

黄斑橡胶榕离体再生体系的建立

刘奕清

(重庆文理学院生命科学系, 重庆 402160)

摘要:以黄斑橡胶榕 (*Ficus robusta* “Yellow spot”) 的顶芽为外植体进行离体培养与植株再生研究。结果表明,黄斑橡胶榕的诱导培养基以 MS+BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹ 为宜;继代增殖以 MS+BA 1.0 mg L⁻¹+NAA 0.05 mg L⁻¹ 为宜,每个外植体可产生 3 个芽;生根培养基以 MS+IBA 0.1 mg L⁻¹+AC 100 mg L⁻¹ 为宜,生根率 96.67%以上。试管苗移栽成活率达到 98%以上。

关键词:黄斑橡胶榕;离体培养;愈伤组织;植株再生

中图分类号:Q943.1

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2006)06-0522-04

In vitro Culture and Plant Regeneration of *Ficus robusta*

LIU Yi-qing

(Department of Life and Science of Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160, China)

Abstract: Callus was obtained from the terminal bud explants of *Ficus robusta* on Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ NAA. Following subculture on MS medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ BA and 0.05 mg L⁻¹ NAA, each explant produced 3 shoots. The frequency of rooting was over 96.67% on MS medium supplemented with 0.1 mg L⁻¹ IBA and 100 mg L⁻¹ AC. The survive rate after transplant reached above 98%.

Key words: *Ficus robusta*; *In vitro*; Callus; Plant regeneration

榕属 (*Ficus*) 是桑科植物种类最多的属,主要分布在热带地区,尤以热带雨林最为集中,其种类多,群体大^[1]。在热带雨林中,榕树不仅体现了热带雨林景观,还为多种动植物提供生态位,在热带雨林的演替中扮演重要角色,是热带雨林生态系统中的一类关键植物。黄斑橡胶榕 (*Ficus robusta*) 是印度象胶榕的彩色变异种,具有叶色艳丽、株形优美、耐暑、耐寒、耐旱、耐贫瘠、耐荫、抗污染、抗病虫、易于移栽及生长快的特点,是美丽奇特的观赏品种,亦是国内外著名的园林和室内观赏植物^[2]。

彩叶植物的种质资源开发及品种培育在我国还处于初级阶段,特别是在重庆三峡库区一带,彩叶乔木品种稀少,园林景观建设需求量大,黄斑橡

胶榕则能满足这种市场需求,对整个花卉市场新品种的引进推广有积极的作用,对美化环境和改善城市园林景观植物色彩结构有重大意义。

黄斑橡胶榕是近年引进选育的观赏性极高的品种,因其叶色美丽,而具有独特的观赏性。目前市场需求量极大,而生产上采用扦插繁殖,但繁殖速度慢,难于满足社会需求。本项研究选用印度橡胶榕的彩色变异种作为研究对象,建立了黄斑橡胶榕的组培快繁技术优化体系,通过顶芽诱导再生植株,能较好的保持其遗传稳定性,为其组培快繁和商品化生产、遗传转化和植物品种定向改良研究提供基础。

收稿日期:2006-05-08 接受日期:2006-08-07

基金项目:重庆文理学院重点课程园林植物建设项目,重庆市教委重点项目(KJ051206)资助

1 材料和方法

1.1 供试材料

黄斑橡胶榕 (*Ficus robusta* “Yellow spot”) 从重庆市永川花卉交易所购买。于温室内培养数月, 采取黄斑橡胶榕正在生长的顶芽作为外植体。

1.2 试验方法

外植体消毒 将采取的顶芽外植体用自来水冲洗 15 min 后, 用 0.5% 洗衣粉溶液浸泡 15 min, 再用自来水冲洗干净。将材料分别放入无菌塑料空杯中, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 再用 0.1% 的升汞消毒 10 min (每杯放 10 个材料), 之后用无菌水冲洗 3–4 次。

分化培养 诱导基本培养基为 MS, 附加激素 BA 和 NAA 的组合设计方案见表 1, 每瓶接种 1 个顶芽, 每个处理接种 30 个外植体。将消毒灭菌后的外植体切取约 0.5 cm 长的顶芽小块, 接种至诱导启动培养基中, 培养 40 d 统计出芽率。培养温度 $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度 2000 Lx 左右, 光照时间为 10–12 h d⁻¹。

增殖培养 在 MS 基本培养基中附加 BA 与 NAA 的不同浓度配比, 试验设计方案见表 2, 每处理 3 次重复。将诱导培养获得的不定芽接种于表 2 的增殖培养基中, 连续继代培养 3 代, 统计其增殖系数和平均苗高。光照 12 h d⁻¹, 光强 2000 Lx, 温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 环境湿度 40%–70%。

生根培养 在 MS 基本培养基中附加 IBA 和活性炭 (AC), 试验设计方案见表 3, 每处理 3 次重复, 每重复接种 10 株 / 瓶。将单株芽苗接种至生根培养基中, 培养 20 d, 统计其生根率, 每株长根的条数。

移栽 当试管苗的根长至 0.5–1 cm 并有 3 至 4 条侧根时, 在温室炼苗 5–6 d, 从杯中取出并洗净培养基, 移栽到盛有基质的育苗盘中, 放置于过渡温室。相对湿度 80%–90%, 温度 20–27 $^{\circ}\text{C}$ 。移植基质配方为泥炭: 珍珠岩 (体积比 9:1)。

试验数据按单因素试验设计相同重复数进行方差分析, 采用 DPS (Data Process System) 软件进行 Duncan 新复极差法检验。

2 结果和分析

2.1 分化培养

把消毒灭菌外植体接种于 MS 附加 BA 和 NAA

的激素组合培养基中进行分化诱导培养, 结果表明, 诱导率为 57.0%–74.3%; 从诱导时间 (天数)、出芽数和诱导率考虑均以 MS+BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.5 mg L⁻¹ 培养基为最好, 与其它处理间存在显著差异, 而其他各处理之间无显著差异。在试验过程中观察到, MS 附加 BA 1.0–3.0 mg L⁻¹ 和 NAA 0.01–0.5 mg L⁻¹ 培养黄斑橡胶榕顶芽外植体, 外植体诱导愈伤组织与 NAA 相关, NAA 浓度越高, 愈伤组织诱导率越大。第 1 周外植体基部开始长雪花状愈伤组织, 第 2 周雪花状愈伤组织增多, 第 3 周雪花状愈伤组织比原顶芽大 3 倍之多, 鞘叶开始脱落, 3 d 后抽出一片新叶, 诱导芽在 MS+BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹ 培养基上生长最好 (叶形舒展, 叶色正常, 芽长势好)

表 1 BA 和 NAA 的浓度对诱导芽的影响
Table 1 Effects of different concentrations of BA and NAA on shoot induction

BA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	外植体数 Number of explants	诱导天数 Induction time(d)	诱导率 Callus induction frequency(%)
1.0	0.01	30	35.0	57.0
1.0	0.10	30	31.5	62.0
1.0	0.50	30	28.0	57.0
2.0	0.01	30	35.0	63.5
2.0	0.10	30	28.0	58.7
2.0	0.50	30	24.5	74.3
3.0	0.01	30	28.0	61.5
3.0	0.10	30	24.5	61.2
3.0	0.50	30	3.5	62.0

同一列后标有相同字母者表示差异不显著 (小写字母, $P<0.05$, 邓肯氏新复极差法)。表 2–3 同。Data followed by the same letters within the column shows no significantly difference (small letter, $P<0.05$) by Duncan's multiple range. The same for Table 2 to 3.

2.2 增殖培养

把获得的无菌芽接种于增殖培养基中 (表 2), 每 25 d 转接继代一次, 研究 BA、NAA 植物生长调节剂的组合对比对黄斑橡胶榕无菌芽增殖的影响。结果表明, 无菌芽萌发可形成 2–3 个 0.5–2 cm 的丛生芽, 增殖系数以 MS+BA 1.0 mg L⁻¹+NAA 0.05 mg L⁻¹ 为最大 (2.56), MS+BA 1.0 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹ 次之 (2.13), MS+BA 0.5 mg L⁻¹+NAA 0.5 mg L⁻¹ 为最小 (1.33), 各处理之间存在显著差异; 苗的平均高度各处理之间没有显著差异。BA 浓度在 0.5–1.5 mg L⁻¹

时,随着浓度的升高,增殖系数先上升再下降。NAA 浓度在 0.05–0.5 mg L⁻¹ 时,随着浓度的增加,增殖系数呈下降的趋势,主要表现为愈伤组织生长量增加,且 NAA 浓度越高,愈伤组织生长量越大,严重时,愈伤组织将整个植株包住,且有水渍状。

试验发现,黄斑橡胶榕在 MS+BA 1.0 mg L⁻¹+NAA 0.05 mg L⁻¹ 上继代培养,前 5 代芽苗生长正常,继代到第 6 代时出现了分离现象。这是继代多次的结果,黄斑橡胶榕保持原种性的正常苗为 95%,全叶转绿为 5%,其变异原因有待进一步深入研究。

表 2 BA 和 NAA 的浓度对增殖的影响

Table 2 Effects of BA and NAA on multiplication of clump shoot

BA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	接种数 Number of explants	增殖系数 Multiplication coefficient	平均苗高 Average height of shoots (cm)
0.5	0.05	30	1.63b	2.9a
0.5	0.10	30	1.53b	2.7a
0.5	0.50	30	1.33b	2.4a
1.0	0.05	30	2.56a	2.8a
1.0	0.10	30	2.13a	2.6a
1.0	0.50	30	1.71b	2.5a
1.5	0.05	30	1.75b	2.6a
1.5	0.10	30	1.61b	2.4a
1.5	0.50	30	1.56b	2.3a

2.3 生根培养

把经过继代培养的黄斑橡胶榕的茎段顶芽接种于表 3 的生根培养基中,研究 IBA 和 AC (活性炭) 的组合对比对再生植株生根的影响。结果表明,各处理间的生根率存在极显著差异(表 3)。以在 MS+IBA 0.5 mg L⁻¹+AC 100 mg L⁻¹ 培养基上培养植株生根率最高(100%),但根的质量较差,为米粒状,这种生根苗较难移栽成活。而在 MS+IBA 0.1 mg L⁻¹+AC 100 mg L⁻¹ 培养基上的生根率次之(96.67%),培养 5–6 d 苗基部开始膨大,8 d 有部分植株形成完整根,10–12 d 形成良好根系。以不添加 IBA 和 AC 的 MS 培养基的生根率最低(5.00%)。

2.4 炼苗与移栽

黄斑橡胶榕属于木本植物,如不充分炼苗,将影响试管苗移栽的成活率,因此,炼苗是移栽成活

的关键环节。将已生根的黄斑橡胶榕试管苗移到遮荫率为 75% 的大棚内炼苗 5–6 d,之后将炼过苗的黄斑橡胶榕试管生根苗取出洗净根部的培养基,并用 0.1% 百菌清的消毒药液浸泡 6 min,按 5 cm×5 cm 株距种植到育苗筛盘,基质为泥炭土 9:珍珠岩 1。注意通风保湿,遮荫及预防病虫害,前 7 d 每天喷水 3–4 次,之后适量浇水,每 7 d 浇灌 0.1% 的 N、P、K 复合肥液一次,成活率达 98% 以上。

表 3 IBA 和活性炭对再生植株生根的影响

Table 3 Effects of IBA and AC on rooting of regenerative plantlet

IBA (mg L ⁻¹)	AC (mg L ⁻¹)	接种数 Number of explants	有根苗数 Number of rooted shoots	根数/株 Number of roots per plantlet	生根率 Frequency of rooting (%)
0.0		60	3Bb	1–2	5.00
0.1	100	60	58Aa	4–5	96.67
0.5	100	60	60Aa	4–5	100.00

3 讨论

影响植物离体培养与植株再生的因素很多,其中确定适宜的外植体类型即供体细胞及其生理状态与培养基成分和浓度最为关键,直接决定着器官分化的模式和程序^[3-4]。顶芽和腋芽是植物组织培养常用的 2 种外植体,试验结果表明以黄斑橡胶榕顶芽为外植体的诱导成功率高,是较理想的外植体。由于橡胶榕体内白色乳汁较多,因此在采取顶芽时动作要迅速,将切下的顶芽(伤口向下)放在预先准备好的无菌水中呈半浸泡状态,使其流出的汁液不致凝固而影响后期消毒。

最优化的增殖体系不但要求有较高的增殖率,而且还要有正常的形态、颜色以及便于转接所需要的植株茎高^[5-6]。细胞分裂素与生长素结合使用时,若生长素的浓度较高,则有利于细胞的增殖和根的分化;若细胞分裂素的浓度较高时,则促进芽的分化^[7-8]。黄斑橡胶榕无菌芽的增殖以 MS+BA 1.0 mg L⁻¹+NAA 0.05 mg L⁻¹ 培养基为宜,既有较高的增殖系数,又有较好的植株茎高,且叶形、叶色正常。在生根培养基中附加活性炭(AC) 100 mg L⁻¹ 有利于提高植株根系的品质,从而提高试管苗移栽的成活率。

榕树及彩叶植物的组织培养在国外很早就有研究,并取得成功^[10-11],但国内近年才陆续有琴叶榕、印度橡胶榕的组织培养研究,潘志斌^[12]报道了琴叶榕的组织培养及快速繁殖。本研究是选用印度橡胶榕的彩色变异种作对象,根据前人经验,选择顶芽为外殖体,建立了一套离体再生和克隆快繁体系。

参考文献

- [1] Wei Z D (魏作东), Yang D R (杨大荣). Function of *Ficus* in tropical rainforest system in Xishuangbanna [J]. Chin J Ecol(生态学杂志), 2005, 24(3): 233-237. (in Chinese)
- [2] 罗泽榕, 庄雪影. 浅论榕属植物在岭南园林中的应用 [J]. 广东园林, 2004, (3): 30-33.
- [3] 熊丽, 吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [4] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001. 36-190.
- [5] Liu Y Q (刘奕清), Wang D P (王大平). Tissue culture and rapid propagation of *Eucalyptus urophylla* × *E. tereticornis* [J]. J Southwest Agri Univ (Nat Sci)(西南农业大学学报自然科学版), 2005, 27(2): 237-239. (in Chinese)
- [6] Liu Y Q (刘奕清), Wang D P (王大平), Xiong Y H (熊运海). *In vitro* culture and rapid propagation of 'T13' (*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*) [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2005, 32(4): 672-673. (in Chinese)
- [7] Chen G F (陈桂芳), Lou L H (娄利华). Research of the techniques for rapid propagation and tissue culture of *Acacia dealbata*. [J]. J Southwest Agri Univ(西南农业大学学报), 2004, 26(2): 195-197. (in Chinese)
- [8] Liu Q Z (刘庆忠), Zhao H J (赵红军). Micropropagation of dwarf rootstocks of sweet cherry [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2001, 37(3): 236-237. (in Chinese)
- [9] Liu Y Q (刘奕清), Wang D P (王大平). Studies on optimize of *in vitro* culture and plant Regeneration of anthurium andraeanum "Valentino" [J]. J Southwest Agri Univ (Nat Sci)(西南农业大学学报自然科学版), 2005, 27(5): 612-615. (in Chinese)
- [10] Park S Y, Murthy H N, Paek K Y. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis* [J]. Plant Cell, Tiss Org Cul, 2000, 63: 67-73.
- [11] Ahmed E U, Hayashi T, Yazawa S. Auins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants [J]. Sci Hort, 2004, 100: 153-159.
- [12] 潘志斌, 刘彤. 琴叶榕的组织培养及快速繁殖 [J]. 石河子科技, 2004, (4): 23-24.