

# 燕子掌的组织培养与植株再生

蒲仕明<sup>1,2</sup>, 李荣峰<sup>1</sup>, 方利娟<sup>1</sup>, 兰翠玲<sup>1</sup>, 周祖平<sup>2</sup>

(1. 百色学院 化学与生命科学系, 广西 百色 533000; 2. 广西师范大学 生命科学院, 广西 桂林 541004)

**摘要:**以燕子掌叶片为外植体,在培养基中添加不同浓度的 6-BA 和 IBA,研究燕子掌组培苗形成过程中 6-BA 和 IBA 浓度对各阶段的影响。结果表明:MS+IBA 5 mg/L+6-BA 5 mg/L 为愈伤组织诱导的最佳培养基,分化不明显,且诱导率为 95.56%;MS+IBA 2 mg/L+6-BA 1 mg/L 为外植体直接诱导不定芽的最佳培养基,平均可达 12 芽以上;MS+IBA 5 mg/L+6-BA 5 mg/L 为愈伤组织增殖最佳培养基,增殖倍数为 10.9;愈伤组织分化的最佳培养基为 MS+IBA 1 mg/L+6-BA 5 mg/L,单位面积芽数为 32 个以上,且芽明显;壮苗的最佳培养基为 MS+IBA 2 mg/L,45 d 后平均苗长为 4.74 cm;诱根的最佳培养基为 MS+IBA 0.5 mg/L,诱根率为 100%。

**关键词:**燕子掌;愈伤组织;增殖;不定芽;球状胚体

**中图分类号:**S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)23-0125-04

燕子掌(*Crassula argentea* Thunb)为景天科青锁龙属多年生多肉植物,中文别名金钱树、花月、玉树、玉树景天等<sup>[1]</sup>。它原产南非较干旱地区,现我国南北各地均有栽培,其体态极为俊美,可作树桩盆景<sup>[2]</sup>。燕子掌在室内的滞尘能力很强,单位面积滞尘量比一般植物高;对室内的 CO、CO<sub>2</sub>、过氮氧化物的吸收能力强;对室内苯和甲醛有很高的净化率<sup>[3-5]</sup>。燕子掌还是很好的试验材料,常用于表皮细胞及气孔,不定根等实验教学材料<sup>[6-7]</sup>。此外,燕子掌的提取物中含有多种有效化合物,如 β-谷甾醇、D-甘露醇、氯化钾、氯化钠的混合物、3-甲基-2-丁烯基异胍等,临床实验证明燕子掌提取物对Ⅱ型糖尿病及并发症的治疗效果好<sup>[8]</sup>。经过多年的研究开发,“燕子掌中药材及其制剂”申报国家新药前的科研工作已基本完成,这预示将需求大量的燕子掌作为原料供药品加工生产使用。

目前,燕子掌组织培养的报道仅有 1 篇, Liu Y L 等<sup>[9]</sup>燕子掌的茎、叶、根为外植体,通过直接分化为芽,再壮苗、生根,形成组培苗。燕子掌不仅具极高的观赏价

值和净化空气的能力,而且其提取物具有药用价值。我国的野生燕子掌并不多见,燕子掌的需求正成为一个突出的问题。通过如扦插、叶片分化出苗等无性繁殖并不理想<sup>[10]</sup>,这些传统的繁殖并不能满足人们对幼苗需要。为了得到更多的燕子掌幼苗,以燕子掌叶为外植体,采用不同激素组合进行愈伤组织的诱导、增殖、分化、不定芽壮苗、不定苗生根,探讨不同激素组合对试管苗形成的影响,以期建立高效的再生体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选用 2010 年 12 月生长在广西百色学院内的 3 龄燕子掌(图 1A),采中等年龄、肥厚的,且健康无裂痕的叶片。愈伤组织诱导与增殖培养基均以 MS 为基本培养基。附加不同浓度的激素,其中蔗糖为 30 g/L,琼脂为 7 g/L。培养于恒温 25℃,恒湿 70%,光照强度为 2 000 lx,光照时间为 13 h/d 的人工气候培养箱(B204LEDR INPUT)中。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体取材与消毒 将采集回来的燕子掌叶片放入大烧杯中,加入洗涤剂浸洗 5 min,在清洗时用毛笔轻轻的刷洗叶片表面的灰尘,但不能刷伤叶片表皮,随后再用流水冲洗 10 min 后带入超净工作台上。先用体积分数为 75%的酒精浸 15 s 后,迅速用无菌水冲洗 1 次,再用浓度为 0.1%的 HgCl<sub>2</sub> 浸泡 5 min,后迅速用无菌水冲洗 4 次,即获得无菌材料。

1.2.2 叶诱导愈伤组织或不定芽 用手术刀先将叶柄伤口前 0.5 cm 的叶柄切去,然后把叶片边缘切去,仅留下叶脉周围的 1 cm 宽的叶片。最后再将它横段成 1 cm<sup>2</sup>

**第一作者简介:**蒲仕明(1987-),男,四川南充人,在读硕士,研究方向为细胞生物学和干细胞生物学。E-mail: pushiming77@163.com.

**责任作者:**李荣峰(1980-),女,广西灵川人,硕士,讲师,现主要从事植物生理生态和微生物及发酵研究工作。E-mail: annyl119520@126.com.

**基金项目:**广西高等学校生物技术特色专业建设资助项目(GXTSZY224);广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFB018044)。

**收稿日期:**2012-07-30

的小块。将外植体横放到附加了不同浓度激素的培养基中,并将其按到培养基内约外植体厚度一半的深度(图 1B),用来诱导愈伤组织或不定芽。

1.2.3 愈伤组织的增殖 选择长势很好的愈伤组织,并将其切成大小基本相同的若干块,随机抽取 20 块在烘箱中烘干。并称得其重量,计算出平均每一块的平均质量(m)。将余下的愈伤组织随机接种到不同配比的 IBA 和 6-BA 的 MS 培养基。培养 40 d 后,取出愈伤组织烘干,并称得其重量,计算出每个方案的平均质量(M)。计算出增重倍数(I)。

1.2.4 愈伤组织的分化 选择长势很好的愈伤组织,并将其切成大小基本相同的若干块,分别接种于不同生长素和细胞分裂素的 MS 培养基上,培养 30 d 后,计算出分化出的平均芽数。

1.2.5 不定芽的壮苗 选择已经分化的不定芽,将其接种到不同生长素的 MS 培养基中,培养 45 d 后,随机从每个方案中各取 20 株测得其不定苗的平均长度。

1.2.6 不定苗的生根 选择壮苗后的不定苗,将其分切成单个的苗,后接种到不同生长素的 MS 培养基中,培养 30 d 后,统计生根率。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度激素对燕子掌叶诱导愈伤组织和不定芽的影响

将无菌材料接种到不同浓度激素的 MS 培养基中进行愈伤组织的诱导。接种 40 d 左右,部分外植体的切面处开始形成愈伤组织(图 1C),为乳白色粒状,随后逐渐长成大颗粒状;后有部分愈伤组织出现分化现象,即

出现球状胚体;随后,部分球状胚体的 2 个叶片分开,出现不定芽。由于培养基激素组合与浓度配比不同,对叶片愈伤组织和不定芽的诱导结果差异较大。由表 1 可知,在相同浓度的 6-BA,随 IBA 浓度从 1~5 mg/L 之间的递增时,诱导率升高;当 IBA 浓度为 5 mg/L 时,诱导率最高,随 IBA 浓度从 5~10 mg/L 之间的递增时,诱导率有所下降。但当 6-BA 为 10 mg/L 时,随 IBA 浓度从 1~10 mg/L 之间的递增时,诱导率下降,说明 6-BA 为 10 mg/L 时激素浓度太高。在 IBA 相同的情况下,当 6-BA 浓度从 1~5 mg/L 之间的递增时,诱导率升高;当 6-BA 浓度为 5 mg/L 时,诱导率最高;当 6-BA 从 5~10 mg/L 之间的递增时,诱导率有所下降,说明 6-BA 的最佳浓度为 5 mg/L。

由表 1 还可知,当 IBA 浓度 $\geq$ 6-BA 时或当 6-BA 的浓度 $\leq$ 2 mg/L 时,诱导出的愈伤组织很快就分化出球状胚体,以后逐渐分化成不定芽。在当 IBA 在 1~5 mg/L 和 6-BA 在 1~2 mg/L 时,愈伤组织很快分化出不定芽,平均每个外植体分化的芽的数目都在 7 个以上,其中当 IBA 为 2 mg/L,6-BA 为 1 mg/L 时,平均每个外植体分化的芽数目最多,均为 12 个以上。故 MS+IBA 2 mg/L+6-BA 1 mg/L 为燕子掌叶片诱导不定芽的最佳培养基。由表 1 可知,当 IBA 浓度小于 6-BA 时,外植体诱导出的愈伤组织很难分化或只有少量的愈伤组织分化成不定芽,而长期保持在愈伤组织状态。当 IBA 和 6-BA 都为 5 mg/L 时,诱导愈伤组织的能力最强,诱导率为 95.56%。故燕子掌叶片诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS+IBA 5 mg/L+6-BA 5 mg/L。

表 1 不同浓度激素对比对燕子掌愈伤组织和芽诱导的影响

Table 1 Different concentrations of hormone proportion effect on induction of callus of *Crassula argentea*

编号 No.	IBA /mg · L <sup>-1</sup>	6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	接种瓶数 Number of bottles inoculated	污染瓶数 Number of pollution bottle	诱导瓶数 Number of induced bottles	诱导率 Induction rate /%	诱芽情况/平均芽数 Induced bud situation /Average number of bud	诱导愈伤组织情况 Callus induced
1	1	1	50	2	39	81.25	+++ / 10	—
2	1	2	50	3	41	87.23	++ / 7	+
3	1	5	50	2	44	91.67	—	+++
4	1	10	50	4	20	43.48	—	++
5	2	1	50	5	39	86.67	+++ / 12	—
6	2	2	50	3	42	89.36	++ / 7	+
7	2	5	50	3	43	91.49	—	+++
8	2	10	50	2	21	43.75	—	++
9	5	1	50	4	39	84.78	+++ / 11	—
10	5	2	50	1	46	93.88	++ / 7	+
11	5	5	50	5	43	95.56	—	+++
12	5	10	50	3	13	27.66	—	+
13	10	1	50	4	26	56.52	+ / 3	—
14	10	2	50	4	24	52.17	+ / 3	—
15	10	5	50	2	13	27.08	+ / 1	—
16	10	10	50	1	7	14.29	+ /	—

注:诱导率=诱导数/(接种数-污染数)×100%,诱芽情况与诱导愈伤组织为相对比例,当诱芽情况全部为芽为“+++”,芽为主,愈伤组织少则为“++”,无芽出现用“-”表示;当诱导愈伤组织情况中无愈伤组织时用“-”表示,少量愈伤组织出现用“+”,大量或全部为愈伤组织时用“+++”表示。

### 2.2 愈伤组织的增殖

经过 40 d 培养,计算得到增重倍数。由表 2 可知,

在 6-BA 浓度相同的情况下,随着 IBA 从 1~5 mg/L 之间递增,培养后质量(M)、增重倍数(I)都随之递增;当

IBA 为 5 mg/L 时,有最大增重倍数。但当随着 IBA 浓度增加,愈伤组织的增重越来越不明显。在 IBA 浓度一定的情况下,随着 6-BA 从 2~5 mg/L 之间递增,培养后质量(M)、增重倍数(I)都随之递增;当 6-BA 为 5 mg/L 时,有最大增重倍数。试验并未设置 6-BA 浓度>5 mg/L 的方案,因为在愈伤组织诱导试验中,高 6-BA 浓度>5 mg/L 的方案出现外植体坏死。因此,愈伤组织(图 1D)在 MS+IBA 5 mg/L+6-BA 5 mg/L 进行增殖,经过 40 d 的传代培养,愈伤组织增重 10.9 倍,为愈伤组织增殖的最佳培养基。

表 2 不同浓度激素配比对愈伤组织增殖的影响

Table 2 Effects of different concentrations of hormone proportion on the proliferation of callus

编号 No.	IBA /mg · L <sup>-1</sup>	6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	接种瓶数 Number of bottles of bottles inoculated	接种前质量 Before inoculation weight/g	培养后质量 Culture after the weight /g	增重倍数 Weight gain of multiples
1	1	2	20	0.0217	0.2002	9.226
2	2	2	20	0.0217	0.2115	9.747
3	5	2	20	0.0217	0.2121	9.774
4	1	5	20	0.0217	0.214	9.862
5	2	5	20	0.0217	0.2361	10.880
6	5	5	20	0.0217	0.2366	10.903

注:增重倍数(I)=培养后质量(M)/接种前质量(m)。

### 2.3 愈伤组织的分化

经过 30 d 的培养,观察并记算每个方案的平均芽数。由表 3 可知,当 IBA 一定时,随着 6-BA 浓度从 1~5 mg/L 之间的递增,组织表面上的平均芽数也随之增加,而且芽分化的越来越明显;在 6-BA 浓度为 5 mg/L 时为芽数最多。试验表明,当 6-BA 浓度与 IBA 浓度之差越大,分化的芽越明显。当 6-BA 浓度与 IBA 浓度之差越小时,愈伤组织分化不明显或愈伤组织分化仅停留在球状胚体时期,球状胚体分化出 2 片幼叶比较困难。燕子掌愈伤组织在 MS+6-BA 5 mg/L+IBA 2 mg/L 的培养基上进行诱导分化时,单位面积可以达到平均 37 芽以上,但其芽多为球状胚体(图 1E),2 个叶片形成困难;而燕子掌愈伤组织在 MS+6-BA 5 mg/L+IBA 1 mg/L 的培养基上进行诱导分化时,单位面积可以达到平均 32

表 3 不同浓度激素对燕子掌愈伤组织分化的影响

Table 3 Effect of different concentrations of hormone on callus differentiation shoots of *Crassula argentea*

编号 No.	6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	IBA /mg · L <sup>-1</sup>	接种瓶数 Number of bottles inoculated	每瓶的平均芽数 Each bottle of the average number of bud	备注 Note
1	1	1	20	24	芽不明显,且芽为球状胚体
2	2	1	20	30	芽较明显
3	5	1	20	32	芽明显
4	1	2	20	21	芽不明显,且芽为球状胚体
5	2	2	20	26	芽少,不明显, 且芽为球状胚体
6	5	2	20	37	芽多,分化多球状胚体

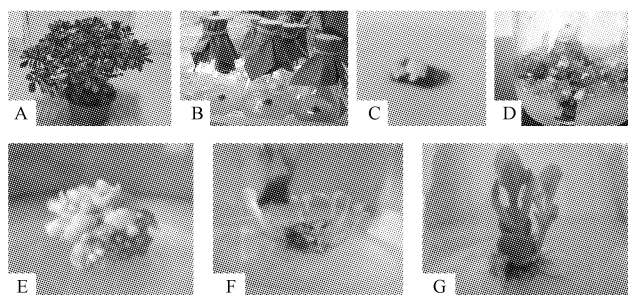


图 1 燕子掌组织培养过程

注:A. 提供外植体的 3 龄燕子掌植株;B. 接种后的外植体;C. 在 MS+IBA 5 mg/L+6-BA 2 mg/L 培养基中燕子掌叶片诱导产生的愈伤组织,和一些分化出的不定芽;D. 愈伤组织在 MS+IBA 5 mg/L+6-BA 5 mg/L 培养基中经过 40 d 增殖后的传代愈伤组织,其为绿色透明状,组织块内部较为紧密,组织块间却极为松散易分;E. 愈伤组织在 MS+IBA 5 mg/L+6-BA 2 mg/L 的培养基上进行诱导分化时形成的球状胚体;F. 在 MS+IBA 2 mg/L 培养基上壮苗的不定苗;G. 在 MS+IBA 0.5 mg/L 培养基上诱导出根的试管苗。

Fig. 1 Tissue culture of *Crassula argentea* Thunb

Note: A. 3 years old *Crassula argentea* Thunb that offer the explant. B. Explants after inoculation. C. Callus and adventitious bud that induced and differentiated by *Crassula argentea* Thunb lamina on medium with MS+IBA 5 mg/L+6-BA 2 mg/L. D. Generated callus that produced by callus after 40 days' proliferation on the medium with MS+IBA 5 mg/L+6-BA 5 mg/L. the generated callus was green transparent shape, tighter inside the tissue block and loose and easy to be separated between tissue blocks. E. Globular embryos that formed by callus during the induction that to induce differentiation on the medium with MS+IBA 5 mg/L+6-BA 2 mg/L. F. Adventitious seedlings that toughened on the medium with MS+IBA 2 mg/L. G. Plantlets that had been induced roots on the medium with MS+IBA 0.5 mg/L. 芽以上,并且芽极为明显,2 个子叶分开明显综合芽数和芽的分化情况考虑,MS+6-BA 5 mg/L+IBA 1 mg/L 为愈伤组织分化出不定芽的最佳培养基。

### 2.4 不定芽的壮苗

培养 45 d,随机的从每个方案中各取 20 株测得其不定苗(图 1F)的平均长度。由表 4 可以看出,随着 IBA 浓度的从 0.5 mg/L 升至 2 mg/L,不定苗平均长度也随之增长;当 IBA 为 2 mg/L 时,不定苗的平均长度为最长,为 4.74 cm;当 IBA 浓度从 2~10 mg/L 时,不定苗的平均长度有下降趋势。故燕子掌壮苗的最佳培养基为 MS+IBA 2 mg/L。

表 4 不同浓度的 IBA 对芽生长影响

Table 4 Effects of different concentrations of IBA on shoot elongation

编号 No.	IBA /mg · L <sup>-1</sup>	接种瓶数 Number of bottles inoculated	平均生长高度 Average growth height/cm
1	0.5	20	3.78
2	1	20	4.12
3	2	20	4.74
4	5	20	4.61
5	10	20	3.44

### 2.5 不定苗的诱根

培养 30 d 后,统计不定苗的生根情况。由表 5 可知,随



着 IBA 浓度在 0.1~0.5 mg/L 递增,生根率呈上升之势,当 IBA 浓度为 0.5 mg/L,生根率为 100%,为最佳。当 IBA 浓度在 0.5~5 mg/L 递增时,生根率开始下降。因此,MS+IBA 0.5 mg/L 为燕子掌不定苗诱根的最佳培养基。

表 5 不同浓度的 IBA 对不定苗根诱导的影响

Table 5 Effect of different concentrations of IBA on root-inducing

编号 No.	IBA /mg·L <sup>-1</sup>	接种瓶数 Number of bottles inoculated	生根瓶数 Number of rooting bottle	生根率 Rooting rate /%
1	0.1	50	39	78
2	0.5	50	48	100
3	1	50	43	86
4	2	50	40	80
5	5	50	31	62

注:生根率=生根数/接种数×100%。

### 3 讨论与结论

Liu Y L 等<sup>[9]</sup>在试验中用根、茎、叶做了对比试验,表明诱导愈伤组织和芽的外植体效果依次是茎、叶、根,但该试验仍只采用叶作为外植体,只为叶来源更加丰富,茎来源受限。刘建华等<sup>[10]</sup>研究表明,外植体诱导产生的愈伤组织大多是在叶脉处出现,故该试验所接种的外植体都为叶脉周围的 1 cm 宽的叶片,这样可以提高外植体的诱导率。

Liu Y L 等<sup>[9]</sup>在附加 0.1~10 μmol/L NAA 和 10 μmol/L 6-BA 的 MS 培养基上,不定芽形成率达到 100%,每个外植体再生芽数达到 10 个以上。该研究虽然没有达到 100%的诱导率,但平均芽数达到 12 个芽以上为最佳。通过分子量的换算,Liu Y L 等<sup>[9]</sup>所用培养基为 MS+NAA 0.02~1.87 mg/L+6-BA 2.25 mg/L,这与该试验在 MS+IBA 2 mg/L+6-BA 1 mg/L 上诱导出 12 个芽的培养基相比有较小的差距。但是,芦站根等<sup>[11]</sup>在研究指出,不同时期燕子掌叶片中激素的浓度有

一定的差异。课题组在 12 月份获取的外植体,正是 IAA 含量最高的时期,故这样的差距是正常的。此外,应用不同的激素类似物,也会造成一定的差异。

燕子掌叶片诱导出来的愈伤组织为乳白色或粉红色(图 1C),组织松散,有部分愈伤组织经过分化出现球状胚体(图 1E)。试验表明,当培养基为 MS+IBA 5 mg/L+6-BA 2 mg/L 时,组织表面产生的球状胚比较多,且能较长时间稳定在这个时间。球状胚体的出现为研究燕子掌的人工种子提供了思考。经过传代后的愈伤组织(图 1D)变为绿色透明状,组织块内部较为紧密,组织块间却极为松散易分。

### 参考文献

- [1] 谢维苏.燕子掌与马齿苋树[J].中国盆景花卉,2006(5):56.
- [2] 高世良.百花百话[M].天津:百花文艺出版社,2007:270-272.
- [3] 周杰良,闫文德,王建湘.7 种盆栽观赏植物室内滞尘能力研究[J].现代农业科技,2009(8):7-8.
- [4] 周涤,王贤.居家装修必备解毒植物[M].北京:气象出版社,2007:78.
- [5] 刘艳菊,葛红.室内观赏植物对苯和甲醛的净化研究及养护技术[M].北京:科学出版社,2010:68-69.
- [6] 汪晓萍.观察叶片表皮的好材料-燕子掌[J].生物学通报,2004,39(7):23.
- [7] 朱跃辰.用燕子掌叶制取不定根标本[J].生物学通报,1994,29(1):27.
- [8] 王福东,汪涛,汪汉卿.燕子掌的驯化栽培[J].中国中药杂志,2007,23(4):341-342.
- [9] Liu Y L,Long Z L,Gao Y,et al. Organ formation and plant regeneration in vitro tissue culture of *Crassula arborescens*[J]. Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci), 2007,33(6):591-596.
- [10] 刘建华,刘佳.观察探究玉树叶的无性繁殖[J].生物学通报,2010,45(8):58-59.
- [11] 芦站根,周文杰.燕子掌不同发育时期内源激素含量变化研究[J].北方园艺,2008(12):123-126.

## Tissue Culture and Clone Construction of *Crassula argentea* Thunb

PU Shi-ming<sup>1,2</sup>, LI Rong-feng<sup>1</sup>, FANG Li-juan<sup>1</sup>, LAN Cui-ling<sup>1</sup>, ZHOU Zu-ping<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry and Life Science, Baise University, Baise, Guangxi 533000; 2. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

**Abstract:** Taking *Crassula argentea* Thunb lamina as the explant and adding different concentrations of 6-BA and IBA in the culture medium, the influence of concentration of 6-BA and IBA on each stage in the *Crassula argentea* Thunb tissue culture forming process were studied. The results showed that MS+IBA 5 mg/L+6-BA 5 mg/L was the best medium for callus induction with unobvious differentiation and an inductivity of 95.56%; MS+IBA 2 mg/L+6-BA 1 mg/L was the best for adventitious bud induction directly with an inductivity of 86.67%, that could achieve more than 12 buds in average; MS+IBA 5 mg/L+6-BA 5 mg/L was the best for callus proliferation and the proliferation multiples was 10.9; the best for callus differentiation was MS+IBA 1 mg/L+6-BA 5 mg/L, the number of buds per unit area was more than 32 and the buds were obvious; when the medium was MS+IBA 2 mg/L+6-BA 5 mg/L, the globular embryos produced more on the tissue surface with a long duration; the best for sound seeding was MS+IBA 2 mg/L, the average length of buds could be 4.74 cm after 45 d; on the medium with MS+IBA 0.5 mg/L, the inductivity of root inducing could be 100%.

**Key words:** *Crassula argentea* Thunb; callus; proliferation; adventitious bud; globular embryos