

猪笼草离体培养及植株再生研究^①

梁 君, 鲁振华, 汪卫星, 林春来, 郭启高, 梁国鲁

西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715

摘要: 以猪笼草的幼嫩茎段为外植体进行离体组织培养及植株再生, 研究表明: 以液体培养基 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 对芽的初始诱导以及固体培养基 1/2MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 对不定芽的增殖效果最好, 增殖率达 419%; 生根培养基以 1/4MS+IBA 0.5 mg/L+活性炭(0.01%)为最佳, 生根率可达 100%.

关键词: 猪笼草; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: Q949.749.3

文献标识码: A

猪笼草是多年生草本食虫植物, 又名食虫草, 属于猪笼草科(Nepenthaceae)猪笼草属(*Nepenthes*). 有 1 个属, 85 个种^[1], 起源于亚洲东南部、马达加斯加岛及澳大利亚. 其中大多数的种分布于苏门答腊岛和婆罗洲^[2], 泰国的东北到西部也都有分布, 我国原产仅有一个种, 分布于南部海南、广东等省. 猪笼草是雌雄异体植物, 因具有独特的捕食功能而具有很高的经济价值. 它还是一种新开发的观叶植物^[3], 由于其变态的叶子奇特优美, 似一个个小猪笼悬立在空中, 具有较高的观赏价值, 可作盆景或盆栽供观赏, 也可药用^[4]. 由于其种子呈丝状, 发芽率极低, 目前主要采用扦插繁殖, 但繁殖率也不高, 不能满足产业化生产需要^[5]. 虽然猪笼草组培快繁方面已有初步报道, 但存在繁殖系数不高、玻璃化现象严重等问题. 本文通过组织培养技术建立了猪笼草的快繁体系, 一方面为产业化生产提供技术支持, 另一方面也为进一步的多倍体育种及其它基础性研究奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材 料

实验材料为猪笼草, 取自西南大学果树重点实验室, 外植体为带腋芽的幼嫩茎段.

1.2 方 法

取猪笼草植株嫩枝, 去除叶片, 用棉花蘸肥皂水擦洗, 自来水冲洗去除表面污垢, 切取约 2~3 cm 带 1 个或 2 个芽眼的茎节. 用 75% 的乙醇表面消毒 30 s, 无菌水冲洗 3~4 次; 再用 0.1% 的升汞分别浸泡 6 min、8 min、10 min、12 min(外植体与消毒液充分接触), 然后用无菌水冲洗 5~6 次. 切除茎段与消毒液接触的伤口部位, 将它们分别接种在诱导培养基上, 待其不定芽长至 3 cm 时, 切取侧芽带 1~2 个节的茎段接种到分化培养基中进行增殖培养, 获得一定数量的不定芽后, 将 2 cm 以上的幼苗转入生根培养基进行生根培养.

1.3 培养条件及培养基

培养温度为(25±2)℃, 光照强度 1 500~3 000 lx, 光照时间 14 h/d; 外植体培养以 MS 为培养基(食

① 收稿日期: 2007-10-24

作者简介: 梁 君(1981-), 女, 黑龙江铁力人, 硕士研究生, 主要从事花卉生物技术及育种研究.

通讯作者: 梁国鲁, 教授.

用白糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L), pH 调至 5.8. 初始诱导培养基: 1) 固体培养基: 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 2) 液体培养基: 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 3) 固体培养基: 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+活性炭 1.0 g/L. 增殖培养采用双因素水平试验设计, 基本培养基采用 MS、1/2MS、1/4MS 共 3 种, 各种培养基均添加不同浓度的 NAA(0.05, 0.1, 0.2) 和 6-BA(0.5, 1.0, 2.0), 共 27 个处理组合. 生根培养基: 1) 1/4MS+IBA 0.1 mg/L; 2) 1/4MS+IBA 0.2 mg/L; 3) 1/4MS+IBA 0.5 mg/L; 4) 1/4MS+IBA 1.0 mg/L; 5) 1/4MS+IBA 0.5 mg/L+活性炭(0.01%).

2 结果与分析

2.1 无菌体系的建立

外植体体表灭菌效果见表 1.

表 1 0.1% HgCl₂ 不同灭菌时间体表灭菌效果

消毒时间/min	接种数量/个	污染数/个	污染率/%	枯死率/%
6	25	22	88	0
8	25	15	60	0
10	25	2	8	0
12	25	0	0	100

注: 污染率=污染外植体数量/接种外植体总数量×100%; 枯死率=枯死外植体数量/接种外植体数量×100%.

用 0.1% HgCl₂ 体表灭菌 10 min 效果最好, 其污染率仅为 8%. 消毒时间太短不能彻底消毒, 致使材料污染; 消毒时间过长容易将组织细胞杀死, 使材料干枯死亡, 培养基褐化.

2.2 初始诱导

切掉已消毒外植体基部褐化的部分, 然后再切成 2~3 cm 带芽点的茎段, 接入诱导培养基内(注意切口要圆滑平整, 减少褐化, 效果见表 2).

表 2 不同培养基对茎段启动的影响

培养基编号	处理数/个	出芽数/个	出芽率/%	褐化数/个	褐化率/%
1	30	25	83.3	15	50
2	30	28	93.3	0	0
3	30	26	86.6	3	10

由表 2 可知, 2 号液体培养基对芽的初始诱导效果最好, 液体培养较固体培养效果好, 固体培养添加活性炭大大减少了茎段的褐化率.

2.3 继代培养

2.3.1 基本培养基对芽增殖的影响

采用 MS、1/2MS 和 1/4MS 共 3 种基本培养基, 采用激素组合 BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 来筛选, MS、1/2MS 和 1/4MS 分别达到了 1, 2.9, 3.1 的增殖倍数, 但在全量 MS 培养基猪笼草的培养中, 芽易变褐枯死, 在 1/2MS 和 1/4MS 猪笼草的培养中, 芽长势良好及健壮. 在 1/2MS 和 1/4MS 的连续培养中, 1/2MS 中培养的材料, 芽的增殖倍数, 生长状况趋于稳定; 而在 1/4MS 中培养的材料增殖倍数逐渐下降, 芽由浓绿逐渐转为淡绿. 因此, 1/2MS 培养基较适宜猪笼草芽的增殖.

2.3.2 不同激素浓度对芽增殖的影响

从表 3 可以看出, 随着 6-BA 浓度的增加, 芽的增殖率也相应的提高, 而芽的增殖率并没有随着 NAA 的浓度而增加. 根据表中数据显示, 最适合芽继代增殖的培养基组合是 1/2MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 增殖率达到 419%.

表3 不同继代培养基对芽增殖的影响

培养基编号	6-BA+NAA 的浓度/(mg·L ⁻¹)	接种数/个	增殖芽数/个	增殖率/%
1	0.5+0.05	28	59	210
2	0.5+0.1	30	69	230
3	0.5+0.2	29	76	262
4	1.0+0.05	26	79	303
5	1.0+0.1	30	86	287
6	1.0+0.2	32	93	290
7	2.0+0.05	29	98	338
8	2.0+0.1	26	09	419
9	2.0+0.2	28	102	364

2.4 诱导生根

挑选2~3 cm高继代培养的单芽,接种到以1/4MS为基本培养基,添加不同浓度的6-BA进行生根培养,经培养可观察到所有培养基都能生根.根刚长出时较白,后生出黑色根毛,一般在30~40 d左右形成完整根系.随着IBA浓度的增加,生根率升高,生根数降低;在IBA浓度较低时,不定根生长纤细,IBA浓度逐渐升高时,根生长较粗壮;在培养基中添加活性碳时,不定根生长短小粗壮,有利于移栽成活.因此,1/4MS+IBA 0.5+活性碳(0.01%)为理想的生根培养基(表4).

表4 不同浓度IBA对组培苗生根的影响

培养基	生根率/%	生根数/条	不定根生长情况
1/4MS+ IBA0.1	87	8~10	35 d后芽开始长根,根纤细
1/4MS + IBA0.2	95	8~10	30~32 d后芽开始长根,根较纤细
1/4MS + IBA0.5	100	6~8	28~31 d后芽开始长根,根粗壮
1/4MS+ IBA1.0	100	6~8	31~33 d后芽开始长根,根较粗壮
1/4MS+ IBA0.5+活性碳(0.01%)	100	6~8	28~31 d后芽开始长根,根粗壮且较短

注:生根率=生根外植体数量/接种外植体数量×100%.

3 讨论

有关猪笼草的研究,国内已有报道,但对其组织培养及植株再生方面的研究均不完整和系统,未能筛选出最佳培养基,以致猪笼草增殖系数低,不能满足大量工业化生产的需要.本实验可在短期内获得大量再生优质植株,加快了繁殖速度,并且有效地解决了培养中的褐化问题,为猪笼草其它基础性的研究奠定了基础.

在外植体灭菌实验中,叶柄和茎的交接处一定要切削圆滑平整,可以防止消毒不彻底和消毒液蚀伤内部组织^[6].在猪笼草的离体培养过程中,高浓度的6-BA在前期容易促进丛状芽的形成,有利于组培苗的大量繁殖,但后期高生长缓慢,其原因可能是由于细胞分裂素与生长素的比例过大,抑制了高生长,降低6-BA的浓度,在很大程度上抑制了丛状芽的形成,促进了植株的高生长,其具体原因还有待进一步研究.

褐化是在植物组织培养过程中普遍出现的现象,它是由于植物体内的酚类物质在多酚氧化酶的作用下转变为醌类物质所致.一般研究均表明6-BA不仅能促进酚类化合物的合成,而且还能刺激多酚氧化酶的活性^[7].外植体接入含6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L的培养基中,培养10 d后在茎基部切口处逐渐出现黑色分泌物,易产生褐化现象.由于活性炭可以吸附褐变所产生的有害物质,因此,在培养基加入活性炭对芽的初始诱导有利,而未添加活性炭的培养基则易使外植体褐变致死,这与徐强兴^[8]等的研究结果一致.

致谢: 十分感谢 Prof. Arunrat Chaveerach (Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand) 给本文提供的参考资料.

参考文献:

- [1] Clark C. A Guide to the Pitcher Plants of Peninsula Malaysia [M]. Borneo: Natural History Publications, 2002.
- [2] Mokkaumul P, Chaveerach A, Sudmoon R, et al. Species Identification and Sex Determination of the Genus *Nepenthes* [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2007, 10(4): 561–567.
- [3] 丰 锋, 谢建英. 新开发的观叶植物——猪笼草 [J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2000, 22(2): 111.
- [4] 丰 锋, 李洪波, 谢建英. 猪笼草的组织培养 [J]. 热带作物学报, 2002, 23(2): 62–65.
- [5] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 53–54, 136–137.
- [6] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [7] 王家福. 花卉组织培养与快繁技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 183–197.
- [8] 徐强兴, 潘学峰. 猪笼草的快速繁殖技术研究 [J]. 热带林业, 2003, 31(2): 45–47.

Studies on *in Vitro* Culture and Plant Regeneration in *Nepenthes Mirabil*

LIANG Jun, LU Zhen-hua, WANG Wei-xing,
LIN Chun-lai, GUO Qi-gao, LIANG Guo-lu

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Stem section of *Nepenthes mirabil* was used as explants in tissue culture to establish rapid propagation. Results show that the optimum liquid medium on primary culture was 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.1 mg/L, the solid medium contained 1/2MS+6-BA 2.0 mg/L +NAA 0.1 mg/L was optimum for crowd buds propagation which ratio was 419%. The optimum medium for rooting contained 1/4MS+IBA 0.5 mg/L+activated carbon 0.01%.

Key words: *Nepenthes mirabil*; tissue culture; rapid propagation

责任编辑 夏 娟