

# 彩叶草组织培养研究

胡国富, 魏 琪, 胡宝忠

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

**摘 要:**以唇形科鞘蕊花属彩叶草(*Coleus blumei* Benth.)叶片为外植体, 进行组织快繁的研究。结果表明: 叶片组织培养中, 最适宜的消毒处理为消毒剂采用 0.1% 升汞溶液, 加入 3~4 滴吐温 80 消毒时间为 5 min, 总体污染率低于 20%; 最适的愈伤组织诱导及继代培养基为 1/2MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 的组合, 其平均诱导率为 72%; 最适分化培养基是 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的组合, 其平均分化率为 85.4%; 彩叶草不定芽的最适生根培养基是 1/2MS+0.5 mg/L NAA 组合, 其平均生根率为 92.5%。

**关键词:**彩叶草(*Coleus blumei* Benth.); 组织培养

**中图分类号:**S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)07-0181-04

彩叶草(*Coleus blumei* Benth.)的繁殖可采用播种或扦插等常规育苗方法, 但这些方法受到季节限制, 速度慢, 质量常常参差不齐, 难以满足市场需求。而采用水培技术培育彩叶草的方法较为适合家庭室内栽培, 不适合园林栽种。因此, 应用植物组织培养技术来快速繁殖彩叶草, 是一种较为理想的方法。该技术成本适中, 方法简便、易学, 繁殖系数高, 繁殖量大, 品质均一性好, 能较好地保持母本植株的优良性状, 是一种较为成熟的方法, 在许多花卉的繁殖中应用, 且应用效果良好。彩叶

草的组织培养虽然已有所报道, 但主要是采用对茎段诱导产生愈伤组织后, 再分化长成植株, 所需时间长。而且利用茎段作为外植体会伤害母本植株, 因此, 还需对其它器官如叶等外植体进行研究, 来获得更好的繁殖途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验选取不同发育时期的彩叶草栽培植株及营养生长阶段的叶片(所用材料, 中文品名为彩叶草, 中文品种为奇才, 颜色为天鹅绒, 产地为美国泛美, 国外供应商为美国伯爵种子子公司(Bodger Seeds, Ltd.), 进口单位为大连华晟景观设计有限公司)。

### 1.2 试验方法

以下所用培养基均含有蔗糖 3%, 琼脂 8 g/L, pH5.8, 并置于 121℃ 高温高压蒸气灭菌 20min, 灭菌后的培养基

**第一作者简介:**胡国富(1974-), 黑龙江人, 农学博士, 讲师, 现任教于东北农业大学生命科学学院, 研究方向为植物生殖生物学与分子生物学。

**通讯作者:**胡宝忠。

**收稿日期:**2007-04-12

## Study on the Industrialized Rapid Clonal Propagation Technology of *Aphelandra squarrosa* cv “Dania”

LI Yong-wen, LI Hong

(Baoding Vocational and Technical College, Hebei, 071051)

**Abstract:** Selects the vigorous and healthy branch of *Aphelandra squarrosa* cv “Dania” as explants carried on the industrialized rapid clonal propagation technology research. The results showed that plant hormone combination of 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L is best for callus induction and Adventitious buds differentiation. 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L is suitable for continuous cultivation, the coefficient of reproduction is up to 6~8. NAA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L is good for rootage, rooting rate was 100%, and completely meets the demands of the industrialized rapid clonal propagation technology.

**Key words:** *Aphelandra squarrosa* cv “Dania”; Plant tissue culture; Rapid clonal propagation

在阴暗处放置 3 d, 再进行接种。培养条件, 均采用光照培养, 每天光照 14 h, 光照强度 2 000lm/m<sup>2</sup>, 温度(25 ±2)℃。

1.2.1 外植体的获取 彩叶草全身被毛, 在消毒剂的水溶液中容易产生气泡, 阻碍了消毒剂对外植体的消毒, 从而引起大量外植体的污染。在所做的 3 个处理中, 只有处理 3 基本不存在污染、外植体伤害小, 应用效果较好。该处理是消毒剂采用 0.1%升汞溶液, 加入 3~4 滴吐温 80, 消毒时间为 5 min。

1.2.2 愈伤组织的诱导 试验应用四因素三水平的正交表设计试验, 共设 9 种处理方式(见表 1), 并以空白的基本培养基 1/2MS 作为对照。经 3 次重复试验后, 重新设置 9 种处理方式(见表 2), 同样以空白的基本培养基 1/2MS 作为对照, 重复 2 次。

1.2.3 继代培养 设 3 种处理, 方式如下: a; 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA; b; 1/2MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA; c; MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+0.5 g·L<sup>-1</sup>活性炭。

1.2.4 分化培养 设 3 种处理, 方式如下: d; 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA; e; 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA; f; 1/2MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA。

1.2.5 不定芽的生根培养 设有 4 种处理, 方式如下: g; 1/2MS; h; 1/2MS+0.5 mg/L NAA; i; 1/2MS+1.0 mg/L NAA; j; 1/2MS+1.5 mg/L NAA。

表 1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计的处理方案

处理号	基础培养基	种类	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	NAA 质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>
1	MS	2 4-D	0.5	0.0
2	MS	KT	1.0	0.1
3	MS	6-BA	2.0	0.5
4	1/2MS	2 4-D	1.0	0.5
5	1/2MS	KT	2.0	0.0
6	1/2MS	6-BA	0.5	0.1
7	1/4MS	2 4-D	2.0	0.1
8	1/4MS	KT	0.5	0.5
9	1/4MS	6-BA	1.0	0.0

表 2 第二次处理方案

处理号	基础培养基	6-BA 质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	NAA 质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>
A	MS	1.0	0
B	MS	2.0	0.5
C	MS	4.0	1.0
D	1/2MS	1.0	0.5
E	1/2MS	2.0	1.0
F	1/2MS	4.0	0
G	1/4MS	1.0	1.0
H	1/4MS	2.0	0
I	1/4MS	4.0	0.5

1.2.6 驯化与移栽 当不定芽长出的 4 条~5 条, 长约 3~4 cm 的健壮的不定根时, 将培养瓶(不打开封口膜)放置于室温下并利用日照进行培养一星期左右, 打开封

口膜练苗, 3~4 d 后进行移栽, 移栽所用的土壤是 1/2 草炭土加 1/2 沙以及少量有机肥。一周内罩塑料布保湿并时常喷雾加湿, 成活后移入盆中。

2 结果与分析

2.1 最适培养基组合筛选

2.1.1 最适愈伤组织诱导培养基筛选 为筛选出最适愈伤组织诱导培养基, 研究设计了第一组方案, 其试验结果见表 3。只有在含有 3 种浓度 6-BA 的培养基中, 彩叶草叶片均产生愈伤组织, 诱导率均超过 60%, 效果较好; 但形成的愈伤组织在形成后容易褐化死亡, 因此, 需要适时将愈伤组织切下移至增殖培养基内。由此, 以 6-BA

表 3 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计处理的结果

处理号	叶片接种数	形成愈伤的叶片数	诱导率 /%	叶片死亡数	叶片死亡率 /%
0	25	0	0.0	25	100.0
1	25	0	0.0	25	100.0
2	26	0	0.0	25	96.2
3	26	16	61.5	10	38.5
4	26	0	0.0	26	100.0
5	26	0	0.0	26	100.0
6	26	20	76.9	6	23.1
7	27	0	0.0	27	100.0
8	32	5	15.6	26	81.3
9	29	20	69.0	9	31.0

表 4 9 种处理的比较

处理号	基础培养基	6-BA 质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	NAA 质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	诱导率 /%		平均诱导率 /%
				1	2	
A	MS	1.0	0.0	16.0	0.0	8.0
B	MS	2.0	0.5	56.4	41.7	49.1
C	MS	4.0	1.0	69.2	65.0	67.1
D	1/2MS	1.0	0.5	52.6	66.7	59.7
E	1/2MS	2.0	1.0	64.0	80.0	72.0
F	1/2MS	4.0	0.0	10.5	25.0	17.8
G	1/4MS	1.0	1.0	16.0	34.0	25.0
H	1/4MS	2.0	0.0	14.6	35.7	25.2
I	1/4MS	4.0	0.5	15.0	34.5	24.8

注: 0—对照组, Note: 0—control group

与 NAA 为主要植物生长调节剂设计了第二组方案, 共 9 个处理, 以 1/2MS 基础培养基为对照。统计接种一个月时的愈伤组织诱导率和叶片的死亡率, 试验结果见表 4。由表 4 可知, 接种的叶片在 B、C、D、E 4 种处理的培养基内愈伤组织形成数量较大。在实际操作中, 由处理 C 和 E 诱导出的愈伤组织质地良好, 易于切离及继代培养。特别是 E 处理中, 愈伤组织诱导效果为最好。而且, 处理 C 内激素的含量相对较高, 从而产生组织染色体变异的可能性也相对较高<sup>[1]</sup>。因此, 综合多种因素, 研究认为 E 处理, 即 1/2MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 的组合, 为最适的愈伤组织诱导培养基, 其具有诱导率高、所诱导形成的愈伤组织质地良好、外植体死亡率较低等优点。

2.1.2 愈伤组织继代培养基筛选 将诱导出的愈伤组

织取下,切成大小相近的小块,接种在 3 种培养基组合内,进行继代培养基的筛选,并重复实验 3 次,统计生长一个月时的结果。在 b 号继代培养基内愈伤组织的生长状态最好,增殖速度较快,且死亡率低于 10%。而 a 培养基内接种的愈伤组织容易褐化死亡,同时死亡率高于 40%,生长较为缓慢;c 号培养基内的绝大多数的愈伤组织都褐化死亡,基本没有体积或质量上的增长。综合多方因素,试验确定 b 号培养基,即 1/2 MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 的组合是愈伤组织的最适继代培养基。而且,该组合与诱导培养基的组合相同。

2.1.3 分化培养基筛选 分化培养基的筛选是在 3 个组合中进行,统计培养 45d 时分化出不定芽的愈伤组织数,结果见表 5。由结果可见,愈伤组织的最适分化培养基组合是 a 号培养基,即 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,该分化培养基内培养的愈伤组织分化速度快,所分化出的不定芽数量大,而且健壮,适于进行生根培养。

表 5 分化培养基的比较

处理号	愈伤组织数	分化数			分化率 %			分化情况
		1	2	3	1	2	3	
a	30	23	26	28	76.7	86.7	93.3	分化迅速,不定芽健壮
b	30	10	17	11	33.3	56.0	36.7	分化缓慢,不定芽弱小
c	30	1	1	4	3.3	3.3	13.3	分化极其缓慢,有不定根分化

2.1.4 生根培养基筛选 当不定芽长至 2 cm 左右时,将其从愈伤组织上取下,进入生根培养阶段。对于生根培养基的筛选是在 4 种培养基内进行的,以培养 20 d 时生根的不定芽数量为比较标准,结果见表 6。其中 e 号培养基内形成的不定根长而粗壮,根排列的密度适中,同时,不定根上着生有较多的根毛,由此形成的完整植株比较健壮,有利于驯化移栽。所以,研究认为 e 号培养基的组合,即 1/2MS+0.5 mg/L NAA,是最为适合进行彩叶草不定芽生根培养的培养基。

表 6 生根培养的比较

处理号	不定芽数	生根的不定芽数			生根率 %			生根情况
		1	2	3	1	2	3	
d	40	23	20	22	57.5	50.0	55.0	生根较快,根细
e	40	37	34	40	92.5	85.0	100.0	生根迅速,根长而健壮
f	40	36	34	40	90.0	85.0	100.0	生根快,根短且密集
g	40	19	16	20	47.5	40.0	50.0	生根较慢,不定芽易死亡

2.2 再生植株的驯化与移栽

当不定芽分化出 4 至 5 条,长 4 cm 左右的健康的根时,对这些健壮的再生植株进行练苗及移栽。彩叶草再生苗在移栽时,对土壤的要求不高,需要透气性好,

土壤肥沃即可。因此,其在含 1/2 草炭土加 1/2 沙以及少量有机肥的土壤中就可以很好的生长,经驯化的再生苗在培养一周后就可以适应外界的条件,成活率可以达到 90%以上,生长状态良好。在培养 5~6 个月后,部分再生苗可开花并结实。

3 讨论

3.1 外植体的选择

研究采用了彩叶草的叶片为外植体,诱导愈伤组织并培养后再分化形成完整的再生苗的方法。有少量的研究者以彩叶草的茎段和种子的上胚轴,而诱导形成丛生芽的方法,来完成快速繁殖<sup>[2,3]</sup>。试验使用叶片作为外植体是较为适宜的,可以降低组织培养对母体植株的伤害,操作简单。而且由叶片诱导愈伤组织的途径可以长时间的进行培养,适于彩叶草的大量快速繁殖,是一种较为合适的方法与途径。

3.2 组织培养过程中的污染问题

污染是植物组织培养过程中三大难题(污染、褐化以及玻璃化现象)之一。植物组织培养中的污染危害很大,包括在早期导致第一代培养的失败、增殖效率的降低、培养材料生长的减缓、玻璃苗的增加等;在后期会导致试管苗移栽困难和死亡,甚至有的污染也会引起培养物的遗传变异。而且,存在于无病症的健康植物组织中的内生休眠病原菌,一旦寄主遇到恶劣的环境或外界微生物干扰时能够重新活动,引起病害。因此,在实践中降低污染意义重大<sup>[4]</sup>。

通常污染是由于环境不洁、培养基和培养材料消毒不彻底、操作不当、操作人员或工具带菌等原因引起的<sup>[5,6]</sup>。一般地解决办法就是预先进行消毒剂种类、浓度以及消毒时间的筛选实验。同时,经常对接种室和超净工作台进行消毒、灭菌;规范操作规程以及提高操作水平,来降低操作污染和环境污染<sup>[7-9]</sup>。

研究彩叶草体表着生大量的表皮毛和腺毛,在消毒剂的水溶液中,容易产生气泡,阻碍消毒剂与外植体表面的接触,从而降低了消毒剂的灭菌效果,增大了外植体的污染率。因此,首先进行了消毒处理的筛选工作,并筛选出最为适宜的处理方法。该方法使用了浓度较低的升汞溶液作为消毒剂,并在其中加入表面活性剂吐温-80。这样的处理可以在较短的时间内完成消毒过程,并降低幼嫩的叶片被消毒剂杀死的机率,同时表面活性剂可以减少叶片表面气泡的产生,有辅助并促进消毒剂发挥作用的功能。所以这种处理方法在研究中被采用。

3.3 组织褐化与活性碳的使用

一般认为,褐化主要是因为多酚氧化酶(PPO)作用于天然底物酚类物质,使其被氧化成醌类物质,呈红褐色,并抑制许多酶的活性,从而影响植物材料的正常生

长, 严重时可导致培养物的死亡<sup>[10]</sup>。

在彩叶草叶片的愈伤组织诱导以及愈伤组织继代的过程中, 都出现了不同程度的褐化。特别是在使用 MS 基础培养基的组合中, 褐化现象最为严重。研究设计了加入活性炭的继代培养基, 但褐化现象并未解决, 还引起了愈伤组织的大量死亡, 效果不佳。这主要是因为活性碳的吸附作用没有选择性, 在吸附有害物质的同时也吸附了培养基中的生长调节物质, 使其失去功能, 而影响愈伤组织的正常生长<sup>[11]</sup>。因此, 研究通过加快转瓶速度、及时更换培养基的方法减轻了愈伤组织继代培养中的褐化现象。

### 3.4 再生苗玻璃化

植物组织培养中, 常常可以观察到分化形成一些半透明状的畸形试管植物, 这类植物体被称为“玻璃苗”, 是植物组织培养中常见的现象, 称为“玻璃化现象”。

目前可考虑的具体措施有: 培养基采用固体培养基, 且琼脂浓度不低于 0.8%; 使用透气性良好的封口膜封装培养瓶, 尽量保持较好的通气性; 筛选适宜的碳源种类及浓度; 注意细胞分裂素和生长素的配比以及植物生长调节剂和  $K^+$  之间的配合, 争取兼顾不定芽增殖系数和控制玻璃苗的发生<sup>[12, 13]</sup>。

在彩叶草组织培养中, 所获得的再生苗中有少量的玻璃苗出现。这些玻璃苗表现为植株弱小; 半透明状; 节间变长; 茎、叶水质、脆弱易碎; 叶片皱缩成纵向卷曲; 叶表缺少角质层和毛状物。这与其它植物产生的玻璃苗在形态特征上基本相同<sup>[14]</sup>。

研究在培养过程中, 采用的方法有: 加强培养瓶内空气流通, 即用灭菌的脱脂棉棉塞代替塑料封口膜; 加强光照, 适当延长光照时间和增强光照强度; 适当增大

琼脂和蔗糖的浓度, 来提高培养基内的渗透压等等。实践中这些方法被证明具有相当的作用, 可有效的降低玻璃苗的发生数量, 并且提高了再生苗的质量和抗性。

### 参考文献

- [1] 黄小梅, 李桂英, 梁艳. 组织培养中大葱染色体倍性变异研究[J]. 中国农业通报, 2005, 21(1): 50-52.
- [2] 段黄金, 高疆生. 彩叶草的组培快繁技术研究[J]. 中国农学通报, 2001, 17(1): 25-27.
- [3] 黄海帆, 李萍. 彩叶草的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 339.
- [4] 邓小梅, 奚如春, 符树根. 植物组织培养过程中污染现象的研究进展[J]. 江西林业科技, 2004(6): 33-36.
- [5] 郝云凤, 李可伟, 张培宏. 植物组织培养操作过程中常见的污染问题及解决办法[J]. 内蒙古农业科技, 2004(S2): 156-158.
- [6] 赵佐敏, 艾勇. 植物组织培养过程中的污染原因及控制措施[J]. 贵州农业科学, 2004, 32(1): 61-62.
- [7] 郑春明, 赵鹏, 徐礼根. 从事植物组织培养工作的点滴经验[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 396.
- [8] 王志成, 刘明稀, 易自力. 杀菌剂防治植物组织培养污染的初步研究[J]. 长沙电力学院学报(自然科学版), 2004, 19(1): 82-84.
- [9] 吴林森. 植物组织培养污染问题的研究及其控制措施[J]. 江苏林业科技, 2005, 32(1): 28-31.
- [10] 陈凯. 植物组织培养中褐变的产生机理及抑制措施[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(5): 1034-1036.
- [11] 叶梅. 植物组织褐变的研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2005, 22(4): 326-329, 381.
- [12] 秦静远, 王军利, 王富容. 植物组织培养中的玻璃化现象[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2004, 3(2): 51-53.
- [13] 蔡祖国, 徐小彪, 周会萍. 植物组织培养中的玻璃化现象及其预防[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(3): 353-355.
- [14] 李娅莉, 张健, 潘远智. 观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(3): 278-282.

## Study on the Plant tissue culture in *Coleus blumei* Benth.

HU Guo-fu, WEI Qi, HU Bao-zhong

(1. Life Science Collage of Northeast Agricultural university, harbin, 150030)

**Abstract:** The study of the plant tissue culture constructed rapid propagation system of *Coleus blumei* Benth. with its leaves as the explants. From this research, the main results were as follows:

In the investigation of plant tissue culture with leaves of *Coleus blumei* Benth., the optimum disinfection method was using 0.1% solution of mercuric chloride as the disinfectant with 3-4 drop of Tween-80, and the disinfection last 5 min. The rate of pollution with this method was below 20%. The optimum culture medium of inducement callus and sub culture was 1/2MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA, and its average rate of inducement was 72%. The optimum culture medium of differentiation culture was 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, and its average rate of differentiation was 85.4%. The optimum culture medium of rooting culture was 1/2MS+0.5 mg/L NAA, and its average rate of rooting was 92.5%.

**Key words:** *Coleus blumei* Benth., tissue culture