

长春花愈伤组织诱导研究

贾鸿儒, 任俞新, 牛晓钰

(甘肃林业职业技术学院, 甘肃 天水 741020)

摘要: 以长春花幼嫩顶芽与茎段为外植体, 研究了不同灭菌剂及处理时间对外植体的灭菌效果及外植体材料对愈伤组织诱导的影响。结果表明, 长春花顶芽为外植体, 用 75% 酒精灭菌 30 s+0.1% 升汞灭菌 300 s 效果较好, 此条件下外植体污染率为 5.5%、褐变率为 9.3%。愈伤组织诱导培养基以 MS+3.0 mg/L 6-BA +2.0 mg/L 2, 4-D 效果较好, 诱导率可达 86.6%。以长春花顶芽为外植体时产生愈伤组织的时间较早, 出愈率为 92.6%, 愈伤组织团块大、致密, 表面有小疣突, 预期有较好的不定芽分化能力。

关键词: 长春花; 外植体灭菌; 愈伤组织诱导; 研究

中图分类号: S567.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)10-0051-03

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2020.10.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2020.10.011)

Study on Callus Induction of *Catharanthus roseus*

JIA Hongru, REN Yuxing, NIU Xiaoyu

(Gansu Forestry Professional Technology College, Tianshui Gansu 741020, China)

Abstract: In this paper, the young top buds and stem segments of *Catharanthus roseus* were used as explants to study the effects of different sterilization agents and treatment time on the sterilization of explants and the effects of different explants on callus induction. The results showed that the top bud of periwinkle was explants, the sterilization effect was better with 75% alcohol for 30 s and 0.1% mercury for 300 s, the contamination rate of the explants was 5.5% and the browning rate was 9.3%. Callus induction medium with MS+3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L 2, 4-d had a good effect, with an induction rate of 86.6%. The callus was produced in a relatively short time and the rate of callus was 92.6% when the terminal bud was used as explants. The callus was large and dense, with small wart on the surface, and the adventitious bud differentiation ability was expected to be good.

Key words: *Catharanthus roseus*; Explant sterilization; Callus induction; Study

长春花 [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] 为夹竹桃科长春花属观赏及药用植物, 亚灌木、高达 60 cm, 花色艳丽, 花朵繁多。长春花性喜高温、高湿, 耐半阴, 不耐严寒, 最适宜温度为 20~33℃, 喜阳光, 忌湿怕涝, 一般土壤均可栽培, 但盐碱土壤不宜, 以排水良好、通风透气的砂质或富含腐殖质的土壤为好, 花期、果期几乎全年。长春花原产地中海沿岸、印度、热带美洲, 是园林

绿化的良好材料, 中国各地引进不少新品种, 可用于盆栽、花坛种植及栽植槽观赏^[1]。长春花作为中草药可全草入药, 具有止痛消炎、安眠、通便及利尿等作用, 还可用于清洗伤口、治疗坏血病等^[2-4]。但长春花种子细小, 结实量不高, 出苗率较低, 扦插繁殖繁殖系数也不高, 利用组织培养快速繁殖无菌苗是长春花苗木生产的重要途径。我们以长春花幼嫩的顶芽、茎段为外植体材料, 进

收稿日期: 2020-04-22

作者简介: 贾鸿儒(1980—), 男, 甘肃天水人, 副教授, 主要从事园林绿化营造的教学与研究工作。联系电话: (0)18093859308。

通信作者: 任俞新(1991—), 男, 甘肃天水人, 主要从事植物学的教学与研究工作。Email: 654692673@qq.com。

行愈伤组织的培养及快速繁殖试验。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料采自甘肃林业职业技术学院内实训基地。选取长春花幼嫩新枝，用清水冲洗干净后备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的制备 将从样品植株上剪取的幼嫩新枝用自来水冲洗干净，蒸馏水漂洗 3~4 次，在无菌条件下剪成 2~3 cm 的小段，放入广口瓶中。先倒入 75%酒精，摇动 30 s 后用无菌水冲洗 3~5 次，分别加入 0.1%升汞溶液灭菌(180、300、420 s)、饱和漂白粉上浸液灭菌(300、600、900 s)，用无菌水冲洗 5~6 次^[5]，将材料放入铺有无菌滤纸的接种盘中备用。

将消毒灭菌所得材料切去两头褐化部分，剩余部分切割成 0.5~1.0 cm 外植体，接种到 MS + 500 mg/L LH 基本培养基上，共设 6 个处理(试验方案见表 1)，每处理 10 瓶，每瓶接种外植体 1 块，3 次重复。接种 14 d 后检查污染率与褐变率。

污染率 = (污染的外植体数 / 接种外植体数) × 100%。

褐变率 = (褐变的外植体数 / 接种外植体数) × 100%。

1.2.2 培养条件 培养基中加入 3%的蔗糖、6 g/L 琼脂，pH 5.6^[6]。培养室温度为(22 ± 2) °C，无菌材料在暗光下培养 15 d 后转入光周期 12 h/12 h(光/暗)的条件下培养。光照强度约 30 μmol/(m²·s)^[7]。

1.2.3 愈伤组织培养 将初试培养所得无菌材料分顶芽和茎段 2 组，分别接种到愈伤诱导培养基中。愈伤组织诱导以 MS 为基本培养基，采用 6-BA、2, 4-D 的 2 因素 3 水平随机设计，共 9 个处理(表 2)，每处理 10 瓶(顶芽和茎段各 5 瓶)，每瓶接种 1 个外植体，重复 3 次。弱光下培养 40 d 后观察统

计出愈率。

出愈率 = (出愈数 / 接种外植体数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 灭菌剂及处理时间对外植体灭菌效果的影响

通过表 1 可以看出，75%酒精 + 0.1%升汞灭菌处理的污染率均明显低于 75%酒精 + 饱和漂白粉上浸液灭菌处理，但褐变率却明显高于后者。分析认为，75%酒精灭菌 30 s + 0.1%升汞灭菌 300 s 是长春花细嫩茎段及顶芽外植体较理想的消毒组合。

表 1 不同灭菌剂及处理时间的外植体灭菌效果

处理	75% 酒精 /s	0.1% 升汞 /s	漂白粉 上浸液 /s	接种数 /个	褐变率 /%	污染率 /%
1	30	180		30	5.6	24.8
2	30	300		30	9.3	5.5
3	30	420		30	30.5	1.9
4	30		300	30	0	28.6
5	30		600	30	3.1	37.9
6	30		900	30	19.6	66.4

2.2 不同激素配比对愈伤组织诱导的影响

观察发现，灭菌所得材料转接到愈伤诱导培养基中，7 d 后顶芽及茎切段肥大，下端切口处有膨大的愈伤现象，40 d 后各处理愈伤组织块明显增大，但不匀一，部分愈伤块较致密、且表面有小疣突(图 1)。从表 2 可以看出，6-BA、2, 4-D 对愈伤组织诱导的出愈率以 6-BA 浓度为 3.0 mg/L、2, 4-D 浓度为 2.0 mg/L 时最大，为 86.6%；6-BA、2, 4-D 浓度分别大于 3.0、2.0 mg/L 时，愈

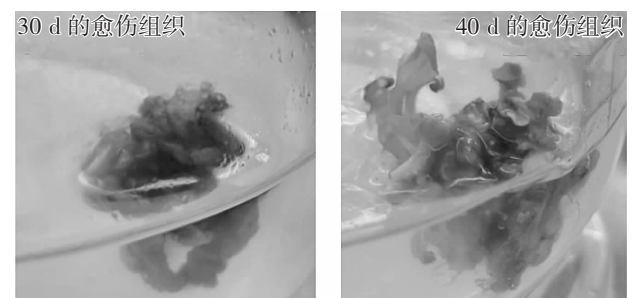


图 1 不同激素配比对愈伤组织诱导的影响

表 2 不同激素配比处理的长春花愈伤组织

处理	诱导结果		外植体数 /个	出愈数 /个	出愈率 /%
	激素(mg/L)				
	6-BA	2,4-D			
1	2.0	1.0	30	5	16.7
2	2.0	2.0	30	14	46.7
3	2.0	3.0	30	9	30.0
4	3.0	1.0	30	16	53.3
5	3.0	2.0	30	26	86.6
6	3.0	3.0	30	23	76.6
7	4.0	1.0	30	15	50.0
8	4.0	2.0	30	20	66.6
9	4.0	3.0	30	19	63.3

伤组织松散透明，失去了不定芽分化的能力。分析认为，MS + 2.0 mg/L 2, 4-D + 3.0 mg/L 6-BA 是较为理想的愈伤组织诱导培养基，此条件下诱导率为 86.6%，愈伤组织块大、致密，表面有小疣突，有较好的不定芽分化能力。

2.3 不同外植体材料对愈伤组织诱导的影响

分别用幼嫩的顶芽和茎段作为外植体进行愈伤组织诱导^[8]，结果(表 3)表明，2 种外植体均能产生愈伤组织，但愈伤组织出现的时间不同。其中以顶芽为外植体的出愈时间较快，一般接种后 6~7 d 内可见愈伤，以茎段为外植体则需要 14~20 d 可见愈伤。2 种外植体的出愈率也有明显的差异，接种 40 d 后观察，顶芽的愈伤组织诱导率较高，为 92.6%；茎段相对较低，为 76.3%，愈伤组织形态也有明显差异。顶芽外植体产生的愈伤组织淡绿、有明显疣突，预期不定芽分化效果较好。

表 3 不同外植体材料的愈伤组织诱导结果

外植体 类型	接种个数 /个	出愈个数 /个	出愈率 /%
顶芽	135	125	92.6
茎段	135	103	76.3

3 小结与讨论

试验结果表明，用 75%酒精灭菌 30 s、无菌水冲洗干净后再转入 0.1%升汞溶液中灭菌 300 s 是长春花细嫩茎段及顶芽外植体较理想的消毒组合，处理后的外植体污染

率为 5.5%、褐变率为 9.3%。MS + 3.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L 2, 4-D 是长春花愈伤组织诱导最适宜的培养基组合，出愈率高达 86.6%，以长春花顶芽为外植体产生愈伤组织的时间较早，出愈率为 92.6%，愈伤组织团块大、致密，表面有小疣突，预期有较好的不定芽分化能力。

愈伤组织的诱导主要受外植体本身、培养基以及培养条件 3 方面因素的影响。外植体的选择和消毒是组织培养顺利进行的前提，植物愈伤组织诱导是细胞脱分化的过程，也是产生大量细胞团，快速分化胚状体和不定芽的基础。植物组织培养不仅可以加快育种进程，而且能降低农林业生产的成本，更容易优化出抗性强的品种，在细胞水平上为抗性育种材料的筛选及优良品种的快速繁殖奠定基础^[8-9]。

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[M]. 北京：科学出版社，2004.
- [2] 陈敏，廖志华，孙敏，等. 生物技术在长春花研究中的应用[J]. 中草药，2001，32(1)：78-79.
- [3] 陈爱晶. 长春花组织培养技术研究[D]. 南京：南京农业大学，2007.
- [4] 严春燕，马伟丽，于荣敏. 长春花愈伤组织诱导及培养条件优化[J]. 中药材，2008(7)：11-12.
- [5] 雷颖，任俞新，吴利红，等. 天水地区铁皮石斛组织培养试验研究[J]. 甘肃农业科技，2019(9)：39-41.
- [6] 雷颖，吴莉红. 四季秋海棠组培快繁技术研究[J]. 甘肃农业科技，2015(2)：34-36.
- [7] 王苑，谢凝子. 植物组织培养中褐变现象及抗褐变研究进展[J]. 黔西南民族师范高等专科学校学报，2007(3)：109-113.
- [8] 张玲，马林，杨国涛. 黄山药愈伤组织诱导与分化[J]. 生物技术，2005(3)：70-73.
- [9] 张赫岩. 金叶杨组织培养技术的研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2019.

(本文责编：陈伟)