

# 牛耳秋海棠的组培快繁研究

曹芳凤<sup>1</sup>, 王冠<sup>2</sup>, 张宵娟<sup>3</sup>, 连芳青<sup>3</sup>

(1. 吉安职业技术学院, 江西吉安 343000; 2. 江西省林业调查规划设计研究院, 江西南昌 330046; 3. 江西农业大学园林与艺术学院, 江西南昌 330045)

**摘要:**为促进牛耳秋海棠的快繁及工厂化生产,以牛耳秋海棠的叶片为外植体,对其离体再生培养技术进行了研究。结果表明:牛耳秋海棠最佳消毒方法为75%酒精消毒8 s,0.1%的HgCl<sub>2</sub>消毒6~7 min(滴加一滴吐温);牛耳秋海棠愈伤组织诱导和分化的最佳培养基为MS+6-BA0.5~1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA0.1 mg·L<sup>-1</sup>,诱导率达85.42%~87.08%;牛耳秋海棠不定芽增殖的最适宜培养基是MS+6-BA1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA0.1 mg·L<sup>-1</sup>,增殖倍数高达42.43。

**关键词:**牛耳秋海棠;不定芽;愈伤组织;组培快繁

**中图分类号:**S682 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)08-0014-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.08.0014

牛耳秋海棠(*Begonia sanguinea* Raddi)是近年来引种栽培的一种优秀的室内花卉,观赏价值高。其叶色油绿光亮,株形端庄,高矮适中,是室内、阳台摆设的理想盆栽观叶植物;叶型优美亮丽,花白色,春天开花,成熟植株易于栽培,是常用作园艺和美化庭院的观赏植物<sup>[1-4]</sup>。牛耳秋海棠在巴西常用作药用植物<sup>[1]</sup>,可以作为秋海棠科药材的一种拓展性品种,有很高的药用潜力<sup>[5]</sup>。然而牛耳秋海棠目前仅采用扦插和分株繁殖,扦插时间受限于4-5月和9-10月,并且牛耳秋海棠严重受到根腐病的危害,成活率较低<sup>[3]</sup>。组织培养技术具有效率高、生长快、周期短、重复性强、可周年生产等优点,因此利用组织培养技术对牛耳秋海棠快速繁殖是一种有效途径。经查证,目前国内关于牛耳秋海棠的组培快繁研究鲜见报道,因此,本试验是对牛耳秋海棠进行组培快繁的初探性试验,为牛耳秋海棠今后的快繁和工厂化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

牛耳秋海棠由江西农业大学花卉盆景基地温室提供,选取生长健壮的牛耳秋海棠的鲜绿色中度成熟叶片作为外植体材料。

收稿日期:2015-01-13

**第一作者简介:**曹芳凤(1989-),女,江西省南昌市人,硕士,从事园林植物栽培与繁育研究。E-mail: caoff1989@126.com。

**通讯作者:**连芳青(1953-),女,教授,从事园林植物栽培与繁育、花卉应用研究。E-mail: lianfangqing@163.com。

### 1.2 方法

**1.2.1 外植体的灭菌** 将叶片用1%洗洁精浸泡30 min,用流水冲洗干净后在超净工作台上用酒精消毒8 s后无菌水冲洗2次,再用0.1%的升汞分别消毒0、5~8、10 min(其中滴加一滴吐温),共设6个处理,分别为处理A1~处理A6(各处理详见表1)。处理后用无菌水冲洗7~8次,无菌滤纸吸干叶片表面水分后,在无菌托盘内将叶片切成1 cm×1 cm的小方块,叶背向下接种到MS培养基上,每瓶仅接一片外植体。每个处理分别接种60瓶外植体,并在第10天进行污染率、死亡率及成活率的统计。

**1.2.2 初代培养** 将无菌外植体接种到含不同浓度配比的植物生长调节物质的初代培养基中,其中NAA浓度0、0.1、0.2、0.5 mg·L<sup>-1</sup>,6-BA浓度0.2、0.5、1.0、2.0 mg·L<sup>-1</sup>,设处理B1~处理B16(各处理详见表2),分别诱导外植体产生愈伤组织。每个处理接种40瓶无菌外植体。培养40 d后调查并统计愈伤组织诱导率,60 d后调查并统计愈伤组织增殖系数。

**1.2.3 继代分化与增殖** 将初代培养中诱导出的愈伤组织块和不定芽块切割成小块转接到含不同浓度配比的植物生长调节物质的继代培养基中,共设12个处理C1~C12(见表3),进行不定芽的分化与增殖试验。每个处理转接30瓶愈伤组织和不定芽块。40 d为一个培养周期,观察不定芽的生长状况并记录其分生倍数。

**1.2.4 培养条件** 培养温度为(25±1)℃,相对湿度为60%~80%,光照强度为1 500 lx,光照时

间为 12 h·d<sup>-1</sup>。培养基均采用 MS+食用白砂糖 30 g·L<sup>-1</sup>+琼脂 6.5 g·L<sup>-1</sup>+植物生长调节剂,pH 调至 5.8~6.0,121℃ 高压灭菌 20 min。

1.2.5 数据处理 采用单因素试验或双因素多水平试验,试验重复 3 次,试验结果通过 SPASS 软件进行方差统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同灭菌处理对牛耳秋海棠外植体的影响

为达到满意的灭菌效果,需根据外植体的情况,选择适合的消毒剂,探索出合理的消毒时间。本试验选用消毒效果较好的升汞为消毒剂,以污染率低、成活率高及死亡率低为原则来进行升汞

消毒时间的筛选试验(见表 2)。方差分析结果表明,6 种消毒处理对污染率、死亡率、成活率的影响均达到极显著水平,说明不同 0.1% 升汞的消毒时间对外植体的灭菌效果影响很大。就平均污染率而言:处理 A3~A6 的污染率较低,且极显著低于其它处理,说明处理 A3~A6 的抗污染效果较好。就平均死亡率而言:处理 A1~A4 的死亡率较低,并极显著低于处理 A5、A6,说明 A1~A4 的抗死亡效果较好。就平均成活率而言,处理 A4 的平均成活率最高,其次是 A3,两者差异不显著,但都极显著高于其它处理,说明处理 A4 和 A3 较好。

表 1 0.1% HgCl<sub>2</sub> 的消毒时间对外植体消毒的影响

Table 1 The effect of the disinfection time of 0.1%HgCl<sub>2</sub> on the disinfection of explants

处理 Treatments	消毒时间 Disinfection time		平均污染率/% Average pollution rate	平均死亡率/% Average mortality	平均成活率/% Average survival rate
	75%酒精/s	0.1%升汞/min			
	75% Alcohol	0.1% Mercuric chloride			
A1	8	0	100.00±0 cC	0±0 aA	0±0 aA
A2	8	5	73.89±3.38 bB	2.78±0.55 abA	23.33±2.89 bB
A3	8	6	37.22±4.01 aA	7.22±2.42 bcAB	55.55±3.64 dD
A4	8	7	28.33±3.47 aA	12.22±2.00 cB	59.44±2.94 dD
A5	8	8	36.11±5.80 aA	25.00±2.55 dC	38.89±3.38 cC
A6	8	10	27.78±1.47 aA	44.45±1.47 eD	27.78±1.47 bBC
	F		67.440 **	89.790 **	66.904 **

\*\* 代表极显著水平。不同大、小写字母表示在 0.01 及 0.05 水平差异显著。下同。  
\* \* mean significance level. Different capital letters and lowercases mean significant difference at 0.01 and 0.05 level. The same below.

### 2.2 不同浓度配比的生长调节剂对叶片愈伤组织的诱导和分化的影响

培养 14~21 d 后,叶片开始膨大,变厚,并出现向上弯曲或向下拱起的现象,28~35 d 后叶片表面开始出现点状绿色愈伤组织,继续培养后愈伤组织逐渐变多,部分处理中伴有不定芽和不定根的分化。由表 2 可知,愈伤组织诱导率最高的是处理 B2,其次是处理 B3。处理 B13~B16 的愈伤组织诱导率极低。处理 B13~B16 培养基均没有添加 NAA,说明没有 NAA 只有 6-BA 的培养基基本不能诱导出愈伤组织,即使个别诱导出愈伤组织,量也极少并且是无用的黄绿色疏松的愈伤组织。从愈伤组织的增殖系数来看,最高的为处理 B3,其次为处理 B2,处理 B13~B16 后期外植体基本上都褐化死亡。此外还可以看出低浓度的 NAA 更有利于愈伤组织的诱导,以 NAA 浓度

为 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 最适合,随着 NAA 浓度的升高,反而抑制了愈伤组织的诱导。当 NAA 浓度一定时,随着 6-BA 浓度的升高,愈伤组织的诱导率和增殖系数会随之升高,超过 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,又随之降低。

由方差分析结果可知,NAA、6-BA 对愈伤组织的诱导效应的影响均达到显著水平,就诱导率而言,NAA 因素的水平 1 和水平 2,6-BA 因素的水平 3 和水平 2 效果最好,即 NAA 浓度为 0.1~0.2 mg·L<sup>-1</sup>,6-BA 浓度为 0.5~1.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,对牛耳秋海棠叶片的启动效果最好;就增殖系数而言,NAA 因素的水平 1,6-BA 因素的水平 3 效果最好,即 NAA 浓度为 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,6-BA 浓度为 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,对牛耳秋海棠叶片愈组织的增殖效果最好。

表 2 不同浓度配比的植物生长调节剂对外植体启动的影响

Table 2 The effect of different concentration and ratio of plant growth regulators on the start of explants

处理 Treatments	生长调节剂/(mg·L <sup>-1</sup> ) Growth regulators		诱导率/% Induction rate	增殖系数 Growth coefficient	生长状况 Growth
	NAA	6-BA			
B1	0.1	0.2	65.93±5.38	2.33±0.17	诱导愈伤组织少,并带有少量根的分化
B2	0.1	0.5	87.08±6.47	2.93±0.07	诱导愈伤组织多,有极少量根的分化
B3	0.1	1.0	85.42±2.08	3.83±0.17	诱导愈伤组织多,伴有不定芽的分化
B4	0.1	2.0	69.72±5.28	2.90±0.06	诱导愈伤组织多,伴有不定芽的分化
B5	0.2	0.2	63.79±13.79	0.63±0.09	多分化为根,带极少数愈伤组织和不定芽
B6	0.2	0.5	72.50±5.20	0.90±0.06	多分化为根,带少数愈伤组织和不定芽
B7	0.2	1.0	77.59±1.45	2.53±0.18	诱导愈伤组织较少,有不定芽和根的分化
B8	0.2	2.0	63.89±7.35	2.30±0.36	诱导愈伤组织较少
B9	0.5	0.2	57.50±3.82	1.47±0.26	诱导愈伤组织,并带有根的分化
B10	0.5	0.5	60.71±12.54	1.50±0.29	诱导愈伤组织,并带有根的分化
B11	0.5	1.0	73.05±1.04	2.43±0.23	诱导愈伤组织,并带有根的分化
B12	0.5	2.0	53.85±7.92	2.00±0.29	诱导愈伤组织,并带有根的分化
B13	0	0.2	5.00±2.55	/	基本褐化死亡,个别长极少数愈伤组织
B14	0	0.5	2.08±2.08	/	基本褐化死亡,个别长黄绿色愈伤组织
B15	0	1.0	0.00±0.00	/	均褐化死亡
B16	0	2.0	2.08±2.08	/	基本褐化死亡,个别长黄色疏松愈伤组织

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

因素 Factors	诱导率/% Induction rate				增殖系数 Growth coefficient			
	K1	K2	K3	K4	K1	K2	K3	K4
NAA	77.04 cC	69.44 bcBC	61.28 bB	2.29 aA	3.00 bB	1.59 aA	1.85 aA	/
6-BA	48.05 aA	55.60 abA	59.02 bA	47.39 aA	1.48 aA	1.78 aA	2.93 cB	2.40 bB

2.3 不同浓度配比的生长调节剂对牛耳秋海棠不定芽的分化和增殖的影响

初代培养基中诱导出的愈伤组织在继代培养基上极易分化出不定芽,但是添加不同浓度配比的植物生长调节剂的培养基,不定芽的增殖及生长情况大不相同,表 3 为继代培养 40 d 后的观察统计结果。从 6-BA 和 NAA 的综合效应看出,处理 C7 的分生倍数最高,且与其余处理均达到 0.1% 的极显著水平。表 5 的方差分析结果表明,NAA 和 6-BA 对不定芽的分生倍数的影响均达到了极显著水平。NAA 的 3 个水平中,水平 2 的分生倍数平均值最高,且与其它两个水平之间差异极显著,说明 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 的 NAA 对牛耳秋海

棠不定芽的增殖影响最好。6-BA 的 4 个水平中,水平 3 的分生倍数平均值最高,且极优于其它 3 水平,说明 6-BA 浓度为 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,牛耳秋海棠不定芽分生倍数最高,增殖效果最好。

此外,由表 4 还可以看出,当 NAA 浓度一定时,不同浓度的 6-BA 对牛耳秋海棠不定芽的增殖具有明显不同的效应,随着 6-BA 浓度的增大,芽的分化及产量都随之增大,但超过 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,芽的产量又随之下降。当 6-BA 浓度一定时,增加 NAA 的浓度有利于芽的增殖,但是不能超过 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,否则会抑制芽的增殖,且芽体质量变差。

表 4 不同浓度配比的植物生长调节剂对不定芽分化和增殖的影响

Table 4 The effect of different concentration and ratio of plant growth regulators on the differentiation and proliferation of adventitious buds				
处理 Treatments	生长调节剂/(mg·L <sup>-1</sup> ) Growth regulators		分生倍数 Generation multiple	生长情况 Growth
	NAA	6-BA		
C1	0.05	0.1	6.53±0.75 fF	出芽少,增殖不明显
C2	0.05	0.5	12.30±0.61 eDE	出芽少,增殖缓慢
C3	0.05	1.0	23.03±1.39 cC	出芽较多,增殖较慢
C4	0.05	2.0	12.27±1.21 eDE	出芽少,增殖缓慢
C5	0.1	0.1	13.40±1.90 eDE	出芽少,增殖缓慢
C6	0.1	0.5	32.73±1.44 bB	出芽多,增殖快,芽体健壮
C7	0.1	1.0	42.43±1.41 aA	出芽极多,增殖迅速,芽体健壮
C8	0.1	2.0	22.77±1.51 cC	出芽较多,增殖较慢
C9	0.2	0.1	4.93±0.60 fF	芽体弱小,增殖不明显
C10	0.2	0.5	11.97±0.75 eE	芽体偏黄,增殖缓慢
C11	0.2	1.0	17.40±1.36 dD	芽体偏黄,增殖慢
C12	0.2	2.0	5.90±1.08 fF	芽体弱小,增殖不明显

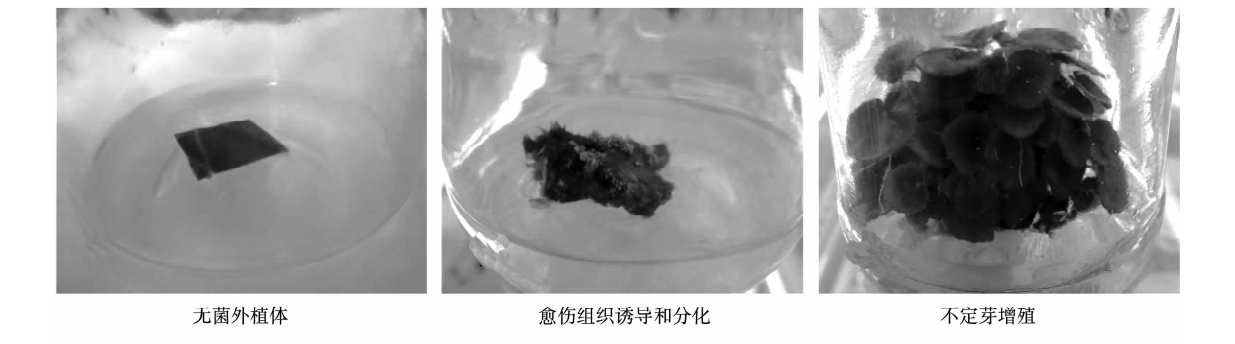


图 1 牛耳秋海棠的组织培养  
Fig. 1 Tissue culture of Begonia sanguinea Raddi

表 5 方差分析  
Table 5 Analysis of variance

因素 Factors	K1	K2	K3	K4
NAA	13.53 bB	27.83 aA	10.05 cB	/
6-BA	8.29 dD	19.00 bB	27.62 aA	13.64 cC

3 结论与讨论

3.1 结论

本试验结果表明,最优的灭菌处理是 A4 和 A3,即用酒精消毒 8 s,用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 消毒 6~7 min(其中滴加一滴吐温)。添加 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 的 NAA,0.5~1.0 mg·L<sup>-1</sup> 的 6-BA 的 MS 培养基是

牛耳秋海棠叶片愈伤组织的诱导效应最佳的培养基,培养的外植体上诱导出大量绿色致密的愈伤组织,并伴有不定芽的分化。此外,诱导牛耳秋海棠不定芽的分化和增殖的最佳培养基为 MS+NAA0.1 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA1.0 mg·L<sup>-1</sup>,培养的苗生长健壮,叶色翠绿。

3.2 讨论

关于秋海棠属植物的组织培养国内外已有大量研究报道<sup>[6-10]</sup>,选用的外植体各异,有叶片、茎段、叶柄、花梗、花瓣、花药、种子等,均离体培养成功<sup>[11]</sup>,其中叶片和叶柄作为外植体最多。牛耳秋海棠属于根茎类秋海棠,根茎较粗壮且不易消毒,故不适于采用茎段作为外植体。本文尝试采用叶

片和叶柄两种外植体进行试验,发现叶柄经多种消毒方式处理后全部污染或死亡,最终选择叶片作为外植体进行离体培养。以叶片作为外植体,材料来源方便、丰富,不牺牲母株,且可周年采用,符合组织培养周年生产的目标<sup>[12]</sup>。花器官只有在开花期间才能取材,受时间的限制,但可以进一步进行尝试。不同类型的外植体对牛耳秋海棠愈伤组织的诱导和分化有影响是不容置疑的,但即使是特定的外植体类型,特别是叶片,其接种方式,叶片部位,叶片年龄不同,对外植体的诱导和分化也有影响<sup>[13]</sup>,这也是本文有待进一步研究的地方。

对于牛耳秋海棠来说,从叶片脱分化到愈伤组织的时间较长,但从愈伤组织再分化到不定芽的时间极短,故在本次试验中发现愈伤组织与不定芽可以同时分化出现,这种方式在生产中可大大缩短培育时间。

在牛耳秋海棠不定芽增殖阶段,发现培养周期短增殖不明显,周期长褐化现象严重。牛耳秋海棠不定芽在一定时间后才开始增殖,前期增殖缓慢,随后增殖速度加快,到达一定培养时间后增殖速率达到最大,之后显著下降甚至增殖停止。这与植物材料本身的生物学特性和培养基的成分有关。牛耳秋海棠不定芽增殖阶段的生长曲线本文没有对其进行量化研究,在今后的试验中,将加强这方面的研究,找到最佳增殖周期,既利于保证增殖系数的最大化,又可减少因为培养周期长而导致的褐化现象,从而提高试验的高效性。

## 参考文献:

- [1] 余树勋. 秋海棠[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 54.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会, 谷粹芝. 中国植物志第 52(1)卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] 中国园林网. 牛耳秋海棠[EB/OL]. [2005-01-13]. <http://www.yuanlin365.com/yuanyi/21124.shtml>.
- [4] 李沛琼, 张寿洲, 王勇进, 等. 耐荫半耐荫植物[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [5] 中国野生植物资源编辑部. 国外简讯“秋海棠的食用及药用价值”[J]. 中国野生植物资源, 1993(1): 56.
- [6] Nakano M, Niimi Y, Kobayashi D, et al. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia* × *tuberhybrida* Voss)[J]. Scientia Horticulturae, 1999(79): 245-251.
- [7] Pierik R L M, Tetteroo F A A. Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan *in vitro* from inflorescence explants[J]. Plant Cell Tis Org Cul, 1987(10): 135-142.
- [8] Simmonds J A, Nelson. Improved micropropagation of *Begonia* × *hiemalis* by maintaining donor plants in long-day conditions[J]. HortScience, 1989, 24(5): 831-832.
- [9] 司徒琳莉, 张小军, 宗宪春, 等. 帝王秋海棠愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 117.
- [10] 李景秀, 管开云, 孔紫才. 长翅秋海棠的叶片培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(5): 439-440.
- [11] 李海燕. 秋海棠属花发育及快繁体系的建立[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2005.
- [12] 杜启兰. 丽佳秋海棠组培快速繁殖技术的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [13] 李春秀, 石大兴, 王米力. 丽格海棠的组织培养外植体再生体系建立关键技术的研究[J]. 四川农业大学学报, 2002, 20(4): 330-333.

# Research on the Tissue Culture About *Begonia sanguinea* Raddi

CAO Fang-feng<sup>1</sup>, WANG Guan<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-juan<sup>3</sup>, LIAN Fang-qing<sup>3</sup>

(1. Ji'an Vocational and Technical College, Ji'an, Jiangxi 343000; 2. Academy of Forest Inventory and Planning, Nanchang, Jiangxi 3300453. College of Landscape and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

**Abstract:** In order to improve the rapid propagation and factory production of *Begonia sanguinea* Raddi, taking leaves of *Begonia sanguinea* Raddi as explants, the tissue culture of *Begonia sanguinea* Raddi was studied. The results showed that the optimum sterilization time of explants were 8 s by 75% alcohol and 6~7 min by 0.1% mercuric chloride with a drop of Tween; The optimized medium for callus induction and differentiation was MS+6-BA 0.5~1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>, the induction rate was 85.42%~87.08%; The optimal multiplication medium was MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>, the multiplication coefficient was as high as 42.43.

**Keywords:** *Begonia sanguinea* Raddi; adventitious bud; callus; tissue culture