

郭 丽,朱飞雪,贾文庆. 大岩桐高频再生体系的研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):51-53,356.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.015

# 大岩桐高频再生体系的研究

郭 丽<sup>1</sup>,朱飞雪<sup>1</sup>,贾文庆<sup>2</sup>

(1.河南农业职业学院,河南郑州 451450; 2.河南科技学院,河南新乡 453003)

**摘要:**采用大岩桐叶片为试验材料,研究了不同培养基对大岩桐的愈伤组织诱导、分化、增殖以及生根培养的影响。结果表明:大岩桐叶片在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上的出愈率最高,为 93.4%;在 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上既生长愈伤组织又生长较少的不定芽,其芽的再生率最高,为 83.3%;在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上很少或不形成愈伤组织,而直接形成不定芽。生根培养用 1/2MS 培养基较好,生根速度快,生根平均为 24.3 条。

**关键词:**大岩桐;离体培养;高频再生体系

**中图分类号:** Q945.52      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0051-03

大岩桐(*Sinningia speciosa*)别称落雪泥、新宁治花、丝绒花,属苦苣苔科苦苣苔属(也有学者认为属大岩桐属),原产南美巴西,为多年生草本花卉,株高 20~30 cm,叶长椭圆形,密被白色绒毛,花顶生或腋生,花期长。1845 年苏格兰人 John Fif 率先育出向上开花的大花型品种,引起了育种家的兴趣,对它加以改良,就产生了现在这样丰富多彩和各种类型的大岩桐品种<sup>[1]</sup>。其花大色泽艳丽,雍容华贵,性喜温湿,耐阴,是不可多得的著名室内观赏花卉、案头花卉<sup>[2]</sup>。在欧洲有 150 多年的栽培历史,但引入我国较晚,还没有形成规模生产和销售,所以是具有很大开发前景的商品花卉。

大岩桐单瓣品种因花柱与花药不等高不能自花授粉,且种子繁殖的后代不能保持原有的优良性状,复瓣品种因雌蕊退化丧失结实能力,因而常应用组织培养技术对其进行快速繁殖。大岩桐组织培养方面的最先报道是 Haramaki 采用茎尖培养获得不定芽的研究<sup>[3]</sup>,Johson 用花和花梗培养完成了试管繁殖<sup>[4]</sup>。国内关于大岩桐组织培养的研究较多<sup>[5-10]</sup>,本研究着重探讨不同激素对愈伤组织、不定芽和生根方面的影响,用大岩桐的叶片作为外植体,研究了叶片的诱导、增殖、生根等获得完整植株的全过程,并探讨大岩桐快速繁殖所需条件,为建立大岩桐快速繁殖体系和工厂化育苗提供一定技术参数,为大岩桐遗传转化体系的建立及转基因育种提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大岩桐(*Sinningia speciosa*)由笔者所在实验室提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 材料处理

取外植体,在自来水龙头下流水冲洗(因外植体叶片表

面有茸毛,冲洗时放少许洗衣粉)大岩桐幼叶 30 min,滤干水分,然后置于超净工作台上,用 75% 乙醇浸泡 10 s,然后用 0.1% 氯化汞溶液处理 7~8 min,最后用无菌水冲洗 5~6 次,用无菌滤纸吸干表面水分,之后将叶片切成 1 cm×1 cm 的小块并接种于培养基上。

#### 1.2.2 培养条件

1.2.2.1 诱导、分化培养基的设置 诱导、分化、增殖均以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA 和 NAA,蔗糖用量为 20 g/L<sup>[11]</sup>,琼脂为 7 g/L,pH 值为 5.8。培养基激素处理浓度设置见表 1。

表 1 大岩桐的诱导、分化培养基激素处理浓度

培养基代号	激素处理浓度(mg/L)	
	6-BA	NAA
1	0.5	0.1
2	1.0	0.1
3	1.0	0.2
4	2.0	0.2
5	3.0	0.2
6	3.0	0.5

注:基本培养基均为 MS。

1.2.2.2 生根培养基的设置 生根培养基的基本培养基及激素处理浓度见表 2,其中蔗糖用量为 20 g/L<sup>[5]</sup>,琼脂为 7 g/L,pH 值为 5.8。

1.2.2.3 接种数量与培养条件 每个处理接种 18 瓶,每瓶接种 5 块外植体,培养温度为 24~26 ℃,光照度 1 500~2 000 lx,光照时间为 16 h/d,30 d 后统计形成愈伤组织、不定芽的外植体数和每块外植体上形成的不定芽数。

1.2.2.4 统计分析 方差分析均采用 LSD 法进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 芽的诱导、分化及继代增殖

培养 10 d 后发现,部分外植体开始弯曲、膨大增厚。培养 20 d 时愈伤组织及不定芽的诱导情况见表 3。

培养 30 d 后观察,诱导效果更明显(图 1 至图 4),在前

收稿日期:2014-06-20

基金项目:河南农业职业学院科研项目(编号:KY201-11)。

作者简介:郭 丽(1979—),女,河南开封人,硕士,讲师,从事园林植物研究。E-mail:guoli197979@163.com。

表 2 大岩桐的生根培养基激素处理浓度

培养基代号	基本培养基	激素处理浓度 (mg/L)	
		NAA	6-BA
A	1/2MS		
B	1/2MS	0.1	
C	1/2MS	0.2	
D	1/2MS	0.5	
E	1/2MS		0.5
F	1/2MS		1.0
G	MS		
H	MS	0.1	
I	MS	0.2	
J	MS	0.5	
K	MS		0.5
L	MS		1.0

表 3 大岩桐在不同培养基上的诱导情况

培养基代号	激素处理浓度 (mg/L)		诱导情况
	6-BA	NAA	
1	0.5	0.1	开始从叶片边缘分化少数不定芽, 几乎看不到愈伤组织
2	1.0	0.1	叶片膨大适中且愈伤组织颜色淡绿
3	1.0	0.2	叶片长得较慢, 只在近叶轴处有小块愈伤组织
4	2.0	0.2	叶片膨大明显, 从切口处形成愈伤组织
5	3.0	0.2	叶片膨大明显, 从切口处形成愈伤组织
6	3.0	0.5	叶片稍膨大, 大部分有愈伤组织形成

注:基本培养基均为 MS。

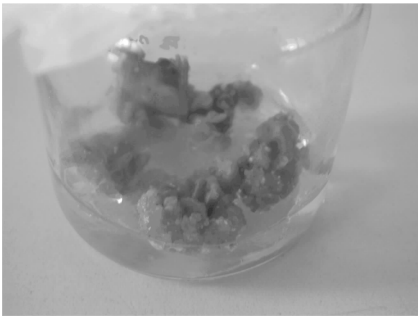


图1 4号培养基上叶片分化培养



图2 4号培养基上继代培养

面基础之上,愈伤组织和不定芽继续生长和膨大,对不同激素浓度配比对叶片再生频率的影响进行统计,结果见表4。

通过观察发现,不同浓度的 6-BA 和 NAA 处理组合对大岩桐叶片的不定芽和愈伤组织的诱导、分化有明显的影响(表3)。接种 10 d 后,1 号培养基上基本不形成愈伤组织,而

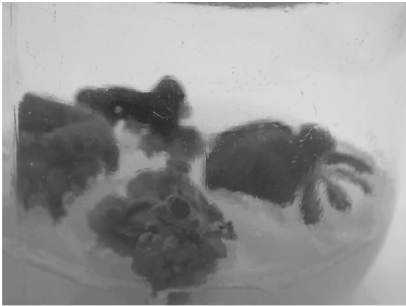


图3 2号培养基上大岩桐叶片分化培养

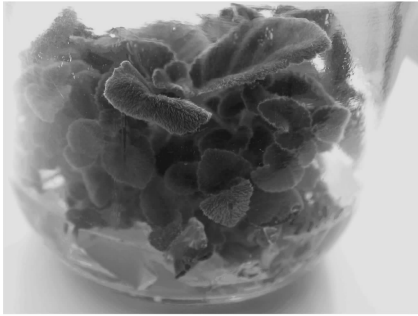


图4 大岩桐继代增殖培养

表 4 不同激素浓度对比大岩桐叶片分化的影响

培养基代号	激素及浓度 (mg/L)		外植体数 (个)	出愈率 (%)	芽再生率 (%)	平均再生不定芽数 (个)
	6-BA	NAA				
1	0.5	0.1	90	4.4d	53.3b	4.7b
2	1.0	0.1	90	80.0ab	83.3a	9.0a
3	1.0	0.2	90	71.1bc	11.1d	1.7c
4	2.0	0.2	90	93.4a	63.3b	5.0b
5	3.0	0.2	90	56.7c	26.7c	3.7bc
6	3.0	0.5	90	73.3b	6.7d	1.7c

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下表同。

是直接长出不定芽;4、5 号培养基则膨大明显,基本上都能形成愈伤组织,继续培养发现,4 号培养基在诱导愈伤组织的基础上继续分化出不定芽,而这个过程历时较长。与之相反,1 号培养基可从外植体切口处直接分化出不定芽,出芽时间最早、最快,但分化的不定芽则较少;2 号培养基在诱导愈伤组织的基础上继续分化出不定芽,分化出不定芽时间介于 1 号培养基和 4 号培养基之间,但是分化出不定芽的数目远远多于 1 号培养基。由此可见,培养基中不同激素对比对诱导愈伤组织和不定芽有很大的影响。

经方差分析后发现,每个培养基上出愈率、出芽率以及每个外植体形成的不定芽数都有显著差异(表4)。从出愈率来看,4 号培养基的出愈率最高,为 93.4%,其次是 2 号培养基,出愈率为 80.0%,二者之间差异不显著。然后依次为 6 号培养基、3 号培养基和 5 号培养基,其出愈率分别为 73.3%、71.1% 和 56.7%,6 号培养基与 3 号培养基之间差异不显著,而与 5 号培养基之间差异显著。在 6 个处理中,1 号培养基的出愈率最低,为 4.4%。由此分析得出,以上 6 个培养基中,4 号培养基是诱导大岩桐叶片产生愈伤组织的最好培养基。

从芽的再生率来看,2 号培养基上芽的再生率最高,为 83.3%,其次为 4 号培养基,为 63.3%,二者之间差异显著。

然后依次为 1 号培养基、5 号培养基和 3 号培养基,其芽再生率分别为 53.3%、26.7%、11.1%,三者之间差异显著。芽再生率最低的为 6 号培养基,只有 6.7%。

从每个外植体的再生不定芽数来看,2 号培养基的芽数最多,为 9 个,与其他几种培养基差异显著。其次为 4 号培养基,为 5 个,最少的为 3 号培养基和 6 号培养基,其平均再生不定芽数均为 1.7 个。

2.2 生根培养

当不定芽在增殖培养基上长有 3~4 张真叶时,选取长势一致的再生不定芽接种到生根培养基上,30 d 后观察统计根的生长情况。

不定芽在几种不同处理的生根培养基上均能生根,培养中先在基部切口处膨大,形成少量愈伤组织,6~8 d 后 1/2MS 培养基中最先开始生根,基本培养基为 MS 的培养基上均无根的形成;30 d 后的生根情况见表 5。

表 5 大岩桐再生不定芽的生根

培养基代号	基本培养基	激素处理浓度 (mg/L)		幼苗数	生根幼苗数	平均生根条数
		NAA	IBA			
A	1/2MS	0	0	90	90	24.3abc
B	1/2MS	0.1	0	90	90	20.0cde
C	1/2MS	0.2	0	90	90	25.0ab
D	1/2MS	0.5	0	90	90	26.7a
E	1/2MS	0	0.5	90	90	22.0abcd
F	1/2MS	0	1.0	90	90	21.3bcd
G	MS	0	0	90	90	16.0efg
H	MS	0.1	0	90	90	12.3g
I	MS	0.2	0	90	90	13.7g
J	MS	0.5	0	90	90	16.3efg
K	MS	0	0.5	90	90	14.0fg
L	MS	0	1.0	90	90	18.7def

通过生根试验观察发现,以 1/2 MS 为基本培养基的处理组,生根速度较以 MS 为基本培养基的处理组早,块茎上的毛细根系发白、较长,且生根数量和质量均高于以 MS 为基本培养基的处理组;在添加生长素的培养基中,以 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L 和 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L 培养基为好,其次为 1/2 MS 培养基。

从生根条数观察,经方差分析后发现,在以上几个处理中,平均生根条数差异显著,基中 D 培养基的最多,为 26.7 条,其次较多的依次为 C 培养基、A 培养基和 E 培养基,分别为 25.0、24.3、22.0 条,四者之间差异不显著。而生根条数最少的为 H 培养基,为 12.3 条。介于中间的为 F、B、L、J、G、K、I 培养基,分别为:21.3、20、18.7、16.3、16、14、13.7 条。

在生根培养中,以 1/2 MS 为基本培养基的处理组中的须根平均长 2.0~3.5 cm,以 MS 为基本培养基的处理组中的须根长 0.5~2.0 cm,无块茎形成,并且在移栽冲洗根部培养基时须根易脱落,不易成活。因此,从生根效果和经济角度来看,1/2 MS 是最适的培养基(图 5、图 6)。

2.3 炼苗与移栽

当大岩桐不定芽切到生根培养基后,待株高 3~4 cm 时可进行炼苗移栽(图 7、图 8)。将封口膜掀开炼苗 2~3 d,将大岩桐幼苗取出,放清水中漂洗,小心洗净上面附着的培养



图5 A培养基上的生根培养



图6 C培养基上的生根培养



图7 大岩桐生根培养处理

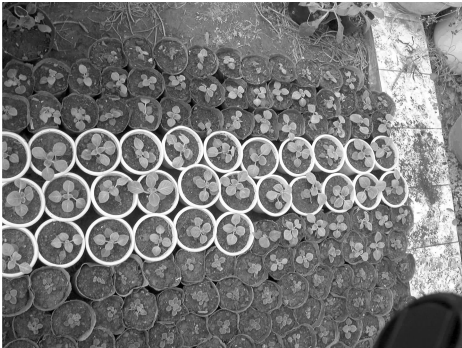


图8 大岩桐移栽幼苗

## 参考文献:

- [1] 陈宜瑜, 吕宪国. 湿地功能与湿地科学的研究方向[J]. 湿地科学, 2003, 1(1): 7-11.
- [2] 白军红, 欧阳华, 徐惠风, 等. 青藏高原湿地研究进展[J]. 地理科学进展, 2004, 23(4): 1-9.
- [3] 罗 磊. 青藏高原湿地退化的气候背景分析[J]. 湿地科学, 2005, 3(3): 190-199.
- [4] Gao J, Li X L, Brierley G. Topographic influence on wetland distribution and change in Maduo County, Qinghai - Tibet Plateau, China [J]. Journal of Mountain Science, 2012, 9(3): 362-371.
- [5] 陈克林, 张小红, 吕 咏. 气候变化与湿地[J]. 湿地科学, 2003, 1(1): 73-77.
- [6] 宋长春. 湿地生态系统对气候变化的响应[J]. 湿地科学, 2003, 1(2): 122-127.
- [7] 陈桂琛, 黄志伟, 卢学峰, 等. 青海高原湿地特征及其保护[J]. 冰川冻土, 2002, 24(3): 254-259.
- [8] 朱万泽, 钟祥浩, 范建容. 西藏高原湿地生态系统特征及其保护对策[J]. 山地学报, 2003, 21(增刊1): 7-12, 39.
- [9] 郑 杰, 蔡 平. 青海省湿地类型保护区现状与发展对策[J].

(上接第 53 页)

基。为提高大岩桐瓶苗移栽成活率, 可先栽在珍珠岩中, 也可栽在珍珠岩: 椰糠 = 1: 1 的基质中<sup>[12]</sup>, 最好先将基质灭菌。大岩桐栽培时, 浇水时坚持“见干才浇, 不干不浇, 浇则浇透”的原则, 并注意避免直接将水喷洒在叶片和花朵上, 尤其是在通风不良、温度偏低时, 这是由于大岩桐叶片表面有密集茸毛, 叶面渍水易腐烂生病。大岩桐虽不喜多水的土壤环境, 却喜较高的空气湿度, 注意土壤要通气性好, 栽植不宜过深。

### 3 讨论

鉴于大岩桐的生物学特性和发展前景, 本试验以大岩桐叶片为外植体进行离体培养, 优化了其再生体系, 研究目的旨在指导并应用于生产、节约成本和适应大规模生产, 并在优化大岩桐高频再生体系的基础上, 为大岩桐的遗传转化体系的建立和大岩桐的品种改良提供参考。适当浓度的细胞分裂素 6-BA 和 NAA 能有效诱导愈伤组织和芽的继代增殖, 浓度太高则抑制愈伤组织分化成芽与芽丛的分化和生长。大岩桐叶片在 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 培养基上的出愈率最高; 在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基上既生长愈伤组织又生长较少的不定芽, 其芽的再生率最高; 在 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基上很少或不形成愈伤组织, 而直接形成不定芽。可以根据不同的目的, 调整激素不同配比来满足需要, 为建立大岩桐快速繁殖体系和工厂化育苗提供一定技术参数, 并为大岩桐种质资源的保护和开发利用奠定一定的基础。

青海科技, 2002, 9(6): 16-19.

- [10] 黄桂林. 青海三江源区湿地状况及保护对策[J]. 林业资源管理, 2005(4): 35-39.
- [11] 赵魁义. 中国沼泽志[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [12] 刘厚田. 湿地的定义和类型划分[J]. 生态学杂志, 1995, 14(4): 73-77.
- [13] 郑作新. 川西地区鸟兽资源调查报告[M]. 北京: 科学出版社, 1962.
- [14] 张国坤, 邓 伟, 吕宪国, 等. 新开河流域湿地景观格局动态变化过程研究[J]. 自然资源学报, 2007, 22(2): 204-210.
- [15] 孙广友. 试论沼泽与冻土的共生机理——以中国大小兴安岭地区为例[J]. 冰川冻土, 2000, 22(4): 309-316.
- [16] 雒维国, 王世和, 黄 俊. 太阳光照对湿地蒸发蒸腾的影响[J]. 太阳能学报, 2007, 28(4): 401-404.
- [17] 王根绪, 李 琪, 程国栋, 等. 40 年来江河源区的气候变化特征及其生态环境效应[J]. 冰川冻土, 2001, 23(4): 346-352.
- [18] 马柱国, 魏和林, 符淙斌. 土壤湿度与气候变化关系的研究进展与展望[J]. 地球科学进展, 1999, 14(3): 88-94.
- [19] 张 芸, 吕宪国, 倪 健. 三江平原典型湿地冷湿效应的初步研究[J]. 生态环境, 2004, 13(1): 37-39.

## 参考文献:

- [1] 宏关斌. 大岩桐的育苗方法[J]. 内蒙古教育学院学报: 自然科学版, 1999, 12(4): 40-41.
- [2] 谢吉容, 李国昌, 梁国鲁. 大岩桐的研究概况及展望[J]. 西南园艺, 2006, 34(2): 33-36.
- [3] Heinz D J. Induced mutations in vegetatively propagated plants[R]. Vienna: International Atomic Energy, 1973: 55.
- [4] 罗士伟. 植物组织培养在花卉上的应用[J]. 植物生理学通讯, 1979(3): 1-9.
- [5] 王树耀, 黄白红. 大岩桐的组培快繁技术研究[J]. 湖南文理学院学报: 自然科学版, 2004, 16(1): 43-44.
- [6] 王家远, 罗荣芬, 周大刚, 等. 大岩桐叶柄诱导再生植株[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2004, 22(4): 19-21.
- [7] 王立凤, 石兰英, 杨 静. 大岩桐的组织培养[J]. 湖北农业科学, 2012, 40(6): 31-33.
- [8] 何若天, 林新全, 邱景锋. 氯化胆碱对大岩桐组培苗生长的影响[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(2): 105-107.
- [9] 赵小梅, 吴翠荣, 刘石泉, 等. NAA、IBA 对大岩桐块茎形成的影响[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2006, 35(4): 61-64.
- [10] 庞基良, 王利琳, 胡江琴, 等. 大岩桐花萼切块离体培养直接再生花芽的形态观察(简报)[J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39(4): 383-389.
- [11] 周根余, 周卫华, 程磊. 大岩桐组培中休眠现象的初步研究(简报)[J]. 上海农业学报, 2000, 16(2): 69-72.
- [12] 李爱华. 大岩桐组培苗移栽技术研究初报[J]. 湖北林业科学, 2004(2): 29-31.