

# 豆瓣绿愈伤组织诱导及再生体系的建立

郭臣臣<sup>1</sup>, 雷亚珍<sup>1</sup>, 刘春<sup>2</sup>, 张黎<sup>1</sup>

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘 要:**以豆瓣绿的叶片、叶柄及带芽茎段为试材, 筛选最佳外植体类型; 使用激素 6-BA 与 IBA, 选出适宜诱导愈伤组织与芽增殖的培养基; 研究活性炭对瓶苗生根的影响, 选出适合的生根培养基。结果表明: 带芽茎段是诱导愈伤组织的最佳外植体, 褐化率仅为 6.7%, 而叶片和叶柄褐化严重, 二者褐化率均超过 60%; 最佳诱导愈伤组织培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L, 出愈率 100.00%; 最佳不定芽增殖培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L, 增殖系数为 13.8; 最佳生根培养基为 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+活性炭 1.00 g/L。

**关键词:**豆瓣绿; 外植体; 再生体系; 愈伤组织; 诱导

**中图分类号:**S 682.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)08-0117-04

豆瓣绿(*Peperomia obtusifolia*)属胡椒科豆瓣绿属多年生常绿草本植物, 又名青叶碧玉、翡翠椒草, 分布在热带与亚热带地区, 约有 1 000 余种<sup>[1]</sup>。豆瓣绿作为观叶植物, 可用于室内装饰, 它的蔓性种类也是理想的吊盆植物<sup>[2]</sup>, 不仅具有较高的观赏价值, 还可以吸收二氧化硫等有害气体, 起到净化室内空气的作用<sup>[3]</sup>。豆瓣绿很难获得种子, 以无性繁殖为主, 繁殖周期长, 成苗率低, 难以满足市场的需求。组织培养繁殖速度快、量大、性状稳定是豆瓣绿快速繁殖的主要手段。以豆瓣绿不同类型外植体为试材, 研究不同激素配比以及不同活性炭浓度对豆瓣绿愈伤诱导、芽增殖及生根影响, 以期对豆瓣绿再生体系的建立提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取无病害、生长健壮的豆瓣绿植株, 剪取带芽茎段、叶柄、叶片作为外植体。

### 1.2 试验方法

1.2.1 不同灭菌时间对外植体成活率的影响 用洗洁精清洗外植体表面, 流水冲洗 4~5 h 后, 放入超净工作台上。用 75% 的酒精浸泡约 30 s 后转入 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌 6、8、10、12、15 min, 最后用无菌水漂洗 5~6 次。灭菌后的外植体用剪刀将叶片切成面积大小约为 1 cm<sup>2</sup> 左右的方块, 分别剪取长度为 1 cm 左右的带芽茎段和叶柄

放入 MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L 培养基中, 经过 20 d 后观察, 统计不同灭菌时间下各外植体的污染率、死亡率和成活率。培养温度 22~26℃, 光照时间 12 h/d, 光照强度为 2 000~2 500 lx。

1.2.2 不同外植体类型对愈伤组织诱导的影响 将灭菌后的外植体叶片、叶柄、带芽茎段, 接种于诱导培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L 上, 45 d 后观察统计。

1.2.3 豆瓣绿愈伤组织及不定芽诱导 MS 为基本培养基, 分别为添加激素 6-BA(1.0、2.0、3.0 mg/L) 和 IBA(0.1、0.5 mg/L), 共 6 种组合(A1~A6), 具体配比见表 3。统计出现愈伤组织的时间、出愈率和出芽率, 观察愈伤组织及不定芽的生长情况, 从中筛选出最佳诱导培养基。每个处理 10 瓶, 每瓶接种 3 个, 3 次重复。

1.2.4 豆瓣绿不定芽的增殖 MS 为基本培养基, 分别添加激素 6-BA(0.5、1.0 mg/L) 和 IBA(0.1、0.3 mg/L), 共 4 种组合(B1~B4), 具体配比见表 4。30 d 后将茎段产生的丛芽切下, 接种到增殖培养基进行增殖培养, 记录增殖的丛芽数, 丛芽的生长情况。每个处理 5 瓶, 每瓶接种 3 个, 3 次重复。

1.2.5 豆瓣绿丛芽生根培养 1/2MS 为基本培养基, 分别为添加激素 IBA(0.1、0.2 mg/L) 和活性炭(0、1.0、2.0 g/L), 共 6 种组合(C1~C6), 具体配比见表 5。待分化的不定芽长至 2 cm 左右时接种至生根培养基中, 20 d 后统计生根数和生根率, 平均根长, 筛选出最佳生根培养基。每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 3 株, 3 次重复。

### 1.3 项目测定

污染率(%) = 污染的外植体数/接种外植体总数 × 100%; 死亡率(%) = 褐化死亡数/外植体接种总数 ×

**第一作者简介:**郭臣臣(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为观赏园林植物。

**责任作者:**张黎(1962-), 女, 硕士, 教授, 研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail: zhang\_li9988@163.com。

**收稿日期:**2014-11-10

100%; 出愈率(%)=产生愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数×100%; 出芽率(%)=愈伤组织的出芽数/出愈数×100%; 增殖系数=增殖丛芽数/接种外植体数; 平均根长=生根总长/分化出的总根数; 平均根数=生根总数/分化出根的幼苗数。

#### 1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 和 SPSS 软件进行分析。

表 1

灭菌时间对各外植体的影响

Table 1

Effect of sterilization time on different explants

灭菌时间 Sterilization time /min	叶片 Leaf			叶柄 Petiole			带芽茎段 Stem with bud		
	污染率 Contamination rate /%	死亡率 Mortality /%	成活率 Survival rate /%	污染率 Contamination rate /%	死亡率 Mortality /%	成活率 Survival rate /%	污染率 Contamination rate /%	死亡率 Mortality /%	成活率 Survival rate /%
6	24.1	63.5	12.4	94.4	2.1	3.5	84.1	1.3	14.6
8	8.2	70.8	21.0	70.2	20.6	9.2	66.4	4.5	29.2
10	0	100	0	39.0	44.3	16.7	42.6	15.8	41.6
12	0	100	0	29.3	60.4	10.3	27.1	20.9	52.0
15	0	100	0	10.5	78.7	6.8	23.6	32.4	44.0

#### 2.2 不同外植体类型对愈伤组织诱导的影响

由表 2 可以看出, 各外植体的出愈率、褐化率及出芽率差异显著, 带芽茎段出愈率和出芽率最高、褐化率最低, 诱导效果最好。叶片与叶柄在诱导培养中, 褐化严重, 褐化率均超过 60.0%。豆瓣绿的最佳外植体为

表 2 不同外植体类型对愈伤诱导的影响

Table 2 Effect of different explant types on callus induction

外植体类型 Explant type	出愈率 Rate of callus /%	褐化率 Browning rate /%	出芽率 Buds rate /%	分化时间 Differentiation time /d
叶片 Leaf	36.7	63.3	23.3	35
叶柄 Petiole	23.3	76.7	17.7	30
带芽茎段 Stem with bud	93.3	6.7	90.0	35

表 3

不同激素配比对不定芽诱导的影响

Table 3

Effect of different hormone combinations on adventitious bud induction

处理 Treatment	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	IBA /(mg·L <sup>-1</sup> )	出愈数 Callus number/个	愈伤组织出芽数 Budding callus number/个	出愈率 Rate of callus/%	出芽率 Buds rate/%	生长状况 Growth condition	
							愈伤组织 Callus	丛芽 Clumpy buds
A1	1.0	0.1	19	11	63.30	57.90	疏松, 黄绿色	叶展开, 瘦弱
A2	1.0	0.5	24	17	80.00	70.83	紧密, 褐色	叶卷曲, 瘦弱
A3	2.0	0.1	30	26	100.00	86.67	紧密, 黄绿	叶展开, 健壮
A4	2.0	0.5	25	19	83.30	76.00	紧松, 淡黄	叶展开, 瘦弱
A5	3.0	0.1	26	21	86.70	80.77	紧密, 黄色	叶卷曲, 瘦弱
A6	3.0	0.5	22	16	73.30	72.73	紧密, 深褐	叶卷曲, 瘦弱

#### 2.4 不同激素配比对不定芽增殖的影响

从表 4 可以看出, 4 种处理之间增殖系数差异显著。当 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时, IBA 浓度 0.1 mg/L 时出芽数最多, 增殖系数为 13.8。当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时, IBA 浓度 0.3 mg/L 增殖系数为 10.8。故豆瓣绿不定芽增殖的最佳培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L。

#### 2.5 不同培养基对生根的影响

接种 10 d 后, 各处理的瓶苗陆续有根产生, 起初为

## 2 结果与分析

### 2.1 不同灭菌时间对外植体成活率的影响

从表 1 可以看出, 不同灭菌时间下各外植体成活率不同。叶片用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌 8 min 时, 成活率最高为 21.0%; 叶柄用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌 10 min 时, 成活率最高为 16.7%; 而带芽茎段用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌 12 min 时, 成活率最高为 52.0%。

带芽茎段。

### 2.3 不同激素配比对不定芽诱导的影响

由表 3 可知, 将灭菌后的带芽茎段接入到不定芽诱导培养基中, 不同激素配比出愈率、出芽率差异显著。在 A1 和 A2 低浓度的 6-BA 中, 出愈率与出芽率随 IBA 的浓度升高而变大, 而 A3~A6 之间高浓度的 6-BA, 出愈率与出芽率随 IBA 的浓度升高而减小。当 6-BA 浓度为 1.0、2.0、3.0 mg/L 时最大出愈率分别为 80.00%、100.00%、86.70%。A3 处理的愈伤组织紧密, 丛芽健壮, 叶展开, 生长情况良好, 表明 2 种生长调节剂的配比达到最好的效果。豆瓣绿最佳的诱导培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L。

白色, 15 d 后白根逐渐变为黄褐色。20 d 后对生根的外植体数、生根数、平均根数、平均根长进行统计。

由表 5 可以看出, 当 IBA 浓度为 0.1 mg/L 时, 活性炭浓度为 1.0 g/L 时, C2 生根数最多, 平均根数与平均根长均显著高于 C1 和 C3。当 IBA 浓度为 0.2 mg/L 时, 活性炭浓度为 1.0 g/L 时, C5 生根数最多, 平均根数与平均根长均显著高于 C4 和 C6。而 C5 的平均根数与平均根长显著高于 C2, 所以, 最适宜生根培养基是 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+活性炭 1.0 g/L。

表 4 不同激素配比对豆瓣绿不定芽增殖的影响

Table 4 Effect of different hormone combinations on adventitious bud proliferation

处理 Treatment	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	IBA /(mg·L <sup>-1</sup> )	接种数 Inoculation number/个	出芽数 Budding number/个	增殖系数 Proliferation coefficient	生长状况 Growth condition
B1	0.5	0.1	15	207d	13.8d	丛芽密,叶片深绿,展开
B2	0.5	0.3	15	174c	11.6c	丛芽较密,叶片绿,展开
B3	1.0	0.1	15	120a	8.0a	丛芽稀,叶片黄色,有畸形
B4	1.0	0.3	15	162b	10.8b	丛芽较稀,叶片黄绿色,卷曲

注:同列不同小写字母表示  $P=0.05$  水平差异显著,下同。  
Note: Different lowercase letters show significant difference at  $P=0.05$  level, the same below.

表 5 IBA 和活性炭对瓶苗生根的影响

Table 5 Effect of IBA and AC on *in vitro* rooting

处理 Treatment	IBA /(mg·L <sup>-1</sup> )	活性炭 Active carbon/(g·L <sup>-1</sup> )	接种数 Inoculation number/个	生根数 Number of rooting	平均根数 Average root number/个	平均根长 Average root length/cm	生根率 Rooting rate/%
C1	0.1	0	30	72	2.4a	1.8a	100
C2	0.1	1.0	30	120	4.0b	2.3b	100
C3	0.1	2.0	30	105	3.5a	1.5a	100
C4	0.2	0	30	108	3.6b	2.4b	100
C5	0.2	1.0	30	180	6.0c	3.9d	100
C6	0.2	2.0	30	126	4.2b	1.2c	100

3 结论与讨论

带芽茎段为豆瓣绿组织培养的最佳外植体,褐化率为 6.7%;叶片和叶柄超过 60.0%。豆瓣绿最佳诱导培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L,出愈率达 100%,出芽率为 86.67%。不定芽增殖最佳培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L,增殖系数达 13.8。生根最佳培养基为 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+活性炭 1.0 g/L,平均根长为 3.9 cm,平均根数为 6.0 个。

不同外植体因分化程度不同,组织结构不同,故而对灭菌处理敏感程度有所差异。同时,各组织、各器官的细胞恢复能力和愈伤组织再分化能力也存在着差异。因此,选择好外植体的类型对植株再生体系的建立非常重要。该试验筛选出的最佳外植体类型为带芽茎段,结果与王涛等<sup>[4]</sup>的研究结果一致。而与黄靖<sup>[5]</sup>研究的花叶豆瓣绿的最佳外植体为叶柄有所差异,与品种有关。

植物激素是植物体形态建成过程的关键因子,适当的激素配比,才能诱导细胞分裂,启动愈伤组织的形成和生长以及根、芽的分化等变化<sup>[6]</sup>。该试验使用 6-BA 与 IBA 2 种激素,一般认为 6-BA/IBA 比值大有利于长芽,比值小则有利于生根,该试验结果在 不定芽增殖培

养过程中,随着 6-BA/IBA 比值增大,B1~B3 增殖逐渐增大,而 6-BA 为 1.0 mg/L,IBA 0.1 mg/L 时,增殖系数最小为 8.0,说明并非比值越大越利于不定芽增殖。

活性炭在培养基中不仅能吸附有毒物质,也能提供一个暗环境,避免强光对根生长的抑制<sup>[7]</sup>,也能吸附外源激素。因此,添加活性炭的量要恰当。试验表明,活性炭含量为 1.0 g/L 时,能显著促进豆瓣绿瓶苗分化出生根,经练苗移栽后成活率达到 100%,再生瓶苗长势良好。该方法完善了豆瓣绿的快繁体系,能更好的大规模发展和推广豆瓣绿组培苗的生产。

参考文献

[1] 高家春. 最佳观叶植物—豆瓣绿[J]. 园林科技信息, 2003(1):30.  
[2] 高尚士. 观叶植物—豆瓣绿[J]. 新农业, 2008(1):53.  
[3] 林大为, 韩月琴. 红边朱蕉茎尖的离体培养和快速繁殖[J]. 植物生理学报, 1991, 27(3): 211-212.  
[4] 王涛, 彭立新. 豆瓣绿 (*Peperomia obtusifolia*) 的组织培养与快速繁殖研究[J]. 天津农学院学报, 2011(2): 1-5.  
[5] 黄靖. 花叶豆瓣绿组培技术研究[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(6): 36.  
[6] 姜黎, 张翼, 邢梅. 红肉猕猴桃离体快速繁殖技术研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(1): 101-104.  
[7] 刘根林, 梁海珍, 朱军. 活性炭在植物组织培养中的作用概述[J]. 江苏林业科技, 2001, 28(5): 46-48.

Callus Induction and Establishment of the Regeneration System of *Peperomia obtusifolia*

GUO Chen-chen<sup>1</sup>, LEI YA-zhen<sup>1</sup>, LIU Chun<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>

(1. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. Research Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** The leaves, petioles and stems with buds of *Peperomia obtusifolia* were chosen as the explants to select the best explant types, the combinations of 6-BA and IBA was used to select suitable medium of callus induction and bud

# 蔬菜根结线虫生防细菌的筛选及菌株 HJT2-1 种类的初步鉴定

霍建飞<sup>1</sup>, 任文来<sup>2</sup>, 郝永娟<sup>1</sup>, 刘春艳<sup>1</sup>, 王勇<sup>1</sup>, 王万立<sup>1</sup>

(1. 天津市植物保护研究所, 天津 300381; 2. 廊坊市文安县农业局, 河北 廊坊 065800)

**摘要:**以天津地区 7 个区县的蔬菜大棚土壤中分离出的 306 株细菌菌株为试材, 采用亚甲基蓝染色法, 研究 306 株细菌菌株发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的影响。结果表明: 细菌菌株 HJT2-1 发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率较高为 81.3%, 其温室盆栽防效为 55.6%, 略低于阿维菌素防效。采用对细菌核糖体 DNA 的内转录间隔区进行分析的方法将菌株 HJT2-1 初步鉴定为假单胞菌属细菌。该试验获得了对根结线虫 2 龄幼虫具有较高致死率的细菌菌株 HJT2-1, 为开发防治根结线虫的生防制剂奠定了基础。

**关键词:**蔬菜根结线虫; 生防细菌; 筛选; 鉴定

**中图分类号:**S 436.44 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)08-0120-04

根结线虫(*Meloidogyne* spp.) 是一类在蔬菜上为害极大的植物病原线虫, 能侵染的植物超过 3 000 种<sup>[1]</sup>, 尤其以茄科、葫芦科和十字花科等蔬菜受害最重<sup>[2]</sup>。根结线虫不仅在蔬菜大棚、温室中为害, 近几年有逐步向露地栽培蔬菜为害的趋势<sup>[3-4]</sup>。目前天津市设施蔬菜发展迅速, 至 2013 年, 设施蔬菜面积已超过 40 000 hm<sup>2</sup>, 2009、2010 年对天津市各区县根结线虫病发生情况调查, 发现西青、北辰、津南、东丽、静海、武青、宝坻、蓟县等 8 区县的蔬菜大棚中均有不同程度的根结线虫病为害, 其中一般发病地块蔬菜减产 20%~30%, 严重地块减产达 50% 以上。生产上主要应用化学农药对蔬菜根结线虫病进行防治, 而化学杀线剂一般毒性较高, 不仅污染环境、对人体有伤害, 且容易产生抗药性<sup>[5]</sup>, 防治效果也并不理想。因此, 人们的视线逐渐转移到生物防治上来。生防菌株具有不污染环境、不产生抗药性、防治效果稳定、对人畜安全等优点, 因此筛选出高效的防治线

虫的生防菌株成为众多学者研究的目标。目前杀线虫微生物种类较多, 包括细菌、真菌、放线菌等。而细菌由于容易定植、培养, 且对根结线虫的防治效果较稳定, 具有广阔的市场前景和开发力。该研究旨在从天津各区县蔬菜大棚土壤中分离的细菌菌株中筛选出对根结线虫二龄幼虫具有较高致死率的菌株, 以期开发研制高效的杀线虫生物制剂奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株为从天津西青、北辰、东丽、武清、静海、宝坻、蓟县等区县的蔬菜大棚土壤根际分离的 306 株细菌菌株。供试番茄品种为“白果强丰”。供试根结线虫均为南方根结线虫。

### 1.2 试验方法

1.2.1 根际细菌的采集与分离 在天津各区县的蔬菜大棚地块采集根际土壤样品, 采用稀释分离法, 于 NA 培养基(牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 17 g, 水 1 000 mL, pH 7.2)平板上进行分离, 所分离细菌纯化后保存、备用。

**第一作者简介:**霍建飞(1981-), 男, 河北承德人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为植物真菌及线虫病害。E-mail: hujf2203@163.com.

**基金项目:**天津市农科院院长基金资助项目(090401)。

**收稿日期:**2015-01-20

multiplication; activated carbon was used to screen the appropriate rooting medium. The results showed that the stems with buds was suitable for inducing callus and the browning rate was only 6.7%, and the leaf and petiole browning rate were more than 60%. It indicated that the optimum medium for callus induction was MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L and the rate of callus was 100.00%; the best shoot proliferation was MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L and the multiplication coefficient was 13.8; the optimum root rooting medium was 1/2 MS+IBA 0.2 mg/L+AC 1.0 g/L.

**Keywords:** *Peperomia obtusifolia*; explant; regeneration system; calus; induction