

DOI:10.11937/bfyy.201515027

厚藤的组织培养及植株再生

黎海利, 谭飞理, 刘锴栋, 成夏岚

(岭南师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘 要:以厚藤不同外植体为试材, MS 为基本培养基进行组织培养, 研究 6-BA 和 NAA 不同浓度组合对不同外植体愈伤组织诱导、不定芽分化及增殖的影响, 以筛选出适合厚藤组织培养的最适外植体和培养基。结果表明:厚藤最佳的愈伤组织诱导培养基为 MS+6-BA 0.75 mg/L+NAA 0.25 mg/L, 最佳外植体为叶片; 不定芽诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1~0.5 mg/L; 在 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 培养基中增殖倍数最高。在 1/2MS 培养基上培养, 生根率达 87.5%。

关键词:厚藤; 组织培养; 植株再生

中图分类号:S 682.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)15-0104-03

厚藤 (*Ipomoea pes-caprae*) 属旋花科甘薯属多年生草本, 又名马鞍藤、海滩牵牛等, 集药用、观赏于一身, 广布于东南沿海的热带及亚热带海滩上。厚藤叶形奇特, 顶端微缺或 2 裂, 裂片圆, 形如马鞍; 花大, 花冠漏斗状, 紫色或紫红色, 具有极强的观赏特性, 特别适合做地被植物。目前国内外对厚藤的研究不多^[1-7]。由于种苗不足, 国内沿海一带园林中厚藤仅在小面积应用, 且主要来源于野生种。该研究用不同激素组合对厚藤进行研究, 建立厚藤的组织培养体系, 对扩大厚藤的种苗生产, 推广厚藤在热带滨海城市的应用, 增加城市绿化物种多样性, 打造具有热带亚热带特色的地被景观具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

厚藤于 2011 年 7 月引种自广东湛江市郊东海岛 (北纬 20°54', 东经 110°09'), 栽植于岭南师范学院生物园。

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料及表面灭菌 外植体采集时间为晴天中午, 取生长期健康、无病虫害的植株。外植体分为顶芽、带芽茎段、叶片, 长度约 2~3 cm, 叶片切成 1 cm²

的小块。先用洗洁精水漂洗 10 min 左右, 再用自来水冲洗 30 min, 后浸泡于无菌水中待用。外植体在超净工作台上用 70% 乙醇处理 15 s, 然后用无菌水清洗 4~5 次, 用升汞浸泡 6 min, 最后用无菌水冲洗 6 次。处理后的外植体剪掉两头茎段, 避免氯化汞渗入而影响营养吸收。

1.2.2 愈伤组织诱导培养基 将外植体接到添加了不同植物激素的 MS 诱导培养基上。诱导培养基的配方分别为 MS+0.50 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA(M1); MS+0.75 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA(M2); MS+1.00 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA(M3), 培养 20 d 后统计出愈率。

1.2.3 丛生芽诱导培养 将生长状况良好的愈伤组织切成 1 cm 的小块, 接到丛生芽诱导培养基中。厚藤不定芽诱导培养基以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA、NAA 进行正交实验设计, 每个因素设计不同的浓度梯度, 其中 6-BA 浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L, NAA 浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0 mg/L。培养约 30 d 后统计丛生芽分化率及生长情况。

1.2.4 增殖培养基的筛选 厚藤增殖培养以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA、NAA 进行正交实验设计, 每个因素设计 3 个浓度梯度, 其中 6-BA 浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L, NAA 浓度为 0.1、0.3、0.5 mg/L。该试验以不添加任何激素的 MS 培养基为对照培养基, 增殖培养约 30 d 后, 每个处理随机选取 5 瓶统计增殖倍数及生长情况。

1.2.5 生根与移栽 生根培养基为 1/2MS 培养基, 30 d 后统计生根率。练苗移栽后统计成活率。

1.2.6 培养条件 培养条件均为光照强度 2 000 lx, 光照时间 14~16 h, 培养温度为 25℃。

第一作者简介:黎海利(1981-), 女, 广西宜州人, 博士, 讲师, 研究方向为观赏园艺。E-mail:lihaili2425@126.com.

责任作者:刘锴栋(1982-), 男, 博士研究生, 副研究员, 研究方向为园艺学。E-mail:liukaidong2001@126.com.

基金项目:国家星火计划资助项目(2013GA780093); 湛江市热带特色资源植物技术开发重点实验室资助项目(2014A06008); 岭南师范学院博士启动资助项目(ZL09011)。

收稿日期:2015-01-22

1.3 数据分析

愈伤诱导率(%)=产生愈伤的外植体数/接种外植体数×100%;分化率(%)=分化芽的愈伤组织数目/接种愈伤组织数×100%;增殖倍数=诱导出的丛生芽中长度大于0.5 cm的芽数/分化的总芽数。

试验数据用 SPSS 13.0 及 Excel 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体的愈伤组织诱导

厚藤在诱导培养基中,8 d 左右开始产生愈伤组织,颜色为黄绿色。由表 1 可知,不同外植体均可诱导产生愈伤组织,但叶片的平均诱导率最高,愈伤诱导率达 90.7%,其次为顶芽,愈伤诱导率为 50.0%,培养基则以

MS+0.75 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA(M2)诱导率最高,宜作为厚藤的最佳诱导培养基。

2.2 厚藤丛生芽诱导培养

由表 2 可知,当 NAA 浓度≥1.0 时,不能使愈伤组织诱导产生丛生芽。当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L, NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,厚藤出芽率最高,达 85.0%,其次为 6-BA 1.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L 的组合,丛生芽出芽率为 78.2%,且生长正常,叶色为绿色。过低浓度的 6-BA 出芽率较低,或不能诱导产生丛生芽,而过高浓度的 6-BA 总体上对诱导丛生芽也是不利的,结果是不能诱导产生丛生芽或者丛生芽生长不良,因此,厚藤较适合的丛生芽诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1~0.5 mg/L。

表 1 厚藤不同外植体愈伤组织诱导率统计

Table 1 The callus induction rate of different explants of *Ipomoea pes-caprae*

培养基 Media	顶芽 Terminal bud		茎段 Stem		叶片 Leaf	
	接种数 Inoculation number	愈伤诱导率 Callus induction rate/%	接种数 Inoculation number	愈伤诱导率 Callus induction rate/%	接种数 Inoculation number	愈伤诱导率 Callus induction rate/%
M1	36	50.0	36	33.0	36	83.3
M2	36	33.3	36	17.0	36	100.0
M3	36	66.7	36	50.0	36	88.8
均值 Average		50.0		33.0		90.7

表 2 不同植物激素组合对厚藤丛生芽诱导情况统计

Table 2 Bud initiation rate of *Ipomoea pes-caprae* under different combination of 6-BA, NAA concentration

培养基 编号 Media	生长调节剂 Growth regulator		接种数 Inoculation number	出芽率 Bud initiation rate/%	生长情况 Growth
	6-BA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)			
1	0.5	0.1	36	3.0	瘦弱
2	0.5	0.5	36	5.5	生长细弱
3	0.5	1.0	36	0.0	
4	0.5	2.0	36	0.0	
5	1.0	0.1	36	85.0	生长正常,叶绿色
6	1.0	0.5	36	78.2	生长健壮,叶绿色
7	1.0	1.0	36	0.0	
8	1.0	2.0	36	0.0	
9	2.0	0.1	36	32.5	生长正常
10	2.0	0.5	36	6.0	生长细弱
11	2.0	1.0	36	0.0	
12	2.0	2.0	36	0.0	
平均 Average				17.5	

表 3 不同植物激素组合对厚藤增殖培养的影响

Table 3 Shoot proliferation rate of *Ipomoea pes-caprae* under different combination of 6-BA, NAA concentration

培养基编号 Media	生长调节剂 Growth regulator		接种数 Inoculation number	增殖倍数 Proliferation rate	不定芽生长情况 Growth of buds
	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)			
1	0.5	0.1	36	8.2 DEde	生长慢,壮实,粗细不均
2	0.5	0.3	36	13.0 Bbc	生长较慢,较壮实
3	0.5	0.5	36	12.2 BCbc	生长较慢,壮实
4	1.0	0.1	36	14.0 Bb	生长较快,芽体均匀
5	1.0	0.3	36	22.2 Aa	生长较快,芽体均匀,较壮实
6	1.0	0.5	36	11.8 BCDe	生长较快,芽体较壮实
7	2.0	0.1	36	9.6 CDEd	生长较快,芽体瘦弱
8	2.0	0.3	36	9.0 DEde	生长较慢,较壮实
9	2.0	0.5	36	7.0 Ee	生长慢,植株粗细不均匀
平均 Average				12.5	

注:表中不同大写、小写字母分别表示经 LSD 多重比较后不同处理在 0.01、0.05 水平上差异显著。

不定芽生长速度较慢,因此,厚藤最佳增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L。

2.4 生根与移栽

不定芽接入生根培养基约 1 周后开始生根,10~12 d 不定根大量发生,30 d 后统计生根情况。结果表明,厚藤生根率达 87.5%。生根植株练苗后栽于有机质丰富的园土中,成活率达 100%。

3 讨论

在组织培养过程中,加入一定浓度的 6-BA 和 NAA 可促进外植体形成愈伤组织、形成不定芽、促进不定芽增殖^[8-11],但生长素质量浓度过低或过高不利于外植体的脱分化和再分化。有研究表明,低浓度时 6-BA 和 NAA 有利于促进芽和促进愈伤组织的形成,而高浓度时利于愈伤组织形成,对茎尖生长有抑制作用,成苗率先增加后降低^[12-13]。该研究表明,当 NAA 浓度 ≥ 1.0 时,愈伤组织不能诱导产生丛生芽,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L,NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,厚藤诱导出芽率最高。在不定芽增殖过程也出现了同样的结果,增殖培养基以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 为宜。

不定芽增殖过程中单一使用细胞分裂素,不定芽增殖倍数普遍较低^[14],在与一定浓度的生长素配合使用,一定程度上可以增加不定芽的增殖倍数,厚藤的不定芽增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L。说明厚藤不定芽增殖中 6-BA 与 NAA 存在交互作用,这与同属植物甘薯的研究一致^[15]。

该研究成功地建立了厚藤的组织培养及植株再生技术体系,可为扩大厚藤的繁殖规模,将厚藤这一优良的地被植物应用于滨海地区,营造具有热带风情的园林景观提供技术支持,另外,该研究也对厚藤种质资源的保护和离体保存具有重要意义。

参考文献

- [1] 欧阳清月,刘楠,张伟伟,等. 海滩植物厚藤(*Ipomoea pes-caprae*)生物学及生理生态特性[J]. 湖南科技大学学报(自然科学版),2011,26(4):117-121.
- [2] 刘建强,胡军飞,欧丹燕,等. 厚藤种子萌发特性[J]. 浙江农林大学学报,2011,28(1):153-157.
- [3] KROTH R, BERTI C, MADEIRA A O, et al. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae*(L.) R. Br[J]. Pharmazie, 1999, 54(6):464-466.
- [4] MANIGANDAN V, DINESH P, THIRUNAVUKKARASU P, et al. Low cost material enhanced the *in vitro* regeneration and micro propagation of medicinal sand dune plant species *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br[J]. American Journal of Plant Physiology, 2014, 9(1):16-23.
- [5] DEVALL M S, THIEN L B. Inland occurrence of the strand plant *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae) around Lake Nicaragua[J]. The Southwestern Naturalist, 2005, 50(3):380-384.
- [6] 王正加,黄有军,龚宁,等. 厚藤耐盐生理指标研究[J]. 江西农业大学学报,2006,28(2):264-267.
- [7] MIRANDA R P, SANCHEZ E E, MARTINEZ C E. Characterization of lipophilic penta-Sachafides from beach morning glory (*Ipomoea pes-caprae*) [J]. J Nat Prod, 2005, 68:226-230.
- [8] 孙慧晶,李建宾,希从芳,等. 两种植物生长调节剂对洋桔梗离体培养的效应[J]. 云南农业大学学报,2014,29(2):208-215.
- [9] 都婷,商雨,杨辉,等. 云南含笑组织培养快繁技术及愈伤组织诱导研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版),2013,28(4):530-535.
- [10] 田国栋,张荷芑,康卓慧,等. 桃叶片再生不定芽的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(2):125-132.
- [11] 陈丽静,齐欣,王玉坤,等. 北五味子快繁体系的建立[J]. 中草药,2011,42(3):575-577.
- [12] 孟德璇,孙周平. 6-BA 和 NAA 对不同甘薯品种茎尖培养的影响[J]. 杂粮作物,2010,30(4):286-287.
- [13] 何凤发,王季春,张启堂,等. 甘薯茎尖脱毒与快速繁殖技术研究[J]. 西南农业大学学报,2002,26(4):509-511.
- [14] 阮慧泽,李珍,任燕燕,等. 半蒴苣苔的叶片组织培养及植株再生[J]. 浙江农林大学学报,2014,31(1):162-166.
- [15] 关崇梅,秦静远,徐志英,等. 甘薯茎尖分生组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 农业生物技术科学,2004,20(4):33-35.

Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Ipomoea pes-caprae*

LI Haili, TAN Feili, LIU Kaidong, CHENG Xialan

(School of Life Science and Technology, Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048)

Abstract: Taking different explants of *Ipomoea pes-caprae* as material, using MS media with different combination of 6-BA, NAA concentration, the effect of 6-BA, NAA on callus induction, bud initiation, shoot proliferation were studied to optimize the tissue culture of *Ipomoea pes-caprae*. The results showed that the initial medium for the callus induction was MS+6-BA 0.75 mg/L+NAA 0.25 mg/L, and the optimal explants were leaves. The best medium for adventitious bud differentiation was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1—0.5 mg/L. The best subculture media for shoot proliferation was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L. The rooting rate was 87.5% in 1/2MS medium.

Keywords: *Ipomoea pes-caprae*; tissue culture; plantlet regeneration