

## 花叶锦带花组织培养的研究

侯淑婧<sup>1,2</sup>, 沈漫<sup>2</sup>, 高遐虹<sup>2\*</sup>, 沈红香<sup>2</sup>, 董清华<sup>2</sup>, 王志忠<sup>2</sup>

(1. 新疆农业大学 林学院, 乌鲁木齐 830052, 2. 北京农学院 植物科学技术系, 北京 102206)

**摘要:**以花叶锦带花的幼嫩茎段为外植体, 进行组织培养与快速繁殖试验。研究结果表明: (1) 初代培养的适宜培养基为 MS+6-BA 0.50 mg/L+IBA 0.05 mg/L, 附加 480 mg/L 氨苄青霉素钠, 可有效抑制内生菌的污染, 抑菌率达 93.3%; (2) 适宜增殖的培养基为 MS+6-BA 0.50 mg/L+NAA 0.05 mg/L, 增殖系数达 6.70, 苗健壮, 无玻璃化现象; (3) 生根最佳培养基为 1/2MS+IBA 0.50 mg/L, 生根率达 98%, 根系粗壮。

**关键词:**花叶锦带花; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号:** S682 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-3186(2008)02-0028-04

## Stem-segment Culture and Propagation of *Weigela florida* cv. *Variegata*

HOU Shu-jing<sup>1,2</sup>, SHEN Man<sup>2</sup>, GAO Xia-hong<sup>2\*</sup>, SHEN Hong-xiang<sup>2</sup>,

DONG Qing-hua<sup>2</sup>, WANG Zhi-zhong<sup>2</sup>

(1. Forestry College, Xinjiang Agricultural University, Wulumuqi 830052, China;

2. Department of Plant Science & Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract:** The young stem-segment with axillary buds was used as the explant, the propagation by tissue culture of *Weigela florida* cv. *Variegata* was studied. The results showed that the media containing 480mg/L sodium ampicillin was helpful to reduce the propagation of plant endophyte. The appropriate media for germination of the axillary buds was MS added 6-BA (0.50mg/L) and IBA (0.05mg/L). The subculture media for plant differentiation was MS added 6-BA (0.50mg/L) and NAA (0.05mg/L), the high coefficient of propagation was 6.70. At the same time, the plants cultured in tube had not the vitric-plant phenomena. For plant rooting, the appropriate media was 1/2MS added IBA (0.50mg/L), which could brought on the high rooting rate at 98%.

**Key words:** *Weigela florida* cv. *Variegata*; stem-segment culture; tube propagation

花叶锦带花(*Weigela florida* cv. *Variegata*), 忍冬科锦带花属的落叶灌木, 是锦带花的主要变异类型之一, 产自中国东北、华北、华东地区<sup>[1-2]</sup>。它的观赏价值较高, 叶色美观, 叶缘为白色至黄色, 花色紫红至淡粉, 花期一般在 5 月至 8 月期间, 花叶相衬, 绚丽多彩, 是一种可增加园林色相、丰富园林绿化景观的彩叶观花植物。

花叶锦带花虽为阳性花木, 但也较耐阴, 而且耐

寒、耐旱和耐瘠薄土壤, 萌芽力和萌蘖力强, 生长迅速<sup>[3]</sup>, 比较适合在北京露地栽培, 可作花篱或丛植于草坪、路旁及孤植于庭园中<sup>[1,3]</sup>。

锦带花属的植物多因种子不易采集而不用有性繁殖, 而常用扦插和分株等繁殖方法, 但繁殖数量有限<sup>[1]</sup>。因此, 本试验以花叶锦带花的幼嫩茎段为外植体, 利用植物组织培养技术对其快速繁殖过程及影响因素进行探讨, 以获得快速繁殖花叶锦带花的

收稿日期: 2008-01-10; 修订日期: 2008-04-01

基金项目: 北京市教委资助项目 (项目编号: KM 200610020008)

作者简介: 侯淑婧, 1981 年出生, 女, 山西人, 硕士研究生, 研究方向为观赏植物抗性生理; \* 通讯作者: 高遐虹, gxx\_mm2002@163.com

植物生长调节剂的优化组合,建立高效的快繁体系,为培养大量的再生植株提供试验技术依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

花叶锦带花,2006年从北京植物园引进,栽植于北京农学院园艺试验基地。

### 1.2 试验方法

1.2.1 取材与表面消毒 参照曹庆和刘青林等方法<sup>[3-4]</sup>。取生长健壮且较幼嫩的带叶茎段,去除叶片,剪成0.5~1.5 cm的茎段,用含数滴洗涤剂的水振荡浸泡10 min,流水冲洗2~3 h。75%乙醇表面消毒30 s,无菌水漂洗1次后,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>溶液(含数滴吐温-80)浸泡10 min,无菌水冲洗6~8次。无菌条件下接种。外植体接种数均为30个。

1.2.2 外植体诱导培养 将灭菌后的茎段切成长1.0 cm左右并带一个腋芽的小段,斜插在培养基上。外植体的初代诱导培养基为MS+BA 0.50 mg/L+IBA 0.05 mg/L,并附加不同浓度的氨苄青霉素钠。观察腋芽萌动的时间和生长情况,培养40 d后转瓶。

1.2.3 继代增殖培养 将诱导出的芽苗分切成1.0 cm左右带腋芽的茎段,分别转接在以MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA,IBA,NAA激素组合的继代增殖培养基中。比较不同激素组合下芽苗的生

长状况、增殖系数、出芽数。培养50 d后转瓶。

1.2.4 生根培养 将继代苗从茎基部起至第3~4节的茎节剪切成1.0 cm左右带腋芽的茎段进行生根培养(上面的茎段和顶芽用于继代增殖培养),以1/2MS为基本培养基,附加不同生长素组合。30 d后统计生根率、根数、根长,比较不同处理条件下的生根率、生根情况。培养50 d后出瓶移栽。

上述各培养基均加入琼脂粉4.5 g/L、蔗糖30 g/L,pH 5.8,培养温度(25±1)℃,光照强度1 500~2 000 Lx,光照12~14 h/d。

1.2.4 瓶苗移栽 将瓶苗放置在自然散光下炼苗3~5 d,取出瓶苗,在温水中浸泡,洗去附在根部的培养基后立即进行移栽,移植基质为珍珠岩:蛭石(2:1)。

## 2 结果分析

### 2.1 不同浓度氨苄青霉素钠的抑菌效果及对花叶锦带花不定芽分化的影响

外植体即使经过严格的表面消毒,接种到初代培养基上,数日后材料基部仍会逐渐出现细菌并开始污染培养基,影响试管苗的生长。

氨苄青霉素钠是一种广谱抗菌药,对革兰氏阳性球菌、杆菌和革兰氏阴性球菌具有较好的杀菌效果,其广谱性要比青霉素好。本试验在MS+BA 0.50 mg/L+IBA 0.05 mg/L的初代培养基中加入不同浓度的氨苄青霉素钠来抑制内生菌的污染(见表1)。

表1 不同浓度氨苄青霉素钠的抑菌效果及对试管苗的影响

Tab.1 Effect of different concentration of sodium ampicillin on shoot in vitro

| 氨苄青霉素钠浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) | 污染苗个数 | 抑菌率/%   | 培养基和试管苗生长情况                     |
|--------------------------------|-------|---------|---------------------------------|
| 0                              | 30    | 0.0 dD  | 培养基污染严重,试管苗不分化生长                |
| 160                            | 28    | 6.6 dD  | 培养基污染严重,试管苗基本不分化                |
| 320                            | 15    | 50.0 cC | 培养基污染较严重,试管苗叶片较绿,丛生芽部分分化        |
| 480                            | 2     | 93.3 aA | 培养基污染轻,试管苗叶片绿而大,茎较粗,丛生芽分化多      |
| 720                            | 5     | 83.3 bB | 培养基污染较轻,试管苗叶片绿但叶片较小,茎较细,丛生芽分化较多 |

注:表中大、小写字母分别表示 $P=0.01$ 、 $P=0.05$ 显著差异水平

从表1可见,不同浓度的氨苄青霉素钠抑菌率差异极显著。氨苄青霉素钠浓度为480 mg/L的抑菌效果和试管苗生长状况都好于其他处理浓度,不仅抑菌率达到93.3%,而且试管苗叶绿健壮,丛生芽分化多。所以采用适宜浓度氨苄青霉素钠为培养基附加物,可有效抑制植物内生菌对组培的影响。

### 2.2 不同激素组合对花叶锦带花再生芽诱导的影响

以MS为基本培养基,将无菌苗接种到含不同浓度的细胞分裂素6-BA、生长素IBA和NAA的诱

导分化培养基中,分别比较不同激素组合对再生芽诱导的影响(见表2)。

试验结果表明,细胞分裂素6-BA的浓度在0.00~0.50 mg/L范围内,以0.50 mg/L时增殖效果最好,增殖系数在2.92~6.70,试管苗表现为腋芽萌发较快,叶绿且长势较强。当6-BA浓度小于或高于0.50 mg/L时,增殖系数都呈下降趋势。尤其当6-BA浓度高于0.50 mg/L时,茎叶开始出现玻璃化现象。因此,可以确定,花叶锦带花初代培养

的适宜增殖的培养基为 MS+6-BA 0.50 mg/L+ IBA 0.05 mg/L。

表 2 不同激素组成对花叶锦带花分化的影响

Tab.2 Effect of different Combinations of hormones on differentiation of *Weigela florida* cv. *Variegata*

| 激素组成/(mg·L <sup>-1</sup> ) |      |      | 增殖系数           | 植株长势                    |
|----------------------------|------|------|----------------|-------------------------|
| 6-BA                       | IBA  | NAA  |                |                         |
| —                          | —    | —    | 0.00 d         | 叶大叶绿叶舒展,茎较粗,芽不分化,基部出现愈伤 |
| 0.30                       | —    | —    | 2.43±0.69 abc  | 植株健壮,叶大、色浓绿,分化多         |
|                            | 0.05 | —    | 2.10±0.38 c    | 叶较大叶绿,茎较粗,丛生芽分化少        |
|                            | 0.10 | —    | 2.01±0.57 c    | 叶较大叶绿,茎较粗,丛生芽分化少        |
| 0.30                       | —    | 0.05 | 2.17±0.64 abcd | 植株较健壮,叶较大、色绿,分化较少       |
|                            | —    | 0.10 | 1.92±0.63 bcd  | 植株较健壮,叶较大、色绿,分化少        |
|                            | 0.05 | —    | 6.70±0.45 a    | 叶片较大,叶绿不平展,茎较粗,丛生芽分化多   |
|                            | 0.10 | —    | 4.80±0.24 b    | 植株较健壮,叶片中等叶绿不平展,分化较多    |
| 0.50                       | —    | 0.05 | 3.19±0.31 a    | 植株较健壮,叶较大、色绿,分化多        |
|                            | —    | 0.10 | 2.92±0.83 ab   | 植株健壮,叶大、色绿,分化较多         |
|                            | 0.05 | —    | 2.60±0.33 a    | 植株健壮,叶大、色绿,分化较多         |
|                            | 0.10 | —    | 2.15±0.41 b    | 植株健壮,叶大、色绿,分化较多         |
| 1.00                       | —    | 0.05 | 2.20±0.23 ab   | 植株健壮,叶大、色绿,分化较多         |
|                            | —    | 0.10 | 1.81±0.55 cd   | 植株较健壮,叶较大、色绿,分化少        |

注:表中数据为 3 次试验结果的均值±标准差,各列中不同小写字母表示同一生长条件比较差异显著(P=0.05)

将细胞分裂素 6-BA 浓度确定为 0.50 mg/L, 分别比较两种生长素 IBA 和 NAA 对花叶锦带花的继代壮苗的影响。从表 2 可见,NAA 浓度为 0.50 mg/L 和 0.10 mg/L 时的增殖系数分别为 3.19 和 2.92,均低于相同浓度 IBA 下的增殖系数,但是,试验中观察到,生长激素采用 NAA 时,试管苗植株健壮,芽苗叶片舒展,叶色浓绿,分化正常,无玻璃化现象(图 1:a~c)。因此,综合考虑,在花叶锦带花继代培养中,可用 NAA 代替 IBA,以 NAA 浓度为

0.05mg/L 壮苗增殖效果较好,最适的花叶锦带花继代分化培养基为 MS+6-BA 0.50 mg/L+NAA 0.05 mg/L。

### 2.3 不同生根培养基对花叶锦带花试管苗生根的影响

将花叶锦带花 1.5 cm 以上的壮苗接种到 1/2MS 生根培养基上,附加不同浓度的 NAA 和 IBA, 7~15 d 后试管苗基部开始陆续膨大,28 d 后根系可达 2.0 cm 以上,苗健壮。30 d 后调查根的生长情况,结果见表 3。

表 3 不同生根培养基对花叶锦带花生根的影响

Tab.3 Effect of different culture medium on the rooting of *Weigela florida* cv. *Variegata*

| 激素组成/(mg·L <sup>-1</sup> ) |      | 根率/% | 平均根数         | 平均根长/cm    | 根长势                   |
|----------------------------|------|------|--------------|------------|-----------------------|
| IBA                        | NAA  |      |              |            |                       |
| —                          | —    | 90 a | 6.5±2.7 cd   | 1.2±0.4 b  | 根多从基部直接生出,根细,无侧根      |
| —                          | 0.10 | 85 b | 11.7±3.7 abc | 1.6±0.3 ab | 从基部直接生出,根较细,无侧根       |
| —                          | 0.20 | 74 b | 15.0±2.7 a   | 1.7±0.3 ab | 根较细,有侧根               |
| —                          | 0.30 | 66 b | 8.2±1.4 b    | 1.3±0.4 b  | 部分根部有少量愈伤组织,根多较粗短,苗健壮 |
| —                          | 0.50 | 45 e | 6.4±3.1 b    | 1.1±0.2 b  | 根部有较多愈伤组织,根较多且短       |
| 0.20                       | —    | 65 c | 8.7±3.8 bcd  | 1.2±0.1 b  | 根较粗壮,有侧根              |
| 0.30                       | —    | 87 b | 13.8±3.4 ab  | 2.2±0.1 a  | 根较粗壮,有侧根,较多           |
| 0.50                       | —    | 98 a | 17.2±0.7 a   | 2.0±0.6 a  | 根部有较多愈伤,愈伤组织上长出细根,苗健壮 |
| 1.00                       | —    | 55 d | 5.4±1.4 d    | 1.2±0.2 b  | 根部有大量愈伤组织,长出较少细根      |

注:表中数据为 3 次试验结果的均值±标准差,各列中不同小写字母表示同一生长条件比较差异显著(P=0.05)

从表 3 中可以看出,使用生长素种类和浓度的不同,根系生长效果也有差异,使用 1/2MS+IBA 0.50 mg/L 培养基最为理想,生根率几乎达 100%, 不仅平均根数多,平均根长也较长,且与其他培养基相比根长势粗壮(图 1:d~e)。其次,采用 1/2MS 的培养基生根效果也较好,生根率达 90%,但平均

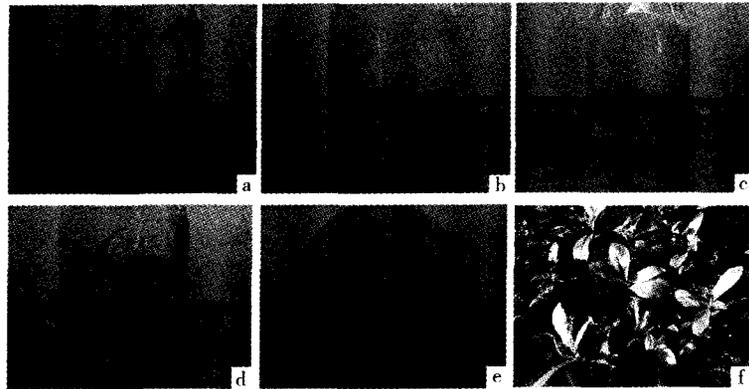
根数和根长稍差一些。

在加入生长素的培养基上,试管苗根部易出现愈伤组织,且随生长素浓度升高,愈伤组织生长越多。试验结果说明,花叶锦带花在不加激素的 1/2MS 培养基中也容易生根。在实际生产扩繁中,可以考虑采取这个生根培养基配方来降低生产成本。

## 2.4 炼苗与移栽

选择生根培养 30 d 的生长势良好、根系健壮发达的试管苗进行移栽。瓶苗移栽后,浇足定根水,置

塑料小拱棚中,移栽 7 d 内,适当遮光,保持较高空气湿度。正常养护管理,移栽成活率可达 90%(图版 1:f)。



a. 在继代培养基 MS+6-BA 0.50 mg/L+NAA 0.10 mg/L 中生长 2 d 的试管苗; b. 在继代培养基 MS+6-BA 0.50 mg/L+NAA 0.10 mg/L 中生长 22 d 的试管苗; c. 在继代培养基 MS+6-BA 0.50 mg/L+NAA 0.10 mg/L 中生长 28 d 的试管苗; d. 在生根培养基 1/2MS+IBA 0.50 mg/L 中生长 23 d 的试管苗; e. 在生根培养基 1/2MS+IBA 0.50 mg/L 中生长 23 d 试管苗的根系; f. 在栽培基质为珍珠岩:蛭石(2:1)中生长 20 d 的小苗。

图 1 花叶锦带花组织培养全过程

Fig. 1 Propagation by tissue culture of *Weigela florida* cv. *Variegata*

## 3 讨论

组织培养是目前提高园艺植物繁殖率的重要途径之一,但是对于部分植物来说,由于体内含有内生菌,因此组织培养还是有一定难度。国内对‘红王子’锦带花的组织培养已有相关报道<sup>[1]</sup>,但尚未见对花叶锦带花的组培快繁研究的相关报道。

本试验在解决花叶锦带花组织培养中内生菌污染的问题上,初步提出解决对策。正常情况下,植物初代培养中,表面细菌引起的污染通常在 2~3 d 就可在外植体周围或培养基表面形成明显的如水污状、油污状、气泡或干缩的红、黄、乳白等颜色的菌落。若在外植体培养 3~5 d 内未发现污染,但在以后不断出现明显的或不明显的菌落,就可判断这种情况可能是由内生菌引起的污染<sup>[5]</sup>。据报道,内生菌广泛分布于植物体的根、茎、叶、花、果实和种子等器官组织的细胞或细胞间隙中,其种类、数量、分布都因植物种类不同而异<sup>[6]</sup>。在多种灌木、草本植物、栽培作物、果树、苔藓和蕨类植物中也陆续发现内生菌<sup>[7]</sup>。因此,在植物组培快繁中使用适宜浓度的氨基青霉素钠为培养基附加物,不仅可有效抑制内生菌的污染,还可减少外植体消毒时杀菌剂 HgCl<sub>2</sub> 的使用时间,保证外植体的成活率。本试验在添加氨基青霉素钠的培养基上进行花叶锦带花初代和继代培养增殖,连续使用几代,则内生菌出现的斑块几乎不再出现。

此外,花叶锦带花在继代增殖过程中容易出现玻璃化现象。要解决这个问题,除采用生长素 NAA 代替 IBA,并逐渐降低 BA 浓度的处理措施外,还可以通过改变琼脂和蔗糖的浓度,如适当增加琼脂和蔗糖的用量(琼脂 0.8%,蔗糖 4%),以及对转接的苗进行变温培养(即在昼夜温差为 9~11 °C 的培养室内培养 14 d)等方法来进行缓解,效果也很显著。通过对花叶锦带花组织培养各阶段的最适培养基配方进行筛选,并采用适当添加抑菌剂的方法来克服组织培养中出现内生菌污染的问题,本试验在花叶锦带花组织培养技术方法上的尝试与改进将对建立花叶锦带花组织培养与快速繁殖体系具有实用意义。

## 参考文献:

- [1] 奕岚,佟凤芹. 锦带花的组织培养与快速繁殖研究[J]. 辽宁师专学报,2003(5):101-102.
- [2] 李殿波,刘玉艳. 锦带花的栽培技术[J]. 特种经济动植物,2006(7):30.
- [3] 曹庆,汪永辉. 锦带花及其繁殖技术[J]. 园林花卉,2002(5):41.
- [4] 刘青林. 花卉组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [5] 李群. 植物组织培养中污染控制技术[J]. 四川林业科技,1999,20(4):22-26.
- [6] 周俊辉,周厚高,刘花全. 植物组织培养中内生细菌污染问题[J]. 广西植物,2003,23(1):41-47.
- [7] Reed B M, Mentzer J, Tanprasert P. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut; identification and antibiotic treatment [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998,52:67-70.