

# 大岩桐叶片再生体系的建立及卡那霉素敏感性研究

尹智慧, 宋丽莉, 司亮, 于典司, 郭长虹

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150025)

**摘 要:**以大岩桐(*Simningia speciosa* Benth.)幼嫩叶片为外植体,研究了不同激素组合对大岩桐叶片再生体系的影响及抗生素卡那霉素的敏感浓度。结果表明:不同激素组合对不定芽的诱导效果差异显著,叶片不定芽的诱导和增殖的最佳培养基均为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,生根适宜培养基 1/2MS+0.5 mg/L NAA,大岩桐叶片对卡那霉素的敏感浓度为 200 mg/L。

**关键词:**大岩桐;组织培养;卡那霉素

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)10-0100-03

大岩桐(*Simningia speciosa* Benth.)属苦苣苔科苦苣苔属多年生草本植物,又名落雪泥,原产于巴西。叶对生,全株密被绒毛,花冠钟形,花大艳美,常作为观赏花卉广泛种植<sup>[1]</sup>。大岩桐自花不育,种子繁殖成本高,且易造成品种退化,采用常规的块茎分割、枝插和叶插等常规方法繁殖系数低,耗时长,因此研究大岩桐的组织培养技术具有较高的实用价值<sup>[2]</sup>。近年来,转基因技术在花卉植物中得到了广泛的应用,利用分子手段创造出具有附加价值的新品种花卉已经成为近年来的研究热点。

现采用不同的激素组合对大岩桐的再生体系进行研究,同时对大岩桐叶片进行了卡那霉素敏感性进行筛选,以期后续遗传转化研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试大岩桐材料购自哈尔滨花卉市场。

### 1.2 试验方法

1.2.1 无菌材料的制备 种植在营养土中大岩桐,长至4~6片叶时,取其幼嫩叶片,用流水冲洗30 min,75%酒精浸泡30~60 s,用无菌蒸馏水冲洗1次,再用0.1%升汞浸泡8 min,然后用无菌蒸馏水冲洗5~6次。用无菌滤纸吸干后将叶片切成1 cm×1 cm的小块,近轴面朝下

接种于诱导培养基上。置于温度为(24±2)℃,光照强度为1500 lx,光照时间为16 h/d的环境中培养。

1.2.2 不同激素组合对大岩桐不定芽的诱导 大岩桐不定芽诱导培养基以MS为基本培养基(含蔗糖30 g/L、琼脂8 g/L、pH为5.8),采用浓度为0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L的6-BA和浓度为0、0.1、0.3、0.5 mg/L的NAA进行不同组合设计,每个处理接种30个外植体,重复3次。定期观察外植体的形态变化,40 d后统计形成不定芽的外植体数和诱导率。

### 1.2.3 不同激素组合对大岩桐不定芽增殖率的影响

取大岩桐不定芽,切成1 cm×1 cm的小块,置于添加6-BA(浓度为0、1.0、2.0 mg/L)和NAA(浓度为0、0.1、0.5 mg/L)不同组合的增殖培养基中,40 d后对不定芽的增殖系数进行统计。

### 1.2.4 不同浓度的NAA对大岩桐组培苗生根的影响

分别以1/2MS和MS为基本培养基,在培养基中分别添加0.1、0.2、0.5 mg/L的NAA,选取高4~5 cm的大岩桐组培苗从其基部切下接种于生根培养基中,定期观察生根情况,30 d后统计生根数。

1.2.5 卡那霉素敏感试验 取大岩桐无菌苗的叶片,切成1 cm×1 cm小块,背面朝上放入添加不同浓度的卡那霉素(0、50、100、150、200、300 mg/L)诱导培养基上进行培养,定期观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素组合对大岩桐叶片不定芽诱导的影响

由图1可知,接种于诱导培养基中的大岩桐叶片,4 d左右叶片开始卷曲,8 d左右叶片的边缘开始膨大,17 d左右叶缘由深绿色变为浅黄色(图1b),25 d左右可见浅绿色的幼芽形成(图1c)。40 d后对不同激素组合培养基中的诱导情况进行调查,结果显示,在只添加6-BA或NAA的诱导培养基中,外植体也可以形成不定芽,且

**第一作者简介:**尹智慧(1987-),女,硕士,研究方向为植物基因工程。E-mail:ly\_whly@yahoo.cn.

**责任作者:**郭长虹(1968-),女,博士,教授,现主要从事植物基因工程等研究工作。E-mail:kaku2008@hotmail.com.

**基金项目:**黑龙江省杰出青年基金资助项目(JC201109);黑龙江省创新团队科研资助项目(2010TD10);哈尔滨师范大学创新团队资助项目(KJTD201102)。

**收稿日期:**2013-02-10

诱导率随着 6-BA 和 NAA 的浓度升高而升高,但最高诱导率也仅为 33.33%和 21.11%,诱导效果不佳;在 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 培养基中诱导不定芽的效果最佳,诱导率较高,可达 98.89%(表 1)。通过 SPSS 软件分析,结果显示不同浓度激素组合对大岩桐叶片不定芽诱导差异显著  $P=0.072(>0.05)$ 。因此确定大岩桐叶片诱导的适宜培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA。

表 1 不同激素组合对叶片诱导的影响

Table 1 Effect of different hormone combinations on leaves induction

6-BA /mg·L <sup>-1</sup>	NAA /mg·L <sup>-1</sup>	接种数 /个	形成不定芽的 外植体数/个	诱导率 /%	差异显 著分析
0.5	0	30	2.00	6.67	g
1.0	0	30	3.00	10.00	g
1.5	0	30	6.00	20.00	f
2.0	0	30	10.00	33.33	e
0	0.1	30	1.00	3.33	g
0.5	0.1	30	16.0	53.33	d
1.0	0.1	30	29.67	98.89	a
1.5	0.1	30	16.00	53.33	d
2.0	0.1	30	26.00	86.67	b
0	0.3	30	1.33	4.44	g
0.5	0.3	30	5.67	18.89	f
1.0	0.3	30	11.33	37.78	e
1.5	0.3	30	21.67	71.11	c
2.0	0.3	30	28.67	95.56	a
0	0.5	30	6.33	21.11	f
0.5	0.5	30	9.67	32.22	e
1.0	0.5	30	14.00	46.67	d
1.5	0.5	30	23.00	76.67	c
2.0	0.5	30	28.00	93.33	ab

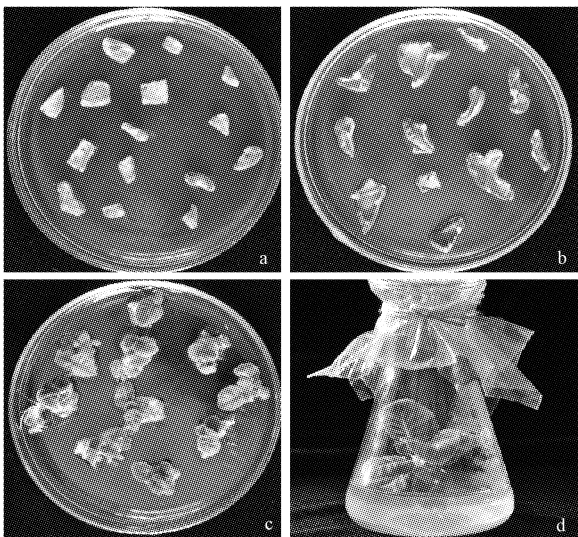


图 1 大岩桐组织培养

注:a:叶片边缘开始膨大;b:叶缘由深绿色变为浅黄色;c:诱导产生不定芽;d:组培苗。

Fig. 1 Tissue culture of *Simingia speciosa* Benth.

2.2 不同激素配比对不定芽增殖率的影响

将不定芽接入到增殖培养基中 40 d 后,对大岩桐不

定芽的增殖情况进行调查。结果显示,在只添加 6-BA 的培养基中,不定芽的增殖速度较慢,增殖系数为 3.4;在只添加 NAA 的培养基中,不定芽的增殖系数仅为 1.2;2 种激素的组合的培养基中,诱导率提高,在 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 培养基中大岩桐不定芽的增殖速率最快,增殖系数达到 4.6(表 2)。通过 SPSS 软件分析,结果显示,不同浓度激素组合对大岩桐叶片增殖具有显著性差异  $P=0.632(>0.05)$ 。由此结果可以看出,6-BA 和 NAA 对大岩桐丛生芽的增殖均起到一定的作用,适当的配比可达到最佳结果。所以,根据试验结果确定 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 培养基为大岩桐不定芽的增殖培养基。

表 2 不同激素配比对不定芽增殖率的影响

Table 2 Effect of different hormone combinations on adventitious buds proliferation rate

6-BA /mg·L <sup>-1</sup>	NAA /mg·L <sup>-1</sup>	接种数 /个	增殖数 /个	增殖系数	差异显 著分析
0	0.5	30	36	1.2	e
1.0	0.0	30	102	3.4	d
1.0	0.1	30	138	4.6	a
1.0	0.5	30	111	3.7	c
2.0	0.1	30	102	3.4	d
2.0	0.5	30	123	4.1	b

2.3 NAA 对大岩桐生根的影响

由生根试验可以看出,不定芽的生根系数随着 NAA 浓度的升高而增大,在 MS 和 1/2MS 培养基中,平均生根系数差异不是很大,但在添加了 0.5 mg/L NAA 的 1/2MS 培养基中,平均生根系数可达到 3.42,对试验数据进行差异显著性分析,差异显著  $P=0.153(>0.05)$ 。而且,在试验过程中发现,与 MS 培养基相比,1/2MS 培养基生根较快,一般 5~7 d 即有萌动,且新根比较粗壮。所以大岩桐无菌苗的适宜生根培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L NAA。

表 3 NAA 对大岩桐生根的影响

Table 3 Effect of NAA concentrations on rooting of *Simingia speciosa* Benth.

基本培 养基	NAA /mg·L <sup>-1</sup>	总接种数 /株	生根数 /株	平均生根 系数	差异显 著分析
1/2MS	0.1	12	14	1.16	d
1/2MS	0.2	12	19	1.58	b
1/2MS	0.5	12	41	3.42	a
MS	0.1	12	15	1.25	cd
MS	0.2	12	18	1.50	bc
MS	0.5	12	20	1.67	b

2.4 大岩桐叶片对卡那霉素敏感浓度的确定

对大岩桐叶片卡那霉素敏感浓度进行筛选,由图 2 可知,Km 浓度小于 200 mg/L 时,对于诱导大岩桐叶片再生不定芽没有太大影响。但是 Km 浓度达到 200 mg/L 后,虽然不影响大岩桐叶片的存活,但是影响再生芽的生长。Km 浓度大于 200 mg/L,对大岩桐的叶片的致死

率为 100%。最终确定大岩桐叶片对卡那敏感浓度为 200 mg/L。

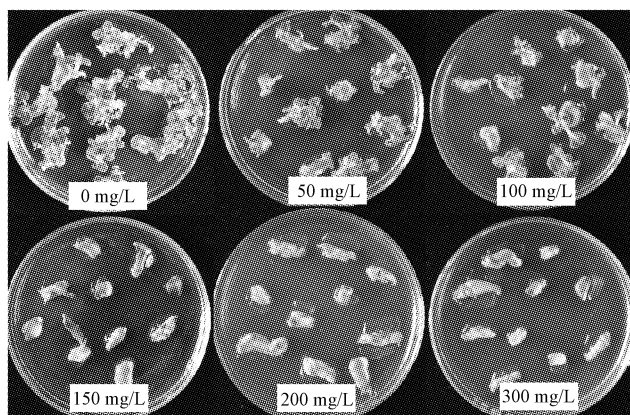


图 2 大岩桐叶片对卡那霉素敏感浓度筛选

Fig. 2 The screening of the kanamycin concentration on leaves of *Sinningia speciosa* Benth.

### 3 讨论与结论

该试验结果表明,叶片诱导和不定芽增殖培养基均为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,最适生根培养基 1/2 MS+0.5 mg/L NAA。在叶片诱导阶段,6-BA 的含量在一定范围内增加,诱导生成的不定芽增多,含量超过一定范围后,叶片只卷曲膨大形成不分化的愈伤组织;NAA 的含量在一定范围内越多,生成的不定芽越粗壮,超过一定范围会抑制芽的生长,导致只诱导生成不定根。唐伟斌等<sup>[4]</sup>报道该培养基激素比有利于不定芽的诱导。在生根阶段,NAA 含量越低幼苗生成的根越细弱,且根少;NAA 含量过高会导致幼苗只长根,不长叶,不利于大岩桐的植物组织培养。1/2MS 比 MS 培养基生根快,根较多且粗壮,有利于组织培养。在试验过程还发现,在较高激素水平上,再生不定芽会发生玻璃化现象,降低激素水平可缓解该现象,所以,这可能是

由于高浓度的激素会导致植物细胞内的内源激素发生较大的变化而造成的。卡那霉素敏感试验中卡那霉素浓度在 0~150 mg/L 时叶片正常诱导出大量不定芽;为 200 mg/L 时,叶片只卷曲,不生成不定芽;超过 200 mg/L 时,叶片会出现褐化的斑点,最终导致叶片死亡,所以认为将叶片对卡那霉素的敏感浓度为 200 mg/L。该试验结果与宋俊芳等<sup>[10]</sup>的结果一致,低于赵万苓等<sup>[7]</sup>的试验结果。

该试验仅对大岩桐再生体系进行了研究,筛选了其叶片对卡那霉素的敏感浓度,为遗传转化过程中对转基因苗的筛选奠定了基础,但大岩桐的遗传转化工作正在进行中。

### 参考文献

- [1] Zhang M Z, Ye D, Wang L L, et al. Overexpression of the cucumber LEAFY homolog CFL and hormone treatments alter flower development in gloxinia (*Sinningia speciosa*) [J]. Plant Mol Biol, 2008, 67: 419-427.
- [2] 祝清俊,周钟信,张宗江,等. 大岩桐组织培养和快速繁殖[J]. 莱阳农学院学报, 1995, 12(1): 47-49.
- [3] 徐全乐,谢亚红,刘文婷,等. 大岩桐高频再生体系建立的两种途径[J]. 园艺学报, 2010, 37(1): 135-140.
- [4] 唐伟斌,刘占牛. 大岩桐组织培养与快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(8): 1418.
- [5] 杨海燕,傅玉兰,黄新,等. 大岩桐组织培养与快速繁殖[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(5): 896-897.
- [6] 周爱芳,李家洲. 提高大岩桐组织培养和栽培技术措施的探索[J]. 广东轻工职业技术学院学报, 2006, 5(3): 24-26.
- [7] 赵万苓,姜世平,付新生,等. 利用农杆菌介导法将查尔酮合酶基因导入大岩桐[J]. 分子植物育种, 2006, 4(1): 45-48.
- [8] 王海洪. 大岩桐组织培养及其练苗移栽技术[J]. 北方园艺, 2008(4): 232-233.
- [9] 徐全乐. 大岩桐组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2011(23): 166-170.
- [10] 宋俊芳,张秋,罗明,等. 绿色荧光蛋白基因转化大岩桐的研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2001, 23(2): 171-173.
- [11] 胡鑫,徐全乐. 连续组织培养引起大岩桐再生植株的表型变化[J]. 西北农业学报, 2010, 19(5): 167-170.

## Study on Optimization of Tissue Culture System of *Sinningia speciosa* Benth. and the Sensitivity on Kanamycin

YIN Zhi-hui, SONG Li-li, SI Liang, YU Dian-si, GUO Chang-hong

(Key laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

**Abstract:** Taking the leaves of *Sinningia speciosa* Benth. as explants, the concentration of the different hormone combinations of the *Sinningia speciosa* Benth. leaves regeneration system and the antibiotics sensitive to kanamycin were studied. The results showed that the significantly different effects of different hormone combinations induction of adventitious bud, the optimal medium for leaf induction was MS with 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA, while the 1/2 MS medium with 0.5 mg/L NAA was successful for rapid rooting. The leaves of *Sinningia speciosa* Benth. with 200 mg/L kanamycin were sensitive.

**Key words:** *Sinningia speciosa* Benth.; tissue culture; kanamycin