

铺地刺蒴麻的不定芽诱导和植株再生

陈双艳^{1,2}, 于昕塍^{1,2}, 熊玉萍², 吴坤林², 郑枫², 简曙光², 任海², 曾宋君², 马国华^{2,*}

¹仲恺农业工程学院, 广州510225

²中国科学院华南植物园, 广州510650

摘要: 以铺地刺蒴麻(*Triumfetta procumbens*)的嫩茎段为外植体, 建立铺地刺蒴麻离体培养繁育和再生体系。结果表明, 最适合诱导不定芽的培养基是添加 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA的MS培养基, 平均每个外植体可以诱导出5.2个不定芽。当不定芽在增殖培养基上持续培养80 d后, 在不定芽的叶片、叶柄和茎段上能够产生次生不定芽。不定芽在所有的生根培养基上均可生根。铺地刺蒴麻生根苗在生根培养基培育30 d后移栽到蛭石:河沙(体积比=1:1)的基质中, 1个月后成活率高达95.3%。

关键词: 铺地刺蒴麻; 不定芽增殖; 生根; 移栽

铺地刺蒴麻(*Triumfetta procumbens*)为椴树科(Tiliaceae)刺蒴麻属(*Triumfetta*)植物, 是一种匍匐的木质草本植物, 分布于澳洲和西南太平洋岛屿(Huang等1994; Florence等1995)。在我国, 分布于南海诸岛, 主要是西沙群岛(简曙光和任海2017)。铺地刺蒴麻多生长于海滨沙滩上, 根系发达, 有很好的固定海沙的作用, 具备良好的海岛生态防护功能。铺地刺蒴麻叶片含有黄酮和黄酮醇苷类化合物(Iwashina和Kokubugata 2012), 在防治肠道鞭毛虫方面有明显的疗效(Peraza-Sánchez等2005)。除了铺地刺蒴麻外, 本属植物刺蒴麻(*Triumfetta rhomboidea*)的叶片能够提取triumboidin, 属于黄酮和黄酮醇苷的类型(Ramachandran Nair等1986), 具有抗菌活性, 可用于治疗传染性疾病、腹痛和消炎(Estella等2017; Mévy等2010)。

目前未见铺地刺蒴麻人工引种栽培和繁育技术研究报道, 它作为主要的热带岛礁工具种(简曙光和任海2017), 急需大量的苗木。我们开展该植物的组织培养研究, 以茎段为外植体直接诱导不定芽的形成, 并通过不定芽的增殖、生根培养, 建立了一套有效的繁殖体系和栽培技术, 为该植物的运用推广打下基础。

1 材料与方法

1.1 外植体的消毒和不定芽诱导

铺地刺蒴麻(*Triumfetta procumbens* Forst. f.)种苗来源于海南西沙群岛, 在海南文昌繁育基地繁殖生长一段时间后, 移到广州中国科学院华南植

物园科研大棚内栽培管理, 用于试验。取其嫩芽为外植体, 在自来水下冲洗10 min, 用滤纸吸干水分, 将小芽的叶片去除, 放入0.1%升汞水溶液中消毒18 min, 无菌水冲洗3次, 于超净工作台上风干表面水分, 切成2 cm长的茎段接种到添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, BA)的MS(Murashige和Skoog 1962)培养基上, 进行不定芽诱导。培养基添加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8~6.0; 培育条件为光周期12 h·d⁻¹, 光照强度 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度为(25±1)°C。

1.2 不定芽增殖

通过茎段培育获得的不定芽为培养材料, 将不定芽分割成2.0 cm长单芽并接种到含有不同浓度的植物生长调节剂的MS培养基中(表1)。接种数量30株(6个培育瓶, 每瓶5株)。培养50 d后, 观察和统计茎段诱导不定芽发生和增殖情况。

1.3 不定根诱导

以通过不定芽增殖获得的生长良好的丛芽苗为培养材料, 将从芽苗切割成3~4 cm长的单芽并转到生根培养基中培养, 包括不同浓度的吲哚丁酸(indole-3-butyric acid, IBA)、萘乙酸(α -naphthalenacetic acid, NAA)的MS蛭石培养基(不添加琼脂)(表2), 以不加任何生长素为对照。每个处理50株(10个培育瓶, 每瓶5株)。培养40 d后, 统计生根率(生根率=生根的苗数/接种苗数×100%)。

收稿 2019-08-08 修定 2019-09-26

资助 中国科学院A类战略性先导科技专项(XDA13020500)。

* 通讯作者(magh@scib.ac.cn)。

1.4 炼苗与移栽

将生根良好的瓶苗, 去除盖子, 置于自然光照条件下培养7 d后, 取出生根的植株移栽于基质为蛭石:河沙=1:1塑料盆(10 cm×10 cm)中。总移栽数量120株。每天用清水喷洒叶面, 且每周用10 mL 1/2MS培养基喷洒叶面1次。移栽30 d后, 统计移栽成活率(成活率=生根植株/移栽植株总数×100%)。

1.5 统计分析

不定芽增殖和生根试验重复3次, 采用(ANO-VA)方法统计其芽的繁殖情况以及生根情况, 并进行差异显著性分析($P\leq 0.05$)。

2 实验结果

2.1 不定芽诱导和增殖

用铺地刺蒴麻的茎段为外植体接入不定芽诱导培养基中, 在含BA的培养基中不定芽诱导较好, 30 d左右, 侧芽开始形成突起并分化出芽, 继续培养30 d左右, 在其侧芽的原基上可见到有多个绿色突起并继续发育为小芽。实验结果表明当单独使用BA的浓度达到1.2 mg·L⁻¹, 不定芽的基部容易形成愈伤组织(图1-A)。而当BA的浓度在0.5~0.8 mg·L⁻¹时, 不定芽的愈伤化减少, 不定芽能够分化形成正常的不定芽(图1-B~C)。

不定芽对NAA比较敏感, 当培养基中有BA并添加低浓度的NAA (0.01~0.1 mg·L⁻¹)时, 容易引起

叶片和茎段形成愈伤化(表1)。

同一浓度的BA比激动素(kinetin, KIN)繁育效果更好。在添加BA 0.8 mg·L⁻¹的MS培养基中, 芽的增殖系数最高可达5.2 (表1)。而KIN所诱导的芽数只有3.0个。

当不定芽在原来的培养基上继续培育达到80 d后, 在叶片、叶柄和茎段上观察到有次生不定芽的形成(图1-D)。

2.2 不定根的诱导

铺地刺蒴麻的芽在添加生长素的培养基或者是对照培养基中培育20~30 d, 生根率均达100%。但是培养基中添加了生长素生根时间相对较短, 一般只需3周即可诱导生根, 而未添加生长素的培养基中, 生根时间需要4周(表2)。植株在添加IBA的培养基中, 生根的质量良好(图1-E), 在添加NAA的培养基中, 根部会出现肥大; 对照处理的培养基的根长势一般, 根系较短(表2), 其生根时间要比IBA或NAA处理的稍迟。

2.3 移栽

将生根良好的植株种植于蛭石:河沙(1:1)基质中1个月后, 移栽成活率可达 95.3% (图1-F)。

3 讨论

目前, 对于刺蒴麻属的繁育技术, 还没有其他的文献报道。有关铺地刺蒴麻所属的椴树科植物

表1 铺地刺蒴麻不定芽的诱导(50 d)
Table 1 Induction of adventitious shoots in *T. procumbens* within 50 days

诱导方式	平均不定芽诱导数/个	不定芽诱导情况
BA 0.5 mg·L ⁻¹	3.1±0.6 ^b	正常
BA 0.8 mg·L ⁻¹	5.2±0.6 ^a	正常
BA 1.2 mg·L ⁻¹	4.6±0.6 ^a	愈伤
KIN 0.5 mg·L ⁻¹	2.3±0.3 ^b	正常
KIN 0.8 mg·L ⁻¹	3.0±0.6 ^b	正常
KIN 1.2 mg·L ⁻¹	3.1±0.3 ^b	正常
BA 0.5 mg·L ⁻¹ +IBA 0.05 mg·L ⁻¹	2.4±0.3 ^c	正常
BA 0.8 mg·L ⁻¹ +IBA 0.1 mg·L ⁻¹	4.2±0.4 ^a	正常
BA 1.2 mg·L ⁻¹ +IBA 0.1 mg·L ⁻¹	2.8±0.4 ^b	愈伤
BA 0.5 mg·L ⁻¹ +NAA 0.05 mg·L ⁻¹	2.2±0.2 ^c	不定芽叶片稍有肥厚
BA 0.8 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹	4.3±0.3 ^a	茎切口愈伤化
BA 1.2 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹	2.7±0.3 ^b	茎切口愈伤化

同列不同小写字母显示存在显著性差异($P\leq 0.05$), 后表同此。

表2 铺地刺蒴麻不定根的诱导(40 d)
Table 2 Rooting inducing of *T. procumbens* within 40 days

诱导方式	生根率/%	平均生根时间/d	生根描述
对照	100 ^a	30±0.5 ^a	根系短
IBA 0.5 mg·L ⁻¹	100 ^a	24±0.4 ^b	根系长
NAA 0.5 mg·L ⁻¹	100 ^a	23±0.3 ^b	根系短且肥大

组织培养的研究已有报道, 主要是椴树属(*Tilia*) (Youn等1988; Moon等2010)和黄麻属(*Corchorus*) (Khatun等2003; Naher等2003)。在欧洲椴(*Tilia cordata*)的组织培育体系中, 木本植物培养基(WPM)附加0.2 mg·L⁻¹ BA增殖效果更好(Youn等1988)。在MS基本培养基添加0.5 mg·L⁻¹ IAA和3.0 mg·L⁻¹ BA中, 能够诱导长蒴黄麻(*Corchorus olitorius*)高频率芽的分化(Khatun等2003)。甚至在黄麻(*Corchorus capsularis*)基因转化技术方面, 其繁芽的MS基本培养基附加0.2~0.5 mg·L⁻¹ BA或与0.5~1.0 mg·L⁻¹

IBA、1.0 mg·L⁻¹ IAA混合(Ghosh等2002; Saha等2014; Bhattacharyya等2015)。上述研究在繁育、再生培养基中并没有附加NAA。而本项研究发现, 铺地刺蒴麻在单独添加0.8 mg·L⁻¹ BA的培养基中, 增殖效果最好, 植株生长良好; 高浓度BA (1.2 mg·L⁻¹)会产生愈伤; BA与NAA混合使用时, 植株会出现愈伤化, 而BA与IBA混合使用不会出现愈伤化, 可见高活性的NAA容易诱导愈伤组织。

本研究利用铺地刺蒴麻的嫩芽建立了组培快繁体系。实验结果表明, 铺地刺蒴麻在添加BA 0.8 mg·L⁻¹的MS培养基中, 能够诱导平均5.2个不定芽, 增殖系数高, 且生长情况良好。在添加KIN的MS培养基中, 生长情况良好, 但增殖系数相对较低。铺地刺蒴麻不适合在高浓度的植物生长调节剂的培养基中生长, 因为它们易形成愈伤组织。铺地刺蒴麻在MS蛭石培养基中均可生根, 生根率无明显差别, 说明该植物是易生根植物。移栽存活率

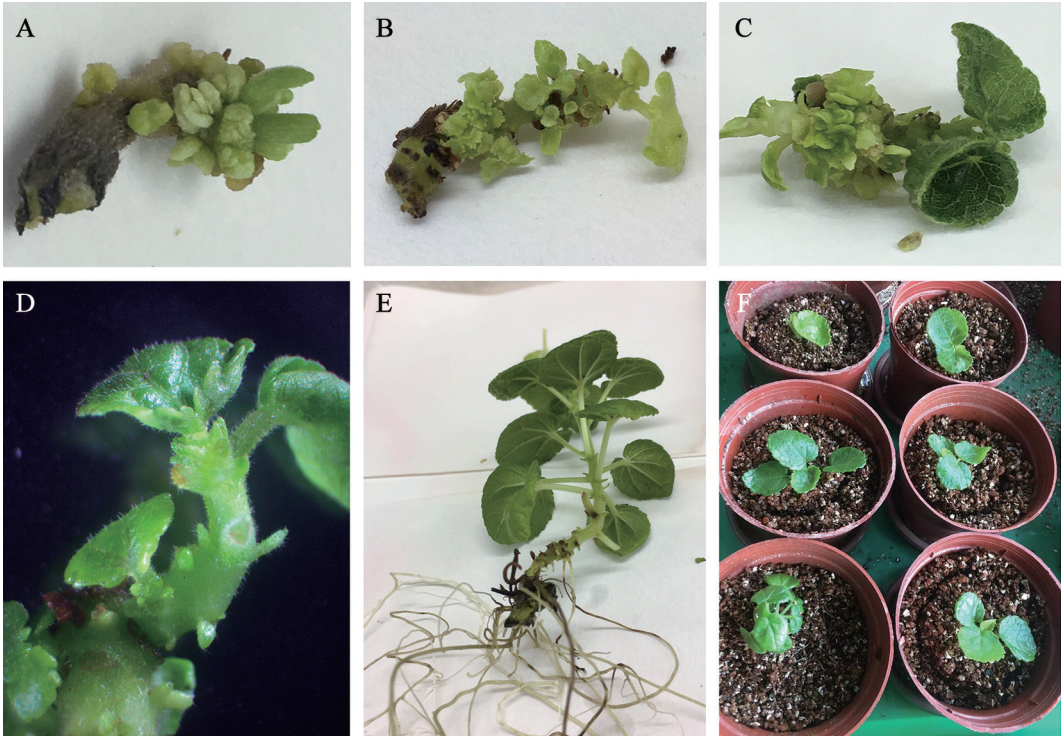


图1 铺地刺蒴麻不定芽的诱导和植株再生

Fig.1 Adventitious shoot inducing and plant regeneration in *T. procumbens*

A: 茎段在BA 1.2 mg·L⁻¹的MS培养基上培育50 d, 出现愈伤组织和不定芽; B: 茎段在BA 0.8 mg·L⁻¹的MS培养基上培育50 d, 形成不定芽; C: 茎段BA 0.8 mg·L⁻¹的MS培养基上培育60 d形成不定芽; D: 茎段BA 0.8 mg·L⁻¹的MS培养基上培育80 d形成不定芽和次生不定芽; E: 植株在有IBA 0.5 mg·L⁻¹的MS培养基上培育40 d后的生根情况; F: 植株于蛭石:沙(1:1)基质移栽1个月后的生长情况。

高, 植株于蛭石:沙(1:1)基质移栽1个月后, 存活率可达95.3%以上。本研究通过组织培育技术进行了铺地刺蒴麻种苗的快速繁育, 为其大规模的人工种苗生产和应用推广提供了基础。

参考文献(References)

- Bhattacharyya J, Chakraborty A, Roy S (2015). Genetic transformation of cultivated jute (*Corchorus capsularis* L.) by particle bombardment using apical meristem tissue and development of stable transgenic plant. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 121 (2): 311–324
- Estella TF, Charles F, Gary H, et al (2017). Evaluation of the cytotoxicity of two Cameroonian herbal plants of genus *Triumfetta rhomboidea* and *Dorstenia elliptica* using the MTT and Neutral Red assays. *J Dis Med Plant*, 3 (6): 97–103
- Florence J, Waldren S, Chepstow-Lusty AJ (1995). The flora of the Pitcairn Islands: a review. *Biol J Linn Soc*, 56 (1-2): 79–119
- Ghosh M, Saha T, Nayak P, et al (2002). Genetic transformation by particle bombardment of cultivated jute, *Corchorus capsularis* L. *Plant Cell Rep*, 20 (10): 936–942
- Huang TC, Huang SF, Yang KC (1994). The flora of Taiping-tao (Aba Itu Island). *Taiwania*, 39 (1-2): 1–26
- Iwashina T, Kokubugata G (2012). Flavone and flavonol glycosides from the leaves of *Triumfetta procumbens* in Ryukyu Islands. *Bull Nat Mus Nat Sci Ser B*, 38 (2): 63–67
- Jian SG, Ren H (2017). *Atlas on Tool Species for Vegetation Restoration on Tropical Coral Islands*. Beijing: Chinese Forestry Publishing [简曙光, 任海(2017). 热带珊瑚岛礁植被恢复工具种图谱. 北京: 中国林业出版社]
- Khatun A, Saha CK, Naher Z, et al (2003). Plant regeneration from the cotyledons of tossa jute (*Corchorus olitorius* L.). *Biotechnology*, 2 (3): 206–213
- Mévy JP, Bessière JM, Rabier J, et al (2010). Composition and antimicrobial activities of the essential oil of *Triumfetta rhomboidea* Jacq. *Flav Frag J*, 21 (1): 80–83
- Moon HK, Kim YW, Park SY (2010). A review of forest trees micropropagation and its current status in Korea. *J Plant Biotech*, 37 (4): 343–356
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15: 473–479
- Naher Z, Khatun A, Mahbub S, et al (2003). Influence of genotypes on plant regeneration from cotyledons of *Corchorus capsularis* L. *Biotechnology*, 2 (1): 44–51
- Peraza-Sánchez SR, Poot-Kantún S, Toores-Tapia LW (2005). Screening of native plants from Yucatan for anti-*Giardia lamblia* activity. *Pharm Biol*, 43 (7): 594–598
- Ramachandran Nair AG, Seetharaman TR, Voirin B, et al (1986). True structure of triumfoidin, a flavone glycoside from *Triumfetta rhomboidea*. *Phytochem*, 25 (3): 768–769
- Saha P, Datta K, Majumder S, et al (2014). *Agrobacterium* mediated genetic transformation of commercial jute cultivar *Corchorus capsularis* cv. JRC 321 using shoot tip explants. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 118 (2): 313–326
- Youn Y, Ishii K, Saito A, et al (1988). *In vitro* plantlet regeneration from axillary buds of mature trees of *Tilia cordata*. *Jap J For Soc*, 70 (7): 315–317

Inducing of adventitious shoots and plant regeneration in *Triumfetta procumbens*

CHEN Shuang-Yan^{1,2}, YU Xin-Cheng^{1,2}, XIONG Yu-Ping², WU Kun-Lin², ZHENG Feng²,
JIAN Shu-Guang², REN Hai², ZENG Song-Jun², MA Guo-Hua^{2,*}

¹Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China

²South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

Abstracts: The young stem sections of *Triumfetta procumbens* were used as explants, an efficient mass shoot proliferation and regeneration systems were established. The optimal medium for inducing adventitious shoot buds was MS medium supplemented with 0.8 mg·L⁻¹ BA, which could induce an average of 5.2 adventitious shoot buds. As the stems sections were continuous cultured for 80 days, secondary shoot organogenesis could be induced on leaves and stem sections. All the rooting media could induce root formation. After 30 days of culture in rooting medium, the rooting seedlings were transplanted into the matrix with vermiculite: sand (1:1) for one month, the plantlets survival percentage was 95.3%.

Key words: *Triumfetta procumbens*; adventitious shoot proliferation; rooting; transplanting

Received 2019-08-08 Accepted 2019-09-26

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA13020500).

*Corresponding author (magh@scib.ac.cn).