

白萼吊钟海棠的组织培养与快速繁殖

顾福根, 陈瑞卿, 万志刚, 孙丙耀

(苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 以带节茎段为外植体进行了白萼吊钟海棠(*Fuchsia alba-coccinea* Hort.)的组织培养和快速繁殖研究,对外植体的灭菌方法以及在试管苗增殖和生根培养过程中不同浓度的激素配比进行了筛选,同时研究了抑制试管苗褐化和玻璃化的方法。结果表明,最适宜白萼吊钟海棠外植体灭菌的方法是用0.1% HgCl₂处理4~6 min;MS培养基中不加NH₄NO₃可完全消除试管苗玻璃化现象;MS培养基中加入1.0 g·L⁻¹ PVP,可基本抑制试管苗褐化;试管苗增殖的最佳培养基为含0.8 mg·L⁻¹ 6-BA、0.10 mg·L⁻¹ NAA和1.0 g·L⁻¹ PVP的MS培养基;试管苗生根的最适培养基为含0.1~0.2 mg·L⁻¹ NAA和1.0 g·L⁻¹ PVP的1/2 MS培养基。

关键词: 白萼吊钟海棠;组织培养;玻璃化;褐化

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2006)03-0055-05

Tissue culture and rapid propagation of *Fuchsia alba-coccinea* Hort. GU Fu-gen, CHEN Rui-qing, WAN Zhi-gang, SUN Bing-yao (College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(3): 55-59

Abstract: By using explants of stem fragments with nodes, the tissue culture and rapid propagation of *Fuchsia alba-coccinea* Hort. were carried out. The results showed that the optimal time for surface-sterilization of explants with 0.1% HgCl₂ was 4-6 min. The best multiplication effect could be achieved when induced in medium MS containing 0.8 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.10 mg·L⁻¹ NAA and 1.0 g·L⁻¹ PVP. The best effect was appeared when shoots rooted on medium 1/2 MS with 0.1-0.2 mg·L⁻¹ NAA and 1.0 g·L⁻¹ PVP. The vitrifying of plantlets could be completely controlled when NH₄NO₃ was removed from medium MS. The browning of plantlets could be generally controlled when 1.0 g·L⁻¹ PVP was supplemented into medium MS.

Key words: *Fuchsia alba-coccinea* Hort.; tissue culture; vitrifying; browning

白萼吊钟海棠(*Fuchsia alba-coccinea* Hort.)又名白萼倒挂金钟,为柳叶菜科(Onagraceae)倒挂金钟属(*Fuchsia* L.)亚灌木植物,原产美洲热带,因其具有大型的纯白色花萼和红色花瓣而极具观赏性,是著名的观赏花卉。倒挂金钟属植物结实率低,主要采用枝条进行扦插繁殖^[1,2]。利用组织培养技术进行观赏花卉的快速增殖已经逐渐受到关注^[3-7]。王泽钧^[8]和冷肖荀等^[9]对倒挂金钟的组织培养进行了初步研究。但是,迄今尚无有关白萼吊钟海棠组织培养的相关报道。为了克服种子繁殖过程中结实率低,扦插等营养繁殖过程中繁殖系数低、繁殖周期长等方面的局限性,笔者在对白萼吊钟海棠组织培养各环节进行探索的基础上,获得了一整套适用于白萼吊钟海棠的组培快繁技术以及防止组培苗褐化和玻璃化的方法,从而为通过组织培养方法提高白萼吊钟海棠的繁殖速度奠定了技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用白萼吊钟海棠品种为垂枝型,花色粉红,萼筒白色,购自苏州市花鸟市场。以当年生枝条的带节茎段为外植体^[8]。

1.2 培养条件

以MS培养基为基本培养基,生根培养时则采用1/2 MS培养基。培养基中含30 g·L⁻¹蔗糖、6.0 g·L⁻¹琼脂粉,pH 5.8。

收稿日期: 2005-12-30

基金项目: 苏州市农业科技发展计划攻关项目(SNZ-0305)

作者简介: 顾福根(1964-),男,江苏苏州人,本科,讲师,主要从事植物学教学及植物组织培养研究。

培养温度(25 ± 2)℃,光照时间 12 h · d⁻¹,光照强度 24 ~ 30 μmol · m⁻² · s⁻¹。

1.3 方法

1.3.1 外植体的无菌处理 剪取当年生枝条,用刀片切去叶片,在节间中部切开成带节茎段,即为组培用外植体。将外植体分成6组,每组约40个。用洗洁精500倍稀释液清洗5 min,然后用自来水流水冲洗约1 h,蒸馏水漂洗2次,以0.1% HgCl₂为表面灭菌剂分别灭菌处理2、4、6、8、10和12 min,无菌水漂洗4~5次,接种在含有1.0 mg · L⁻¹ 6-BA、0.1 mg · L⁻¹ NAA和0.1 mg · L⁻¹ GA₃的MS启动培养基上,每瓶接种1个外植体。14 d后统计各组的无菌外植体成活率,获得最适灭菌时间。

1.3.2 抑制试管苗褐化的实验 在含有1.0 mg · L⁻¹ 6-BA和0.1 mg · L⁻¹ NAA的MS培养基中分别加入浓度均为1.0 g · L⁻¹的Na₂S₂O₃、PVP、柠檬酸(Citric acid)、Vc和活性炭(Activated carbon, AC)等抗褐化剂^[7,10],将白萼吊钟海棠的无菌苗分别接种在含上述5种抗褐化剂以及不含抗褐化剂(对照)的培养基上,每组接种无菌苗20株,每瓶接种2株。14 d后观察各培养基中试管苗的褐化情况,筛选出能有效抑制白萼吊钟海棠试管苗褐化的抗褐化剂。

1.3.3 增殖培养基的筛选 在MS培养基中分别加入0.3、0.5、0.8、1.0和2.0 mg · L⁻¹ 6-BA以及0.05、0.10和0.20 mg · L⁻¹ NAA,共15个培养基组合,加入已筛选出的抗褐化剂,接入无菌苗,每组接种无菌苗20株,每瓶接种2株。培养28 d后,从每组中随机取出5瓶,统计各组的增殖率^[3]、苗高等指标,筛选出增殖系数较高、丛生苗生长健壮的最适增殖培养基及生根前的壮苗培养基。

1.3.4 抑制试管苗玻璃化的实验 以筛选出的增殖培养基为基本培养基,分别改变培养基中蔗糖、琼脂和无机盐的浓度,并以基本培养基作为对照,比较各种培养条件下试管苗的玻璃化情况^[5]。每组接种无菌苗100株,每瓶接种5株。

1.3.5 生根培养基筛选 以加入抗褐化剂的1/2 MS培养基作为基本培养基,分别加入0、0.1、0.2、0.5和1.0 mg · L⁻¹ NAA,接入无菌苗^[11],每种培养基上接种60株无菌苗,21 d后统计各组的生根数、根长势、根长及苗长势,筛选出最适的生根培养基。

1.3.6 炼苗与移栽 试管苗根长约5 mm后进行

炼苗移栽,30 d后统计成活率。

1.4 非量化指标的评判标准

1.4.1 褐化程度 以对照组的褐化程度为中度,如褐化程度轻于对照组,则依次分为较轻、很轻、无褐化等等级;如褐化程度重于对照组,则依次分为较重、很重、严重等等级。

1.4.2 长势 以对照组的生长状况为一般,长势好于对照组的,则分为较好、很好等等级;长势较对照组差的,则分为较差、很差等等级。

1.4.3 玻璃化苗统计方法 将未分割的丛生苗统计为1株,不论其中1株或数株丛生苗出现玻璃化,均将该丛生苗统计为玻璃化苗。

2 结果和分析

2.1 外植体的最佳灭菌方法与效果

以0.1% HgCl₂为灭菌剂,对白萼吊钟海棠的外植体表面灭菌2~12 min,14 d后统计灭菌效果,结果见表1。

由表1可知,随着灭菌时间的增加,外植体的污染率逐渐下降,灭菌10 min以上,外植体无污染,但随着灭菌时间的增加,外植体的死亡数逐渐增加,外植体的褐化程度也有加重趋势。从最终获得无菌存活外植体的情况来看,处理6 min的灭菌效果最佳,存活的无菌外植体达到61.8%;处理4 min的灭菌效果次之。因此可以认为,用0.1% HgCl₂对白萼吊钟海棠当年生茎段进行表面灭菌的适宜时间为4~6 min。

2.2 抗褐化剂的筛选

在含有1.0 mg · L⁻¹ 6-BA和0.1 mg · L⁻¹ NAA的MS培养基中分别加入5种抗褐化剂,将无菌苗接种培养14 d后观察比较试管苗的褐化情况,结果见表2。

表2显示,加入1.0 g · L⁻¹ Na₂S₂O₃后无菌苗的萌芽数及萌出芽的长势均与对照组相近,但褐化情况比较严重;加入1.0 g · L⁻¹ PVP、1.0 g · L⁻¹ 柠檬酸或1.0 g · L⁻¹ Vc均对无菌苗的褐化起明显抑制作用,且萌芽数相近,其中PVP处理组对褐化的抑制作用及萌出芽长势均明显优于另外2组;加入1.0 g · L⁻¹ 活性炭后,褐化情况难以观察,但试管苗长势略差于PVP处理组。因此,综合对比后可看出,加入1.0 g · L⁻¹ PVP对白萼吊钟海棠试管苗褐

化的抑制作用效果最佳。

2.3 增殖培养基的筛选

改变增殖培养基中6-BA和NAA的浓度,培养28d后,白萼吊钟海棠丛生苗的苗高、丛芽数和增殖系数见表3。

观察结果及表3统计数据表明,当6-BA浓度

较高(1.0~2.0 mg·L⁻¹)时,丛生苗较矮,繁殖系数较高,丛生侧枝紧密成球状,但往往因枝叶过于茂盛而使丛生苗基部脱离培养基,致使丛生苗生长受到影响;6-BA浓度较低(0.3~0.5 mg·L⁻¹)时,丛生侧枝较疏,繁殖系数较低,不利于增殖;当6-BA浓度为0.8mg·L⁻¹时,繁殖系数适中,丛生

表1 0.1% HgCl₂不同处理时间对白萼吊钟海棠茎段灭菌效果的比较(接种14d后)

Table 1 Effects of different times of 0.1% HgCl₂ treatment on sterilization of *Fuchsia alba-coccinea* Hort. explants (14 d after inoculation)

灭菌时间/min Sterilization time	外植体数量 Number of explant	污染外植体数 Number of contaminated explant	死亡外植体数 Number of died explant	外植体存活数 Number of survival explant	外植体存活率/% Survival rate of explant	外植体褐化程度 Browning degree of explant
2	37	19	2	16	43.2	中度 Moderate
4	31	10	4	17	54.8	中度 Moderate
6	34	2	11	21	61.8	中度 Moderate
8	45	3	20	22	48.9	中度 Moderate
10	30	0	19	11	36.7	较重 Relatively serious
12	40	0	26	14	35.0	较重 Relatively serious

表2 不同种类抗褐化剂抑制白萼吊钟海棠试管苗褐化效果的比较(接种14d后)

Table 2 Effects of different inhibitors on browning level of *Fuchsia alba-coccinea* Hort. plantlets (14 d after inoculation)

抑制剂种类 Type of inhibitor	接种无菌苗株数 Number of inoculated sterile shoot	褐化程度 Browning level	萌出侧芽总数 Total number of axillary bud	试管苗长势 Growing performance of plantlet
对照 CK	20	中度 Moderate	28	一般 General
1.0 g·L ⁻¹ PVP	20	很轻 Very gentle	35	很好 Excellence
1.0 g·L ⁻¹ Na ₂ S ₂ O ₃	20	严重 Serious	27	一般 General
1.0 g·L ⁻¹ citric acid	20	较轻 Gentle	33	较差 Worse
1.0 g·L ⁻¹ Vc	19	较轻 Gentle	32	一般 General
1.0 g·L ⁻¹ activated carbon	20	无 Unobservable	32	较好 Better

表3 增殖培养基中不同浓度6-BA和NAA对白萼吊钟海棠试管苗生长的影响(接种28d后)

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA in multiplication culture medium on growth of *Fuchsia alba-coccinea* Hort. plantlets (28 d after inoculation)

培养基编号 No. of medium	激素浓度/mg·L ⁻¹ Conc. of phytohormone		统计苗数 Counted number of inoculated shoot	平均株高/mm Average height	丛芽总数 Amount of tufted bud	增殖系数 Multiplication coefficient
	6-BA	NAA				
1	2.0	0.05	10	15	181	18.1
2	2.0	0.10	10	18	141	14.1
3	2.0	0.20	10	20	150	15.0
4	1.0	0.05	10	16	116	11.6
5	1.0	0.10	10	21	105	10.5
6	1.0	0.20	10	22	89	8.9
7	0.8	0.05	10	15	82	8.2
8	0.8	0.10	10	21	81	8.1
9	0.8	0.20	10	23	82	8.2
10	0.5	0.05	10	16	75	7.5
11	0.5	0.10	10	22	79	7.9
12	0.5	0.20	10	23	63	6.3
13	0.3	0.05	10	17	44	4.4
14	0.3	0.10	10	22	41	4.1
15	0.3	0.20	10	24	38	3.8

侧枝紧密适中,便于丛生苗分割操作。当6-BA浓度为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,试管苗株高随NAA浓度($0.05 \sim 0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的增加而增加,但NAA浓度为 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时试管苗较细,因此,NAA浓度以 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜。综上所述,增殖培养基中加入 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA对白萼吊钟海棠丛生苗的增殖效果较佳。

在含 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基中,尽管试管苗的增殖系数不高,但从生苗长势均匀,高度一致,可作为生根前的壮苗培养基。

2.4 试管苗玻璃化的抑制方法筛选

以含 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP、3%蔗糖和0.6%琼脂的MS培养基为基本培养基,改变其中某一成分的浓度,28 d后统计试管苗玻璃化情况,结果见表4。

由表4可看出,蔗糖和琼脂浓度的增加均能明显减轻试管苗玻璃化的程度,降低培养基中蔗糖和琼脂浓度均能加重试管苗的玻璃化程度;MS的加倍对试管苗的玻璃化几乎无影响;MS培养基中不添加 NH_4NO_3 ,可完全消除试管苗玻璃化现象,且苗的长

表4 培养基成分的改变对白萼吊钟海棠试管苗玻璃化的影响(接种28 d后)

Table 4 Effects of culture medium composition changes on vitrifying of *Fuchsia alba-coccinea* Hort. plantlets (28 d after inoculation)

处理组 Treatment group	接种苗数 Number of inoculated shoot	玻璃化株数 Number of vitrified shoot	玻璃化率/% Percentage of vitrified shoot
CK	100	12	12
2 MS	100	11	11
1.5% sucrose	100	15	15
6.0% sucrose	100	4	4
0.4% agar	100	18	18
0.8% agar	100	5	5
Unadding NH_4NO_3	100	0	0

势良好。

2.5 生根培养基筛选

以含 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP的1/2 MS为基本培养基,分别加入0、0.1、0.2、0.5和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA,将增殖产生的丛生苗分别转接于上述生根培养基上,约11 d后,有嫩黄的根原基出现,以后以每天约3 mm的速度生长,21 d后观察统计生根情况,结果见表5。

表5 生根培养基中不同浓度NAA对白萼吊钟海棠试管苗生根的影响(接种21 d后)

Table 5 Effects of different concentrations of NAA in rooting culture medium on rooting of *Fuchsia alba-coccinea* Hort. plantlets (21 d after inoculation)

NAA浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of NAA	接种苗数 Number of inoculated shoot	平均每苗生根数 Average root number	平均根长/mm Average root length	根的长势 Growing performance of root	苗的长势 Growing performance of shoot
0.0	60	5.0	30	一般 General	一般 General
0.1	60	6.7	32	很好 Excellence	很好 Excellence
0.2	60	7.3	29	一般 General	较好 Better
0.5	60	7.5	31	一般 General	一般 General
1.0	60	6.3	30	较差 Worse	一般 General

由表5可知,NAA浓度达 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,尽管试管苗生根数不是最多,但根和苗的长势却较好;NAA浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,试管苗的根和苗的长势较前者稍差,但生根数比前者多。因此,白萼吊钟海棠试管苗生根的最适培养基为含 $0.1 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA和 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP的1/2 MS培养基。

2.6 炼苗与移栽

在试管苗根长约5 mm时,打开瓶盖炼苗2~3 d,洗去根部附着的培养基,移栽到含基质[V(珍珠岩):V(草炭土):V(菜园土)=1:1:1]的穴盘中。移栽后的前2天保持相对湿度85%以上,温度 20°C ~

28°C ,以后逐渐过渡到自然的温湿条件下。30 d后观察统计,成活率均达到95%。

3 讨论

3.1 白萼吊钟海棠的组织培养与快速繁殖体系

通过对白萼吊钟海棠组织培养与快速繁殖各环节的探索研究,掌握了外植体的处理方法,筛选出了比较合适的增殖和生根培养基,试管苗移栽成活率达到95%以上,组织培养与快速繁殖的体系已基本建立,但是有些环节还有待进一步优化。采用 HgCl_2

作为外植体的表面灭菌剂,灭菌效果良好,但 HgCl_2 对外植体的褐化有促进作用,应在表面灭菌剂种类的选用及灭菌方法上作进一步的探讨。在增殖培养基的筛选时,只使用了 6-BA 和 NAA 2 种常用激素,筛选出的增殖培养基能较好地实现增殖培养。选用或再加进其他种类的激素是否能获得更好的增殖效果,有待进一步研究。

3.2 白萼吊钟海棠试管苗玻璃化的控制

Phan 等^[12]认为, NH_4^+ 过多会毒害与木质素合成相关的酶。MS 培养基中 NH_4NO_3 浓度高达 $1.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 可能引起白萼吊钟海棠体内相关酶的活性降低,从而影响到木质素的合成,进而导致粗纤维含量下降,细胞壁膨压下降,水势降低,细胞吸水过多而发生玻璃化。采用不含 NH_4NO_3 的 MS 培养基,降低了培养基中的铵态氮以控制白萼吊钟海棠试管苗的玻璃化,从增殖培养的前 6 代来看,试管苗没有出现玻璃化现象,生长良好。

3.3 白萼吊钟海棠试管苗褐化的抑制

褐化是植物组织培养中的常见问题,由于切割使组织受到伤害,酚类化合物外溢,在多酚氧化酶作用下,被氧化成醌类物质,进一步与植物组织中蛋白质发生聚合,导致整个组织代谢紊乱,甚至死亡。在培养基中加入适宜的抗褐化剂,能有效控制褐化的发生^[7,13]。目前,植物组织培养中采用的抗褐化剂主要有 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、Vc 等抗氧化物质和活性炭、PVP 等吸附剂^[13],但不同的抗褐化剂对不同植物种类的抗褐化效果存在差异。张卫芳等发现^[14],培养基中加入 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 能较显著地抑制核桃 (*Juglans regia* L.) 外植体的褐变;而周俊辉等^[15]在进行红星凤梨 (*Guzmania minor*) 的组织培养时,在培养基中加入 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 没有取得显著的抗褐化效果;张明文等^[16]则发现培养基中加入 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭可显著抑制银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 组织褐化,抗褐化效果明显优于 PVP 等吸附剂。

本实验结果表明, $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 可显著抑制白萼吊钟海棠组织培养过程中的褐化现象;而采用 Na_2

S_2O_3 处理不但没有抗褐化作用,相反地还在一定程度上促进白萼吊钟海棠的褐化。因此,对于白萼吊钟海棠而言,PVP 是较适宜的抗褐化剂。

参考文献:

- [1] 北京林业大学园林学花卉教研组. 花卉学[M]. 北京:中国林业出版社,1990. 548-550.
- [2] 徐玲娜,杨青贤,于爱霞. 倒挂金钟的扦插繁育技术[J]. 山东林业科技,2006(2): 61.
- [3] 陈英,王光萍,诸葛强,等. 香石竹叶片离体再生体系的建立[J]. 植物资源与环境学报,2005,14(1): 16-19.
- [4] 李云,田砚亭,罗晓芳. 珠美海棠试管苗玻璃化发生机理的初步研究[J]. 北京林业大学学报,1996,18(1): 53-57.
- [5] 张宏志,唐前瑞,周朴华. 观赏植物试管苗玻璃化现象及防止研究进展[J]. 湖南农业大学学报,2000,26(4): 318-322.
- [6] 张燕玲,姚军,王润珍,等. 满天星组织培养中克服玻璃化现象的初探[J]. 广西植物,1997,17(3): 246-248.
- [7] 周俊辉,周家容,曾浩森,等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报,2000,27(增刊): 481-486.
- [8] 王泽钧. 倒挂金钟组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯,1981(5): 35.
- [9] 冷肖肖,王青华. 倒挂金钟的组织培养[J]. 河北林业科技,2001(2): 14.
- [10] 徐振彪,傅作申,原亚萍,等. 植物组织培养过程中的褐化现象[J]. 国外农学-杂粮作物,1997(1): 55-56.
- [11] 高贵珍,张兴桃,刘小阳,等. 三角紫叶酢浆草的组织培养与快速繁殖[J]. 植物资源与环境学报,2004,13(1): 62-63.
- [12] Phan C T, Hegedus P. Possible metabolic basis for the developmental anomaly observed in *in vitro* culture, called "vitreous plants" [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1986(6): 83-94.
- [13] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯,1999,35(6): 501-506.
- [14] 张卫芳,高疆生,欧勇慧,等. 核桃组培中抑制褐化现象初探[J]. 中国农学通报,2003,19(5): 43-46.
- [15] 周俊辉,王国彬,曾浩森. 观赏凤梨嫩吸芽离体培养中褐化防止的初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报,2000,13(1): 5-9.
- [16] 张明文,陈力耕. 银杏组织培养中控制褐化的研究[J]. 中国南方果树,2003,32(3): 51-52.