鼎湖山紫背天葵组织培养及植株再生

陈 刚,陈雄伟,王瑛华

(肇庆学院 生命科学学院,广东 肇庆 526061)

摘 要:选用紫背天葵无菌苗叶片为外植体,建立了离体培养体系,并探讨其愈伤组织生长和不定芽诱导的适宜培养条件。通过研究得出:愈伤组织诱导的最佳培养基是 MS+2,4-D 1.00 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+LH 200 mg/L+CH 200 mg/L+YE 200 mg/L,愈伤组织诱导率为 96.88%。不定芽诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+LH 200 mg/L+CH 200 mg/L+YE 200 mg/L,不定芽诱导率为 77.3%。不定芽转至 1/2MS 培养基中均可 100%生根并长成完整植株,小苗移栽成活率达到 90%。

关键词:紫背天葵;愈伤组织;不定芽;再生植株

中图分类号:Q943.1;S567 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-3142(2010)03-0407-04

Tissue culture and plant regeneration in *Begonia fimbristipula*

CHEN Gang, CHEN Xiong-Wei, WANG Ying-Hua

(*Faculty of Life Science, Zhaoqing University*, Zhaoqing 526061, China)

Abstract: An efficient and rapid regeneration protocol was developed using leaves from geminating seedlings of *Begonia fimbristipula*. MS medium containing 1.00 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L 6-BA, 200 mg/L LH, 200 mg/L CH and YE 200 mg/L was most effective in inducing calli. The frequency of callus induction was above 96.88%. Optimal medium for inducing adventitious buds is MS+1.0 mg/L 6-BA+200 mg/L LH+200 mg/L CH+YE 200 mg/L, and the highest frequency reached 77.3%. The proper culture medium of rooting was 1/2MS and the rooting rate was 100%. The survival rate of the plantlet was up to 90% after being transplanted into soil.

Key words: *Begonia fimbristipula*; callus; adventitious buds; plant regeneration

紫背天葵(*Begonia fimbristipula*)为秋海棠科植物,分布于我国广东、广西、福建和江西等地,模式标本采自广东鼎湖山和罗浮山(中国科学院中国植物志编辑委员会,1999)。它既可作为中药使用,同时还被用于开发出多种紫背天葵的饮品和食品,现已享誉全国(赵秀贞,1998)。但是,由于长期采挖野生紫背天葵,自然繁殖系数低,自然资源已日益缺乏,现已被列为珍稀保护植物(李耿光等,1983;陈刚等,2008)。通过用组织培养的方法进行繁殖,能实现紫背天葵人工栽培,可解决野生资源日益短缺的问题,避免野生紫背天葵的破坏性开采,满足人们生活中对紫背天葵的需求。同时为紫背天葵的药用研究和大规模综合开发利用提供基础条件。

植物组织培养中的再生可通过两条途径,即体细胞胚胎发生和器官发生。紫背天葵可通过体细胞发生途径实现植株的再生(张兰英等,1988),也可通过叶片不定芽诱导及生根进行离体快速繁殖(陈刚等,2008)。但器官发生途径中经过愈伤组织获得再生植株的研究并不完善(李耿光等,1983)。不定芽的分化与细胞分裂素的种类和浓度密切相关。国内

收稿日期:2008-12-19 修回日期:2009-05-02

基金项目:广东省农业科技攻关项目(2007B020704001);肇庆学院自然科学基金(0651)[Supported by Agricultural Science and Technology Research and Development Program of Guangdong Province(2007B020704001); the Natural Science Foundation of Zhaoqing University(0651)]

作者简介:陈刚(1974-),男,安徽宿县人,博士,副教授,主要从事植物细胞工程和基因工程研究,(E-mail)chengang@zqu.edu.cn。

外有银星秋海棠、红叶秋海棠、变色秋海棠和裂叶秋海棠等组织培养成苗的报道，结果发现，6-BA 对丛生芽的诱导和增殖具有较明显的效果，但 6-BA 的使用浓度和组合激素种类各不相同（李任珠等，1997；田代科等，2001；唐荣华等，2004；Espino，2004；Burritt，2008）。本文旨在研究不同种类和不同浓度的激素对其诱导愈伤组织和不定芽分化的影响，筛选出培养基中激素的最佳浓度，建立紫背天葵器官发生途径中经过愈伤组织获得再生植株的体系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

紫背天葵引种于广东省鼎湖山自然保护区，种植于肇庆学院生物园。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导 将紫背天葵蒴果消毒后的种子接种于 MS（Murashige & Skoog，1962）培养基，萌发后将紫背天葵叶片切成小块，接种于上述培养基上进行愈伤组织的诱导。愈伤组织的诱导以 MS 培养基为基本培养基，0.5～2.0 mg/L 2,4-D 和 1.0 mg/L 6-BA 不同浓度组合作梯度比较，同时添加有机附加物 200 mg/L LH（水解乳蛋白），200 mg/L CH（水解酪蛋白）和 200 mg/L YE（酵母提取物），培养基 pH5.8～6.2，琼脂 0.8%。种子萌发采用光照培养，愈伤组织诱导采用暗培养。培养条件为：温度（25±2）℃，光照强度为 40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$，光照时间为 14 h/d。

1.2.2 不定芽的诱导 将诱导形成的愈伤组织接种于添加不同浓度 6-BA 与 NAA 组合的培养基，诱导不定芽的形成，同时添加有机附加物（同愈伤组织诱导培养基），培养基 pH5.8～6.2，琼脂 0.8%。光照培养，条件同种子萌发，30 d 后统计不定芽诱导率和增殖系数。

1.2.3 不定根及球茎的诱导 当不定芽长成较健壮的小苗后，转入生根培养基。比较培养基中离子浓度和有机附加物的有无对生根的影响，培养基 pH5.8～6.2，琼脂 0.8 %。每种处理接 30 个小苗，光照培养，条件同种子萌发，14 d 后观察有无球茎的形成，统计生根率和平均根数。

1.2.4 炼苗及移栽 根据紫背天葵的生长特性及对环境条件的要求，以腐殖质土为移栽基质。将生好根的试管小苗移出培养室，在室外炼苗 3 d，洗净根系上的培养基，移栽至装好基质的花盆中，在荫蔽度 70 %大棚中培养，30 d 后统计成活率。

表 1 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different concentrations of 2,4-D on callus induction

编号 No.	激素 Hormone (mg/L)		愈伤组织形成时间 Calli induction time (d)	接种个数 No. of plant inoculation	愈伤组织块数 No. of calli	愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)
	2,4-D	6-BA				
C1	0.125	0	12	36	20	55.6
C2	0.125	1.0	12	32	26	81.25
C3	0.25	0	10	36	23	63.89
C4	0.250	1.0	10	32	27	84.38
C5	0.5	0	11	36	25	69.44
C6	0.500	1.0	10	32	30	93.75
C7	1.0	0	10	36	26	72.22
C8	1.000	1.0	9	32	31	96.88
C9	2.0	0	12	36	14	38.89
C10	2.000	1.0	13	32	27	84.38

3 结果与分析

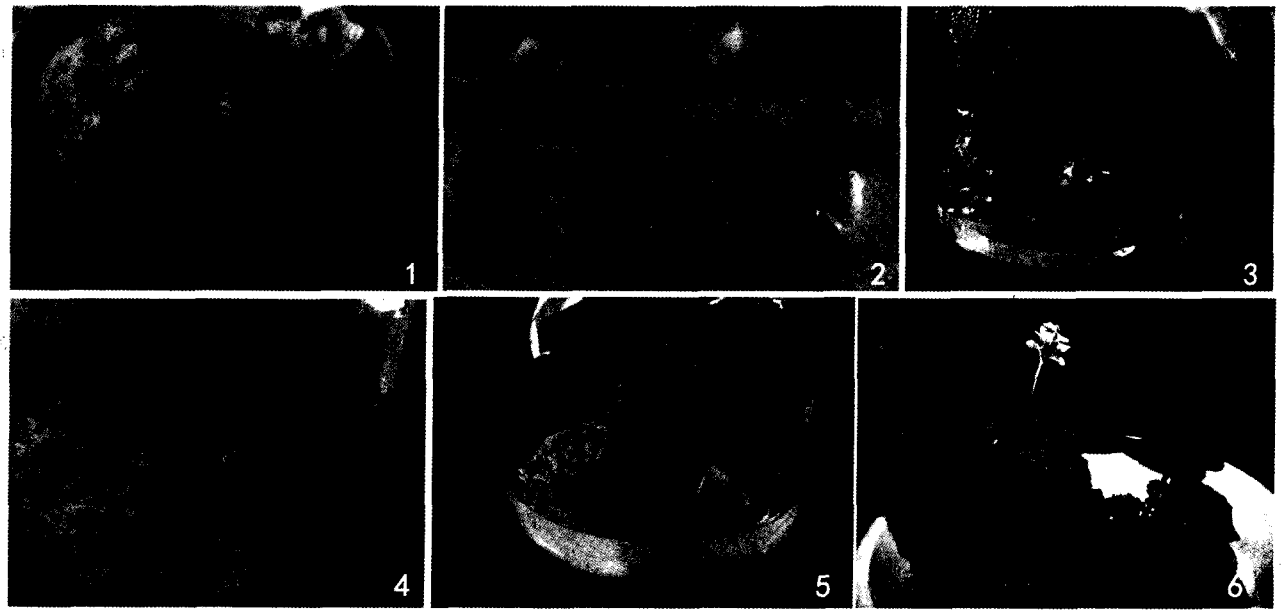
3.1 愈伤组织的诱导

3.1.1 不同浓度 2,4-D 和 6-BA 1.0 mg/L 组合对愈伤组织诱导的影响 紫背天葵叶片外植体接种在表 1 所列的各培养基上，均可形成愈伤组织（图版 Ⅰ：1），在接种后 9～12 d 开始卷曲膨大，叶片边缘出现少量淡黄绿色的愈伤组织。20 d 后愈伤组织增殖明显，并表现出不同培养基上愈伤组织诱导率差异较大，最大差异达到 57.99%。在添加 2,4-D 的培养基 C1、C3、C5、C7 和 C9 上，外植体愈伤组织诱导率随着 2,4-D 的浓度增加逐渐增加，最高达到 72.22%，在 C9 上愈伤组织诱导率明显下降，较 C7 的愈伤组织诱导率低 33.33%。在 2,4-D 和 6-BA

组合的培养基 C1、C3、C5、C7 和 C9 上，也表现出愈伤组织诱导率随着 2,4-D 的浓度增加逐渐增加的趋势，但在 C10 上愈伤组织诱导率略有下降。添加 1.0 mg/L 6-BA 能明显提高愈伤组织的诱导率，平均提高愈伤组织诱导率达 28.12%，最大提高幅度达到 57.99%。以上结果表明：1.00 mg/L 2,4-D 和 1.0 mg/L 6-BA 对紫背天葵愈伤组织的诱导效果最好，对愈伤组织的生长有促进作用。

3.2 不同浓度 6-BA 与 NAA 组合对愈伤组织诱导不定芽的影响

愈伤组织接种于不定芽诱导培养基上，7 d 左右愈伤组织表面开始产生绿色突起。接种 12 d 后诱导形成不定芽（图版 Ⅰ：2），30 d 后统计不定芽的诱导情况（表 2）。结果证明：在 NAA 浓度相同的条件下，愈伤组织诱导不定芽的时间随着 6-BA 浓度的升高而缩短，如 S1、S4 和 S6 比较，2 mg/L 6-BA 比 0.5 mg/L 6-BA 诱导不定芽时间缩短 3 d。但是，随着 6-BA 浓度的升高，不定芽的诱导率和增殖倍数也逐渐升高，同时诱导效果也更好（图版Ⅰ：3），当 6-BA 为 2.0 mg/L 时趋势平缓。在 6-BA 浓度相同的条件下，愈伤组织诱导不定芽的时间随着 NAA 浓度的升高而延长，不定芽的诱导率及增殖倍数也随着降低。即紫背天葵愈伤组织的不定芽诱导率与 6-BA 浓度成正相关，而 NAA 则抑制不定芽的发生。



图版 Ⅰ　1. 紫背天葵愈伤组织；2. 愈伤组织分化出芽；3. 丛生芽；4. 根的分化；5. 紫背天葵球茎；6. 开花的再生植株。

Plate Ⅰ　1. Calli of *Begonia fimbristipula*; 2. Shoots differentiation from calli; 3. Multiple shoots; 4. Root differentiation; 5. Corm of *B. fimbristipula*; 6. Flowering of regeneration plantlet.

3.3 不定根的诱导

当不定芽长到 2 cm 以上时，转入生根培养基（表 3）进行壮苗和生根，6 d 后就可在不同培养基上逐渐见到不定根长出，2～3 周就可形成根系，且生长健壮，生根率均达到 100%（图版 Ⅰ：4）。对比可知：在基本培养基强度为 1/2MS 上紫背天葵不定芽长根时间较 MS 提前，如 R1 比 R3 开始长根时间提前 3 d，R2 比 R4 提前 4 d；R1 和 R2、R3 和 R4 比较说明，添加有机附加物对平均根长有明显抑制作用。所得结果显示对于不定根的诱导，各因素的最佳组合为：1/2MS＋糖 3%＋琼脂 0.7%，生根最早，最快，而且经观察，在这种培养基中新长的球茎红褐色，叶片正面鲜绿，叶背紫红色（图版 Ⅰ：5）。

3.4 植株移栽

当紫背天葵的幼根在生根培养基 R1 上长到 1～3 cm 时，去掉玻璃瓶的封口膜，在室内炼苗 2 d 后，取出组培苗用自来水洗净根部黏附的琼脂，移栽到腐殖土中，盖塑料薄膜保湿 3～5 d，保持湿度 80%～90%，温度 25 ℃左右，植株成活率达 90%以上。目前首批移栽的紫背天葵已开花结实（图版Ⅰ：6）。

4　讨论

秋海棠类植物组织培养常选用叶片或叶柄为外

表 2 6-BA 与 NAA 组合对不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of different combinations of 6-BA and NAA on differentiation of adventitious buds

编号 No.	激素(mg/L) Hormone		分化芽时间 Differentiation time (d)	不定芽的诱导率 Differentiation frequency (%)	增殖系数 Propagating coefficient
	6-BA	NAA			
S1	0.5	0.0	15	71.5	1.65
S2	0.5	0.2	16	66.6	0.89
S3	0.5	0.5	21	63.8	0.78
S4	1.0	0.0	14	77.3	3.01
S5	1.0	0.2	18	72.4	2.23
S6	1.0	0.5	19	71.8	1.86
S7	2.0	0.0	12	73.5	3.13
S8	2.0	0.2	15	72.8	2.86
S9	2.0	0.5	17	71.9	2.11

表 3 MS 的强度和有机附加物对生根的影响

Table 3 Effect of MS strength and organic substances on rooting

编号 No.	MS 培养基强度 MS strength	有机附加物 Organic substances	长根时间 Rooting time (d)	球茎 Grown bulbs	生根率 Rate of rooting (%)	平均根个数 No. of average roots
R1	1/2MS	无	6	有	100	5.239
R2	1/2MS	有	8	无	100	1.156
R3	MS	无	9	无	100	1.810
R4	MS	有	12	有	100	1.222

植体，如以球根秋海棠(*Begonia*×*tuberhybrida*)的叶片为外植体进行离体繁殖(Peck & Cumming, 1984)；也有以叶柄为外植体对红叶秋海棠(*Begonia*×*erythrophylla*)进行不定芽的诱导(David, 2008)，甚至有以叶片和叶柄为外植体对 4 种秋海棠科植物进行组织培养(Espino 等，2004)。本研究中，紫背天葵叶片接种后 10 d 左右外植体开始卷曲膨大，4 周后部分外植体边缘出现少量淡黄绿色的愈伤组织，并不断增殖。这一结果与李任珠等(1997)对银星秋海棠的研究结果相似。在紫背天葵愈伤组织诱导中，当单独使用 2,4-D 时，其浓度为 0.50 mg/L 即能较好地诱导出愈伤组织，2,4-D 1.00 mg/L 时愈伤组织诱导率最高，浓度达 2.00 mg/L 时诱导率降低。此时，愈伤组织质地较为稀疏，叶片外植体颜色偏黄，生长较慢，说明高浓度的 2,4-D 抑制愈伤组织的诱导。相似的研究结果还有裂叶秋海棠，若单独使用 2,4-D，当其浓度为 0.5 mg/L 即能较好的诱导出愈伤组织，当浓度达 2.0 mg/L 时诱导率最高。本研究还表明 1.0 mg/L 6-BA 对紫背天葵愈伤组织的诱导率有明显的提高，并能促进愈伤组织生长。如 2,4-D 2.0 mg/L 时，愈伤组织诱导率仅有 38.89%，当 2,4-D 2.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 组合时，愈伤组织诱导率提高到 45.49%。最佳组合为 2,4-D 1.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L，愈伤组织诱导率高达 96%；同时诱导出的愈伤组织性质均一、生长旺盛、叶脉及叶片边缘具有大量致密的瘤状突起。经比较确定 C8 培养基(MS+2,4-D 1.00 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+LH 200 mg/L+CH 200 mg/L+YE 200 mg/L)为愈伤组织诱导的最佳培养基。这一结果与唐荣华等(2004)对裂叶秋海棠的研究结果基本一致。

本研究发现，在 6-BA 和 NAA 组合的不定芽诱导培养基上，紫背天葵愈伤组织表面可产生多个生长中心从而长成不定芽。15 d 后愈伤组织表面形成许多半透明的圆形突起，紧接着突起伸长，每个小突起逐渐成为一个或多个生长中心，随后发育成无根小苗。其中 6-BA 的浓度为 2.0 mg/L 时，分化率降低。这一现象在变色秋海棠不定芽分化时表现更为明显，使用高浓度 6-BA 时，外植体能产生芽原基，但不能分化出芽，出现分化停滞现象，最后逐渐发黑趋于死亡(田代科等，2001)。紫背天葵不定芽诱导随着 NAA 浓度的增加，诱导率降低，NAA 对不定芽形成表现出抑制作用。因此，不定芽诱导的最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+LH 200 mg/L+CH 200 mg/L+YE 200 mg/L，不定芽诱导率最高，增殖率较好。这一点与大多数秋海棠科植物不定芽分化时添加 NAA 或 IAA 有促进作用的结果相反。

不定根形成受到植物生长物质和培养基中离子浓度的共同影响(王瑛华等，2007)，大多材料在 1/2MS 或者低离子强度的条件下进行生根实验。紫背天葵不定芽在 4 种生根培养基上均可 100 %诱导不定根形成，但 1/2MS 长根时间最早，根的平均个数最多，并且有球茎形成，更易储藏和运输，更有利于移栽成活。

参考文献：

赵秀贞. 1998. 青草药彩色图谱[M]. 厦门：福建科学技术出版社：650－651

中国科学院中国植物志编辑委员会. 1999. 中国植物志(第 52 卷第 1 分册)[M]. 北京：科学出版社：190－192

Burritt DJ. 2008. Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia*×*erythrophylla* using encapsulation-dehydration requires pretreatment with both ABA and proline[J]. *Plant Cell*

(下转第 421 页 Continue on page 421)

导，感谢邹利娟、余阿梅、曾艳、杨敬天在研究过程中给予的帮助，同时还要感谢重庆江津果树研究所对本研究的大力支持。

参考文献：

王玉英，高新一. 2006. 植物组织培养技术手册[M]. 北京：金盾出版社：49－50，82－83

谭文澄，戴策刚. 1991. 观赏植物组织培养[M]. 北京：北京林业出版社：124－125

Bach A. 1988. Effect of AC on *in vitro* propagation of *Iris*×*Houandica*[J]. *Bull Poilsh Acad Sci Biol Sci*，**36**(46)：107

Dong GF(董高峰)，Huang T(黄涛)，Li GG(李耿光)，*et al*. 2001. Studies on the tissue culture of different explants *in vitro* and plant regeneration from *Citrus grandis* cv. Shatian Yu(沙田柚不同外植体离体培养与植株再生的研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究)，**19**(5)：440－444

Han ML(韩美丽)，Lu RS(陆荣生)，Du XL(杜晓莉). 2004. Studies on factors affecting shoots regeneration from epicotyls of *Citrus grandis* cv. Shatian-Yu(沙田柚上胚轴离体培养影响因素研究)[J]. *Southwest China J Agric Sci*(西南农业学报)，**17**(5)：639－641

Li GP(李国平)，Huang QC(黄群策)，Qin GY(秦广庸). 2005. *In vitro* culture of *Hedyotis diffusa* leaves and establishment of regeneration system(白花蛇舌草叶片离体培养及试管无性系的建立)[J]. *Guihaia* (广西植物)，**25**(5)：455－458

Li Q(李群)，Liu GY(刘光勇)，Wang L(王丽). 2004. Effect of hormone on plantlet regeneration and studies of root regeneration culture of *Eustoma* sp.(激素对洋桔梗植株再生的影响及生根培养的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物)，**24**(1)：40－42

Li SX(李盛先). 1998. Say good fruit golden grapefruit(金秋佳果话柚子)[J]. *Zhejiang Fore*(浙江林业)，**5**：20

Liang QH(梁倩华)，Wang RX(王任翔)，Chen TT(陈腾土)，*et al*. 1994. Tissue culture of *Citrus grandis*(砧板柚的组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯)，**30**(3)：204－206

Lin XH(林小桦)，He H(贺红)，Wu LR(吴立蓉)，*et al*. 2007. *In vitro* culture of different explants from pogostemon cablin(广藿香不同外植体离体培养的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物)，**27**(4)：658－661

Wang RX(王任翔)，Liang QH(梁倩华)，Chen TT(陈腾土)，*et al*. 1996. Tissue culture of *Citrus grandis*(酸柚的组织培养)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报)，**13**(增刊)：70－71

Xia ST(夏石头)，Xiao LT(萧浪涛). 2003. Regulation of polar transport of auxin and its mechanism(生长素极性运输的调控及其机制)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯)，**39**(3)：255－261

Xu XF(徐晓峰)，Huang XL(黄学林). 2002. Establishment of broccoli plant regeneration system with orthogonal design(应用正交设计建立青花菜植株的再生体系)[J]. *Guihaia*(广西植物)，**22**(6)：513－516

Zou JM(邹金美)，Yu JF(余金富)，Ye GL(叶国利)，*et al*. 2006. Studies on the technique of tissue culture *in vitro* and rapid propagation of *Citrus grandis* cv. Wendan and *Citrus grandis* cv. Miyou(文旦柚和下河蜜柚组织培养快速无性繁殖)[J]. *J Zhangzhou Teach Coll*：*Nat Sci Edi*(漳州师范学院学报·自然科学版)，**2**：74－77

(上接第 410 页 Continue from page 410)

Tiss Organ Cult，**95**：209－215

Chen G(陈刚)，Chen XW(陈雄伟)，Wang YH(王瑛华). 2008. *In vitro* rapid propagation in *Begonia fimbristipula* Hance[J]. *J modern Agric Tech* (现代农业科技)，**36**(24)：23－24

Espino FJ，Linacero R，Rueda J，*et al*. 2004. Shoot regeneration in four *Begonia* genotypes[J]. *Biol Plant*，**48**：101－104

Li GG(李耿光)，Zhan LY(张兰英)，Zhu BQ(朱宝卿)，*et al*. 1983. Callus induction and organ differentiation in the tissue culture of *Begonia fimbristipula* Hance(紫背天葵的愈伤组织诱导和器官分化)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报)，**25**(3)：238－244

Li RZ(李任珠)，Lu HQ(卢海强)，Xing ZS(邢增盛). 1997. Study on the tissue culture of *Begonia argenteo-guttata*(银星秋海棠组织培养的研究)[J]. *J Hainan Univ*：*Nat Sci Edi*(海南大学学报·自然科学版)，**15**(4)：331－336

Murashige T，Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol Plant*，**15**(3)：473－497

Peck DE，Cumming BG. 1984. *In vitro*-propagation of *Begonia*×*tuberhybrida* from leaf sections[J]. *Hort Sci*，**19**：395－397

Tang RH(唐荣华)，Li YF(李云飞)，Wang L(王丽). 2004. The rapid propagation *in vitro* of *Begonia laciniata*(裂叶秋海棠的离体快速繁殖)[J]. *J Sichuan Univ*：*Nat Sci Edi*(四川大学学报·自然科学版)，**41**(3)：637－640

Tian DK(田代科)，Guan KY(管开云)，Guo RX(郭瑞贤)，*et al*. 2001. Propagation and cultivation of *Begonia versicolor*(变色秋海棠的繁殖栽培)[J]. *Guihaia*(广西植物)，**21**(4)：375－380

Wang YH(王瑛华)，Chen G(陈刚)，Chen XW(陈雄伟). 2007. Establishment of a high frequency efficient regeneration system from leaf in *Torenia fournieri* Linden(蓝猪耳叶片高频率再生体系的建立)[J]. *J Zhaoqing Univ*(肇庆学院学报)，**28**(2)：58－61

Zhang LY(张兰英)，Li GG(李耿光)，Guo YJ(郭俊彦). 1988. Study on the somatic embryogenesis from leaf of *Begonia fimbristipula in vitro*(紫背天葵叶片培养体细胞胚状体发生的研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报)，**30**(2)：134－139