

金正日球根海棠叶片组织培养诱导的研究

张凤生, 樊绍燾, 薛丹丹, 姜 淼, 李健虹, 王保菊, 武 斌, 赵 娜
(哈尔滨市农业科学院, 黑龙江哈尔滨 150070)

摘要:以金正日球根海棠(*Begonia tuberhybrida* Vosa)的叶片为外植体进行组织培养的诱导,以MS培养基为基本培养基,并附加不同浓度的细胞分裂素6-BA以及生长素NAA或2,4-D进行组织培养和植株再生。经实验筛选出最适合诱导愈伤组织的培养基是MS+6-BA1.0~2.0+NAA0.1~0.5;脱分化的最佳激素组合是培养基MS+6-BA1.0+NAA0.5。

关键词:球根海棠;组织培养;诱导

中图分类号: S685.99 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)02-0017-03

Study on Leaves of Kim Jong-il *Begonia tuberhybrida* Vosa Induced by Tissue Culture

ZHANG Feng-sheng FAN Shao-zhu, XUE Dan-dan, JIANG Miao, LI Jian-hong WANG Bao-ju WU Bin, ZHAO Na
(Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: Leaves of Kim Jong-il *Begonia tuberhybrida* Vosa were used as explants to conduct tissue culture induction. MS medium was basic medium, adding with different concentrations of cytokinin 6-BA and NAA or 2,4-D to carry on plant tissue culture and regeneration. The experiment selected the most suitable callus induction of the medium was MS+6-BA1.0~2.0+NAA0.1~0.5; dedifferentiation hormone combination was the best medium MS+6-BA1.0+NAA0.5.

Key words: *Begonia tuberhybrida* Vosa; tissue culture; induction

球根海棠(*Begonia tuber hybrid* Hens)以其花大、色艳而被誉为观花类秋海棠之王,金正日是从球根海棠中选育出的红色大花品种。球根海棠是多年生球根花卉,品种繁多,硕大鲜艳的花朵形似茶花或牡丹,美丽诱人,观赏价值极高。球根海棠多年生草本,地下具有肉质扁圆形的块茎,为园艺杂交品种,株高30~60 cm。茎直立,肉质,绿色或暗红色,被毛。单叶互生,叶片斜卵形,先端锐尖,叶缘有齿牙。花顶生,重瓣,紫红色、黄色或粉色等,其花大如茶花,直径可达20 cm,花期9月至翌年5月。喜温暖湿润的生活环境,夏季凉爽的气候,在富含腐殖质,排水良好的微酸沙质壤土上生长较好。球根海棠兼有月季、牡丹、茶花等名贵花卉的色、香、姿、韵,是珍贵的观赏花卉,经济价值较高。

球根海棠的传统繁殖方法是种子繁殖、扦插、嫁接、分株等方法,繁殖系数低、苗木质量差、繁殖周期长、品种推广慢,且受季节和自然发育的限制,严重阻碍了花卉业在我国的迅速发展。近年来,植物组织培

养应用于植物的离体快速繁殖,是目前应用最多、最广泛和最有成效的一种技术。利用组织培养便可以提高苗木质量,使品种纯化、优化,加快繁殖速度,提高经济效益。组织培养是国内外最先进的无性繁殖方法,可以在短期内进行大量繁殖,迅速形成生产规模,以满足不断增长的广大鲜花消费者及市场的需求。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为球根海棠金正日的幼嫩叶片。

1.2 实验方法

1.2.1 外植体的获得与灭菌 金正日的组织培养以嫩叶作为外植体。在取材前15 d左右,把母株置于温室内,要防止往叶片上喷水。在接种前选择健壮无病的叶片剪下,放入广口瓶,加少量洗衣粉,然后用自来水冲洗20~60 min。在无菌室内用73%的乙醇灭菌3~5 s,用无菌水冲洗一次,接着用0.1%的氯化汞溶液浸泡5~7 min(浸泡过程要轻轻摇几次),再用无菌水冲洗4~6次,将灭过菌的叶片放在无菌纸上,剪成1 cm²左右的小块^[1]。接种到预制的已灭过菌的MS培养基上,每个试管只接种一个外植体。

1.2.2 培养基及培养条件 基本培养基为MS,蔗糖

收稿日期:2008-08-04

第一作者简介:张凤生(1977-),男,黑龙江绥化市人,学士,农艺师,从事园艺类组织培养研究。Tel: 13936322142; 0451-84302560。

3%，琼脂0.75%，pH 5.8。并添加有不同种类和浓度的植物生长调节剂。培养温度为(25±1)℃，光照强度1 500~2 000 lx，每日光照 12 h^[2]。

1.3 球根海棠愈伤组织诱导和分化的研究

1.3.1 激素组合对愈伤组织形成的影响 将配制好的8种初始培养基分装在三角瓶中，再将经过灭菌后接种在基本培养基中培养 10 d，无污染的叶片随机分成8组，每组30块，分别转接于8种含有不同激素组合的初始培养基中进行初代培养，培养室的温度控制在20~22℃，光照强度在1 500 lx，每天光照 12 h^[3]。每天观察球根海棠叶片的变化，观察、记录不同培养基中愈伤组织的发生时间、生长速度、发生数量及产生的愈伤组织的颜色等，20 d后分别统计在不同培养基中愈伤组织发生的块数。

1.3.2 不同培养基的不定芽分化比较 将配制好的8种初始培养基分装在三角瓶中，再将在基本培养基中

培养 10 d 后无污染的叶片随机分组，每组 30 块，分别转接于 8 种含有不同激素组合的初始培养基中进行初代培养，培养室的温度控制在 20~22℃，光照强度在 1 500 lx，每天光照 12 h，30 d 后转接一次^[4]，直到 8 种培养基中都有不定芽的分化，观察、记录不同基因型在不同激素组合下愈伤组织的增殖速度和数量及再分化开始时间、分化的速度、芽点的颜色、密集程度等，统计在不同培养基中再生植株的多少。观察愈伤组织与不定芽发生的关系。

2 结果与分析

2.1 激素组合对愈伤组织形成的影响

取经无菌处理的外植体在无菌条件下，分别接种在准备好的 A1~A8 培养基上，培养基 pH 5.8，琼脂 8 g·L⁻¹，蔗糖 30 g·L⁻¹。培养条件：培养温度(20±2)℃，光强 1 200 lx，每天 10~12 h 光照，4 周后观察愈伤组织形成情况(见表 1)。

表 1 激素组合对愈伤组织平均诱导率的影响^[5]

序号	培养基	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	2,4-D /mg·L ⁻¹	愈伤组织 诱导率/%	愈伤组织形成
A1	MS	2	1		100	愈伤组织生长旺盛 薄片疏松。
A2	MS	2	0.5		100	愈伤组织生长旺盛 薄片疏松。
A3	MS	2	0.1		100	愈伤组织生长紧密 颜色浅绿 突起 粗厚。
A4	MS	2		0.5	100	形成淡绿色的愈伤组织，突起。
A5	MS	1		0.5	100	形成淡绿色的愈伤组织，紧实、形成植株
A6	MS	1	0.5		100	形成淡绿色的愈伤组织，形成植株。
A7	MS	1	0.1		85	形成愈伤组织。
A8	MS	0.5	0.1		80	形成愈伤组织。

经实验分析：在 Ms 培养基上由于激素种类及含量的不同，愈伤组织形成有差异。总趋势附加 6-BA、NAA 或 2,4-D 的各组分均形成愈伤组织，诱导率 100%~80%；随着 NAA 的减少，愈伤组织的体积生长变慢，2,4-D 0.5 mg·L⁻¹ 对愈伤组织的形成作用比较大，6-BA 0.5 mg·L⁻¹ 的浓度对愈伤组织形成作用比较大。在 A1、A2 培养基由于激素 NAA 含量过高，愈伤组织形成迅速，但呈薄片，疏松。A3 培养由于激素 NAA 含量减少，愈伤组织生长紧密，颜色浅绿，突起，

粗厚。A4 没有激素 NAA，而添加激素 2,4-D 0.5 mg·L⁻¹ 形成淡绿色的愈伤组织，有突起^[9]。A5 培养基 6-BA 含量减少为 1.0 mg·L⁻¹，也没有激素 NAA，取而代之的是 2,4-D 0.5 mg·L⁻¹，形成淡绿色的愈伤组织，紧实、健壮。从试验情况可以总结出：A3、A4、A5、A6 培养基都有利于愈伤组织形成，且能达到粗厚健壮。也就是适宜激素含量范围为 6-BA 2~1 mg·L⁻¹ 和 NAA 0.5~0.1 mg·L⁻¹。

表 2 激素含量对不定芽分化率的影响^[7]

序号	培养基	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	2,4-D /mg·L ⁻¹	不定芽 分化率/%	生长情况
A1	MS	2	1		0	愈伤组织生长旺盛、疏松，继续培养不发芽，后期死亡。
A2	MS	2	0.5		0	愈伤组织生长旺盛、疏松，淡绿色，长时间无变化。
A3	MS	2	0.1		75	愈伤组织生长紧密、突起、粗厚，继续培养 9 周后出现细密的芽原基。
A4	MS	2		0.5	81	形成淡绿色的愈伤组织，继续培养 8~9 周后形成芽，芽细小、密集。
A5	MS	1		0.5	95	形成淡绿色的愈伤组织，继续培养 6~8 周后形成芽，粗壮 数量 5~17 个不等。
A6	MS	1	0.5		95	4 周后形成丛生芽，每个瓶内 8~17 个不等，粗壮。
A7	MS	1	0.1		95	4 周后形成丛生芽，芽细弱。
A8	MS	0.5	0.1		70	变化不大，继续培养 16 周开始形成芽。

2.2 激素含量对不定芽分化影响

40 d 后观察含有不同浓度的外源激素 6-BA 的培养基对愈伤组织形成和芽分化(见表 2),从试验情况可以看出激素种类、含量对不定芽分化有重要影响^[8]。A1 组织死亡是由于 6-BA、NAA 用量过高, A2 形成愈伤组织后不进行分化生长是由于 6-BA 用量高造成的, A3 由于 6-BA 浓度高形成愈伤组织后再分化形成芽, 生长时间长。A4 由于 2, 4-D 的加入形成愈伤组织再发芽因而生长缓慢, 6-BA 高浓度使芽分裂多而细, A7 生长素不足而影响生长^[9]。从苗的质量上看 A5 和 A6 都可以作为建立无性系的培养基, 但从培养的时间上看 A6 是最适宜的, A4 和 A7 形成的芽细弱, 从研究结果可以看出 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 即能满足愈伤组织不定芽的分化。从实验可以看出诱导再分化的最佳激素组合是: A6 培养基 MS+6-BA1.0+NAA0.5。

3 结论与讨论

在不同激素组合对愈伤组织形成的实验中, 我们配制了的 8 种不同激素组合和不同浓度激素的培养基, 其中 A3 培养基 MS+6-BA2.0+NAA0.1, A4 培养基 MS+6-BA2.0+2, 4-D0.5, A5 培养基 MS+6-BA1.0+2, 4-D0.5, A6 培养基 MS+6-BA1.0+NAA0.5 有利于愈伤组织形成, 配比组合均有利于球根海棠的脱分化即由外植体形成愈伤组织^[10]。经实验筛选出最适合

诱导愈伤组织的培养基是 MS+6-BA1.0~2.0+NAA0.1~0.5。在愈伤组织的保持与不定芽的分化的比较实验中, A6 培养基 MS+6-BA1.0+NAA0.5 有利于愈伤组织的形成和增殖, 有利于球根海棠愈伤组织的再分化。

参考文献:

- [1] 唐中彦, 刘淼. 球根海棠金正日的离体培养研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(10): 45-46.
- [2] 钟士传. 球根秋海棠金正日花的繁殖技术[J]. 中国种业, 2006(3): 42.
- [3] 钟士传, 杜巨兰. 球根秋海棠金正日花的组织培养技术[J]. 北方园艺, 2003(1): 54.
- [4] 远凌威, 袁正仿, 张苏锋. 丽格海棠的组织培养与快速繁殖研究[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2002, 15(2): 219-221.
- [5] 渠立明. 球根秋海棠组织培养技术研究[J]. 广西园艺, 2005(1): 9-10.
- [6] 杨乃博. 试管植物名录(增补一)[J]. 植物生理学通讯, 1985(3): 53-73.
- [7] 王俊英, 慈忠玲, 李日胜. 毛叶海棠(*Begonia cathayana* Hemsl)的组织培养和体细胞胚胎发生[J]. 内蒙古农业大学学报, 2001, 22(3): 52-55.
- [8] 达克东, 张松, 高东升. 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(2): 180-181.
- [9] Redfearn P L, Tan B C. A newly updated and annotated checklist of Chinese mosses [J]. J Hattori Bot Lab 1996, 79: 163-357.
- [10] Piippo S. Annotated catalogue of Chinese hepaticae and anthocerotae [J]. J Hattori Bot Lab, 1990, 68: 19F-192.

(上接第 13 页)

3 讨论

作为建立再生体系的前提和基础, 愈伤组织的诱导是非常关键的。愈伤组织的形成过程一般分为三个阶段: 诱导期、分裂期和形成期。大量的研究表明, 几乎所有高等植物的各种器官(如根、茎、叶和花等)以及各种组织(如皮层、茎髓和形成层等)离体后在适合条件下都能产生愈伤组织。愈伤组织诱导的成败关键不是外植体的来源和种类, 而是培养条件, 其中植物生长调节剂的种类和浓度最为重要。诱导愈伤组织的培养基中植物生长调节剂的配比, 一般为生长素类和细胞分裂素类间的配比。用于诱导愈伤组织的植物生长调节剂有 2, 4-D、6-BA、KT、ZT、NAA 等^[6]。

在植物愈伤组织的诱导中, 虽然对 NAA 的利用不是很多, 但 NAA 对愈伤组织的诱导也有很重要的作用。林娅等研究表明, NAA 诱导愈伤组织的效果优于 2, 4-D, NAA 与任何一种细胞分裂素类物质结合使用, 愈伤组织诱导率都为 100%。龙雯虹等对萝卜愈伤组织的诱导研究也指出, 不同的生长素类物质对萝卜愈伤组织的诱导效果不同, 诱导效果为 $\text{NAA} > 2, 4\text{-D} > \text{IBA}$, 但植物生长调节剂对不同植物的诱导效果不同, 在诱导植物愈伤组织时, NAA 的使用浓度范围一般为 $0.05 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

不同激素组合对辛夷幼嫩花瓣愈伤组织诱导的影响不同, 司怀军等对菊花幼嫩花瓣愈伤组织的诱导研究表明, 菊花幼嫩花瓣是诱导愈伤组织的良好材料, 在 $\text{MS} + 6\text{-BA} 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上诱导率可达 100%^[8]。本实验中, 辛夷幼嫩花瓣愈伤组织诱导的最佳培养基为 $\text{MS} + 6\text{-BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导率为 31.1%。但总体来看, 辛夷幼嫩花瓣愈伤组织的诱导率偏低, 因此提高其愈伤组织诱导率还有待于进一步探索。

参考文献:

- [1] 于培明, 田智勇, 许启泰, 等. 辛夷研究的新进展[J]. 时珍国医国药, 2006(7): 665-666.
- [2] 朱雄伟, 杨晋凯, 胡道伟. 辛夷成分及其药理应用研究综述[J]. 海峡药学, 2002(5): 5-7.
- [3] 沈作奎. 辛夷植物繁殖技术研究概况[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2006(4): 358-362.
- [4] 周丽华, 许冲勇, 曾雷, 等. 紫玉兰组织培养繁殖研究[J]. 经济林研究, 2002(4): 36-37.
- [5] 孟雪. 白玉兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005(3): 339.
- [6] 王琪, 王喆之, 李映丽. 荷花玉兰组织培养的研究[J]. 西北药学杂志, 2001(1): 1-13.
- [7] 黎明, 马焕成. 木兰科植物无性繁殖研究概况[J]. 西南林学院学报, 2003(2): 92-96.
- [8] 毕艳娟, 高书国, 乔亚科, 等. 植物生长调节剂对白玉兰组织培养的影响[J]. 河北职业技术师范学院学报, 2002(3): 14-16.