

文章编号: 1008-3464 (2006) 03-0265-04

玫瑰海棠组培快繁技术的研究

方勇

(金华职业技术学院 生物工程学院, 浙江 金华 321007)

摘要: 采用盆栽玫瑰海棠的叶片作外植体进行组织培养试验。结果表明: 用0.1% HgCl_2 对叶片表面灭菌10 min 的死亡率和感染率较低, 接种于3/4 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+琼脂7.8 g/L+蔗糖25 g/L的培养基上诱导出新生芽, 在3/4 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+琼脂7.8 g/L+蔗糖25 g/L的培养基上, 增殖系数可达6~8; 在1/2 MS+KT 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+琼脂7.8 g/L+蔗糖25 g/L的培养基上培养25 d左右, 可形成6~9条粗壮的根和2.0~3.0 cm高的完整植株, 试管小苗带培养基移栽到泥炭+泥沙+锯屑(1:1:1)的基质上, 成活率达95%。

关键词: 玫瑰海棠; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S685.99 **文献标识码:** A

Study on tissue culture and rapid propagation of *Begonia mannii*

FANG Yong

(Bio-engineering Branch, Jinhua College of Profession and Technology, Jinhua 321007, China)

Abstract: Tissues cultures were carried out using the blade of *Begonia mannii* in pot as explants. Results showed that explants of blade's which their surfaces treated by 0.1% HgCl_2 for 10 min could obtain low rate of dead and infection, and they could be induced to regenerate plant when they were inoculated in culture medium of 3/4 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+Agar 7.8 g/L+Sucrose 25 g/L. The regenerated plant of *B. mannii* cultured in 3/4 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+Agar 7.8 g/L+Sucrose 25 g/L had the propagation coefficient of 6~8. An 2.0~3.0 cm individual plant with 6~9 strong roots was obtained after the regenerated plants were divided and cultured in 1/2 MS+KT 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+Agar 7.8 g/L+Sucrose 25 g/L for 25 days. The optimum transplantation medium is Peat+Silt+Sawdust (1:1:1) in which the survival rate of transplant test-tube seedling is 95%.

Key words: *Begonia mannii*; tissue culture; rapid propagation

玫瑰海棠 (*Begonia mannii*) 为秋海棠科的多年生草本花卉, 是由素科特海棠 (*Begonia socotrana* Hook.) 与球根海棠 (*B. tuoerhybrida* Vois.) 的杂交种经多年选育而产生的。玫瑰海棠花色娇艳优美如玫瑰, 花期长达4~6个月, 性喜冷凉, 生长适温在15~18℃, 较耐荫, 十分适宜室内、阳台、雨棚等非阳光直射区域摆放, 是理想的室内观赏花卉^[1], 目前市场上平均售价在30~50元/盆, 是极受欢迎的小型盆花之一, 具有较好的市场发展前景。但在实际生产上, 玫瑰海棠系雌雄异花的多年生草本花卉, 利用种子繁殖后代易发生花朵由重瓣向单瓣变异, 且种子播种的成功率极低 (据有经验的花农介

收稿日期: 2005-06-24; 修回日期: 2005-10-25。

基金项目: 金华职业技术学院校级科研项目 (20041120)。

作者简介: 方勇 (1967-), 男, 浙江永康人, 金华职业技术学院副教授, 硕士研究生; E-mail: jhfy658@sohu.com。

绍,其种子播种成功率只有1%左右);利用分株繁殖的增殖率也较低,因而无法实现规模化生产。如何实现玫瑰海棠的快速繁殖以满足市场的需求是一个值得研究的课题。为此,作者利用组织培养的方法对玫瑰海棠叶片进行诱导,建立玫瑰海棠的再生体系,为玫瑰海棠的快速繁殖和规模化生产提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以盆栽的玫瑰海棠叶片作外植体。

1.2 试验时间和地点

试验于2003年5月~2004年6月在金华职业技术学院生物工程学院组培室进行。

1.3 试验方法

1.3.1 外植体的灭菌及接种 选取玫瑰海棠的健壮无菌斑的叶片,用流动的自来水冲洗干净,在超净工作台(预先工作15 min)上分别用0.1% HgCl_2 溶液(每100 mL HgCl_2 溶液加10滴吐温-20)对叶片表面消毒5 min(处理 A_1)、10 min(处理 A_2)和15 min(处理 A_3);然后用无菌水冲洗5次,把已灭菌的玫瑰海棠叶片用无菌滤纸吸去表面的水分后置培养皿中,用解剖刀切割成1 cm×1 cm的小块,接种于不同的诱导培养基(初代培养基)上。每瓶接种1小块,在温度为 $(24\pm 1)^\circ\text{C}$,光照时间为12 h/d,光照强度为800~1 500 lx的条件下培养。

1.3.2 丛生芽诱导培养 以 B_1 (3/4 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L)、 B_2 (3/4 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L)、 B_3 (3/4 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L)为丛生芽诱导培养基(所有培养基均附加蔗糖25 g/L和琼脂7.8 g/L,调pH至5.8,下同),观察比较在不同培养基下培养10、20、30 d的叶片诱导情况。

1.3.3 丛生芽增殖培养 将诱导出的玫瑰海棠丛生芽分切成小丛生芽,接种于 C_1 (3/4 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L)、 C_2 (3/4 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L)、 C_3 (3/4 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L)培养基上。每瓶接种5株,各接种20瓶。小丛生芽上不断分化出很多幼芽,约30 d后可继代1次,观察比较不同丛生芽增殖培养基的增殖系数。

1.3.4 不定根诱导培养 将高2~3 cm的生长健壮的玫瑰海棠无根苗接种到 D_1 (1/2 MS+KT 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L)、 D_2 (1/2 MS+KT 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L)、 D_3 (1/2 MS+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.3 mg/L)培养基上。每瓶接种5株,各接种20瓶,培养25 d观察比较不同培养基中根的生长状况。

1.3.5 移栽 在培养室内将培养瓶打开,通风炼苗6 d,将根部不带培养基小苗和根部带培养基小苗分别移栽到用2 g/L多菌灵溶液消毒过的泥炭+泥沙+锯屑(1:1:1)和椰糠+泥炭+珍珠岩(2:2:1)2种基质中,根部浇上含1/2 MS大量元素的稀释培养液,每处理25株苗,分5行植,用薄膜覆盖,每天喷水2次,每7 d喷多菌灵2次,移栽25 d后观察比较不同处理的幼苗成活率。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对外植体的影响

植物材料的灭菌是组织培养过程中的重要环节。在常用的植物材料灭菌剂中, HgCl_2 是一种极有效的杀菌剂^[2~4]。但灭菌时间的长短对不同外植体的死亡率和感染率有较大的影响^[5]。由表1可见,灭菌时间由5 min延长到15 min,外植体的感染率由64.29%下降到25.81%,而由于 HgCl_2 伤害导致的死亡率则由28.57%上升到61.29%。3种灭菌处理以用0.1% HgCl_2 溶液处理10 min的效果较好,外植体无感染存活率达26.47%。

表1 不同灭菌时间对玫瑰海棠叶片存活率的影响

Tab. 1 Effect of different disinfecting methods on survival blade of *Begonia mannii*

处理	灭菌时间/min	接种叶片数	感染数	感染率/%	枯死数	死亡率/%	无感染存活数	无感染存活率/%
Treatment	Sterilize time	Number of leaf disk	Number of infection	Rate of infection	Number of dead	Dead rate	Number of survival	Survival rate
A ₁	5	28	18	64.29	8	28.57	2	7.14
A ₂	10	34	12	35.30	13	38.24	9	26.47
A ₃	15	31	8	25.81	19	61.29	4	12.90

2.2 不同激素配比的培养基对诱导玫瑰海棠丛生芽分化的影响

由于初代培养基中的激素配比不同,玫瑰海棠丛生芽分化的时间有较大差异。处理B₃在接种10 d左右即出现黄绿色的疏松的愈伤组织,在25 d左右既出现大量的绿色小芽点,在35 d左右即有大量的丛生芽出现;而处理B₁和处理B₂的分化时间较处理B₃显著地晚一些,新萌发的芽点明显少,处理B₁在35 d左右才出现叶片增厚,处理B₂在25 d左右才出现叶片增厚、35 d左右才出现绿色芽点。可见,玫瑰海棠诱导丛生芽培养基中激素配比以6-BA 2.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L比较适宜。

2.3 不同激素配比的增殖培养基对玫瑰海棠继代的影响

不同激素配比的增殖培养基对玫瑰海棠继代的增殖影响是不同的。处理C₁的茎粗短、生长缓慢、基部无愈伤组织,有些茎存在生长畸形的现象,增殖系数为2.1,这可能是由于生长激素偏少所导致;处理C₃的茎生长较快,但较细长,存在失绿的现象,增殖系数为7.4;而处理C₂的增殖系数虽与处理C₃相近,为7.3,但其茎生长粗壮,30 d后开始展出绿色小叶,45 d后形成小植株体。可见,增殖培养基中激素配比以6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L比较适宜。

2.4 不同激素配比的生根培养基对玫瑰海棠生根的影响

试验结果表明,处理D₃ 7 d开始分化出辐射状的乳白色根,25 d时每株生根6~9条,其根细弱,根长4.0~5.0 cm,苗高1.0~2.0 cm,生根率达100%,每株根数为7.4;处理D₂ 7 d开始分化出辐射状的乳白色根,25 d时每株生根6~9条,根粗壮,根长3.0~4.0 cm,苗高2.0~3.0 cm,生根率达100%,每株根数平均为7.3;处理D₁ 12 d开始分化出辐射状的乳白色根,25 d时每株生根3~4条,根粗短,苗高0.5~1.0 cm,生根率达86%,每株根数平均为2.8。处理D₃的生根率、每株根数虽与处理D₂的相同且均优于处理D₁,但根细弱,苗生长缓慢;而处理D₂的生根率、每株根数、根长、苗生长速度和植株生长等方面较为理想。可见,玫瑰海棠的生根培养基的激素配比以KT 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L为比较适宜。

2.5 不同基质及带培养基和不带培养基对移栽苗成活率的影响

由于玫瑰海棠试管苗的根、茎和叶均极其脆嫩,洗去根部培养基移栽幼苗极易受到损伤,从而导致移栽成活率的极大降低。因此,作者根据玫瑰海棠根系生长需要较湿润且透气的环境^[6]配制两种不同移栽基质,并对带培养基和不带培养基的移栽苗进行对比试验。结果表明,以泥炭+泥沙+锯屑为基质,带培养基的小苗移栽成活率为95%,不带培养基的小苗移栽成活率为48%;而以椰糠+泥炭+珍珠岩为基质,带培养基的小苗移栽成活率为86%,不带培养基的小苗移栽成活率为35%。可见,无论是否带培养基移栽,以泥炭+泥沙+锯屑为基质的成活率均比以椰糠+泥炭+珍珠岩为基质的高,这可能是锯屑的保湿性能比椰糠的保湿性能好的缘故;而带培养基移栽的幼苗在供试的两种基质上的成活率分别比不带培养基移栽的高50%左右。其主要原因:一方面可能是由于在清洗幼苗根部培养基的过程中造成根系和茎叶损伤;另一方面是带培养基移栽的幼苗适应环境的能力比较强,在移栽后3~4 d即可长出新根,而不带培养基移栽的幼苗在移栽7~8 d后才长出新根。

3 结论与讨论

(1) 玫瑰海棠叶片用0.1% HgCl₂溶液(每100 mL HgCl₂溶液加10滴吐温-20)处理10 min,后

用无菌水冲洗4~5次的灭菌效果相对较好,但外植体的无感染存活率也仅为26.47%。合适的灭菌方法仍有待进一步试验研究。玫瑰海棠丛芽发生的初代诱导培养基和增殖培养继代培养基虽然分别以3/4 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+琼脂7.8 g/L+蔗糖25 g/L和3/4MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+琼脂7.8 g/L+蔗糖25 g/L比较合适,但培养的时间仍较长,也需要进一步探索。

(2) 玫瑰海棠组织培养的生根培养基以1/2 MS+KT 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+琼脂7.8 g/L+蔗糖25 g/L (pH 5.8) 的效果较好,一般在培养7 d后即长出新生根,25 d后即可炼苗移栽。

(3) 玫瑰海棠试管幼苗移栽,以泥炭+泥沙+锯屑(1:1:1)为移栽基质的效果较好;带培养基移栽的幼苗在移栽后3、4 d即可长出新根,适应环境能力较强,成活率达95%,并可减少洗去培养基的麻烦,该方法值得推广应用。

(4) 采用玫瑰海棠叶片作外植体进行组培快繁,能极大提高繁殖系数,成本比较低,便于实现玫瑰海棠小型盆花的规模化生产,满足市场的需要。

参考文献:

- [1] 蒋海青. 家庭养花大全 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2002: 263-265.
- [2] 朱广廉. 植物组织培养中灭菌和无菌操作的几个问题 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31 (5): 373-375.
- [3] 朱广廉. 植物组织培养中外植体灭菌 [J]. 植物生理学通讯, 1996, 32 (6): 444-446.
- [4] 孙凡江, 刘巧红, 江莉萍, 等. 不同因素对甜菜组织培养种子表面灭菌污染率的影响 [J]. 中国甜菜, 1999, 26 (4): 8-9.
- [5] 姚连芳, 董美华, 毛玉收. 太行菊组织培养 [J]. 中国农学通报, 2004, 20 (4): 29-31.
- [6] 程广有. 名贵花卉组织培养技术 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2001: 27-45.

(责任编辑 裴润梅)

(上接第264页)

参考文献:

- [1] 杨永梅, 韩望, 魏武, 等. 碱性脂肪酶产生菌的筛选与产酶条件及酶学性质研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2003, 40 (5): 935-938.
- [2] 周晓云, 黄建宁, 王慧中, 等. 链霉菌碱性脂肪酶的研究 [J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5 (5): 529-532.
- [3] 宋欣, 曲音波. 耐碱性脂肪酶产生菌的选育及酶学性质的研究 [J]. 工业微生物, 1999, 29 (4): 22-26.
- [4] 张立莹, 魏东芝, 童望宇. 假丝酵母 *Candida rugosa* 产脂肪酸条件的优化 [J]. 生命科学研究, 2003, 7(4): 320-323.
- [5] 任丽虹, 周应揆. 脂肪酶产生菌的筛选及一株黑曲霉产脂肪酶最适条件研究 [J]. 工业微生物, 1996, 26(1): 23-26.
- [6] 乔红群, 徐虹, 付闪雷, 等. 脂肪酶产生菌的筛选及其酶性质 [J]. 南京化工大学学报, 1998, 20 (1): 15-19.
- [7] 吴松刚, 谢新东, 黄建忠, 等. 类产碱假单胞菌耐热碱性脂肪酶的研究 [J]. 微生物学报, 1997, 37(1): 32-39.
- [8] 施巧琴. 碱性脂肪酶的研究 [J]. 微生物学通报, 1981, 8 (3): 108-110.

(责任编辑 裴润梅)