

珍稀濒危植物北碚榕的组培快繁

张艳玲^{1,2}, 唐澄莹^{1,2}, 何夫^{1,2}, 吴秀华², 汤绍虎^{1,2,*}

西南大学¹三峡库区生态环境教育部重点实验室, ²生命科学学院, 重庆400715

摘要: 以北碚榕茎尖(1.5 cm)为外植体, 通过丛芽诱导、增殖和生根建立离体繁殖体系。结果表明, 茎尖在MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA培养基中培养30 d, 丛芽诱导率达100%, 繁殖系数达9.2; 不定芽在此培养基中继代培养, 1~6代平均繁殖系数达7.0, 丛芽长势良好; 不定芽在1/2MS培养基中, 30 d生根率达100%, 根系发达, 试管苗生长健壮。105株试管苗移栽到土壤营养钵中, 30 d存活102株, 成活率达97.14%。1个茎尖外植体在半年内可繁殖试管苗10万株。

关键词: 北碚榕; 茎尖; 组织培养; 快速繁殖

Tissue Culture and Rapid Propagation of Rare and Endangered *Ficus beipeiensis*

ZHANG Yan-Ling^{1,2}, TANG Cheng-Ying^{1,2}, HE Fu^{1,2}, WU Xiu-Hua², TANG Shao-Hu^{1,2,*}

¹Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, ²School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The stem tips (1.5 cm) of *Ficus beipeiensis* were used as explants to establish a propagation system *in vitro*. The results indicated that the stem tip explants were cultured on MS medium supplemented with 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA for 30 days, the induction rate of the adventitious buds achieved 100% and a propagation coefficient reached 9.2. The adventitious buds were subcultured every other 30 day. The Average multiplication coefficient achieved 7.0 from 1 to 6 generations, and the cluster buds grew well. The adventitious buds were trained on 1/2MS basal medium for 30 d, their rooting rate was as high as 100%, the root system developed well and the test-tube plantlets grew vigorously. One hundred and five rooted plantlets were then transplanted to matrix soil, and 102 of them (97.14%) survived after 30 days' culture. A stem tip can multiply one hundred thousand of test-tube plantlets in six mouths.

Key words: *Ficus beipeiensis*; stem tip; tissue culture; rapid propagation

北碚榕(*Ficus beipeiensis*)隶属桑科(Moraceae)榕属。乔木, 高约为15 m, 胸径15~20 cm; 叶纸质, 长圆状椭圆形, 长12~22 cm, 宽5~9 cm; 榕果梨形, 直径1~2 cm, 生于老茎发出的无叶枝上。产于重庆市北碚区(北温泉公园, 模式标本产地), 生于海拔300~500 m石灰岩陡壁上或岩下较阴湿的地方(中国科学院中国植物志编辑委员会1998), 分布在重庆缙云山国家自然保护区东面山麓和北温泉公园内, 现有野生植株5株(陈龙2013)。另在北碚公园、重庆市花卉园等地有零星扦插栽培, 但成年植株总数不足10株。北碚榕重庆特有, 但种群数量稀少, 生存现状极危, 2004年被列入《中国物种红色名录》(汪松和解焱2004)。

北碚榕四季常绿, 树形优美, 冠大浓郁(齐亮2010)。2007年经园林专家考评, 其生物学特性、观赏价值和开发利用潜力之综合性状居重庆市十大本土树种之首(李珩2007; 纪文伶和康文霖2007),

是一种优良的园林绿化树种。

榕属植物主要通过种子和扦插繁殖(Laman 1995; 王曼等2008; 吴志红和张绍茹2010; Chen等2013)。然而, 北碚榕雌雄异株, 野生植株4雌1雄, 仅2雌株可结实, 且结实率低, 种皮硬实, 种子难于萌发, 根系无萌芽能力(野生植株冠下及周围未曾见到其种子萌发和幼苗生长), 故自然繁殖困难, 种群数量稀少(陈龙2013)。迄今, 关于北碚榕的繁殖研究, 仅有扦插繁殖的报道(齐亮2010; 齐亮等2010)。扦插繁殖不仅损伤为数不多的母树, 而且繁殖效率较低。植物组织培养既可实现植物的离体快速繁殖(赵静等2012), 又能保持其优良性状

收稿 2015-02-12 修定 2015-03-10

资助 国家自然科学基金(31370317)和三峡库区生态环境教育部重点实验室开放基金(SXKQSYS-ZW-2013001)。

* 通讯作者(E-mail: tangsh@swu.edu.cn; Tel: 023-68252838)。

(杨长青等1991),因而在植物无性繁殖中广泛应用(吴秀华等2013)。本试验以野生北碚榕茎尖为外植体,通过丛芽诱导、增殖和生根建立离体快繁体系,为其工厂化育苗和园林应用奠定基础。

材料与方 法

1 实验材料及其表面消毒

试验材料为北碚榕(*Ficus beipeiensis* S.S. Chang)野生植株(雌株)枝条,2013年4月取材于重庆市北温泉公园。试验于2013年4~12月在西南大学生命科学学院进行。

取生长健壮的当年生枝条,截取长3 cm左右苗端,洗净。在无菌条件下,先用75%乙醇消毒0.5 min,无菌水冲洗1次;后用0.1% HgCl₂消毒10 min,无菌水冲洗5~6次。剥除幼叶,切取长约1.5 cm茎尖,作为诱导丛芽的外植体。

2 丛芽诱导与不定芽继代增殖

将茎尖外植体接种到含0.5、1.0、1.5、2.0 mg·L⁻¹ 6-BA和0.05、0.10、0.15、0.20 mg·L⁻¹ NAA组合的丛芽诱导培养基中,培养30 d后统计丛芽诱导率、繁殖系数(培养后不定芽总数/接种茎尖数)及生长状况。分离、切割丛芽,取大小基本一致(长约2 cm)的单个不定芽,用上述各浓度6-BA和NAA的丛芽诱导培养基进行继代培养,30 d后统计各代繁殖系数(培养后不定芽总数/接种不定芽

数)。每个培养基接种36个不定芽(3~4个·瓶⁻¹),3次重复。

3 不定芽生根与试管苗移栽

分离、切割丛芽,取大小基本一致(长约3 cm)的单个不定芽,接种在0、0.05、0.10、0.20 mg·L⁻¹ IBA和NAA组合的1/2MS培养基中,30 d后统计生根率、不定根数量和长度。将根系发达、生长良好的试管苗(高4 cm以上)培养瓶移出培养箱,室内放置2 d后逐渐揭盖炼苗5 d;取出试管苗,用温水洗净根部琼脂后移栽到营养钵中,保持基质(田间土、腐殖土各半)湿润,每2~3 d叶面喷施1%尿素1次,30 d后统计成活率。之后将幼苗移栽到田间,半年后统计成活率和观察生长情况。

4 培养条件与数据处理

所用基本培养基均为MS(生根为1/2MS),含蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂7 g·L⁻¹,pH 5.8;培养温度为(25±1) °C,光照强度约65 μmol·m⁻²·s⁻¹,光照时间12 h·d⁻¹。试验数据利用SPSS 12.0软件计算均值和进行统计分析,结果用Excel 2003制表、作图。

实验结果

1 北碚榕茎尖的丛芽诱导

丛芽诱导培养结果表明,植物生长调节剂显著影响北碚榕茎尖的丛芽发生(表1)。除B₄培养基外,其余15个培养基的丛芽发生率均达100%,而繁

表1 植物生长调节剂对北碚榕丛芽诱导的影响

Table 1 Effects of plant growth regulators on bunch buds formation from stem tip of *F. beipeiensis*

培养基编号	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	接种茎尖数/个	形成丛芽茎尖数/个	丛芽发生率/%	繁殖系数/倍	丛芽生长状况
B ₁	0.5	0.05	36	36	100	3.7±0.44 ^{def}	叶翠绿,较小,茎细长
B ₂	0.5	0.10	36	36	100	2.8±0.72 ^{fg}	叶翠绿,较小,茎细长
B ₃	0.5	0.15	36	36	100	2.7±0.44 ^{fg}	叶绿,茎短
B ₄	0.5	0.20	36	32	88.9	1.7±0.44 ^g	叶绿,茎细短
B ₅	1.0	0.05	36	36	100	5.8±0.72 ^{cd}	叶翠绿,茎长
B ₆	1.0	0.10	36	36	100	4.2±0.67 ^{def}	叶翠绿,茎长
B ₇	1.0	0.15	36	36	100	3.3±0.60 ^{efg}	叶黄绿,较小
B ₈	1.0	0.20	36	36	100	3.2±0.44 ^{fg}	叶小,黄绿,茎短
B ₉	1.5	0.05	36	36	100	9.2±0.17 ^a	叶大,翠绿,茎粗长
B ₁₀	1.5	0.10	36	36	100	8.8±0.60 ^b	叶翠绿,较小,茎粗长
B ₁₁	1.5	0.15	36	36	100	5.8±0.60 ^{cd}	叶翠绿,茎粗长
B ₁₂	1.5	0.20	36	36	100	4.7±0.67 ^{def}	叶绿,小卷曲,茎短
B ₁₃	2.0	0.05	36	36	100	6.8±1.30 ^c	叶大,翠绿,茎粗长
B ₁₄	2.0	0.10	36	36	100	7.2±0.33 ^{bc}	叶绿,舒展,茎粗
B ₁₅	2.0	0.15	36	36	100	5.3±0.33 ^{cde}	叶黄绿,小卷曲,茎短
B ₁₆	2.0	0.20	36	36	100	4.2±0.67 ^{def}	叶黄绿,卷曲,茎短

同列数字旁不同小写字母表示差异显著(P<0.05),下表同。

殖系数整体上随6-BA浓度升高和NAA浓度下降而提高。说明培养基中的6-BA/NAA比值决定繁殖系数的高低。其中, B₉培养基繁殖系数最高(9.2), 并与次高的B₁₀培养基(繁殖系数8.8)存在显著差异 ($P \leq 0.05$), 且丛芽生长良好。因此, 丛芽诱导最佳培养基为B₉培养基, 即MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05

mg·L⁻¹ NAA。试验表明, 茎尖接种后(图1-A), 15 d左右明显伸长(图1-B), 30 d形成明显丛芽(图1-C)。

2 北碚榕不定芽的继代增殖

不定芽继代结果表明, 在不同培养基中, 随着继代次数的增加, 繁殖系数逐渐降低(表2)。这可能与细胞分裂素(6-BA)在不定芽内的积累有关。

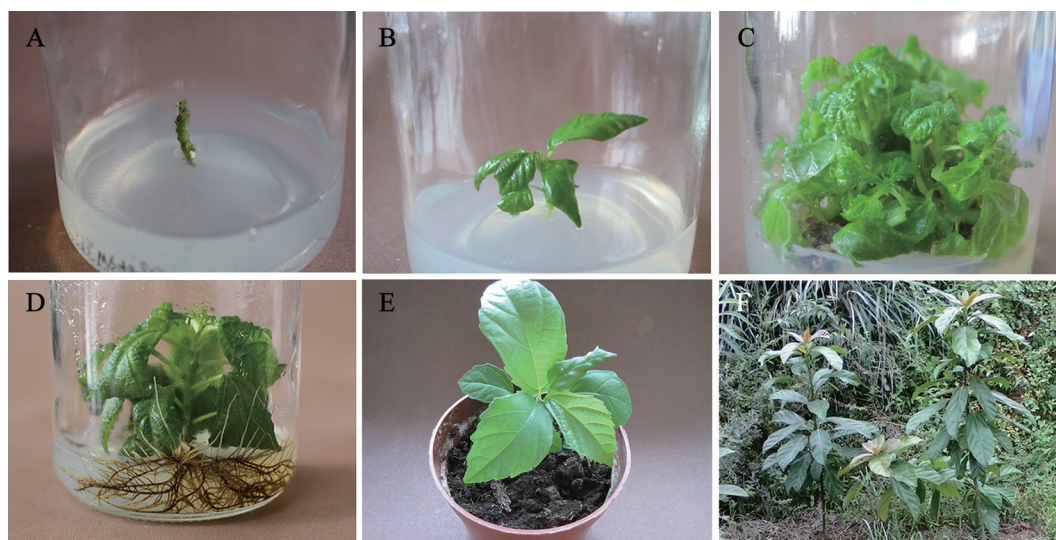


图1 北碚榕的茎尖培养及快速繁殖

Fig.1 Stem tip culture and rapid propagation of *F. beipeiensis*

A: 刚接种的茎尖; B: 培养15 d后的茎尖; C: 茎尖培养30 d形成的丛芽(继代丛芽生长状况与其类似); D: 生根后的不定芽; E: 移栽到营养钵中30 d的试管苗; F: 试管苗在田间生长半年形成的幼苗。

表2 植物生长调节剂对不定芽继代增殖的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on proliferations of adventitious buds of *F. beipeiensis*

培养基编号	繁殖系数/倍						平均繁殖系数/倍	生长状态
	第1代	第2代	第3代	第4代	第5代	第6代		
B ₁	3.7	4.2	2.0	2.0	1.9	1.7	2.6±0.44 ^{de}	较好
B ₂	2.8	2.2	1.3	2.9	1.7	1.2	2.0±0.30 ^{de}	较好
B ₃	2.7	3.7	1.3	1.6	1.5	1.3	2.0±0.40 ^{de}	差
B ₄	1.7	2.5	1.0	1.2	1.2	1.0	1.4±0.24 ^e	差
B ₅	5.8	5.7	4.7	4.0	3.2	2.8	4.4±0.51 ^{cd}	好
B ₆	4.2	5.3	4.5	3.3	1.3	2.5	3.5±0.59 ^{ode}	较好
B ₇	3.3	3.0	2.2	3.0	1.8	1.2	2.4±0.34 ^{de}	较好
B ₈	3.2	3.2	1.7	2.8	1.8	1.3	2.3±0.34 ^{de}	差
B ₉	9.2	8.7	5.8	6.0	6.5	5.5	7.0±0.65 ^a	最好
B ₁₀	8.8	6.2	6.5	7.0	4.7	4.2	6.2±0.68 ^b	好
B ₁₁	5.8	6.3	4.0	4.3	3.5	2.3	4.4±0.60 ^{bcd}	较好
B ₁₂	4.7	7.3	5.3	3.0	2.7	3.5	4.4±0.71 ^{bcd}	较好
B ₁₃	6.8	4.4	4.3	5.8	5.0	4.2	5.1±0.42 ^{bc}	好
B ₁₄	7.2	7.2	7.5	7.3	4.2	3.7	6.2±0.71 ^b	较好
B ₁₅	5.3	8.8	5.7	5.8	4.0	3.0	5.4±0.81 ^{bc}	差
B ₁₆	4.2	6.0	2.2	3.7	3.5	1.5	3.5±0.65 ^{cde}	差

B₁~B₁₆培养基中的6-BA和NAA浓度同表1。

在连续6代的继代培养中, B₉培养基不定芽增殖效果最好, 1~6代平均繁殖系数最高(7.0), 并与其他培养基存在显著差异($P \leq 0.05$), 且不定芽生长最好。因此, 不定芽继代的最佳培养基也为B₉培养基。

3 北碚榕不定芽的生根

不定芽接种后, 7 d左右开始产生不定根, 之后迅速伸长, 30 d形成良好根系。不定芽在是否添加IBA或NAA的1/2MS培养基中均能100%生根(表3)。其中, R₂培养基的不定根数量最多(10.5条); R₁的不定根最长(4.13 cm), 与次者R₅(2.21 cm)存在显

著差异($P \leq 0.05$)。R₁的不定根数量(7.33)虽比R₂少, 但其不定根最长, 且实际上具较多侧根, 根系较发达, 植株生长最好(图1-D)。故从整体比较而言, 不定芽生根的最适培养基为R₁培养基, 即不添加IBA和NAA的1/2MS基本培养基。

4 北碚榕试管苗的移栽

105株试管苗移植到营养钵中, 30 d存活102株, 成活率达97.14%, 且生长正常(图1-E)。幼苗移栽到田间, 半年后成活率为100%, 在自然条件下生长良好(图1-F)。

表3 植物生长调节剂对不定芽生根的影响

Table 3 Effects of plant growth regulators on rooting of adventitious buds of *F. beipeiensis*

培养基编号	IBA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	接种不定芽数	生根不定芽数	生根率/%	根数/条	根长/cm
R ₁	0	0	36	36	100	7.33±0.67 ^{bcd}	4.13±0.09 ^a
R ₂	0.05	0	36	36	100	10.50±0.76 ^a	1.50±0.07 ^c
R ₃	0.10	0	36	36	100	8.00±1.00 ^{abcd}	1.98±0.14 ^b
R ₄	0.20	0	36	36	100	9.83±0.44 ^{ab}	1.33±0.13 ^c
R ₅	0	0.05	36	36	100	8.67±0.88 ^{abc}	2.21±0.14 ^b
R ₆	0	0.10	36	36	100	5.67±0.67 ^d	1.92±0.07 ^b
R ₇	0	0.20	36	36	100	9.00±0.58 ^{ab}	1.45±0.07 ^c
R ₈	0.10	0.10	36	36	100	5.33±0.33 ^d	1.58±0.12 ^c
R ₉	0.20	0.20	36	36	100	6.33±0.33 ^{cd}	0.57±0.06 ^d

讨 论

榕属植物起源于热带、亚热带, 在东南亚各国和我国南方各省市广为栽培, 是颇具人文、自然和生态景观的特色植物(罗泽榕和庄雪影2004), 具有树姿美、形体美和色彩美等特点, 广泛应用于现代园林绿化(江尊钦2011)。北碚榕为重庆市特产的榕属植物, 不仅园林性状优良, 而且适生性好、抗逆性强(李珩2007; 纪文伶和康文霖2007)。但北碚榕种子难于萌发, 自然繁殖困难(陈龙2013)。扦插繁殖既伤母树, 效率又低。开展北碚榕的组培繁殖, 可在短时间内获得大量苗木, 满足城市园林绿化的需要, 且对该珍稀植物的保护和丰富我国尤其是南方各省市园林绿化的植物多样性有重要意义。

北碚榕雌雄异株。雌株叶片较小, 形态和树形较好, 园林价值更优, 所以目前扦插繁殖的北碚榕均为雌株(陈龙2013)。因此, 本试验选择野生北碚榕的雌株为培养和繁殖材料。至今, 关于北碚榕的组织培养还未见报道。本试验以北碚

榕野生植株的茎尖为外植体, 率先建立了北碚榕的离体快繁体系。连续继代培养6代, 不定芽平均繁殖系数达7.0, 1个茎尖外植体在半年内可繁殖试管苗10万株。同时, 本试验所用植物生长调节剂为人工合成、价格较低的6-BA和NAA, 不定芽生根培养基为不含植物生长调节剂的1/2MS基本培养基, 使试管苗生长成本较低, 适合规模化生长。

在本试验中, 继代丛芽偶有内生菌污染现象。通常, 外植体的内生菌潜伏较深, 随着继代次数的增加, 菌量逐渐积累后才会培养基上显现出来(姚娜和赖志强2010)。周俊辉等(2002)认为, 内生菌污染在前期会导致培养物生长缓慢、增殖率降低, 后期会导致试管苗死亡和移栽困难。对于内生菌污染问题, 我们目前采取的措施是剔除被污染丛芽, 今后将考虑在培养基中加入抗生素、生物活性物质等加以防治(张寅玲等2006; 杨国泰等2011)。另外, 在本试验中, 丛芽继代次数(6代)还较低, 平均繁殖系数(7.0)还不

高。因此, 更高代次的繁殖系数还需考查, 丛芽继代培养基还需优化和继续筛选, 继代丛芽的内生菌污染问题应当引起重视和深入研究, 以进一步提高北碚榕离体繁殖体系的整体繁殖效率。

参考文献

- 陈龙(2013). 北碚榕(*Ficus beipeiensis* S.S Chang)形态特征与繁殖生物学研究[硕士论文]. 重庆: 西南大学
- 纪文伶, 康文霖(2007). 重庆将大面积种植10种植物. 中国绿色时报, 2007-11-6第3版
- 江尊钦(2011). 桑科榕属植物在园林绿化中的应用研究——以福州为例[硕士论文]. 福州: 福建农林大学
- 李珩(2007). 十大植物将在我市广种. 重庆晚报, 2007-10-22第6版
- 罗泽榕, 庄雪影(2004). 浅论榕属植物在岭南园林中的应用. 广东园林, (3): 30~33
- 齐亮(2010). 北碚榕繁殖技术研究[硕士论文]. 重庆: 西南大学
- 齐亮, 李先源, 李名杨(2010). 北碚榕扦插繁殖技术研究. 安徽农业科学, 38 (6): 2906~2907
- 汪松, 解焱(2004). 中国物种红色名录(第一卷: 红色名录). 北京: 高等教育出版社, 316
- 王曼, 史素霞, 刘健亭(2008). 无花果的扦插育苗技术. 南方农业, 2 (1): 56~57
- 吴秀华, 张艳玲, 周月, 罗克明, 汤绍虎(2013). ‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立. 植物生理学报, 49 (8): 759~763
- 吴志红, 张绍茹(2010). 菩提树繁殖栽培技术. 云南农业科技, (1): 29~30
- 杨国泰, 李亮, 张冬梅, 钟凤林(2011). 克服植物组织培养中内生菌污染的研究. 中国园艺文摘, (12): 180~182
- 杨永青, 陈扬祥, 魏文雄(1991). 枇杷茎尖组培苗的遗传稳定性及生产性能. 园艺学报, 18 (2): 107~114
- 姚娜, 赖志强(2010). 象草腋芽外植体消毒方法的筛选. 基因组学与应用生物学, 29 (5): 943~946
- 张寅玲, 刘艳军, 黄俊轩, 李建科, 杨霞, 杨静慧, 汪海霞(2006). 含内生菌外植体红掌组培方法的研究. 西南园艺, 34 (6): 9~11
- 赵静, 帅明蓉, 赵玉飞, 李先源, 李名扬(2012). 南川百合组织培养与快繁技术体系研究. 西南师范大学学报(自然科学版), 37 (6): 109~115
- 中国科学院中国植物志编辑委员会(1998). 中国植物志(第23卷第1分册). 北京: 科学出版社, 172~173
- 周俊辉, 刘花全, 罗慧君, 谢海佳, 黄树行(2002). 玛丽安万年青茎段培养的污染防止. 仲恺农业技术学院学报, 15 (4): 43~48
- Chen H, Cao M, Baskin JM, Baskin CC (2013). Temperature regulates photoblastic seed germination in four *Ficus* (Moraceae) tree species from contrasting habitats in a seasonal tropical rainforest. *Am J Bot*, 100 (8): 1683~1687
- Laman TG (1995). *Ficus stupenda* germination and seedling establishment in a Bornean rain forest canopy. *Ecology*, 76 (8): 2617~2626