

斑点大吴风草叶片再生体系的建立

胡仲义, 何月秋

(宁波市职业技术学院 环境学院, 浙江 奉化 315502)

摘要: 现以斑点大吴风草为试材,系统研究了灭菌方式、激素等因子对叶片再生的影响,建立了斑点大吴风草不定芽的高频再生体系。结果表明:建立斑点大吴风草无菌培养物的较好方法是0.1%HgCl₂ 加吐温—80 处理叶片 10 min;适宜的不定芽诱导培养基MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L;最佳的不定芽增殖培养基是MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L;其增殖系数可达到 6.05;其芽长至 2~3 cm 时,最佳的生根培养基是 1/2MS+NAA 0.05 mg/L,生根率达到 100%,最终得到完整的植株。该再生体系可作为基因转化的受体系统。

关键词: 斑点大吴风草; 叶片; 不定芽; 植株再生

中图分类号: S 688.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)21—0177—03

斑点大吴风草(*Farfugium japonica* var. *auseomaculata*)是菊科大吴风草属多年生草本植物, 又称花叶如意, 原产日本^[1]。根状茎粗壮, 叶面具有金黄色斑点, 耐荫、耐寒、少病虫害, 是优良的庭园种植、城市绿化、背阴高架公路耐荫的地被材料, 有着广阔的市场前景^[2]。然而, 目前的种子繁殖、分株繁殖等方法远不能满足市场的巨大需求, 采用组织培养方法是一条有效的途径。周根余^[3]、于爱萍^[4]等以茎尖、无菌苗叶片为外植体进行其组培研究, 但未见实现组培规模化生产。现首次采用地栽斑点大吴风草叶片作外植体不经过愈伤组织阶段而直接诱导出不定芽, 取材方便, 高效稳定, 可大大降低生产成本。同时, 不定芽每株每年以 6¹² 的几何频率扩增, 可在较短的时间内培育出大批商品苗。这不但为斑点大吴风草在市场大量推广打下基础, 而且为研究斑点大吴风草叶面斑点形成机理, 并进一步应用转基因技术实现斑点大吴风草的品种改良提供一个良好的操作平台。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为宁波城市职业技术学院环境学院温室种植的斑点大吴风草。

1.2 试验方法

1.2.1 灭菌处理 将斑点大吴风草幼嫩叶片从植株上小心剪下, 带回实验室用洗洁精浸泡 15 min, 后用流水冲洗 4~5 次; 分装好后移至超净工作台采用不同的灭菌方法进行处理。

1.2.2 诱导和分化培养 诱导培养基以 MS+琼脂 7.0 g/L+白糖 30 g/L, 附加激素为 6-BA 和 NAA, 并参阅周根余^[3]、于爱萍^[4]使用的浓度, 并采用四因素三水平正交设计[L₉ (3⁴), 表 1]^[5]。培养基 pH 为 5.8, 在温度 (25±1) °C、光照强度为 40 μmol·m⁻²·s⁻¹、在每日光照 14 h 的条件下培养。接种 4 周后统计每个组织块所形成的不定芽数量。

表 1 丛生芽诱导和丛生芽增殖的正交实验 mg/L				
水平	丛生芽的诱导		丛生芽的增殖	
	6-BA	NAA	6-BA	NAA
1	1.0	0.5	0.5	0.05
2	1.5	1.0	1.0	0.10
3	2.0	2.0	1.5	0.15

1.2.3 不定芽的增殖培养 不定芽长至 1 cm 左右, 将不定芽分割成 2~3 个不定芽为一丛进行增殖培养。增殖培养基以 MS+琼脂 7.0 g/L+白糖 30 g/L 附加不同浓度的 6-BA、NAA。接种 15 d 后统计丛生芽的增殖系数。

1.2.4 生根培养 不定芽长至 2~3 cm 时, 将不定芽分割成单个外植体, 转入生根壮苗培养基, 生根壮苗培养基与丛生芽诱导和增殖培养条件基本相同, 只是基本培养为 1/2MS、白糖 15 g/L 附加不同浓度的 NAA 和 IBA, 转接 15 d 后调查苗的生根率, 20 d 后统计根长及生长状况。

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌试验分析

将不同灭菌方法处理的斑点大吴风草叶片接入培养基中, 每天观察外植体的污染状况作好记录。接种 10 d 以后, 外植体的污染状况基本稳定。从表 1 可知斑点大吴风草叶片无菌体系比较难建立。主要因为叶片幼嫩, 高浓度的灭菌剂导致绝大多数外植体出现褐

第一作者简介: 胡仲义(1967-), 男, 本科, 副教授, 研究方向为植物基础。

基金项目: 浙江省教育厅科研资助项目(Y200803329)。

收稿日期: 2010-06-28

化、坏死现象,因此外植体的存活问题成为系统研究斑点大吴风草再生体系的重要障碍。试验表明,采用乙醇和升汞混合使用的方法时,尽管随着乙醇处理的时间增多,污染率略微有所下降,但成活率很低,最高仅有5%;单独采用升汞时,升汞处理时间为12 min以上时,污染率有所下降,但叶片全部褐化死亡。相比较而言,采用升汞加吐温—80的处理方式是较为理想的斑点大吴风草灭菌方法,可以控制污染率在40%左右,且能获得较高的成活率。

表 2 不同灭菌方法对斑点大吴风草叶片的影响

编号	75%乙醇处理	0.1%升汞处理/min	吐温—80	接种数/块	污染数/块	污染率/%	成活数/块	成活率/%
M ₁	15	10	—	40	20	50.0	2	5.0
M ₂	20	10	—	40	18	45.0	2	5.0
M ₃	30	10	—	40	17	42.5	0	0.0
M ₄	—	10	—	40	20	50.0	3	7.5
M ₅	—	10	✓	40	16	40.0	4	10.0
M ₆	—	12	✓	40	12	30.0	0	0.0
M ₇	—	15	✓	40	10	25.0	0	0.0

2.2 斑点大吴风草叶片不定芽的分化

2.2.1 再生芽的获得 斑点大吴风草叶片在分化培养基上培养,30 d后叶片逐渐肥厚和肿大,在培养过程中边缘向远轴面卷曲,40 d后在切口边缘长出不定芽(图1),随后,经过转移后不定芽迅速扩大繁殖(图2)。形成的不定芽并不经历愈伤组织阶段,而是直接从培养的叶片分化产生,通常不定芽成簇密集生长,不定芽再生位点主要集中在切口部位。再生的不定芽较少,经过一段时间的培养后可长成小植株。试验中芽分化率较低,最高仅有44%。

表 3 斑点大吴风草不定芽的诱导

编号	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	外植体 /块	分化外植体/块	诱导率 /%
1	1.0	0.5	30	3	10.0
2	1.0	1.0	28	0	0.0
3	1.0	2.0	30	0	0.0
4	1.5	0.5	32	5	15.6
5	1.5	1.0	25	11	44.0
6	1.5	2.0	28	0	0.0
7	2.0	0.5	31	9	29.0
8	2.0	1.0	24	6	25.0
9	2.0	2.0	30	0	0.0

2.2.2 不同激素浓度对芽分化的影响 在MS培养基中加入不同的激素,配制成多种培养基,以长势良好的叶片为外植体,筛选分化好的培养基。由表3可看出,所设计的9个处理中,不定芽的分化率都比较低,甚至有些培养基中不定芽的分化率为0;同时,培养基中6-BA和NAA的配比对不定芽的分化至关重要,细胞分裂素对生长素的含量比值高时有利于芽的分化(1、3、4、7、8号培养基),比值低时则不分化(2、3、6、9号培养基)。综合观察表明,5号培养基分化的外植体数量最多,因此该

试验以该培养基作为分化培养基。

2.3 斑点大吴风草不定芽的增殖

将有不定芽的组织块转移添加到设计的9种培养基上,在5、10、15 d后观察生长、增殖情况,统计增殖倍数。表4表明,斑点大吴风草不定芽在不同激素处理下均能较快的增殖。在适宜的培养基中,单芽增殖的不定芽数目最多可达到8个之多(图2)。其中2号培养基增殖效果最好,不但增殖系数高,平均可达到6.05,而且丛生芽生长旺盛;其它培养基中丛生芽的增殖倍数最少也在3.44。不过,观察表明随着激素的浓度增加,丛生芽叶片出现不同程度的增厚和畸变,甚至出现玻璃化苗,生长速度也减缓。一般而言,细胞分裂素类物质/生长素类物质的比值过大丛生芽的分化系数高,但诱导形成的丛生芽矮小细弱,甚至培养时间长会导致玻璃化苗的出现。综合以上结果可知,MS+NAA 0.10 mg/L+6-BA 0.5 mg/L是斑点大吴风草不定芽增殖的最佳培养基。

表 4 斑点大吴风草不定芽的增殖

编号	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	增殖倍数	生长状态
1	0.5	0.05	4.23	不定芽生长速度慢 植株粗壮,并伴随有根的分化,叶色嫩绿
2	0.5	0.10	6.05	不定芽数量多 植株粗壮 生长快速,叶色嫩绿 斑点明显,生长旺盛
3	0.5	0.15	3.44	不定芽数量多 植株粗壮 生长快速,但部分叶片肥厚,卷曲
4	1.0	0.05	5.16	不定芽数量多 植株粗壮 生长快速,叶片深绿 生长旺盛
5	1.0	0.10	4.57	不定芽数量多且小 生长快速,但部分叶片肥厚 卷曲
6	1.0	0.15	4.57	不定芽数量较多,植株小 生长快速,但部分叶片肥厚,卷曲
7	1.5	0.05	4.36	不定芽数量多而且小 植株排列紧密,生长慢,叶片肥厚 卷曲
8	1.5	0.10	4.68	不定芽数量多而且小 植株排列紧密,生长慢,部分叶片肥厚 卷曲
9	1.5	0.15	4.51	不定芽数量多而且小 植株排列紧密,生长慢,叶片肥厚 卷曲

2.4 生长调节剂对组培苗生根的影响

将健壮的植株转入生根壮苗培养基10 d后开始生根并逐渐生长,新生长出根吸收营养物质后会明显促进茎叶的生长,15 d后小植株可产生2~5条根,长成粗状的根系后,植株可长到3~3.5 cm高(图3),最高生根率达到100%。各处理对斑点大吴风草生根率影响有较大的影响,不但生根率差异明显,而且苗的长势也有不同(表5)。NAA浓度在0~0.1 mg/L时,组培苗的根诱导率随着激素浓度的提高而逐渐上升,而且苗的长势逐渐变好;但NAA浓度在0.1 mg/L以上时,NAA浓度增加反而不利于组培苗生根。综合观察结果认为,斑点大吴风草组培苗最佳的组合为1/2MS+NAA 0.1 mg/L。

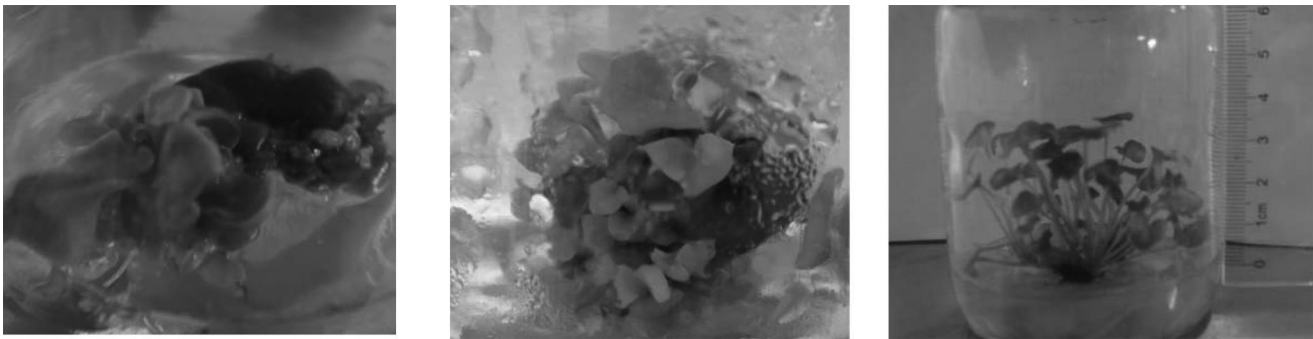


图 1 叶片不定芽形成

图 2 叶片不定芽的增殖

图 3 生根的斑点大吴风草组培苗

表 5 斑点大吴风草生根率				
编号	NAA/ mg · L ⁻¹	接种芽 数/株	生根率 /%	长势
1	0.00	38	94.4	小苗长势较弱, 叶色淡绿, 生根缓慢
2	0.05	38	95.2	小苗长势弱 叶色淡绿 根长但比较细弱
3	0.10	40	100	小苗健壮 叶色深绿, 根数较多, 根粗且长 侧根多 长势良好
4	0.20	32	92.3	小苗健壮 叶色深绿, 根粗且长, 但根毛少
5	0.50	33	96.0	小苗健壮 叶色深绿, 根粗且长, 但无侧根

3 讨论

斑点大吴风草叶片比较敏感, 经过无菌处理后, 极易发生褐化、枯死现象, 是研究斑点大吴风草再生体系的早期障碍。褐化主要是由于植物受伤后体内多酚氧化酶被激活, 使得酚类物质氧化产生有毒的醌类物质, 进而逐渐扩散到培养基中, 毒害整个外植体^[6]。另外, 植物组织培养中, 激素使用不当时材料也容易褐变。该

研究表明, 去除乙醇单独使用加有吐温-80 的 0.1% 升汞处理叶片 10 min 是减小外植体伤害, 降低材料褐变的有效途径。在斑点大吴风草叶片分化阶段, 使用 6-BA 1.5 mg/L 和 NAA 1.0 mg/L 浓度组合处理可获得 44.0% 的分化率。虽然分化率不高, 但不定芽的增殖和生根相对容易, 在降低了激素浓度增殖培养基本中获得客观的增殖倍数, 是斑点大吴风草的规模化重要基础; 而在添加有 NAA 的生根培养上, 生根率一般可达到 90% 以上。

参考文献

[1] 凌一家. 花叶如意—优秀的色叶观花地被[J]. 园林, 2007(10): 52.
[2] 周根余, 杨永刚. 斑点大吴风草的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3): 224-224.
[3] 于爱萍, 刘石泉, 吴翠荣 等. 斑点大吴风草叶愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2005, 34(1): 76-80.
[4] 周国宁, 孙晓萍. 大吴风草的引种栽培及应用[J]. 植物杂志, 2000(1): 22-23.
[5] 邵崇斌. 概率论与数理统计[M]. 北京: 中国林业出版社, 2007.
[6] 周俊辉, 周家容, 曾浩森 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, 27(增刊): 481-486.

Establishment of Leaf Regeneration in *Farfugium japonica* var. *auseomaculata*

HU Zhong-yi, HE Yue-qiu

(Environmental Faculty of Ningbo City College of Vocational Technology, Fenghua, Zhejiang 315502)

Abstract: The *F. japonica* var. *auseomaculata* leaf regeneration was thoroughly discussed for the first time. The leaves of *F. japonica* var. *auseomaculata* were used as the experimental material. Several factors such as sterilization methods, hormone concentration, and so on were investigated to optimize the regeneration system *in vitro*. The results showed that the treatment of 0.1% HgCl₂ + tween-80 10 min had better result to the explants. The high frequency of shoot regeneration was observed when leaf explants were cultured on MS medium supplemented with 6-BA 1.5 mg/L and NAA 1.0 mg/L. The high proliferation times of adventitious bud was observed when adventitious buds were cultured on MS medium supplemented with 6-BA 0.5 mg/L and NAA 0.1 mg/L, which reached to 6.05. The buds were transferred into the rooting medium when it reached to 2 ~ 3 cm. The best rooting medium for the radication was 1/2MS medium supplemented with NAA 0.05 mg/L. The rate of rooting could be 100%. This regeneration system can be applied to *F. japonica* var. *auseomaculata* transgenic manipulation.

Key words: *Farfugium japonica* var. *auseomaculata*; leaves; adventitious buds; plant regeneration