

裂叶秋海棠组织培养及植株再生研究

陈 刚¹, 梁 晶 龙¹, 陈 雄 伟¹, 金 红²

(1. 肇庆学院 生命科学学院, 广东 肇庆 526061; 2. 深圳市仙湖植物园科技部, 广东 深圳 518004)

摘 要:以裂叶秋海棠(*Begonia palmata* D. Don)种子获得无菌苗, 取其叶片为外植体, 对裂叶秋海棠叶片丛生芽诱导和植株再生进行了研究。结果表明: MS+TDZ 0.5 mg/L 诱导叶片外植体产生不定芽的诱导效果最佳, 诱导率为 100%, 不定芽个数可达 200 个/cm²; 最佳生根培养基为 1/3MS+IBA 0.2 mg/L, 2 周后生根率达到 100%。

关键词:裂叶秋海棠; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S 685.99; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0092-03

裂叶秋海棠为秋海棠科多年生草本, 根状茎粗壮而横走; 叶互生, 轮廓斜卵形, 基部斜心形。花粉红色, 花期 6~9 月^[1], 是一种较好的观赏植物^[2]。裂叶秋海棠也是一种较好的药用植物, 它具有祛风通络、活血消肿、清热解毒的功效^[3-4], 内用可治疗感冒, 急性支气管炎, 风湿性关节炎, 跌打内伤瘀血; 外用毒蛇咬伤, 跌打肿痛等^[4]。此外裂叶秋海棠的嫩茎叶富含维生素 C, 可以食用^[5]。由此可见裂叶秋海棠不仅具有较高的观赏、药用价值, 而且具有食用的价值。

虽然裂叶秋海棠可用种子和扦插繁殖^[2,5], 但是植物组织培养是遗传转化的基础和前提, 同时必须具有高频、稳定的再生能力, 以及对转化筛选剂有良好的敏感性。对关于裂叶秋海棠离体快速繁殖的研究国内外只有 1 篇报道^[6], 存在着生根率低和培养周期较长等问题。该研究旨在前人的基础上建立完善的裂叶秋海棠组织培养和植株再生体系, 为利用植物组织培养技术加速裂叶秋海棠的开发研究及工厂化生产奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

裂叶秋海棠(*Begonia palmata* D. Don)采自广东省鼎湖山自然保护区。

1.2 方法

将裂叶秋海棠即将成熟的蒴果用自来水冲洗 0.5 h, 在超净工作台中用 70% 的酒精浸泡 30 s, 再用

0.1% 升汞溶液(每升加 2~3 滴 Tween-80)处理 10 min, 无菌水冲洗 5~6 遍。随即将处理好的蒴果撕开, 种子接种于 MS 培养基中萌发。

1.2.1 不定芽的诱导 当种子苗长出 3~4 片叶子后, 选择全展叶切成 0.5 cm² 小块, 接种于不定芽诱导培养基中。不定芽诱导培养基以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度 4-PU、TDZ、6-BA 和 NAA 的组合, 均加有 0.7% 琼脂和 3% 蔗糖, pH 5.8~6.2。培养条件为温度(25±2)℃, 光照 16 h/d, 光照强度为 2 000 lx。

1.2.2 不定根的形成 当不定芽长成较健壮的小植株后, 切取高 2 cm 左右的单芽, 转入生根培养基。生根培养基是以 MS 为基本培养基, 比较 MS、1/2MS 和 1/3MS 基本培养基对生根的影响, 在此基础上再比较不同浓度的 NAA 和 IBA 生根效果。每处理接种 30 个, 14 d 后统计生根数。

2 结果与分析

2.1 不定芽诱导

外植体接种 1 周后开始卷曲, 2 周后叶片均有膨大, 但无其他明显变化。3 周后外植体表面开始出现密集点状突起, 进而形成大量芽体, 各激素配比对不定芽诱导的情况如表 1。

表 1 6-BA 和 NAA 组合对不定芽诱导的影响

编号	激素		芽的个数	平均芽长	诱导率
	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	/cm ² 叶片	/mm	/%
A1	1.0	0	80	4.8	100
A2	2.0	0	150	6.5	100
B1	1.0	0.2	40	3.5	100
B2	2.0	0.2	50	3	90

由表 1.2 可知, 不定芽的诱导主要与激素的种类和浓度有关。6-BA、4-PU 以及 TDZ 均可以诱导芽的产生, 不定芽发生数目在同一浓度下(这里以 1.0 mg/L 作比较), 以 TDZ 为最佳, 4-PU 次之, 6-BA 则最差(但也能达到 80 个/cm²)。在激素一定时不定芽发生数目在 6-BA

第一作者简介: 陈刚(1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物细胞工程和基因工程。E-mail: chengang@zqu.edu.cn.

通讯作者: 陈雄伟(1958-), 男, 广东封开人, 本科, 副教授, 研究方向为资源植物学。E-mail: cxw@zqu.edu.cn.

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2007B020704001); 肇庆学院教学研究基金资助项目(0629)。

收稿日期: 2008-12-27

浓度 ≤ 2.0 mg/L 时与激素浓度成正比; 在 4-PU 浓度 ≤ 1.0 mg/L 也随激素浓度的增加而有所增加; 对于 TDZ 来说浓度 ≤ 1.0 时不定芽的发生个数均在 180 个以上, 分化非常剧烈。在浓度近 1.0 mg / L 时甚至有小程度的玻璃化现象, 可能由于 TDZ 浓度较高, 细胞分裂旺盛, 较难分化成特异组织细胞有关。从发生的不定芽的长度和粗壮程度来看, 可以看出 C2 明显优于其他培养基, A2 和 A1 则次之(表 1、2)。此外在 A1 和 A2 培养基中另加入了 NAA 即 B1、B2 培养基, 则所有外植体均有根的分化, 由此可见 NAA 可以诱导外植体长根。综合各方面因素, 不定芽的最佳诱导培养基应为 A2 和 C2 培养基。

表 2 4-PU 和 TDZ 组合对不定芽诱导的影响

编号	激素		芽的个数	平均芽长	诱导率
	4-PU/ mg * L ⁻¹	TDZ/ mg * L ⁻¹	/ cm ² 叶片	/ mm	/ %
C1	0.1	0	30	6	61.90
C2	0.5	0	120	7.3	100
C3	1.0	0	> 170	3.3	100
D1	0	0.1	> 180	3.5	100
D2	0	0.5	> 180	3.5	100
D3	0	1.0	> 200	2.5	100

2.2 生根诱导

不定芽长成较健壮的小植株后, 切取高 2 cm 左右的单芽, 转入生根培养基。培养 4 d 时, 4 种培养基上的小苗均开始长根。培养 14 d 时, 1/2MS 和 1/3MS 培养基上小苗的生根率均达到 95%, 平均根长在 2.6 ~ 4.5 cm 之间。在 MS 培养基上, 小苗长的根粗短, 平均根的个数较少, 生根率最低, 比 1/3MS 低 15%; 在 1/2MS 培养基上, 生根率为 95%, 与 1/3MS 相当, 但平均根长较小; 1/4MS 的小苗生根细长, 平均根长最长, 但是部分小苗开始出现黄化, 随着培养时间的延长, 黄化现象更为明显(表 3)。三者比较可知, 1/3MS 培养基对试管苗生根的诱导效果最佳。因此选择 1/3MS 为基本培养基, 在此基础上调整激素 NAA 和 IBA 的浓度, 使生根条件更加优化, 具体见表 4。

表 3 不同 MS 强度对生根的影响 14 d

编号	MS 强度	生根率/ %	平均根长/ cm	平均根个数
E1	1	80	3.52	4.15
E2	1/2	95	2.64	5.35
E3	1/3	95	4.34	5.55
E4	1/4	85	4.75	5.3

表 4 不同激素对生根的影响 14 d

编号	激素		生根率	平均根长	平均根
	NAA/ mg * L ⁻¹	IBA/ mg * L ⁻¹	/ %	/ cm	个数
F1	0.2	0	100	6.61	7
F2	0.5	0	100	6.11	8.5
G1	0	0.2	97.5	3.94	9.45
G2	0	0.5	100	5.34	7.15

由表 4 可知 F1、F2 和 G2 的生根率均为 100%, 只有 G1 的是 97.5%, 就根长来说 F1、F2 和 G2 的效果较

好。但 G2 的根长波动较大, 而 F1 和 F2 的相对较均匀。此外 4 种培养基在 9 d 时均未看到有明显的根分化; 14 d 时可以观察到: 大多根是从茎与培养基接触的上半部分长出, 茎与培养基接触的下半部分则分化的根较少而且短。30 d 时, 4 种培养基的生根率均达到了 100%, 且 F1 和 F2 生根条数较 G1 和 G2 的少, 但根粗壮; 从生根和苗的健壮情况来看 F1 对生根的诱导应是最好的, 故综合其他因素生根的最佳培养基为 1/3MS+NAA 0.2 mg/L。

2.3 试管苗的移栽

移栽前打开封口膜练苗 3~5 d 选择较健壮的小苗, 用自来水洗净根上附着的培养基, 移栽至腐质土与粗沙(2:1)的土壤中, 用薄膜覆盖保持湿度 90%左右, 置于室温 3~5 d 后揭去薄膜, 成活率在 90%以上。

3 讨论

植物离体组织培养主要受外植体、培养基和环境三大因素的调控。秋海棠类植物多以叶片为外植体。如莲叶秋海棠即采用叶片为外植体^[7]; 而蟆叶秋海棠幼嫩叶片、茎节、叶芽和花梗研究证实, 叶片的诱导不定芽的效果最好。同时蟆叶秋海棠组织培养试验还证明不同外植体的污染率不同^[8]。前人采用裂叶秋海棠叶片直接进行外植体灭菌, 存在着污染率较高的可能^[9]。而该研究采用裂叶秋海棠的蒴果进行灭菌, 以无菌萌发的种子苗叶片为外植体能够降低污染率。在植物形态建成过程中, 起主要作用的是培养基中生长调节剂组合的配比, 细胞分裂素和生长素在外植体离体培养中影响植物特定基因的激活与表达, 从而调节特定蛋白质的合成, 影响整个细胞的分裂及分化过程^[9]。在试验中发现 TDZ 为 1.0 mg/L 时, 有轻度玻璃化现象, 这可能是由于细胞分裂素浓度过高时会导致不定芽结构畸形。由表 1 可知 B1 培养基中 A1 的基础上多加了 NAA 0.2 mg/L, 不定芽诱导的个数与 A1 比较(80 个/cm²), 则少了一半, 可能在于高浓度的细胞分裂素和生长素会抑制芽的形成。

参考文献

[1] Gu C Z, Ching-I P, Turland N J. Begoniaceae[M] // Wu Zheng-yi and P. H. Raven eds. Flora of China. Science Press and Missouri Botanical Garden 2007. 13: 153-207.

[2] 王淑芬. 新编四季养花[M]. 北京: 中国商业出版社, 2002: 427-428.

[3] 徐亚萍. 时有斌. 庭园药用植物 300 种[M]. 北京: 中国纺织出版社 2001: 128-129.

[4] 王玉生, 蔡岳文. 南方药用植物图鉴[M]. 汕头: 汕头大学出版社 2004: 166.

[5] 刘正才. 四季野菊[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998: 202-204.

[6] 唐荣华, 李云飞, 王丽. 裂叶秋海棠的离体快速繁殖[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, 41(3): 637-640.

[7] 陈贤, 龚元圣, 赵雁. 莲叶秋海棠组培快繁技术[J]. 黑龙江农业科学 2008(2): 114-126.

矮牵牛愈伤组织的诱导及植株再生研究

范小峰¹, 赵国栋², 徐均泉¹

(1. 陇东学院 生命科学系 甘肃 庆阳 745000; 2. 黄河上中游管理局 陕西 西安 710021)

摘要:以矮牵牛无菌苗为材料, 研究不同激素配比对其不同外植体愈伤组织的诱导、不定芽的分化和生根诱导的影响。结果表明: 叶柄为诱导愈伤组织的最佳器官。最佳愈伤组织诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L, 最佳愈伤组织分化培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L, 最佳生根培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg/L, 生根率可达 100%, 生根后移栽成活, 获得再生植株。

关键词:矮牵牛; 愈伤组织; 诱导; 植株再生

中图分类号:S 681.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)06-0094-03

矮牵牛(*Petunia hybrida*), 又名洋牡丹、碧冬茄, 为茄科矮牵牛属多年生草本。原产南美阿根廷、巴西等国, 各国现在广泛栽培, 均为杂交种, 喜光照, 不耐阴, 喜温畏寒^[1]。矮牵牛花期长, 6~10月整个夏、秋季节花开不断, 是现代城市美化、庭院布置的常用花卉, 也可盆栽室内观赏。矮牵牛多播种繁殖, 也可扦插繁殖, 但由于杂交种结实率低, 且用种子繁殖易引起后代性状的分离退化, 扦插繁殖又受到材料的限制, 所以组织培养是解决繁殖材料供不应求的最有效途径。该试验以矮牵牛为材料, 探讨不同种激素组合对叶、叶柄、茎段3种外植

体愈伤组织的诱导、分化及生根的影响。筛选出适合矮牵牛愈伤组织诱导及植株再生的最佳配方, 为其快繁提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以矮牵牛无菌苗为材料, 取其幼嫩叶块、叶柄和茎段进行试验。

1.2 方法

将茎段和叶柄切成 0.5 cm 左右的小段, 叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的叶块接入启动培养基上, 观察不同植物激素对愈伤组织诱导及分化的影响; 将诱导产生的愈伤组织接种于愈伤组织分化培养基上诱导不定芽产生; 将分化产生的不定芽转入生根培养基中, 获得完整的再生植株。生根苗采用“二步法”移栽, 练苗 1 周后, 洗净生根苗根部培养基, 均匀移入珍珠岩苗床, 搭设塑料棚, 并

第一作者简介:范小峰(1966-), 女, 甘肃西峰人, 副教授, 现主要从事植物生理学和植物组织培养研究工作。E-mail: qyszxf@126.com.

收稿日期: 2008-12-27

[8] 李建革, 刘敏, 王磊. 蟛叶秋海棠快速繁殖的研究[J]. 山东农业科学, 2006(5): 26-28.

[9] 赵术珍, 阮圆, 王宝山. 盐地碱蓬幼嫩花序的组织培养及植株再生[J]. 植物学通报, 2006, 23(1): 52-55.

Study on Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Begonia palmata* D. Don

CHEN Gang¹, LIANG Jing-long¹, CHEN Xiong-wei¹, JIN Hong²

(1. Faculty of Life Science, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China; 2. Department of Science and Technology, Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen, Guangdong 518004, China)

Abstract: Using tissue culture methods, different set of hormone concentration of medium cleft leaf begonia (*Begonia palmata* D. Don) leaves were studied. Results showed that MS+6-BA 2.0 mg/L and MS+4-PU 0.5 mg/L induced leaf explants of adventitious buds produced the best results induction, induction rate was 100%, Bud were 150/cm², and 120/cm²; one of three strength MS was the best medium for rooting, and rooting rate reached 100% after two weeks.

Key words: Cleft leaf begonia; Tissue culture; Regeneration