

文章编号:1673-0747(2007)04-0087-03

丽格海棠的组织培养初探

于涛, 王薇

(宁夏石嘴山市星瀚市政产业(集团)有限公司, 宁夏 石嘴山 753000)

摘要:通过对丽格海棠组织培养快速繁殖过程中的4个阶段即不定芽诱导、丛芽增殖、生根培养、入土移栽的试验研究分析,摸索出各个阶段的较适生长条件.筛选出诱导分化的最适培养基是MS+NAA0.1 mg/L+6-BA0.5 mg/L,诱导率为95.3%,适宜生根的培养基是1/2MS+NAA0.6 mg/L,生根率为95.33%.同时还对移栽方面进行了一定的研究,选出最佳的基质为蛭石与粗砂以1:1比例混合,其成活率为86.6%.

关键词:丽格海棠;组织培养;诱导分化;移栽

中图分类号:S661.4 **文献标志码:**A

丽格海棠(*Begonia elalior*)和球根秋海棠(*Begonia tuberhybrida* Voss.)是目前国际上非常流行的商业盆花.丽格海棠花期长、花色丰富鲜艳,在欧美、日本和美国等地深受欢迎,观赏价值远高于球根海棠,是秋海棠类的上品.丽格海棠只开花不结籽,又无块茎,靠叶插来繁殖,叶插繁殖形成完整的植株较困难,形成花周期慢,这就大大限制丽格海棠的繁殖,使其盆栽丽格海棠的价格高于一般的球根海棠和其他一般的盆花,无法满足市场的需求.因此,丽格海棠组织培养繁殖就显得尤为重要,本文旨在通过对丽格海棠组织培养技术中外植体再生体系建立的关键技术进行研究,从而为丽格海棠的组培快繁产业化生产及繁育新品种提供可靠的科学依据.

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验以盆栽丽格海棠无病害的健壮较幼嫩叶作为材料.

1.2 方 法

1.2.1 培养条件 温度均以(24±2)℃,光照12 h/d,光强超过2 000 lx.外植体消毒是取叶片用洗洁精稀释溶液泡洗2~3次后,用自来水冲洗3次,用体积分数为70%的酒精浸泡5 s,之后用无菌水冲洗3次,再用0.1%/L汞浸泡5 min,取出用无菌水冲洗5~6次后备用.基本培养基为MS培养基,生长调节剂为6-BA和NAA.

1.2.2 较嫩的丽格海棠叶片作为外植体,试验采用二

因素(6-BA, NAA)三水平激素配比设计(表1),每次处理接种30个外植体,重复3次.

表1 初代培养激素配比方案
Tab. 1 Hormone proportion in culture medium for primary culture stage

| 处理编号 | 激素种类 | |
|------|---------|--------|
| | 6-BA/mg | NAA/mg |
| 1 | 2.0 | 0.5 |
| 2 | 1.0 | 0.5 |
| 3 | 0.5 | 0.1 |
| 4 | 2.0 | 0.2 |
| 5 | 1.0 | 0.2 |
| 6 | 0.5 | 0.2 |
| 7 | 2.0 | 0.1 |
| 8 | 1.0 | 0.1 |

1.2.3 叶片接种模式对诱导分化的影响 叶片接种模式分为正放和反放2种,每种模式接种30个外植体,重复3次.

1.2.4 观察外植体的生长状况 分别统计15, 30, 60 d的膨大率,诱导出芽的百分率,褐变率,其中:

$$\text{膨大率} = \frac{\text{膨大的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$$

$$\text{褐变率} = \frac{\text{褐变的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$$

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死亡的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$$

$$\text{成活率} = \frac{\text{成活的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$$

收稿日期:2007-09-10

作者简介:于涛(1977-),男,河南孟州人,主要从事园林景观、绿化工程、生态建设研究.

$$\text{诱导出芽率} = \frac{\text{出芽外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$$

2 结果分析

2.1 不同激素配比的筛选

植物激素种类的选用 6-BA(6-苄基腺嘌呤)和 NAA(a-奈乙酸),2 种激素用量采用了 9 种配比进行筛选,观察结果(表 2)。

表 2 正交培养试验结果统计

Tab. 2 Orthogonal raise statistical result for tissue culture

| 处理 | 项 目 | | | | | | | | |
|----|---------|------|------|---------|------|------|-------|------|------|
| | 膨大百分率/% | | | 诱导百分率/% | | | 褐变率/% | | |
| | 15 d | 30 d | 60 d | 15 d | 30 d | 60 d | 15 d | 30 d | 60 d |
| 1 | 23.3 | 42.3 | 53.5 | 0 | 0 | 11.6 | 39.7 | 47.7 | 67.5 |
| 2 | 18.6 | 56.6 | 86.6 | 0 | 0 | 16.0 | 10.5 | 31.5 | 67.8 |
| 3 | 33.4 | 97.4 | 95.4 | 0 | 95.3 | 95.3 | 0.8 | 1.1 | 1.1 |
| 4 | 12.5 | 51.8 | 73.3 | 0 | 0 | 3.6 | 24.1 | 36.1 | 73.1 |
| 5 | 17.3 | 49.3 | 73.4 | 0 | 0 | 1.8 | 23.5 | 46.3 | 75.6 |
| 6 | 11.6 | 32.3 | 25.5 | 0 | 0 | 0 | 41.2 | 61.2 | 89.5 |
| 7 | 12.5 | 15.1 | 16.3 | 0 | 0 | 0.8 | 51.7 | 67.1 | 84.5 |
| 8 | 22.1 | 37.5 | 36.6 | 0 | 0 | 0 | 46.6 | 66.6 | 77.8 |
| 9 | 14.5 | 21.5 | 53.3 | 0 | 0 | 0 | 43.5 | 63.5 | 74.5 |

注:以上结果均为 3 次重复的平均数。

叶片外植体在 1 周后开始膨大变绿,并且有淡黄绿色的愈伤组织颗粒产生,在培养 15 d 时观察均无不定芽产生,15 d 时对膨大率进行方差分析(表 3)结果表明,NAA 和 6-BA 的交互效应的 F 值小于 $F_{0.05}$,即 $P > 0.05$,也就是说它们之间的交互效应不显著^[1];NAA 和 6-BA 对膨大率的影响 F 值也大于 0.05,说明它们单独对膨大率的影响也不显著。

表 3 15 d 时丽格海棠组织材料膨大的方差分析

Tab. 3 Results of the variance analysis of tumescent rate in tissue materials of Begonia elaror at 15 days cultivated

| 变异来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | F 值 | $F_{0.05}$ |
|------|-----|----------|--------|-------|------------|
| A×B | 4 | 2 856.62 | 714.15 | 0.60 | 3.01 |
| A | 2 | 1 366.44 | 683.22 | 0.57 | 3.63 |
| B | 2 | 1 490.18 | 745.09 | 0.62 | 3.63 |

在 30 d 时膨大率有了明显的变化,对其进行方差分析(表 4),结果表明 3 个 F 值均大于 $F_{0.01}$,即 $P < 0.01$,说明在 30 d 时处理对膨大率的影响达到了极显著水平。

表 4 30 d 时丽格海棠组织材料膨大率的方差分析

Tab. 4 Results of the variance analysis of tumescent rate in tissue materials of Begonia elaror at 30 days cultivated

| 变异来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | F 值 | $F_{0.01}$ |
|------|-----|----------|--------|-------|------------|
| A×B | 4 | 2 485.51 | 621.38 | 11.25 | 4.77 |
| A | 2 | 1 252.70 | 626.35 | 11.35 | 6.23 |
| B | 2 | 1 232.80 | 616.40 | 11.16 | 6.23 |

也就是说在这表 2 的 9 个处理中 3 号(表 2 中的处理序号)配方培养基为最适合丽格海棠初代培养的,同时从诱导出芽率来看,仅在 3 号培养基上处

理的材料有不定芽产生,鉴于 3 号配方都是激素浓度设计的底限,在接种 30 d 时均无不定芽产生。可见丽格海棠叶片对激素的配比极其敏感,仅在一个极小的范围内诱导出芽的效果好^[2]。本试验又做了一个补充试验,结果见表 5。

表 5 补充试验正交培养试验结果统计表(60 d)

Tab. 5 Orthogonal raise statistical result for tissue culture at 60 days cultivated

| 处理 编号 | 6-BA /(mg·L ⁻¹) | NAA /(mg·L ⁻¹) | 诱导出芽率 /% | 褐变率 /% |
|----------|--------------------------------|-------------------------------|-------------|-----------|
| 10 | 0.25 | 0.10 | 7.8 | 61.8 |
| 11 | 0.25 | 0.05 | 34.5 | 57.5 |
| 12 | 0.50 | 0.05 | 14.3 | 58.6 |

从 15,30,60 d 的变褐率(表 2)可知,随着时间的增加褐变率也在上升,通过方差分析标明不同处理的褐变率差异不显著,说明激素及激素间的配比在初代培养中对褐变率的影响不显著。在 60 d 时观察,1 号,2 号分别有 11.6%,16% 的外植体有不定芽产生,4 号,5 号,7 号仅有极少量的芽产生,补充试验中 3 个配方培养基上的外植体都有不定芽的产生,但其诱导出芽显著低于 3 号培养基。

另外,在预备实验中发现叶片接种模式对诱导分化的影响很大,于是单独将叶片接种模式对诱导分化的影响作了对比试验。正放的接种模式死亡率为 86.9%,膨大率为 8.8%;反放的死亡率为 4.3%,膨大率为 94.6%。以上统计结果均为 3 组重复的平均数。

由试验结果可看出,反放叶片的膨大率显著高于正放叶片,其死亡率显著低于正放叶片;随着培养时间的增加死亡率不断增加,培养到 30 d 以后,死亡率才趋于稳定,且死亡率相当高。可见,正放外植体不能吸收培养基中的养分和水分,30 d 是消耗自身养分和水分的时间极限^[3]。以后能成活的叶片就不易死亡;反放的叶片死亡率在 15 d 以后就相当稳定,且死亡率较低。根据观察反放叶片的死亡原因不是养分的吸收,而是主要来自外界空气污染。研究结果表明,反放是丽格海棠叶片的最佳接种模式。

2.2 不同质量浓度激素对丽格海棠组培苗生根的影响

将继代培养分化的新芽分别接种到 5 种生根培养基上,1 周后观察,茎段基部开始出现不定根,随着时间的增长,根不断加粗,形成带有根毛的辐射根,茎段逐渐生长成为完整的植株,2 周后,丽格海棠的生根量达到高峰,此时观察其生根情况。

通过试验得到激素的质量浓度不同对丽格海棠组培苗的生根有很明显的影响。当 NAA 的质量浓度分别为 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/L 5 个质量浓度梯度时,其中当质量浓度为 0.6 mg/L 时生根率最高为 95.33%;质量浓度为 0.2 mg/L 生根数量最

少且比较细弱;质量浓度为 0.4 mg/L 生根数比质量浓度为 0.2 mg/L 生根数量有所增加,根最为强壮,质量最好;质量浓度为 0.8 mg/L 时的根比质量浓度为 0.6 mg/L 时的根细弱,质量不如质量浓度为 0.6 mg/L 时的根;质量浓度为 1.0 mg/L 的根也细弱。由此可知,丽格海棠组培苗对生根培养基中的激素要求也比较严格。由试验的结果可知,最适宜的生根培养基为 3 号即:1/2MS+NAA0.6 mg/L。

2.3 丽格海棠组培苗的移栽

试管苗移栽前应该进行炼苗处理。选取生长势良好、植株健壮的组培苗 30 株进行炼苗后,将其从瓶中取出,洗净其根部的培养基,将其浸入稀释 600 倍的多菌灵溶液中 20 min,然后把组培苗栽植到装有蛭石、蛭石与粗砾 1:1 混合、蛭石与草炭 1:1 混合的营养钵中,浇足水后放入简易的塑料棚,初期注意适度遮盖以保持湿度,维持棚内温度为 25℃左右,湿度为 90%左右,后期随着移栽苗的逐渐健壮,逐渐撤去塑料膜。2 周后统计其成活率,蛭石中成活率为 77.7%,根苗叶片油绿,枝干挺拔,幼苗生长缓慢;蛭石与粗砾 1:1 混合的营养钵中成活率为 86.6%,根苗叶片油绿,枝干挺拔,幼苗生长较快;蛭石与草炭 1:1 混合的营养钵中成活率为 66.7%,叶片及枝干易萎蔫或腐烂,幼苗生长缓慢;可以看出最好的为蛭石与粗砾 1:1 混合的营养钵。

3 小结与讨论

(1)丽格海棠的组培快繁技术,通过外源激素的诱导使外植体增殖和生根,这样不仅可以提高种苗繁殖的速度和倍数,同时提高种苗的质量,也是品质保持的最佳方式。试验结果分析可知,在快繁过程中,外源激素质量浓度的不同,对试验结果有着较大的影响,丽格海棠外植体仅在 6-BA0.2~0.5 mg/L 和 NAA0.05~0.1 mg/L 极窄的范围内效果较好,特别是从膨大到诱导出芽阶段极敏感,因此优先选出适宜丽格海棠初代培养的最佳培养基为:MS+NAA0.1 mg/L+6-BA0.5 mg/L。叶片的接种模式对诱导分化的影响也极大。在做丽格海棠的

切片试验中发现丽格海棠的气孔也分布在叶背,叶表几乎没有气孔。因此,丽格海棠叶片外植体吸收培养基的养分、水分的通道不是通常人为的气孔,吸收养分的途径可能主要依靠生命细胞的活动来完成,表皮细胞的活力高于叶背细胞,具有较强的生命力,有利于水分和养分的吸收。但确切的途径还有待进一步的研究。

(2)丽格海棠组培苗对生根培养基中的激素质量浓度要求也较为严格,最适宜的生根培养基为 1/2MS+NAA0.6 mg/L,其生根率高达 95.3%。根据生长情况得知,茎段生根数同激素质量浓度呈现出有规律的变化,即随着激素质量浓度的升高,生根数量也跟着增加;但根的粗壮程度却不与激素质量浓度的增加出现规律性的变化,当激素质量浓度超过一定范围,根的生长开始变得细弱,虽然每株根的数量很多,但由于生长细弱,不适宜移栽。

(3)在丽格海棠的快速繁殖过程中,试管苗的移栽是一个重要过程。因为经过数周的培养,试管苗已经适应了高温,恒温,无菌的生活环境,一旦将它们移入自然环境,势必会出现生理功能上的紊乱而容易死亡,因此,为了提高移栽成活率,一定要在定植前经过透气变温锻炼,以提高它们的抗逆性。在移栽的过程中,空气湿度的保持是至关重要的,尤其在移栽初期,因为生根苗从组培室取出时,其叶片各处气孔处于完全张开状态,无法自动调节自身水分含量,如不维持住其生存环境的空气湿度,则会引起植株萎蔫,但是如果湿度一直居高不下则会造成根部腐烂。因此在移栽后的最初几天维持空气湿度在 90%左右,每天上午、中午、下午各打开通风 10 min,以后随着时间的推移逐步减低空气湿度,延长通风时间,这样才可以得到较高的成活率。

参考文献:

- [1] 达克东,张松,高东升,等.丽格海棠叶片培养胚状体发生和植株再生[J].园艺学报,2001,28(20):180-8.
- [2] 包尚理.玫瑰海棠的观赏与管理[J].花卉,2000(2):5.
- [3] 李进进,柯丽婉,吕丽蓉,等.玫瑰海棠离体快速繁殖[J].植物生理学通讯,1997(50):358-359.

Primary study on tissue culture in *Begonia elalior*

Yu Tao, Wang Wei

(Ningxia Xinghan Municipal Industry Co. Ltd, Shizuishan 75300, China)

Abstract: Based on the four stages of the tissue culture of *Begonia elalior*, which were buds inducing stage, buds multiplication stage, rooting culture stage and transplanting stage, the paper summarized the suitable growth condition for the every stage, and selected appropriate culture mediums for inducing and rooting culture which was MS + NAA0.1 mg/L + 6-BA0.5 mg/L and 1/2MA + NAA0.1 mg/L respectively. The perfect transplanting medium was vermiculite mixed with thick sand (1:1).

Key words: *Begonia elalior*; tissue culture; callus differentiation; transplanting

(责任编辑、校对 郑国琴)