0	0.1	30	19	63	3.3	+++
0.5	0	0.2	30	12	40	2.8	++
0.5	0	0.3	30	11	37	2.1	+
0.5	0	0.5	30	5	18	1.6	+
1.0	0.1	0	30	25	83	6.3	++
1.0	0.2	0	30	17	57	3.2	++
1.0	0.3	0	30	15	50	3.9	+
1.0	0.5	0	30	10	33	5.6	+
1.0	0	0.1	30	0	0	0	
1.0	0	0.2	30	0	0	0	
1.0	0	0.3	30	0	0	0	
1.0	0	0.5	30	0	0	0	
1.5	0.1	0	30	29	97	8.6	+++
1.5	0.2	0	30	21	70	6.4	++
1.5	0.3	0	30	14	47	5.3	++
1.5	0.5	0	30	9	30	3.1	+
1.5	0	0.1	30	0	0	0	
1.5	0	0.2	30	0	0	0	
1.5	0	0.3	30	0	0	0	
1.5	0	0.5	30	0	0	0	

注 :+++ 为长势最好,++ 为长势较好,+ 为长势一般。

露子愈伤组织分化和不定芽分化的理想培养基。

2.3 不定芽的生根培养和生根继代培养

把上述分化培养的甘露子不定芽,从基部剪下,接种到以 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度 NAA 和 IAA 的培养基上进行生根培养。培养结果证明:在 1/2MS+IAA0.2 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹ 的培养基上,接种后 9 d 可见形成根原基,随后根系和植株迅速生长。当培养至 28 d 时,绝大多数的生根苗可以长成具有 3~7 条根、5~8 个叶片、株高 4~5 cm、长势旺盛的试管苗。

把上述试管苗剪成至少具有一个腋芽的茎段(每棵试管苗可剪成 3~4 个茎段),接种到相同的培养基上继续进行生根继代培养,经过 25 d 的培养,又能剪成 3~4 个具有腋芽的生根试管苗,繁殖出 3~4 株生根试管苗。经过 5 次继代培养的试管苗,其试管苗的生根率、根系和植株的生长状况保持不变,平均每代的繁殖系数为 3.5。

在进行剪段生根继代培养时,将生根试管苗基部保留一个腋芽继续培养,20~25 d 又可以生长为一株高 4 cm 左右的试管苗。利用这种方法,

只要控制污染,一次接种的生根培养,可以连续培养 3 代迅速生长的试管苗,直到培养基完全耗尽为止。在培养基即将耗尽时,如果仍然没有污染,可在超净工作台上,向培养瓶中加入 30 mL 左右已经灭菌的不含琼脂的液体生根培养基,这样又可以长出 1~2 代正常的生根试管苗。上述结果说明,1/2MS+ IAA0.2 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹ 是甘露子生根培养的理想培养基。

2.4 试管苗的移栽和扦插

打开生根试管苗培养瓶的瓶塞,置于 4 000~5 000 lx 的光照下炼苗 3 d 后,把试管苗从培养瓶中取出,剪下上半段,洗净基部的培养基,把具有根的试管苗移栽到表层约为 7 cm 厚的炉灰渣、下层为肥沃园土的温室苗床或花盆中。然后弥雾浇透水,在始终保持具有充足水分、湿度 90%~95%、温度 22~28℃、没有直射光照的情况下,25 d 后成活率达 97%。

把剪下的移栽试管苗上半段和剪下的没有经过炼苗的生根试管苗的上半段从培养瓶中取出后,剪成至少具有一个生长点、长 2 cm 左右的茎

段,把下部切口放到 $90\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IAA 溶液中处理 5 min,扦插到事先已经浇透水并打上了深约 1 cm 小孔、温度在 $22\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温室苗床的炉灰渣中。接着弥雾喷浇淤闭插孔后,再按照与移栽试管苗相同的环境条件进行管理。15 d 后可见成活并正常生长,30 d 后成活率为 92%。

2.5 试管苗移植与长势

把移栽和扦插成活的试管苗移植到农田中,移植的成活率接近 100%。经过 3 年的小批量的移植试验证明,试管苗与常规扦插苗相比,试管苗长势具有非常旺盛、秋天块茎收获量增产 18%、根系增加 1~2 倍、入冬前枯萎时间晚 7 d 的特点。

3 讨 论

虽然国内已有甘露子组织培养、无性系建立的报道^[6-8],但前人研究所用的材料都是以具有分生能力的组织——生长点为材料的,本研究以具有有利变异性状的甘露子非分生组织嫩茎为材料,进行了甘露子嫩茎愈伤组织的诱导、愈伤组织的分化、不定芽的生根、试管苗的继代、试管苗的移栽与扦插研究,建立起具有有利变异性状甘露子嫩茎的无性系。这不仅在理论上证明了甘露子的非分生组织细胞具有全能性,而且在实践上还证明了采用组织培养、无性系建立的方法可使甘露子的自然有利变异得到保存,同时还为甘露子优良变异植株的工厂化育苗奠定了技术基础。

由不定芽继代分化培养 40 d 的分化率为 5.6%。按照这个速率计算,甘露子愈伤组织分化培养年增殖数为 5.6⁹;用生根继代培养的方法进行增殖培养,25 d 的繁殖系数为 3.5,按照这个速率计算,甘露子生根继代培养年增殖数为 3.5^{14.6}。加之移栽时还可以将移栽苗的上半段剪下来扦插,

这样就又将繁殖系数提高了 1 倍。上述结果说明,不论采用上述哪种方法进行快速繁殖,一年都能繁殖出数百万株试管苗,达到快速繁殖、工厂化育苗的目的,可满足生产上对甘露子变异植株的需要。在上述所研究的几种快速繁殖技术中,生根继代培养快速繁殖的方法具有试管苗生长旺盛,没有无效苗的特点。因此,在生产上应采用生根试管苗继代培养的方法进行快速繁殖。

移植的甘露子试管苗与常规的扦插苗相比,出现了根茎收获量增加 18%、入冬前枯萎时间晚 7 d、长势非常旺盛的特点,主要是与以下两方面因素有关:一是与培养甘露子试管苗的材料有关。材料来源于生长非常旺盛、具有有利变异的植株;二是与在试管苗的培养中使用了较高浓度的生长素有关,试管苗移植后生长素具有后效作用,仍然会促进分生细胞快速分裂,从而形成了发达的根系,能吸收更多的营养和水分。

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 (第六十六卷)[M]. 北京:科学出版社,1977:18.
- [2] 中国科学院北京植物研究所主编. 中国高等植物图鉴 (第三册)[M]. 北京:科学出版社,1972:662.
- [3] 李书心. 辽宁植物志(下册)[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1991:221.
- [4] 姜长阳. 植物组织培养培养基琼脂用量的商榷[J]. 植物生理学通讯,1992,28(2):52.
- [5] 安利佳,姜长阳. 植物组织培养导论[M]. 大连:辽宁师范大学出版社,1996:55-72.
- [6] 李 卫,董 文,赵东利,等. TDZ 诱导甘露子茎段再生[J]. 西北植物学报,2002,22(4):965-969.
- [7] 郭月霞,郭东伟,李春莲,等. 不同激素配比对离体地灵芽增殖的影响[J]. 西北农林科技大学学报,2004,32(8):53-56.
- [8] 郭东伟,李春莲,郭月霞,等. 不同支持物对地灵试管苗生根的影响[J]. 西北农林科技大学学报,2004,32(10):25-28.

能,施用量超出正常用量的几倍也不会发生由于养分过多而引起秧苗徒长或其他异常现象。

4 讨 论

有机育苗床土杂草控制率为 86.4%,比施用除草剂的常规育苗床土低 5.9%。如何提高有机育苗床土的杂草控制效果有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 片野学. 自然农法水稻栽培[M]. 东京:农山渔村文化协会,1990.
- [2] 薄上秀男. 发酵肥的制作方法与应用[M]. 东京:农山渔村文化协会,2004.
- [3] 稻叶光国. 有机农业与水稻栽培[M]. 东京:筑波书房,2005.

3 结 论

3.1 使用有机育苗生物调理剂配制的有机育苗床土,由于在配制育苗床土过程中产生高温能够杀灭杂草,从而有效控制杂草的发生。

3.2 有机育苗生物调理剂具有丰富的各种生理活性物质,能够促进秧苗的生长,提高免疫力,增强抗逆性。

3.3 有机育苗生物调理剂具有抑制土传病菌的传播功能和提高秧苗抗病能力,防治立枯病效果可达 99.0% 以上。

3.4 有机育苗生物调理剂具有非常高的安全性