

三角梅两种植株再生途径丛生芽增殖比较研究

叶 顶 英

(四川农业大学 风景园林学院, 四川 温江 611130)

摘 要:以紫花三角梅和紫红重瓣三角梅为外植体,进行丛生芽增殖比较研究,以期筛选出丛生芽诱导和增殖的最佳培养基。结果表明:愈伤组织丛生芽增殖最佳培养基为 MS+BA 2.0 mg/L(2.5 mg/L)+IBA 0.2 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L,增殖系数达 7.7 以上;侧芽途径丛生芽的增殖最佳培养基为 MS+BA 3.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L,增殖系数达 4.0 以上。考虑生产成本和生产周期,侧芽途径优于愈伤组织途径。

关键词:三角梅;植株再生途径;丛生芽增殖

中图分类号:Q 949.745.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)08-0164-03

三角梅(*Bougainvillea glabra*)为紫茉莉科叶子花属常绿木质大藤本植物,属观花树木中的观花灌木类,是重要的观赏花卉和优良的园林绿化植物。

该试验以紫花三角梅(*B. glabra* cv. Paper flower)和紫红重瓣三角梅(*B. spectabilis* Willd)为外植体,进行丛生芽增殖比较研究,以期筛选丛生芽诱导和增殖的最佳培养基,探索通过组织培养加快三角梅繁殖速度的有效途径,并最大限度的降低成本,提高繁殖系数,为三角梅试管苗工厂化生产提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为盆栽紫花三角梅和紫红重瓣三角梅。

1.2 试验方法

选取三角梅生长健壮、无病虫害的半木质化枝条,半木质化茎除去叶,留一小段叶柄,切割成 5~8 mm 后,用洗洁精浸泡 10 min,自来水冲洗 15~20 min,将茎段置于 75%酒精中浸没 30 s,再用 0.1% 升汞溶液浸泡 6~7 min,无菌水冲洗 5 次后,置于无菌滤纸上,吸干表面水分,接种于诱导培养基上。诱导培养基以 MS、1/2MS、2MS 为基本培养基,再添加不同浓度生长调节剂,采用 6-BA、IBA、琼脂 0.7%、蔗糖 3%。培养条件为:昼温 26℃,夜温 24℃,湿度 80%,光强 1 500~2 000 lx,16 h/d。每处理接种 30 个外植体,通过 40~50 d 的初带培养,得到大量的愈伤组织和不定芽,再以 2 种中间繁殖体为材料分别接种于 2 种继代培养基上(表 1、7),以研究不同培养基对丛生芽诱导和增殖的影响。每试管接种 1 个外植体,每处理每次接种 10 管,3 次重复。

作者简介:叶顶英(1976-),女,硕士,讲师,现主要从事园林植物应用研究工作。E-mail: yege2003@126.com。

收稿日期:2010-10-26

2 结果与分析

2.1 愈伤组织丛生芽增殖

2.1.1 培养基对愈伤组织丛生芽增殖的影响 以初代培养所获得的愈伤组织,接种于愈伤组织丛生芽途径继代增殖培养基上。经过 40 d 的继代培养,大部分愈伤组织上有丛生芽分化,100 d 后,其增殖系数达到最大,最多的可达 7.7 以上。分别统计 60、80、100 d 丛生芽的增殖系数(表 1)。通过对芽的增殖系数进行方差分析(表 2)结果

表 1 培养基对愈伤组织丛生芽途径继代增殖的影响

处理编号	基本培养基	BA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	GA ₃ /mg · L ⁻¹	平均增殖系数
1	1/2MS	1.0	0.0	0	2.6
2	1/2MS	1.5	0.1	1	3
3	1/2MS	2.0	0.2	2	4.1
4	1/2MS	2.5	0.5	3	3.3
5	MS	1.0	0.1	2	4.5
6	MS	1.5	0.0	3	3.9
7	MS	2.0	0.5	1	6.3
8	MS	2.5	0.2	0	7.7
9	1.5MS	1.0	0.2	3	4.0
10	1.5MS	1.5	0.5	2	4.1
11	1.5MS	2.0	0.0	1	5.5
12	1.5MS	2.5	0.1	0	4.8
13	2MS	1.0	0.5	1	5.8
14	2MS	1.5	0.2	0	4.0
15	2MS	2.0	0.1	3	5.4
16	2MS	2.5	0.0	2	3.0

表 2 愈伤组织途径丛生芽增殖系数方差分析

变异原因	自由度	平方和	方差	F 值	F _{0.05(3,32)} = 2.90 F _{0.01(3,32)} = 4.46
重复间	2	0.51	0.26	<1	
因素 A	3	33.39	11.13	39.75**	
因素 B	3	16.48	5.49	19.61**	
因素 C	3	11.21	3.74	13.36**	
因素 D	3	17.26	5.75	20.54**	
误差	32	9.10	0.28		
总和	47	87.95			

注: ** 表示 0.01 显著水平; * 表示 0.05 显著水平。

表明,重复间差异不显著,说明此试验结果具有较好的重现性。其中,因素 A(基本培养基)、因素 B(BA)、因素 C(IBA)、因素 D(GA₃),都呈现极显著的差异性,说明这 4 个因素对三角梅愈伤组织丛生芽的增殖都有显著的影响。因此,有必要对各因素内水平间进行多重比较,采用新复极差测验(表 3~6)得出,MS+BA 2.0 mg/L(2.5 mg/L)+IBA 0.2 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L 为最佳组合,处理 8 为其中组合之一,而处理 8 的增殖系数达 7.7,也证明该组合是所有处理中的最佳组合。

表 3 A 因素 4 水平 LSR 检验

水平	平均值	0.05 水平	0.01 水平
A ₂	5.61	a	A
A ₃	4.60	bc	A
A ₄	4.55	c	A
A ₁	3.26	d	B

注:小写字母表示 5% 差异显著水平,大写字母表示 1% 差异显著水平,字母相同表示差异不显著,下表同。

表 4 B 因素 4 水平 LSR 检验

水平	平均值	0.05 水平	0.01 水平
B ₃	5.33	a	A
B ₄	4.71	ab	AB
B ₁	4.23	b	AB
B ₂	3.74	b	B

表 5 C 因素 4 水平 LSR 检验

水平	平均值	0.05 水平	0.01 水平
C ₃	4.94	a	A
C ₄	4.90	a	A
C ₂	4.43	ab	A
C ₁	3.74	b	A

表 6 D 因素 4 水平 LSR 检验

水平	平均值	0.05 水平	0.01 水平
D ₂	5.50	a	A
D ₁	4.43	bc	AB
D ₄	4.13	c	B
D ₃	3.96	c	B

2.1.2 愈伤组织形态、颜色与丛生芽增殖的关系 在愈伤组织继代培养中发现,一般来说,颜色浅的愈伤组织质地较疏松、突起较明显,生长速度快,其上面芽的诱导增殖率高、生长也快,特别是乳白色的愈伤组织质地最松软,其芽的诱导增殖率最高,其增殖系数可达 10 左右;而颜色深的愈伤组织质地较致密、突起少,其生长缓慢,芽的诱导和增殖率低,黑的愈伤组织质地最为致密,芽的诱导、增殖率最低,有的根本就没芽诱导出来,甚至最后褐化死亡。褐色的愈伤组织介于前二者间,一般芽的增殖系数在 5 左右。愈伤组织之所以呈现出该种从颜色到质地到生长习性的较大差异,原因较复杂,但一般来说,材料的基因型对愈伤组织的形态及其发生有决定性的影响;同一植物的不同器官或组织,不同年龄的外植体产生的愈伤组织可能表现不同;另外还与培养基和培养条件有关^[1]。王海波将愈伤组织分为 3 种类型^[2]:类型 I 结构致密,生长较慢,容易分化成苗,称为保守分裂

型;类型 II 结构松散,生长旺盛,色泽鲜艳,增殖很快,称为亢进分裂型;类型 III 结构疏松,生长缓慢,色泽暗淡,称为衰败型。从三角梅初代培养所获得的愈伤组织来看,乳白色的愈伤组织结构松软,生长速度快,芽的诱导增殖率较高,应该属于类型 I 和类型 II 之间的过渡类型;而褐色的愈伤组织结构较致密,芽的诱导增殖率较小,应属于保守分裂型;而黑色的愈伤组织,结构最为致密,生长缓慢,芽的分化困难,应属于衰败型,这与王海波的分类有些差异。因此,就三角梅愈伤组织芽的分化与增殖而言,乳白色的愈伤组织最佳。

2.2 侧芽途径丛生芽的增殖

以初代培养中产生腋芽的茎段为中间繁殖体,转接于侧芽途径继代增殖培养基上。以 30 d 为周期,在相同培养基上连续转接,3 个月后,统计其丛生芽的增殖系数,结果见表 7。

表 7 培养基对侧芽途径丛生芽的增殖的影响

处理号	培养基	BA/mg · L ⁻¹	IBA/mg · L ⁻¹	平均增殖系数
1	1/2MS	1.0	0.1	1.3
2	1/2MS	2.0	0.2	2.2
3	1/2MS	3.0	0.5	2.8
4	MS	1.0	0.2	2.7
5	MS	2.0	0.5	3.2
6	MS	3.0	0.1	4.1
7	2MS	1.0	0.5	1.9
8	2MS	2.0	0.1	8.1
9	2MS	3.0	0.2	3.7

表 8 继代侧芽的增殖系数方差分析

变异原因	自由度	平方和	方差	F 值	F _{0.05,0.01}
重复间	2	0.067	0.03	1.75	F _{0.05} (2,18) = 3.55
因素 A	2	6.74	3.37	175.28**	F _{0.01} (2,18) = 6.01
因素 B	2	12.01	6.00	312.29**	
因素 C	2	0.22	0.11	5.80*	
误差	18	0.35	0.02		
总和	26	19.39			

注:** 表示 0.01 显著水平,* 表示 0.05 显著水平。

表 9 A 因素 3 水平 LSR 检验

水平	平均值	0.05 水平	0.01 水平
A ₂	3.32	a	A
A ₃	2.76	b	B
A ₁	2.09	c	C

表 10 B 因素 3 水平 LSR 检验

水平	平均值	0.05 水平	0.01 水平
B ₃	3.55	a	A
B ₂	2.70	b	B
B ₁	1.91	c	C

表 11 C 因素 3 水平 LSR 检验

水平	平均值	0.05 水平	0.01 水平
C ₂	2.85	a	A
C ₁	2.68	a	A
C ₃	2.64	a	A

对侧芽途径丛生芽的增殖系数方差分析结果(表 8)表明,重复间差异不显著,因素 A(基本培养基)和因素 B(BA)呈极显著差异,而因素 C(IBA)呈显著差异。说明基

本培养基和 BA 对三角梅侧芽增殖有较大的影响。再对各因素各水平进行新复极差检验(表 9~11)得出,最佳的促进侧芽增殖的组合是处理 6:MS+BA3.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L,而从试验统计结果来看,处理 6 的繁殖系数达 4.0 以上,也证明了处理 6 是侧芽增殖的最佳组合。

3 结论与讨论

三角梅丛生苗的诱导增殖有 2 种途径。一种是在茎段基部形成愈伤组织,再由愈伤组织分化出芽,芽进一步抽长形成丛生苗,该种丛生苗的形成方式被认为是愈伤组织发生型。另一种丛生苗的形成方式是由腋芽直接萌发而成,该类型丛生苗基部一般没有愈伤组织或者愈伤组织为乳白色到褐色松软状,常被认为是腋芽发生型。

产生 2 种增殖途径的原因从形态建成上来看是由于培养基中生长调节物质的种类和浓度的不同影响了植物体内各种激素的水平,导致其形态建成上的发展方向各异^[3]。愈伤组织增殖途径的植株再生过程是:植物组织→愈伤组织→拟分生组织(Meristemoid)→器官原基(Organ primordium)→植株;而腋芽增殖途径,是经过腋芽原基→腋芽→侧生枝这样的过程再生植株,因此,愈伤组织增殖途径是经过外植体脱分化成愈伤组织,再由愈伤组织再分化成植株,是一个从无到有的过程;而腋芽增殖途径是从腋芽原基发育成腋芽,再进一步长成侧生枝最后发育成完整植株,是一个从小到大的过程,因此腋芽增殖途径不经过愈伤组织到器官再生的过程,从而降低了细胞内染色体变异的机率,减少了无性系变异的可能性^[4]。

试验通过愈伤组织丛生芽增殖,一般三角梅的月增殖系数为 5~8(最多的有 10 以上),增殖系数较高,按谭文澄的方法^[5],以 1 a 增殖 12 代计算,按处理 8 平均增殖系数计算,三角梅愈伤组织增殖方式年出苗可达 7.7^{12} ,即 4.34×10^{11} 株;而从侧芽增殖途径看,丛生苗增殖,一般月增殖系数为 3~4 倍,年出苗可达 1.68×10^7 株。因此,从增殖系数看,前者较高。另外,从所得芽苗的质量

来看,愈伤组织途径所得芽苗比较纤弱,必须经过壮苗培养方能生根,且移栽成活率较低;而腋芽增殖途径所得的芽苗,茎叶粗壮,质量较好,可直接生根,且移栽成活率较高。最后,从 2 种途径多次继代后的植株再生能力来看,愈伤组织起初都具有胚胎(或器官)发生潜力,但经过反复继代和保存之后,愈伤组织最初表现的植株再生能力可能逐渐下降,最后甚至完全丧失^[6];而有研究表明,有若干植物应用腋芽增殖方式繁殖小苗的能力可以保持 10~15 a,而且没有出现繁殖功能衰退的现象^[7]。

综合以上分析,对 2 条途径的比较而言,愈伤组织发生途径繁殖系数较高,但所得的有效苗较少,必须进行壮苗培养后才能生根,否则成活率低,而且此途径具有发生变异的危险^[8];而腋芽发生途径变异性小^[9],不经过愈伤组织脱分化阶段和壮苗培养阶段,从而简化了培养程序,而且此途径虽然与上途径相比繁殖系数稍小,但所获得的丛生苗质量好,茎叶粗壮,移栽成活率较高。因此,在实际生产中,考虑到生产成本和生产周期,第 2 种腋芽发生途径丛生芽增殖途径较优。

参考文献

- [1] 朱建华,彭士勇.植物组织培养实用技术[M].北京:中国计量出版社,2002:67-72.
- [2] 李俊明.植物组织培养教程[M].2版.北京:中国农业大学出版社,2002.
- [3] 沈清景.白色叶子花的组织培养[J].植物生理学通讯,1987(3):40.
- [4] 周岩,李保印,赵一鹏.植物组织培养中的体细胞无性系变异[J].河南职业技术师范学院学报,2000,12(4):25-27.
- [5] 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,1991:106-107.
- [6] 李俊明.植物组织培养教程[M].2版.北京:中国农业大学出版社,2002.
- [7] 李宝健,曾庆平.植物生物技术原理与方法[M].长沙:湖南科学技术出版社,1990:345-352.
- [8] 韦三立.花卉组织培养[M].北京:中国林业出版社,2001:8-11.
- [9] 崔德才,徐培文.植物组织培养与工厂化育苗[M].北京:化学工业出版社,2003:101.

Comparative Research on Multiplication of Two Types of Shoots from *Bougainvillea glabra* Micropropagation

YE Ding-ying

(College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Wenjiang, Sichuan 611130)

Abstract: This paper mainly dealt with the comparative research on multiplication of shoots through the organ culture with cv. Paper flower and *B. spectabilis* Willd as explant, in the hope of finding out the best explants medium culture procedure of shoots regeneration and multiplication. The results showed that the multiplication of callus induced shoot clumps: MS+BA2.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L was the best medium. The multiplication rate of shoot clumps could be up to 7.7. The multiplication of side buds: MS+BA 3.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L was the best medium, the multiplication rate of side buds could be up to 4.0. As a result of the comparing of the two shoot clumps multiplication, the method of side buds was superior.

Key words: *Bougainvillea glabra*; plant regeneration methods; multiplication of shoot