

龙翅海棠组织培养快速繁殖体系研究

陈妹幼

(福建省厦门市忠仑苗圃 361009)

摘要: 以嫩叶和茎段为外植体对龙翅海棠进行离体培养与植株再生研究, 结果表明: 嫩叶和茎段的最适芽诱导分化培养基为 MS + KT 0.5 mg/L + IAA 0.2 ~ 1.0 mg/L, 接种培养 30 ~ 40 d; 最适继代增殖培养基为 MS + KT 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L, 培养时间为 25 d; 壮苗生根培养基为 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L + IBA 0.2 mg/L + 2% 蔗糖 + 琼脂 3 g/L, 培养时间为 15 ~ 20 d。

关键词: 龙翅海棠; 再生体系; 组织培养

龙翅海棠又名珊瑚秋海棠, 为海棠目秋海棠科多年生常绿半垂吊型草本花卉, 是用四季海棠中的直立型与垂吊型杂交培育成的海棠新品种。其株形奇特, 叶大、互生, 叶尖细长, 形状如翅膀, 基部偏斜, 形似龙身插翅而得名^[1]。龙翅海棠每节有腋生枝条, 花朵繁多密集, 光彩夺目, 周年开花, 具有较高的观赏价值, 既可作为室内盆花也可作花坛花卉, 同时又是很好的垂吊花卉, 是装点庭院、美化居室的理想花卉。龙翅海棠种子繁殖易产生变异, 扦插虽容易成活, 但扦插苗分枝性差, 常常只有一个主茎, 株形单薄, 影响观赏^[2]。而利用组织培养方法是快速繁殖秋海棠的有效途径^[3-5]。为了在短时间内繁殖出大批量的龙翅海棠苗木, 特进行了组培快繁技术研究和探讨, 建立了龙翅海棠的组培再生体系。该体系的建立对龙翅海棠种苗快速繁殖和规模化生产有着重要的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 无菌外植体材料的获得

选取当年生、长势好的龙翅海棠嫩枝, 将所取材料先用清水冲洗干净, 在超净工作台上用 70% 酒精消毒 8 s, 再用 0.1% 升汞溶液消毒茎段和茎尖 5 min, 之后用无菌水冲洗 4 ~ 6 次, 用无菌滤纸吸去表面水分。将消毒好的茎尖和茎段端部切去, 接种在琼脂固化的 1/2 MS 培养基上生长。20 d 后获得 3 cm 高的无菌小芽苗。将小芽苗叶片切成 1 cm² 见方的小块, 茎段切成 1 cm 长的切段作外植体。

1.2 培养条件

培养温度为 (25 ± 3) °C, 每天 12 h 光照, 光照强度为 1500 ~ 2000 Lx。

1.3 培养基

以 MS 为基本培养基, 附加 3% 蔗糖及 0.6 % 琼脂, 灭菌前 pH 值调至 5.8, 按不同的培养目标添加相应的激素, 配制成诱导分化、继代增殖、生根成苗培养基, 常规方法灭菌。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对丛生芽分化的影响

为了寻找适合龙翅海棠丛生芽诱导的培养基, 设计了 17 组配方处理 (表 1)。每个处理接种 20 瓶, 每瓶接 5 个外植体, 培养 35 d 后统计试验结果。叶片和茎段在含不同激素配比下的分化培养基中培养 30 d 左右便可在外植体切口处直接形成大量丛生芽。

从表 1 可知, 在不含激素的培养基 (CK) 上培养的叶片和茎段的分化率为零, 说明激素是诱导丛生芽的必要条件; 适宜的 BA、KT 配比均能诱导分化丛生芽, 且诱导率随着 BA 和 KT 浓度的增加而下降; 高浓度的 BA 与 KT 易使外植体褐化, 产生的芽苗易玻璃化。在细胞分裂素水平相同时, 生长素 IAA 比 NAA 更有利于丛生芽的诱导。试验结果表明, 龙翅海棠理想的丛生芽诱导培养基为 MS + KT 0.5 mg/L + IAA 0.2 ~ 1.0 mg/L, 诱导率为 100%。

收稿日期: 2008 - 04 - 21

作者简介: 陈妹幼, 女, 1972 年生, 农艺师。

基金项目: 厦门市园林风景管理局科技项目。

表 1 不同激素对比对龙翅海棠芽分化的影响

| 序号 | 激素配比 (mg/L) | 接种外植体 (个) | 诱导率 (%) | 丛生芽生长情况 |
|--------|----------------------|--------------|------------|------------------------|
| 1 | 6 - BA 1.5 + NAA 0.5 | 100 | 0 | 多根毛,大部分褐化死亡 |
| 2 | 6 - BA 1.5 + NAA 0.2 | 100 | 9 | 大部分褐化死亡,少数有小芽 |
| 3 | 6 - BA 1.5 + IAA 1.0 | 100 | 16 | 大部分死亡,切口有少许根毛 |
| 4 | 6 - BA 1.5 + IAA 0.2 | 100 | 23 | 有许多根毛,大部分褐化死亡 |
| 5 | 6 - BA 0.5 + NAA 0.5 | 100 | 14 | 切口水渍状,有许多根毛 |
| 6 | 6 - BA 0.5 + NAA 0.2 | 100 | 18 | 切口愈伤组织致密,根毛较多,少数有小芽 |
| 7 | 6 - BA 0.5 + IAA 1.0 | 100 | 90 | 切口有不定根,芽多,芽苗较弱 |
| 8 | 6 - BA 0.5 + IAA 0.2 | 100 | 80 | 切口多不定根,切口有小芽 |
| 9 | KT 1.5 + NAA 0.5 | 100 | 40 | 切口多不定根,芽少且顶芽多畸形 |
| 10 | KT 1.5 + NAA 0.2 | 100 | 45 | 切口有许多根毛,芽少且多畸形 |
| 11 | KT 1.5 + IAA 1.0 | 100 | 25 | 许多褐化死亡,少数切口有芽和不定根 |
| 12 | KT 1.5 + IAA 0.2 | 100 | 22 | 切口膨大,多根毛,少数有芽 |
| 13 | KT 0.5 + NAA 0.5 | 100 | 36 | 多不定根,芽数少 |
| 14 | KT 0.5 + NAA 0.2 | 100 | 48 | 很多不定根,芽数少 |
| 15 | KT 0.5 + IAA 1.0 | 100 | 100 | 少许不定根,外植体四周产生大量丛生芽,芽苗多 |
| 16 | KT 0.5 + IAA 0.2 | 100 | 100 | 有少量根毛,长势好且有较多的芽分化, |
| 17(CK) | 0 | 100 | 0 | 切口水渍状,不分化,茎尖生长 |

注:①基本培养基为 MS;②丛生芽生长情况为外植体接种 30 d 后的观察结果。

2.2 继代增殖培养分析

丛生芽在诱导培养基中培养 25~30 d 后,取出丛生芽,在无菌条件下分割成 1 cm² 小块,接种到不同配比 KT 与 IAA 继代培养基上进行继代培养。培养 30 d 后统计株高大于 2 cm 的苗数。由于细胞分裂素的持续作用,增殖培养基中的不定芽不断分化和生长形成芽丛。由表 2 可知,在供试激素水平范围内,随着 KT 浓度的升高,丛生芽增殖倍数也相应提高;当 KT 浓度为 1.0 mg/L 时,增殖倍数最高达 8 倍,但苗较细弱。综合考虑增殖倍数和小苗发育情况,认为培养基 MS + KT 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L 是理想的增殖培养基。

表 2 KT 与 IAA 不同对比对龙翅海棠增殖率的影响

| 激素配比 (mg/L) | 接种外 植体 (个) | 株高≥2 cm 的苗数 (株) | 增殖 倍数 | 芽苗生长情况 |
|------------------|------------------|-----------------------|----------|--------------------|
| KT 1.0 + IAA 0.5 | 30 | 239 | 8 | 细弱 |
| KT 0.5 + IAA 1.0 | 30 | 156 | 5 | 健壮,基部产生大量不定根 |
| KT 0.5 + IAA 0.2 | 30 | 182 | 6 | 健壮,基部有不定根 |
| KT 0.2 + IAA 0.2 | 30 | 118 | 4 | 芽生长缓慢,苗壮,基部产生大量不定根 |

注:基本培养基为 MS。

2.3 生根培养分析

将继代培养基上形成的粗壮芽(2~3 cm)分株切割,扦插于生根培养基中培养 20 d 后进行生根统计。结果(表 3)显示, NAA、IAA、IBA 3 种生长素均能诱导生根,其中培养基 1/2 MS + 蔗糖 20 g/L + NAA 0.2 mg/L + IBA 0.2 mg/L 对生根有明显的促进作用,在切口长出辐射状的不定根,生根多且粗壮,植株生长均衡,株型较好。

2.4 不同琼脂浓度对芽苗生根的影响

琼脂一直被认为只是培养基的固化剂,起支撑培养物的作用。但近几年来人们对琼脂浓度在组培中的作用有了进一步的认识。培养基中琼脂浓度是影响植物离体再生的一个重要因素。琼脂浓度对龙翅海棠离体生根的影响试验结果(表 4)表明,不同琼脂浓度对生根率没有明显影响,但随着浓度的增加,发根时间推迟;琼脂浓度为 6 g/L 时发根慢,且根稀苗弱;琼脂浓度为 3 g/L 时,即半固体培养基有利于固定苗且早发根、根系多且壮,茎叶和根生长比例协调,在移栽时容易洗去培养基;琼脂浓度为 0 时(液体状培养基),发根早,根系多而壮,茎叶生长也较快,但苗东倒西歪,不利于育壮苗。因此采用半固化琼脂有利于苗的固定和根系早发。

表 3 不同生长素对龙翅海棠芽苗生根的影响

| 生长素 (mg/L) | 生根率 (%) | 根生长情况 | 苗长势 |
|-------------------|------------|------------------------|--------------|
| NAA 0.5 | 95 | 根多,长有很多根毛,分布不均匀,不定根易褐化 | 叶宽大,茎粗壮,节间短长 |
| IAA 0.5 | 100 | 根系丰富,但较细弱 | 苗矮小,生长缓慢 |
| IBA 0.5 | 100 | 根较少,粗壮,须根丰富 | 叶较宽大,茎粗,节间短 |
| NAA 0.2 + IBA 0.2 | 100 | 发根时间早,根多且粗壮,呈辐射状 | 株形紧凑,叶大,节间适中 |
| 0 | 15 | 少数有粗根 | 生长缓慢 |

注:基本培养基为 1/2 MS^[6] + 蔗糖 20 g/L。

表 4 不同的琼脂浓度对龙翅海棠离体生根的影响

| 琼脂浓度 (g/L) | 生根率 (%) | 根系生长情况 | 试管苗生长状况 |
|---------------|------------|------------------------|---------------|
| 6 | 100 | 8 d 发根,20 d 时根较稀且弱 | 茎较细 |
| 3 | 100 | 5 d 发根,15 d 根粗壮且多不定根 | 叶较宽大,茎粗,苗壮 |
| 0 | 100 | 3 d 就开始发根,12 d 根粗壮且多根毛 | 叶片大,厚实,茎较细,苗高 |

注:培养基 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L + IBA 0.2 mg/L + 蔗糖 20 g/L。

2.5 炼苗及移栽

当苗基部诱导出 4~5 条不定根且根长 2 cm 左右时,培养瓶移至室温条件下,适应 3 d 后,将培养瓶的薄膜盖掀开,在常温和散射光下炼苗 3~4 d,再将培养苗从培养瓶中取出,并洗净根上附着的培养基,移栽于消毒过的的基质(1 份珍珠岩 + 1 份泥炭土)中。塑料大棚上覆盖遮阳网,使苗处于半荫环境。刚移入大棚前 2 d 每天喷雾 3~4 次,保持较高的环境湿度($\geq 85\%$),大棚温度控制在 20~25℃。在大棚中炼苗 40 d 后就可上盆移栽。

3 小结与讨论

3.1 外植体供体植株的年龄、发育阶段、生长环境和外植体取材部位可导致外植体生理生化状态差异,从而影响组织培养的形态发生^[7],同时从盆栽的植株直接采摘的嫩枝,经消毒处理也会有部分污染而影响试验结果,且消毒液易使幼嫩组织受伤而影响其分化。因此,本试验采用带腋芽的茎节和茎尖培养获得无菌苗作为外植体,使得试验在相同水平下进行,减少了误差。

3.2 适时、适量地选用适宜的植物激素,是外植体成功诱导的关键技术。曾幼玲^[8]、崔月玲^[9]等采用 MS + 6-BA + NAA 等诱导龙翅海棠叶片产生不定芽,诱导率为 94%。本试验发现芽分化激素组合 KT + IAA 优于 6-BA + NAA,最佳丛芽诱导培养基为 MS + KT 0.5 mg/L + IAA 0.2~1.0 mg/L,诱导率为 100%。

3.3 为了加快繁殖速度和尽快增大繁殖量,可以

在苗刚分化时就切割继代,而无需待苗长到很大时才进行继代,同时可以间隔较长的时间继代,既可以维持一定的繁殖量,又可提高组培苗产量的。芽增殖培养基是在芽诱导培养基的基础上,对 KT 和 IAA 设浓度梯度分别配组,筛选出最适继代增殖培养基为 MS + KTO.5 mg/L + IAA0.2 mg/L。

3.4 生根研究中发现,琼脂浓度对龙翅海棠组培苗的生长和不定根的生长有一定影响,半固化培养基有利于根系的早发和提高苗的质量。

参考文献

- [1] 洪亮,李枫,高林.龙翅海棠的繁殖技术[J].花木盆景:花卉园艺,2006(2):11.
- [2] 杨开太,余汉雄.龙翅海棠的生长特性与繁殖技术[J].广西林业科学,2003,32(4):219-222.
- [3] 达克东,张松,李雅志,等.苹果离体叶片培养直接体细胞胚胎发生研究[J].园艺学报,1996,23(3):241-245.
- [4] 程家琴,胡玉欣.斑叶竹节海棠的离体快速繁殖研究[J].河南大学学报:自然科学版,1996,26(2):71-75.
- [5] 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,1997,33(5):358-359.
- [6] 黄燕芬,范成五,唐丽,等.组织培养快速繁殖龙翅海棠[J].种子,2004,23(4):41-42.
- [7] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1997.
- [8] 曾幼玲,王越铭,张富春.龙翅海棠的组织培养[J].新疆农垦科技,2006(4):29.
- [9] 崔月玲.龙翅海棠离体培养技术研究[J].山东林业科技,2007(3):22-23,79.

(责任编辑:林树文)