

利用仙客来种苗组培快繁建立单株无性系的研究^{*}

曲复宁¹, 由翠荣¹, 康黎芳², 龚雪琴¹, 张敏¹, 王云山²

(1 烟台大学 生化系, 山东 烟台 264005; 2 山西省农业科学院 园艺研究所, 山西 太原 030031)

[摘 要] 利用仙客来(*Cyclamen persicum*) 种苗进行组培快繁建立良种无性系, 对初培养、继代、生长及生根各时期的适宜配方进行了研究, 并对继代期间不定芽分化等进行了数量性分析。结果表明: 在初培养时, 6-BA 和 2, 4-D 的配合对不定芽的分化启动是必须的。在继代过程中, 激素、不同品种和单株对芽分化能力和苗再生都有显著影响。在组培苗生根过程中品种间的差异极显著。不定芽生根前经一代生长壮苗后其生根状态及生长状态均优于未经生长直接生根的植株。利用单株种苗建立无性系可成为仙客来无性快繁的一条新路。

[关键词] 仙客来; 组培; 种苗; 单株无性系; 数量性分析

[中图分类号] S682.2⁺62.04⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0081-06

仙客来是冬季重要的盆栽花卉, 因用种子繁殖的原因, 所培育的优良品种后代分离严重, 优良性状很难保持, 观赏价值越高的品种种子生产越困难, 这已成为制约仙客来商品化生产和经济效益的主要因素之一。因此, 通过组织培养建立无性繁殖体系, 保持优良品种的性状, 对于仙客来产业化种苗生产及种质资源保存都具有重要意义。

由于仙客来种性的原因, 进行组培育苗的难度很大。日本自 20 世纪 80 年代开始进行仙客来组织培养无性繁殖的研究^[1~4], 美国、比利时、德国和约旦等国也先后报道了仙客来野生种和杂交单株的组织培养研究^[5~7], 我国先后有傅新生等^[8]、侯喜林^[9]、张方等^[10]对仙客来组织培养进行过研究。但因仙客来的特殊性, 目前我国的仙客来组培工作仍停留在初步探索阶段。本研究旨在从产业化的角度, 利用仙客来种苗, 研究组培育苗的技术路线, 建立优良单株无性快繁体系。

1 材料与方法

1.1 材料与初培养

试验材料为仙客来(*Cyclamen persicum*) 的 3 个大花品种(胜利女神、大红、深红)的实生种子。种子用体积分数 0.1% HgCl₂ 灭菌, 无菌水冲洗后播于 1/2 MS 无激素培养基上暗培养萌发。40 d 后, 当种苗叶柄长至 8~10 cm 时, 将种苗叶柄切段成 5 mm, 分单株接种到初分化培养基上。根据正交预试

结果, 选择了 6 个初培养基配方: ① 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L; ② 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + 2, 4-D 0.5 mg/L; ③ 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + KT 0.2 mg/L + 2, 4-D 0.5 mg/L; ④ 1/2 MS + KT 1 mg/L + 2, 4-D 0.5 mg/L; ⑤ 1/2 MS + 2, 4-D 0.5 mg/L; ⑥ N6 + 6-BA 2 mg/L + KT 0.2 mg/L + 2, 4-D 0.5 mg/L (N6 为无机元素与 MS 不同的培养基)。暗培养 50 d 后, 计数 1 mm 以上不定芽的数量。

1.2 继代培养

根据不定芽发生状况, 将初培养配方中 2, 4-D 撤掉, 形成 1', 2', 3', 4', 4 个配方, 6 号配方撤掉 2, 4-D 为 6 配方, 继续培养 30 d, 记数 1 mm 以上不定芽的数量, 同时观察不定芽发生状态以确定继代配方。对筛选出的正常质量不定芽苗, 分别采用 1/2 MS + 6-BA 2, 1, 0.5 mg/L 的质量浓度, 附加 KT 或否、附加 NAA 或否等几个配方进行连续继代培养。对不同配方中不同品种的连续继代分化能力进行观察, 从胜利女神和深红品种接种株数大于 30 株的单株系列中选取 15 株为统计样本, 对单株间分化能力进行统计分析。并对单株系进行连续 15 次继代扩繁。

1.3 生长和生根试验

在对单株繁殖到一定数量的基础上, 分别对 3 个品种的再生新梢分不同激素和水平、不同品种和单株系列、不同糖源、不同数量叶片和新梢等因素处

^{*} [收稿日期] 2002-11-06

[基金项目] 山东省科技攻关项目(012010121)

[作者简介] 曲复宁(1959-), 女, 山东烟台人, 副教授, 主要从事植物生理和生物技术研究。

理, 进行生长和不定根发生的试验。生长配方为:

G₁, 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L;

G₂, 1/2 MS + 6-BA 0.4 mg/L + NAA 0.04 mg/L;

G₃, 1/2 MS + 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.03 mg/L;

G₄, 1/2 MS + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.02 mg/L;

G₅, 1/2 MS + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.01 mg/L;

G₆, 1/2 MS + 6-BA 0.1 mg/L。生长30 d, 计数新梢生长势和叶片伸展情况。

生根配方为: R₁, 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L; R₂, 1/2 MS + BA 0.5 mg/L; R₃, 1/2 MS + BA 0.3 mg/L; R₄, 1/2 MS + NAA 0.3 mg/L; R₅, 1/2 MS + BA 0.2 mg/L + NAA 0.3 mg/L; R₆, 1/2 MS + BA 0.2 mg/L + NAA 0.3 mg/L (1/2 MS 为 MS 无机元素半量后硝酸胺再减半), 蔗糖 30 g/L, 琼脂 6.5 g/L, pH 为 5.8。每品种每处理 6 瓶, 每瓶 4~5 株, 重复 2 次。培养到 25 d 时计数每 9 瓶内的生根株率和平均单株根数, 计算平均数和标准差。

1.4 炼苗栽培

将生根瓶苗按品种及单株体系分别进行炼苗栽培, 炼苗基质为纯砾石, 栽培基质为草炭混合基质。经 12 个月正常生长后观察单株体系生物学性状并同母本进行比较。

2 结果与分析

2.1 初培养过程中不定芽的分化

在初培养 20~30 d 后, 3 个品种即有大量的愈伤组织产生。培养 50 d 后, 即产生了大量不定芽(图 1-1)。由表 1 可见, 胜利女神、深红两个品种均以接入③号配方的不定芽分化率最高, 分别为 117.4% 和 44.3%, ②号配方次之。大红品种则表现出接入②号配方的不定芽分化率最高, 为 35.8%, ③号配方次之。通过①, ④, ⑤号配方比较可以看出: 6-BA 和 2, 4-D 的配合对不定芽分化的启动是必须的。培养 50 d 后, 撤掉 2, 4-D, 不定芽进一步分化(图 1-2)。由不同的初代培养基转接于 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + KT 0.2 mg/L 培养基上, 分化能力均高于其他配方(表 1)进一步得出, 6-BA 对于叶柄不定芽的持续分化是必须的, 附加一定比例的 KT 更加有利于不定芽的分化。适宜质量浓度的 2, 4-D 对前期启动组织脱分化是必须的, 但是应及时撤掉, 否则会抑制不定芽的分化。为了比较无机元素的影响, 对大红品种附设了一个⑥号初培养配方和 6 继代配方, 与③和 3 配方相比, 仅为无机元素不同。试验结果表明, 对于相同激素处理, 1/2 MS 比 N6 培养基更适宜仙客来不定芽的分化。

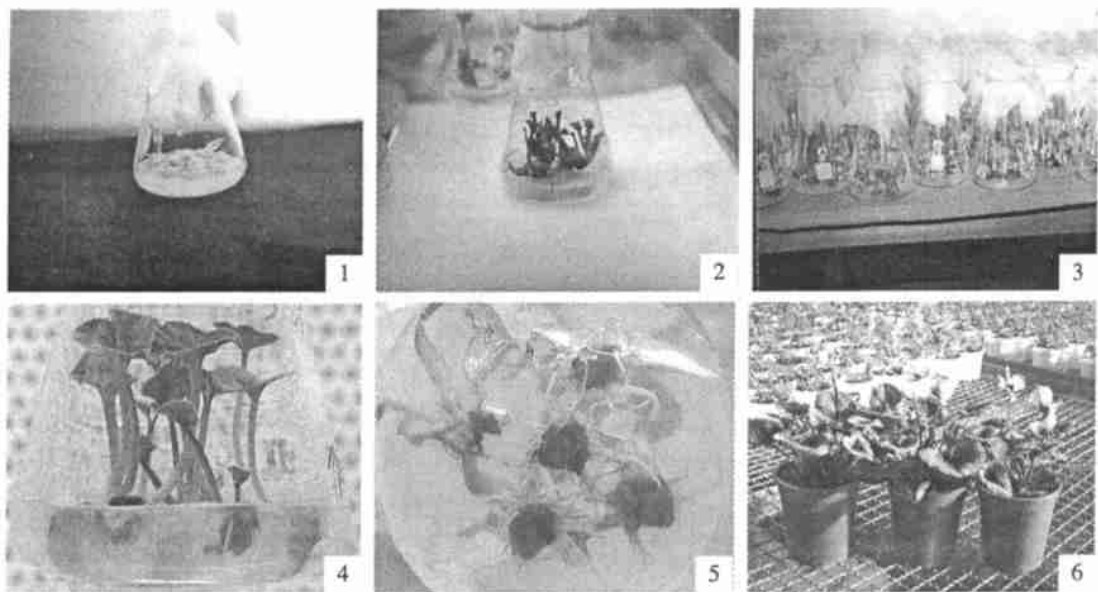


图 1 仙客来组织培养各个时期的状态

1 初培养时期的愈伤形成和少量不定芽; 2~3 继代培养时期不定芽增殖情况; 4~5 试管苗生长及生根; 6 炼苗栽培结果

Fig 1 The character on tissue culture of *Cyclamen persicum*

1 The callus and adventitious buds at primary culture; 2-3 The multiplying of adventitious buds at subcultures;

4-5 The growth and rooting of the plantlets in vivo; 6 The growth and flowering of the plantlets

表 1 不同品种仙客来种苗叶柄不定芽分化率

Table 1 D ifferentiation rate of adventitious buds of different cultivars

品种 Culture	初培养 Primary culture			继代培养 Subculture				
	培养基 M edium	接种块数 No. of inoculations	不定芽分化率/% D ifferentiation rate	培养基 M edium	接种块数 No. of inoculations	不定芽数量 No. of adven- titious bud	不定芽分化率/% D ifferen- tiation rate	
胜利女神 V ictoria	①	56	26.8	1'	24	33	235.7	
				3'	30	86	150.9	
	②	202	88.6	2'	112	165	147.3	
				3'	86	384	446.5	
	③	184	117.4	3'	85	190	223.5	
				3'	96	497	517.7	
	④	88	27.3	4'	24	65	62.5	
				3'	41	80	195.1	
	⑤	93	31.2	3'	80	153	191.3	
	深红 Black red	①	90	0				
②		81	29.6	2'	27	27	100	
				3'	45	172	382.2	
③		88	44.3	3'	30	43	143.3	
				3'	41	139	339	
④		163	13.4	4'	50	2	4	
				3'	38	34	89.5	
⑤		87	8	3'	44	4	9.1	
大红 Bright red		①	84	13.1	1'	26	35	134.6
					3'	18	25	138.9
	②	83	35.8	2'	18	2	11.1	
				3'	24	52	216.7	
	③	80	18.8	3'	15	38	253.3	
				3'	21	60	285.7	
	④	71	1.4					
	5	71	2.8	3'	44	19	111.4	
⑥	135	0	6'	131	131	100		

注: 分化率/% = (出芽块数/接种块数×出芽数/出芽块数) ×100%。
Notes: D ifferentiation rate = (No. of tubes w ith bud/No. of inoculations×No. of buds/tubes w ith bud) ×100%.

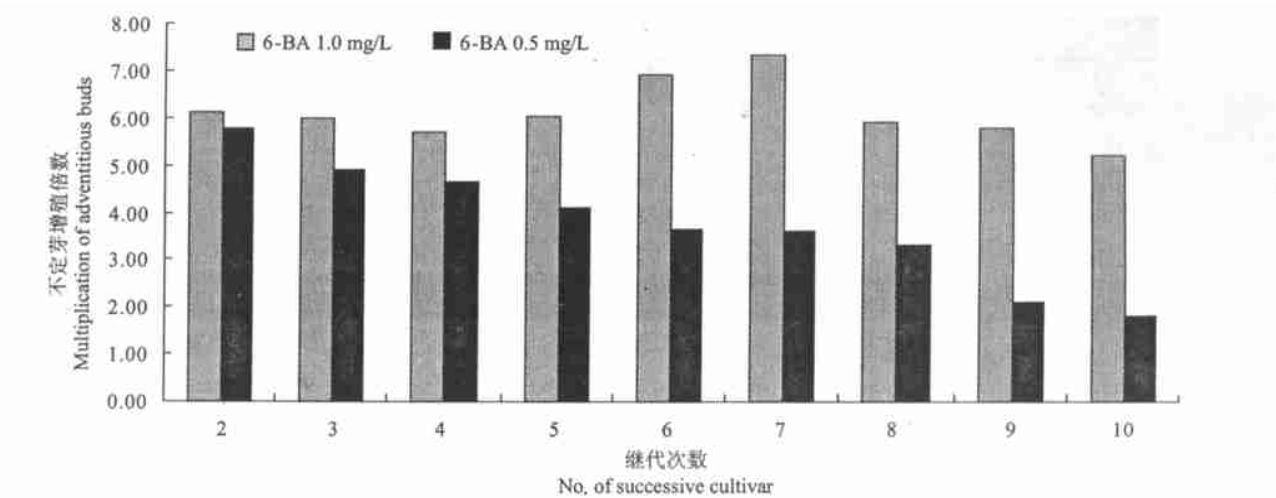


图 2 不同 6-BA 水平与不定芽苗持续增殖能力

Fig. 2 Relation of different L evel of 6-BA and continuous multiplying ability of adventitious buds of V ictoria

2.2 继代培养中不定芽分化能力与芽苗再生 的不定芽苗在不同激素及水平的培养基上进行继代
2.2.1 激素与继代繁殖能力的关系 将 3 个品种 增殖比较, 计数了第 2~ 10 次继代的增殖倍数。通过

方差分析表明, 试管植株的分化能力主要受激素水平的影响。在 6-BA 为 1.0 mg/L 的培养基上, 其不定芽的分化能力显著高于 6-BA 为 0.5 mg/L 的水平, 差异均达到 0.01 显著性水平。植株在 6-BA 为 1.0 mg/L 的培养基上连续培养, 其分化能力比较恒定, 而在 6-BA 为 0.5 mg/L 的培养基上连续培养, 其分化能力呈明显的下降趋势(图 2)。

2.2.2 不同品种和单株间增殖能力的差异 从 3 个品种第 4 次继代的试管苗中随机调查统计了 15

个单株系列的平均增殖倍数, 对不同品种和同一品种不同单株间的增殖能力进行了方差分析, 结果见表 2。由表 2 可知, 对单株增殖能力与 6-BA 质量浓度影响的方差分析表明, 6-BA 的影响因素仍是最显著的。胜利女神品种的 F 值达到了 52.887 ($F_{0.01}=8.86$), 深红品种的 F 值为 18.26, 也达到了 0.01 的显著水平。而单株间的差异, 胜利女神品种达到了 0.01 的显著水平, $F=5.697$ ($F_{0.01}=3.70$)。深红品种单株系列的增殖能力无显著差异(图 1-3)。

表 2 不同品种及单株间不定芽增殖能力的差异

Table 2 Difference of multiplying ability of adventitious buds among individual plants of different cultivars

配方 Medium	单株系列 Single plant clone							
	胜利女神 Victoria				深 红 Black Red			
1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + KT 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L	4.79,	4.91,	4.75,	6.08,	4.50,	4.79,	5.55,	4.45
	5.52,	4.17,	6.45,	6.29,	3.88,	4.27,	4.44,	3.77,
	7.38,	7.31,	5.42,	6.61,	5.43,	4.79,	4.30,	4.17,
	6.00,	5.33,	4.45		3.50,	4.02,	4.05	
	$\bar{x}=5.607$		$S=0.962$		$\bar{x}=4.367$		$S=0.582$	
1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/ L + KT 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L	4.19,	4.39,	4.30,	4.77,	3.85,	3.56,	3.91,	3.00,
	4.19,	3.96,	4.93,	4.81,	3.50,	3.77,	3.53,	3.35,
	4.67,	5.82,	4.45,	4.95,	2.83,	3.68,	3.43,	3.48,
	4.84,	4.27,	3.43		2.85,	3.56,	4.87	
	$\bar{x}=4.531$		$S=0.527$		$\bar{x}=3.545$		$S=0.476$	

2.3 生长和生根

2.3.1 不定芽苗展叶壮苗的培养 仙客来在继代分化过程中所产生的不定芽苗, 3 个品种均表现出由不定芽直接长成叶柄, 但叶片很小, 不伸展不变绿的丛生状, 与种苗正常栽培的幼苗有差别。因此, 在

生根之前需进行一代生长或壮苗的培养。将 6-BA 按 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.0 mg/L 的梯度减少, 相应的 NAA 为 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.00 mg/L, 结果见表 3。不定芽经过一代生长表现出叶片充分伸展、变绿的新梢状, 对胜利女神尤其明显。

表 3 不同配方与新生芽苗的壮苗生长

Table 3 Relation between different formula and growth of newly born shoots

配方 Medium	品种 Cultivar	芽苗增殖倍数 Multiplication of shoot	宽度 > 1 cm 叶片的百分率 > 1 cm petiole	叶片展开百分率 Leaf expanding of shoot
G ₁	胜利女神 Victoria	1.247±0.198	78.96±13.892	71.36±14.577
	深红 Black red	1.243±0.214	51.79±23.215	33.33±23.570
G ₂	胜利女神 Victoria	1.340±0.241	63.68±27.063	58.46±17.489
	深红 Black red	1.113±0.080	29.367±10.707	11.11±15.712
G ₃	胜利女神 Victoria	1.518±0.292	81.206±13.573	27.394±21.509
	深红 Black red	1.047±0.066	77.777±31.429	0.000±0.000
G ₄	胜利女神 Victoria	1.342±0.325	63.388±15.123	53.906±32.719
	深红 Black red	1.330±0.061	36.787±5.274	33.33±27.218
G ₅	胜利女神 Victoria	1.344±0.099	51.504±39.146	78.00±27.129
	深红 Black red	1.580±0.127	36.67±26.247	35.00±15.00
G ₆	胜利女神 Victoria	1.530±0.457	9.262±5.483	0.00±0.00
	深红 Black red	1.350±0.033	39.290±2.527	22.22±31.429

2.3.2 激素对不同品种组培苗不定根发生的影响

对生根结果进行的方差分析和多重比较得出, 以生根株率为指标, 品种之间的差异极显著, F 值为 14.728^{**} ($F_{3,24,0.01}=4.724$), 配方间的差异不显著, F 值为 1.405 ($F_{5,15,0.05}=2.910$)。以平均单株

生根数量为指标, 品种之间的 F 值为 263.310^{**}, 差异极显著, 配方间的 F 值为 2.535, 尚未达到 $P=5\%$ 的显著水平。但是, 品种与配方间的交互作用达到了极显著水平, F 值为 44.571^{**} ($F_{15,24,0.01}=2.207$)。由品种之间的比较得出, 胜利女神的生根株

率和单株平均根量均显著高于深红和大红。从品种特性分析, 胜利女神品种对激素种类更加敏感。在 NAA 中生根的两项指标, 0.5 mg/L 水平或 0.3 mg/L 水平均大于 BA。未经见光处理的新梢直接生根, 明显表现出地上部发育不良的现象, 叶片不展, 不变绿。由于每株新梢叶片不整齐, 造成小植株不正常, 又影响了不定根的发生。而经过一代生长光照处理, 新梢上的叶片变绿, 叶面积明显增大, 新梢健壮整齐, 其生根效果和生根后的试管植株均优于未经生长的植株(图 1-4, 5)。

表 4 再生新梢叶片数量和糖源对仙客来单株生根数量的影响

Table 4 Influence of the number of leaves on regenerated new shoots and sugar sources on the number of roots of individual cyclamen plant

叶片数量 The number of leaves	单株生根量 The number of roots of individual plant					
	R ₁	R ₁ [*]	R ₂	R ₂ [*]	R ₅	R ₅ [*]
1	2.33±1.25	1.60±1.36	0.00±0.00	0.00±0.00	2.50±0.50	2.67±1.89
2	1.75±1.79	2.00±1.41	3.16±2.61	4.50±1.61	3.00±1.41	3.00±2.97
3	4.5±3.61	2.66±3.30	4.33±1.25	3.00±2.16	7.50±2.96	4.43±2.59
4	3.50±1.50	2.00±2.83	4.43±4.17	3.50±1.12	10.33±3.30	4.67±3.50
5	7.25±5.26	4.75±2.95	6.20±3.76	3.75±2.49	10.67±4.03	6.14±3.83
6	12.0±1.87	4.00±2.55	9.80±3.54	4.40±2.65	11.40±3.38	9.40±7.12
7	8.50±0.50	4.33±3.30	10.28±3.96	8.50±2.96	11.75±2.49	12.67±1.11
平均数 Mean	5.69±3.45	3.00±1.31	5.45±3.38	3.52±2.46	8.16±3.66	6.14±3.39

注: 带*号的配方糖源为葡萄糖, 其他成分与同配方号相同。
Note: The sugar source of the formula with “*” is glucose, the other compositions of these formula are the same with the other ones

2.4 炼苗栽培

将胜利女神、大红、深红品种生根瓶苗, 按品种及单株体系分别炼苗栽培。炼苗初期, 球茎为不规则状, 随着生长球茎逐渐变成正常的扁圆形。单株体系内各株之间开花后, 各项性状均无明显差异, 形成了较为整齐的单株系列。各单株体系间可用观赏价值等指标进行筛选(图 1-6)。

3 讨论

1) 将已知性状的母本利用组织培养技术实现优良无性系的高速繁殖是组织培养的优势。根据仙客来本身杂合性强、种子繁殖后代分离严重的特点, 仙客来组织培养无性繁殖的外植体应该是利用已开花的具有优良性状的成苗。但考虑成苗进行组织培养研究的难度较大, 本研究除利用种苗探索仙客来优良品种组织培养较为全面、成熟的技术路线外, 拟建立仙客来单株无性系, 待单株定植开花后进行比较筛选, 然后, 将筛选出的单株无性系进行扩繁, 笔者

2.3.3 新梢叶片数量和糖源与生根的相关性 将着生 1~7 个叶片的新生新梢分别接到 6 个培养基中, 其中 R₁, R₂, R₅ 分别与生根配方相同, 带“*”号的配方糖源为葡萄糖, 其他成分与同配方号相同, 结果见表 4。按随机模型两因素无重复方差分析得出: 对平均单株生根数量指标, 新梢叶片数量的影响极显著, F 值为 $19.928^{**} > F_{6, 30, \alpha=0.01} = 3.474$; 糖源之间的差异也极显著, $F = 9.381^{**} > F_{6, 30, \alpha=0.01} = 3.699$ 。新梢叶片数量与平均生根量之间呈显著的线形回归 $Y = 0.001 + 1.347X$ 。

认为这不失为一条无性快速繁殖的路线。
2) 仙客来由于其独特的遗传杂合性, 在组织培养的过程中, 器官发生受不同品种、单株、不同器官、激素、糖源、无机元素、继代次数、不同发育时期等单一因素和相互交叉因素影响很大, 为产业化育苗而研究的成熟技术路线必须来自于大样本的数量性分析。
3) 在本研究中, 初培养时 6-BA 和 2, 4-D 的配合对不定芽的分化和启动是必须的, 随后要及时撤掉 2, 4-D。随着继代次数的增加, 要改变 6-BA 的质量浓度。在继代过程中, 仙客来不同品种和不同单株体系间分化能力有显著差异, 同时亦受 6-BA 质量浓度的影响。组培苗不定根的发生对激素种类和品种交互作用非常敏感, 尤其品种间的差异极显著。在生根之前经一代生长壮苗后可显著提高瓶苗叶片状态和生根指标, 同时新梢叶片数量与仙客来生根指标之间亦有显著的相关性。

[参考文献]

- [1] 三浦泰昌 シクラメンの 培养技术[J]. 农耕と园艺, 1988, 1: 186- 188
- [2] 村崎公明 组织培养苗生产の现状と展望[J]. 农耕と园艺, 1993, 3: 134- 136
- [3] Murasaki K, Tsurushima H. Improvement of clonal propagation of cyclamen *in vitro* by the use of etiolated petioles[J]. Acta Hort, 1988, (226): 421- 427.
- [4] Hawkes H Y, Wainwright H H. *In vitro* organogenesis of *Cyclamen persicum* Mill from seedling tissue[J]. Acta Hort, 1987, 212: 711- 714
- [5] Wainwright H H, Harwood A C. *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Cyclamen persicum* Mill using seedling tissue[J]. J Hort Sci, 1985, 60(3): 397- 403
- [6] Willy Dillen, Ingrid Dijkster, Johan Oud. Shoot regeneration in long-term callus cultures derived from mature flowering plants of *Cyclamen persicum* Mill [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(7): 545- 548
- [7] Mohannad A M, Karam N S. *In vitro* propagation wild *Cyclamen persicum* Mill from seedling tissue[A]. Proceedings of the International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation[C]. Cork Ireland: ISHS, 1999: 243- 250
- [8] 傅新生, 仇质慧, 孙富林, 等. 仙客来组织培养成苗初报[J]. 植物生理学通讯, 1985, (6): 42
- [9] 侯喜林. 仙客来实生黄化叶柄培养的研究[J]. 园艺学报, 1991, 18(1): 81- 86
- [10] 张麟方, 张喜春, 刘宏伟, 等. 仙客来离体叶培养与植株再生[J]. 东北林业大学学报, 1992, 20(4): 18- 21
- [11] 曲复宁, 由翠荣, 康黎芳, 等. 仙客来(*Cyclamen Persicum* Mill)组织培养中不定芽分化培养基的筛选[A]. 植物组织培养与脱毒快繁技术[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001: 1- 3

Fast propagation of cyclamen clones from single plant through tissue culture

QU Fu-n ing¹, YOU Cui-rong¹, KANG L i-fang², GONG Xue-q in¹, ZHANG M in¹, WANG Yun-shan²

(1 Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai, Shandong 264005, China;

2 Institute of Horticulture, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031, China)

Abstract: Clones of cyclamen were fast propagated through tissue culture. Studies were made on formula of mediums suitable for different culture stages such as primary culture, successive culture, growth and rooting. The results showed that, in order to start differentiation of adventitious buds, it was necessary to add both 6-BA and 2, 4-D during primary culture. During successive culture, hormones, sugar sources, cultivar and individual plant all had significant influence on differentiation of buds and regeneration of shoots. During the rooting stage, there was highly significant difference between cultivars and cultivars showed different sensitivity to the concentration of hormone and its range. Before rooting, adventitious buds went through another run of culture to make them stronger. They showed better performance in rooting and growth. Obtaining clones from single plant and then making selective fast propagation is a new way to propagate cyclamen.

Key words: cyclamen; tissue culture; seedling tissue; single plant; quantitative analysis