

王一诺,李 翠,肖 冬,等. 中华石蝴蝶组织培养及试管开花诱导[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):98-100.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.027

# 中华石蝴蝶组织培养及试管开花诱导

王一诺,李 翠,肖 冬,李林轩,韦 莹,王晓峰,韦坤华

(广西壮族自治区药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室,广西南宁 530023)

**摘要:**以中华石蝴蝶(*Petrocosmea sinensis* Oliv.)的幼嫩叶片为外植体,以MS为基本培养基,研究植物生长调节剂多因素组合对中华石蝴蝶继代增殖和生根培养的影响,并诱导获得的无菌苗在试管中开花。结果显示,不同的生长调节剂配比对中华石蝴蝶继代培养和生根培养的影响不同,MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.1 mg/L IAA 利于芽继代增殖,MS+0.5 mg/L IBA+0.1 mg/L NAA+1.0 g/L 活性炭适于诱导生根获得再生植株,MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 利于试管苗开花,持续继代可抑制中华石蝴蝶的试管开花。

**关键词:**中华石蝴蝶;组织培养;继代增殖;生根培养;试管开花

**中图分类号:** S682.1+90.4+3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0098-03

中华石蝴蝶(*Petrocosmea sinensis* Oliv.)为苦苣苔科石蝴蝶属多年生草本植物,产于云南北部、四川和湖北西部,生于

收稿日期:2015-10-15

基金项目:广西科学研究与技术开发计划(编号:桂科重 1355001-3-4、桂科重 14125008-2-21);广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(编号:GZPT1234);南宁市科学研究与技术开发计划(编号:20133032-4)。

作者简介:王一诺(1984—),女,广西梧州人,硕士,研究实习员,从事药用植物组织培养方面的研究。Tel:(0771)5602850;E-mail:yyzwyynuo@sina.com。

通信作者:韦坤华,博士,副研究员,主要从事药用植物生物技术研究。E-mail:divinekh@163.com。

不同浓度NaCl胁迫下,北海道黄杨愈伤组织中游离脯氨酸的含量见图3。北海道黄杨愈伤组织中游离脯氨酸的含量随盐浓度升高呈现先比较平缓后急剧上升趋势,在无盐及低浓度盐胁迫的情况下,愈伤组织内的游离脯氨酸含量均较低,随着培养基中NaCl浓度升高,脯氨酸含量变化呈急剧上升趋势,在盐浓度相对较高(1.0%)时游离脯氨酸含量最高,达184.2 μg/g。

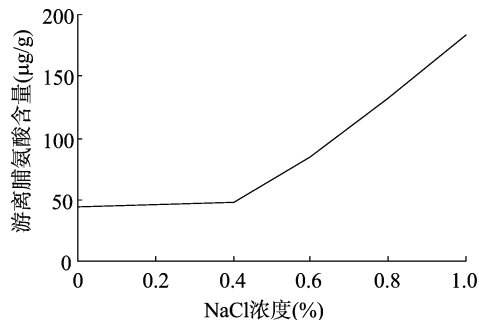


图3 NaCl胁迫对北海道黄杨愈伤组织中游离脯氨酸含量的影响

## 3 讨论

在诱导叶片愈伤组织阶段,2,4-D 1.5 mg/L、6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 这2个激素配比对愈伤组织的诱

低山阴处的石上。目前,苦苣苔科(Gesneriaceae)植物在全世界约有140属2000余种,中国有58属(其中28属特产中国)463种,从辽宁到海南均有分布,多数属、种分布于云南、广西、广东等省(区)热带及亚热带石灰岩的陡崖上<sup>[1]</sup>。苦苣苔植物很多品种花色艳丽,极具观赏价值。此外,芒毛苣苔属、非洲紫苣苔属、大岩桐属,中国产的吊石苣苔、蚂蚱七、牛耳朵等具有药用价值<sup>[2]</sup>。由于许多苦苣苔科植物分布区域狭窄,对生长条件要求苛刻,加上民间的过度采挖,使许多苦苣苔科植物的野生资源濒临绝种<sup>[3]</sup>。

中华石蝴蝶不仅花色美丽,可作为观赏花卉,同时也是一种中药材,以全草入药,具有清热解表、健脾和胃等功效,可用于治疗感冒、小儿疳积等症状<sup>[4]</sup>。本研究通过对中华石蝴蝶

诱导效果最好,诱导率最高。在试验中发现在叶片培养前期诱导出愈伤组织量很低的叶片,在转移到6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L的培养基中进行2次培养后,会促进叶片四周切口处愈伤组织的形成,诱导出愈伤组织厚度为1.0~1.5 cm。在愈伤组织增殖培养中,愈伤组织增殖生长启动时间比较晚,15 d左右开始启动,而在30 d时出现褐化现象;0.5 mg/L 2,4-D对愈伤组织增殖效果最好。

在加入不同浓度NaCl的培养基中进行愈伤组织培养,NaCl浓度为0.2%时愈伤组织长势没有受到太大影响,当NaCl含量上升到0.4%以上时,愈伤组织生长量出现明显的下降趋势,褐化现象逐渐严重,游离脯氨酸含量增加。因此,在后续研究中可选用大于0.4%的浓度作为耐盐细胞的诱变与筛选的NaCl浓度。

## 参考文献:

- [1]王新生. 北海道黄杨的特性和用途[J]. 中国林业,2008(10):44.
- [2]王瑞云,王玉国. 北海道黄杨试管快速繁殖技术研究[J]. 生物技术,2004,14(2):51-53.
- [3]周和平,张立新,禹 锋,等. 我国盐碱地改良技术综述及展望[J]. 现代农业科技,2007(11):159-161,164.

组织培养的技术研究,探索行之有效的中华石蝴蝶繁殖技术并通过仿生栽培,可以对其野生资源进行有效保护。试管开花是利用组织培养技术使组培植物在离体环境下开花的一种现象,不受季节的限制,可以通过控制相应的条件,让组培植物进入开花时期<sup>[5]</sup>。中华石蝴蝶的试管开花可为人们对鲜花日益增长的需求提供广阔的市场。因此,利用植物组织培养技术对中华石蝴蝶进行培养并对其试管开花作初步探究,研究其开花机制,具有重要的现实意义和应用价值。本研究在中华石蝴蝶组织培养的基础上,进行无菌苗的试管开花诱导,可为研究其花期生理和调控提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中华石蝴蝶采取广西壮族自治区药用植物园科研基地内健壮无病害的植株,选取其幼嫩的叶片为外植体。

### 1.2 外植体消毒

将采回的外植体在流水下缓慢冲洗,并用软毛刷轻轻擦拭去除表面的污垢,放入烧杯中,用适量浓度洗洁精溶液浸泡 15 min 后,再用流水冲洗 10 min。将材料移至超净工作台上,用 75% 乙醇表面消毒 15 s 后用无菌水冲洗 2 次,再用 0.1% 氯化汞溶液浸泡 8 min,最后用无菌水浸泡冲洗 5 次,将氯化汞溶液彻底洗出。在无菌器皿中将外植体与消毒液接触的伤口切除,接种于诱导培养基中,以诱导出的丛生芽作为试验材料。

### 1.3 继代增殖

取无菌中华石蝴蝶丛生芽,接入添加不同浓度植物生长调节剂 6-BA、NAA、IAA 的 MS + 30 g/L 蔗糖 + 4.0 g/L 琼脂的培养基中,调节培养基的 pH 值为 5.8,设置其培养条件为平均光照度 1 500 ~ 2 200 lx,光照时间 12 d/h,培养温度 (25 ± 3) °C,考察不同培养配方对中华石蝴蝶继代的影响。

### 1.4 生根培养

挑取继代培养得到的增殖苗,单切丛生芽为单芽,接入添加不同浓度的植物生长调节剂 6-BA、NAA 的 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 4.0 g/L 培养基中,另一部分接入添加 1 mg/L 活性炭的上述培养基中生根,设置其平均培养条件为光照度 1 500 ~ 2 200 lx,光照时间 12 d/h,培养温度 (25 ± 3) °C,考察不同培养配方对中华石蝴蝶生根率的影响。

### 1.5 植物生长调节剂对中华石蝴蝶诱导开花的影响

选取继代增殖的无菌苗,接种到 MS 培养基以及添加 6-BA、NAA 的 MS 培养基上,每种培养基中含有 30 g/L 蔗糖、4.0 g/L 琼脂,培养条件为平均光照度 1 500 ~ 2 200 lx,光照时间 12 d/h,培养温度 (25 ± 3) °C,在培养期间观察植物的生长情况并记录试验结果。

### 1.6 继代培养对中华石蝴蝶试管开花的影响

设计 1 组继代试验,中华石蝴蝶试管苗每 40 d 转接至继代培养基中继代培养 1 次,比较连续继代、只继代 1 次对中华石蝴蝶试管开花的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 继代增殖

切取诱导出的芽,将其接种在不同外源激素配比的继代

增殖培养基中,每天观察接入芽发生的微小变化,大概 10 d 后开始有新芽出现,一段时间后芽苗的数量慢慢增多,于 60 d 后统计芽的增殖系数。表 1 表明,MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L IAA 培养基中华石蝴蝶的长势最好,增殖倍数高,芽粗壮,叶色翠绿,部分出现幼根但比较弱。从试验结果可以看出,中华石蝴蝶的增殖率会受到 6-BA 含量的影响,在 0 ~ 1.0 mg/L 范围内,在低含量时芽的生长速度相对较慢;随着 6-BA 含量的增大,芽的增殖倍数不断增大,有效芽苗的数量也不断增加;但当 6-BA 含量大于 1.0 mg/L,达到 1.5 mg/L 时,芽苗相对长势比较弱,部分出现玻璃化现象,有效的芽苗数量减少,表明 6-BA 含量过高反而抑制了中华石蝴蝶的生长。较好的芽苗生长情况见图 1。

表 1 不同培养基对中华石蝴蝶继代的影响

编号	6-BA 含量 (mg/L)	IAA 含量 (mg/L)	NAA 含量 (mg/L)	增殖 倍数	芽形态特征
1	0.5	0.1	0.1	4.8	细,长势较慢
2	0.5	0.2	0.2	6.2	粗,芽黄绿色
3	0.5	0.4	0.4	4.4	细,绿色
4	1.0	0.1	0.2	7.8	粗壮,翠绿色
5	1.0	0.2	0.4	7.1	较粗,绿色
6	1.0	0.4	0.1	5.5	粗,黄绿色
7	1.5	0.1	0.4	5.1	粗,绿色
8	1.5	0.2	0.1	4.7	细,绿色
9	1.5	0.4	0.2	4.8	细,出现玻璃化



图 1 中华石蝴蝶的继代增殖培养情况(4号继代培养基)

### 2.2 生根培养

将继代培养得到的增殖苗单切丛生芽为单芽接入不同植物生长调节剂含量的生根培养基中,一部分接入添加 1.0 mg/L 活性炭的上述培养基中。表 2 结果表明,中华石蝴蝶在上述培养基中均能生根,但在 MS + 0.5 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA + 1.0 g/L 活性炭培养基上生根效果最好,植株长势较好,平均的生根数为 18 条/株,平均根长 3.62 cm,生根率达到 100%,生根苗相对粗壮,利于试管苗的移栽。其中 IBA 影响苗的生长,当培养基中只添加 IBA 时生根数较少,根较细、弱,质量不好。NAA、活性炭对生根有促进作用,两者同时配合使用时,生根效果最好(图 2),但 NAA 含量过高,对生根也会产生抑制作用。

### 2.3 不同植物生长调节剂对中华石蝴蝶试管开花的影响

以 MS 培养基为空白对照,剪取长势良好的中华石蝴蝶无菌试管苗,接种于研究试管开花的培养基中,比较在基本培养基中添加 6-BA、NAA 激素对中华石蝴蝶试管开花的影响。

表 2 不同培养基对生根的影响

编号	IBA 含量 (mg/L)	NAA 含量 (mg/L)	活性炭含量 (mg/L)	接种数 (个)	平均每株生 根数(条)	平均根长 (cm)
1	0.1	0.0	0.0	20	3	1.76
2	0.1	0.1	0.0	20	8	2.11
3	0.1	0.1	1.0	20	10	2.89
4	0.5	0.0	0.0	20	4	2.67
5	0.5	0.1	0.0	20	15	3.04
6	0.5	0.1	1.0	20	18	3.62
7	1.0	0.0	0.0	20	4	2.73
8	1.0	0.5	0.0	20	11	3.01
9	1.0	0.5	1.0	20	16	3.41

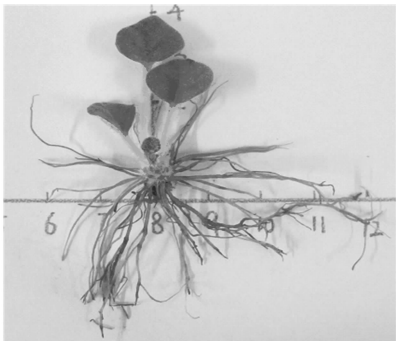


图2 中华石蝴蝶的生根培养情况(6号生根培养基)

响。表 3 表明,中华石蝴蝶在不添加任何激素的 MS 培养基中能够正常生长,但不能进行试管内开花,培养一段时间后,试管苗会出现黄化的现象;在 MS 培养基中分别添加激素 6-BA、NAA,试管内开花率明显高于对照培养基 MS,在只添加激素 6-BA 的基本培养基中,花序比较纤细、幼弱,而当同时添加 2 种激素时,中华石蝴蝶试管开花率最高,花开得更大、更伸展,花色相对艳丽(图 3)。结果说明,6-BA、NAA 激素配合使用,对中华石蝴蝶的试管开花有促进作用。

表 3 激素对中华石蝴蝶试管开花的影响

编号	MS	6-BA 含量 (mg/L)	NAA 含量 (mg/L)	接种数 (个)	开花率 (%)
1	MS	0.0	0.0	20	0
2	MS	0.2	0.0	20	5
3	MS	0.0	0.2	20	7
4	MS	0.2	0.2	20	10



a.样品1



b.样品2

图3 中华石蝴蝶无菌苗试管开花情况(4号诱导培养基)

2.4 继代培养对中华石蝴蝶试管开花的影响

设计 1 组试验,比较不同继代培养次数对中华石蝴蝶试管开花的影响。分别剪取中华石蝴蝶持续继代、只继代 1 次

的无菌试管苗,接种在利于试管开花的 MS + 0.2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 培养基中,连续培养 3 个月,观察并记录试验结果。结果显示,减少继代培养的次数利于试管开花,继代 1 次的中华石蝴蝶的开花率明显高于持续继代的,表明持续继代会抑制中华石蝴蝶的试管开花。

3 讨论与结论

在组织培养的过程中,培养基中不同生长调节剂的配比是诱导植物产生芽、根的关键因素<sup>[6]</sup>。不同的植物在组织培养中所需要激素的种类和含量是不同的,同大多数苦苣苔科植物一样,培养基中细胞分裂素、生长素的含量和配比对中华石蝴蝶组织培养中芽的增殖和生根起着决定性的作用。6-BA 是目前使用广泛的细胞分裂素,其含量在合适的范围内才有利于植物的生长,过高会抑制植物生长而出现玻璃化,过低则不利于芽苗增殖。IAA 是促进细胞分裂和生长的内源性激素,在中华石蝴蝶的组织培养过程中,添加 6-BA 的同时配合 NAA、IAA 使用,并使其达到合适的比例,才能达到较为理想的效果。在本试验中,中华石蝴蝶的继代增殖在 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L IAA 培养基中较好,增殖倍数高,芽苗粗壮且颜色翠绿。在培养基中添加活性炭可有效防止褐变,提供生根的暗环境,降低培养基中的盐离子浓度或吸附利于生根的物质<sup>[7]</sup>。中华石蝴蝶在添加活性炭的 MS + 0.5 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA + 1.0 g/L 活性炭培养基中生根率达到 100%。

中华石蝴蝶在 MS 培养基中可以生长但不能进行试管开花,说明激素是中华石蝴蝶开花所需要的条件,在培养基中加入 6-BA 可以促进开花,因为植物在开花分化时,细胞分裂素是必不可少的<sup>[8]</sup>。当培养基中只添加单一的激素时,诱导试管开花率相对都比较低,在试验中发现,6-BA 配合使用一定量的生长激素 NAA 时能使试管开花率提高。这也进一步说明细胞分裂素与生长素的组合使用可产生更利于中华石蝴蝶试管开花的交互作用效果。本试验成功诱导了中华石蝴蝶试管开花,但开花率仍需要进一步提高,关于其开花的调控机制尚须深入研究。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社,1979:125-581.  
[2] 李振宇,王印政. 中国苦苣苔科植物[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2004:197.  
[3] 张占江,李 翠,吕惠珍,等. 条叶唇柱苣苔组织培养研究[J]. 种子,2013,32(9):19-22.  
[4] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京: 科学出版社,1994.  
[5] 桂 毓,李双跃,刘艳军,等. 紫苏草开花技术研究[J]. 天津农业科学,2014,20(11):5-8.  
[6] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2001.  
[7] 邹 娜,喻苏琴,王春玲,等. 铁皮石斛组织培养及试管开花研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):42-44.  
[8] 桂 毓,李双跃,刘艳军,等. 紫苏草试管开花的研究[J]. 天津农业科学,2014,20(11):5-8.