

## 球根秋海棠金正日离体再生影响因素研究

邢桂梅<sup>1</sup>, 吴海红<sup>1</sup>, 李 丹<sup>1</sup>, 徐兴伟<sup>2</sup>

(1. 辽宁省农业科学院 花卉研究所, 辽宁 沈阳 110161; 2. 北京金色农华种业科技有限公司, 北京 101407)

**摘要:**为了建立球根秋海棠组培快繁体系,以球根秋海棠(*Begonia tuberhybrida* Voss)品种金正日的叶为外植体,研究了培养中各因素对叶基部的影响。结果表明:不同叶片部位外植体的诱导和分化能力不同,叶基部愈伤组织诱导和分化能力最强,诱导率和分化率分别为85.7%和85.4%;暗培养和接种前4℃低温预处理降低了外植体的诱导率和分化率,在金正日花离体培养中不宜采用;叶基部最适宜的诱导和分化培养基为MS+2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>。

**关键词:**球根秋海棠;离体再生;影响因素

**中图分类号:**S682.2<sup>+</sup>9

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2013)12-0009-04

金正日花为秋海棠属球根秋海棠(*Begonia tuberhybrida* Voss)中的优良品种,以其花大色艳、姿态优美被誉为观花秋海棠之王,经济价值很

高<sup>[1]</sup>。金正日花的常规繁殖主要是种子繁殖和扦插繁殖,后代易发生变异且繁殖周期长、速度慢,远不能满足商品生产的需求。目前,国内外学者对金正日花的组织培养进行尝试并取得了一些进展<sup>[2-5]</sup>,但难以实现规模化生产。

该试验旨在利用金正日花的叶为外植体,对其诱导愈伤组织与分化成苗进行较为系统的研

收稿日期:2013-06-29

第一作者简介:邢桂梅(1982-),女,内蒙古自治区赤峰市人,硕士,助理研究员,从事观赏植物遗传育种和组织培养研究。  
E-mail: xingguimei0105@163.com。

- [9] 崔北米,潘巧娜,张陪陪,等.大蒜内生细菌的分离及抗菌拮抗筛选与鉴定[J].西北植物学报,2008,28(11):2343-2348.
- [10] 谢永芳,梁亦龙,王会会,等.大蒜内生菌抑菌蛋白提取的研究[J].江苏农业科学,2009(1):122-123.
- [11] 刘新,李凡,陈海如,等.致病性尖孢镰刀菌生物防治研究进展[J].云南大学学报:自然科学版,2008,30(S1):89-93.
- [12] 王坚,刁治民,徐广,等.植物内生菌的研究概况及其应用[J].青海草业,2008,17(1):24-28.

- [13] 王娜娜.拮抗性大蒜内生细菌的多样性及其促植物生长特性研究[D].陕西:西北农林科技大学,2010:38.
- [14] 张鑫,孟国庆,刘新利.内生菌的分离方法及其次级代谢产物研究[J].山东轻工业学院学报:自然科学版,2011,5(2):23-26,34.
- [15] 石晶盈,陈维信,刘爱媛,等.植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J].生态学报,2006,26(7):2395-2401.
- [16] 江军山,张鑫.产抗菌活性物质植物内生菌的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(22):11704-11705,11761.

## Research on the Separation and Bacteriostasis of Garlic Endophytes

WEI Zhi-zhong, LIU Meng-ya, LI Zhen, ZHOU Yi-jun

(College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081)

**Abstract:** In order to utilize the garlic in bio-control, taking garlic as materials, endophytes were isolated using different culture mediums, and the bacteriostatic effect of the metabolites of the garlic endophytes were studied. The results showed that 28 strains of endophytes were obtained from garlic which produced in Guangxi autonomous region. Five strains of endophytic bacteria had better bacteriostatic effect on the *Fusarium oxysporum*, and they had different characteristics in morphology, physiology and biochemistry.

**Key words:** garlic; endophytes; *Fusarium oxysporum*; bio-control

究,以提高金正日花离体培养的再生频率,对建立秋海棠组培快繁体系有一定的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取辽宁省农业科学院花卉所基地温室内正常盆栽管理的金正日花带叶柄的幼叶为外植体。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒 选取金正日花带叶柄的幼叶,用自来水冲洗 40~60 min,0.1%升汞浸泡消毒 5 min,无菌水冲洗 3 次,切成 2 cm×2 cm 小块接种于预先准备的培养基上。每 7 d 观察记录 1 次培养情况。诱导率(%)=(诱导愈伤组织外植体数/接种外植体数)×100,分化率(%)=(分化成苗愈伤组织数/诱导愈伤组织数)×100。

1.2.2 愈伤组织诱导和分化 以 MS 为基本培养基附加 2,4-D、BA、NAA,蔗糖浓度为 3%,琼脂

3 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8,观察不同的激素种类和浓度对金正日花离体再生的影响,确定金正日花离体再生的最佳培养基;将金正日花的叶尖、叶中部、叶基部和叶柄接种到培养基(MS+2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 3.0 mg·L<sup>-1</sup>)上,筛选适宜金正日花离体再生的相应外植体部位;对叶基部外植体分别进行 10、20、30 d 的全暗培养,以正常 12 h·d<sup>-1</sup>光照培养为对照,确定适宜金正日花离体培养的光照时间;对叶基部外植体进行 4℃低温预处理,处理梯度为 0、1、3、5 d,确定金正日花离体培养最佳的低温预处理时间。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源激素对金正日花叶片基部愈伤组织诱导与分化的影响

由表 1 可知,在 MS+2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>培养基上叶片

表 1 外源激素对金正日花叶基部离体再生的影响

Table 1 Effect of hormone on leaf bases *in vitro* regeneration of *Begonia tuberhybrida* Voss cv Jingzhengri

培养基编号 No.	激素浓度/mg·L <sup>-1</sup> Concentration of hormones			接种外植体数 Number of explants inoculated	形成愈伤组织 的外植体数 Number of explants induced	诱导率/% Rate of callus inducted	分化成苗的 愈伤组织数 Number of callus differentiated	分化率/% Rate of differentiation
	2,4-D	BA	NAA					
1	1.0	4.0		50	31	62.0	20	64.5
2	1.0	3.0		48	34	70.8	25	73.5
3	1.0	2.0	0.5	56	48	85.7	41	85.4
4		1.0	0.5	49	36	73.5	26	72.2
5		0.5	0.5	45	30	66.7	23	76.7

基部愈伤组织诱导率与分化率最高,分别为 85.7%和 85.4%。随着 BA 浓度的升高叶片基部愈伤组织诱导与分化的能力不断提高,当浓度大于 2.0 mg·L<sup>-1</sup>时,诱导和分化率有所下降。可见,2.0 mg·L<sup>-1</sup>的 BA 与 2,4-D 和 NAA 配合最适于叶基部外植体的诱导与分化。

叶片外植体接入培养基中(见图 1A),培养 14 d 后,一部分外植体转为黄绿色,28 d 后愈伤组织形成(见图 1B),大部分愈伤组织 56 d 形成再生芽,63 d 后把有再生芽的愈伤组织切成小块接种于增殖培养基上,84 d 后芽平均增殖系数为 8.0,芽增殖最多达 10 个以上(见图 1C),112 d 后长成再生苗(见图 1D)。

### 2.2 不同部位外植体对金正日花诱导与分化的影响

不同部位外植体的愈伤组织诱导率和分化率

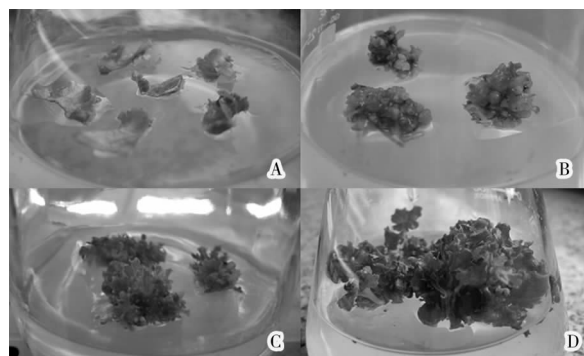


图 1 金正日花离体培养再生植株

A. 刚接种的叶片外植体;B. 诱导的胚状愈伤组织;C. 再生芽增殖;D. 再生苗

Fig. 1 Regeneration of leaf *in vitro* culture of *Begonia tuberhybrida* Voss cv Jingzhengri

A. Leaf explants inoculated just; B. Callus induced from leaf explants; C. Buds multiplied from leaf explants; D. Shoots regenerated from leaf explants.

差异较大(见表 2),叶片基部的愈伤组织诱导率与分化率最高,分别为 85.7%和 85.4%,叶柄的诱导与分化率最低,为 35.6%和 25.0%,分化能力依次为叶基部>叶中部>叶尖部>叶柄。

表 2 不同接种部位对金正日花离体再生的影响

Table 2 Effect of different explants parts on *in vitro* regeneration of *Begonia tuberhybrida* Voss cv Jingzhengri

外植体取材部位 Parts of explants	接种外植体数 Number of inoculated explants	诱导愈伤组织 的外植体 Number of explants induced callus	诱导率/% Rate of induction	分化成苗的愈伤组织数 Number of callus differentiated into seedlings	分化率/% Rate of differentiation
叶尖部 Leaf apex	48	25	52.1	14	56.0
叶中部 Middle part of leaf	52	28	53.4	19	67.9
叶基部 Leaf base	56	48	85.7	41	85.4
叶柄 Petiole	45	16	35.6	4	25.0

2.3 暗培养对金正日叶基部愈伤组织诱导与分化的影响

暗培养时间对叶片基部外植体愈伤组织诱导及分化有一定影响(见表 3)。常规培养(光照 12 h·d<sup>-1</sup>)下外植体再生频率最高,诱导与分化率分别为 85.7%和 85.4%;随着暗处理时间的延长

愈伤组织诱导率和分化率都逐渐下降,暗处理 30 d 时的外植体的诱导与分化率仅为 61.8%和 73.5%。适当的暗培养可以在一定程度上减轻污染,长时间的暗培养对金正日花叶基部外植体的离体再生没有促进作用。

表 3 暗处理对金正日花叶基部离体再生的影响

Table 3 Effect of dark treatment on leaf bases *in vitro* regeneration of *Begonia tuberhybrida* Voss cv Jingzhengri

暗处理天数/d Days of dark treatment	接种外植体数 Number of explants inoculated	诱导愈伤 组织的外植体数 Number of explants induced	诱导率/% Rate of induction	分化成苗的外植体数 Number of callus differentiated into seedlings	分化率/% Rate of differentiation
0	56	48	85.7	41	85.4
10	58	45	77.6	38	84.4
20	60	39	65.0	30	76.9
30	55	34	61.8	25	73.5

2.4 低温预处理对金正日花离体再生的影响

由表 4 可知,低温预处理对叶基部离体再生有一定影响。未经处理的外植体诱导率和分化率最高分别为 85.7%与 85.4%。处理 1、3 和 5 d

的诱导率和分化率都有下降。可见,叶基部外植体后的愈伤组织诱导率和分化率随低温预处理时间的延长而降低,在金正日花的离体再生中不宜采用低温预处理。

表 4 低温预处理对金正日花叶基部离体再生的影响

Table 4 Effect of low temperature pretreatment on leaf bases *in vitro* regeneration of *Begonia tuberhybrida* Voss cv Jingzhengri

4℃预处理天数/d Days treated in 4℃	接种外植体数 Number of inoculated explants	诱导愈伤组织外植体数 Number of explants induced callus	诱导率/% Rate of induction	分化成苗的愈伤组织数 Number of callus differentiated into seedlings	分化率/% Rate of differentiation
0	56	48	85.7	41	85.4
1	56	46	82.1	38	82.6
3	55	40	72.7	32	80.0
5	59	39	66.1	30	76.9

### 3 结论与讨论

目前金正日花组织培养主要以叶片为外植体,该研究表明,叶基部诱导与分化能力远远大于叶中部和叶尖部,叶基部是建立金正日花高频再生体系的首选材料,这与周艳萍等<sup>[6]</sup>利用百合鳞茎叶片的试验结果一致。

秋海棠组织培养普遍采用 BA 与 NAA 的组合<sup>[7-8]</sup>。该试验采用 2,4-D 与 BA 及 NAA 配合使用,对金正日花的诱导与分化的效果较好,最佳培养基为 MS + 2,4-D  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

试验中对接种外植体进行一定时间的黑暗培养,在一定程度上降低了外植体的污染率,但对于外植体愈伤组织的诱导率和分化有一定的抑制作用,这与贾永芳等<sup>[9]</sup>的结果一致。低温预处理会降低金正日花的叶基部外植体的诱导和分化率,这与魏瑛<sup>[10]</sup>和邢桂梅<sup>[11]</sup>等的结果也基本一致。

#### 参考文献:

- [1] 唐中彦,刘森.球根海棠“金正日”的离体培养研究[J].安徽农业科学,2007,35(10):2906,3035.
- [2] 张凤生,樊绍翥,薛丹丹,等.金正日球根海棠叶片组织培养诱导的研究[J].黑龙江农业科学,2009(2):17-19.
- [3] Shigeto Kiyokawa, Yasuhiro Kikuchi, Hiroshi Kamada, et al. Genetic transformation of *Begonia tuberhybrida* by *Ri-rol* gene[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 606-609.
- [4] 钟士传,杜启兰.球根秋海棠“金正日花”的组织培养技术[J].北方园艺,2003(1):54.
- [5] Masaru Nakano, Yoshiji Niimi, Daisuke Kobayashi, et al. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia tuberhybrida* Voss) [J]. Scientia Horticulturae, 1999, 79, (3): 245-251.
- [6] 周艳萍,郑红娟,贾桂霞.两个亚洲百合品种离体再生体系的建立[J].北京林业大学学报,2007(29):123-127.
- [7] 陈刚,梁晶龙,陈雄伟,等.裂叶秋海棠组织培养及植株再生研究[J].北方园艺,2009(6):92-94.
- [8] Espino F J, Linacero R, Rueda J, et al. Shoot regeneration in four *Begonia* genotypes [J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(1):101-104.
- [9] 贾永芳,马玉坤,郭余龙.安祖花组织培养研究[J].河南师范大学学报,2007,35(2):164-166.
- [10] 魏瑛.低温预处理对西瓜花药愈伤组织诱导的影响[J].甘肃农业科技,1999(9):34-36.
- [11] 邢桂梅,毕晓颖,雷家军.君子兰花器官离体培养[J].园艺学报,2007,34(6):1563-1568.

## Influencing Factors of Regeneration *in vitro* on *Begonia tuberhybrida* Voss cv Jinzhengri

XING Gui-mei<sup>1</sup>, WU Hai-hong<sup>1</sup>, LI Dan<sup>1</sup>, XU Xing-wei<sup>2</sup>

(1. Institute of Floriculture, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161; 2. Beijing Kings Nower Seed Science and Technology Company Limited, Beijing 101407)

**Abstract:** In order to establish rapid propagation system of tissue culture for *Begonia tuberhybrida* Voss, the leaves of *Begonia tuberhybrida* Voss cv Jinzhengri were used as explants for regeneration *in vitro*, influencing factors of cultivation *in vitro* were studied. The results showed that the rates of induction and differentiation of four kinds of explants were different, the leaf base had the highest induction and differentiation rates of 85.7% and 85.4%; the induction and differentiation rates reduced after dark culturing and in 4℃ before inoculation, which were not fit to be used in leaf base culture *in vitro* of *Begonia tuberhybrida* Voss cv Jinzhengri; the best medium for induction and differentiation of the leaf base was MS + 2,4-D  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Key words:** *Begonia tuberhybrida* Voss; regeneration *in vitro*; influencing factors