

鸭跖草组织培养再生体系建立的研究

时圣凤^{1,2}, 王永志², 李启云², 王金刚¹

(1. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 吉林省农业科学院, 吉林 长春 130033)

摘要:以鸭跖草为试材,以无菌带节茎段、节间茎段、叶片为外植体,采用正交实验设计,研究了不同激素水平对鸭跖草再生体系的影响,以期探讨快速获得大量无性系苗的有效方法。结果表明:最佳外植体为幼嫩的带节茎段;最佳诱导培养基配方为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;最佳增殖培养基配方为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;最佳生根培养基配方为 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

关键词:鸭跖草;组织培养;正交实验;再生体系

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0111-04

鸭跖草(*Commelina communis* L.)为鸭跖草科鸭跖草属 1 a 生草本植物^[1],别名竹节草、蓝花菜。鸭跖草是书橱、几架等良好的室内盆栽装饰植物,具有极高的观赏价值^[2];在室外,鸭跖草因其具有管理粗放、不需修剪、耐阴耐湿、耐瘠薄、抗污染等特点,多用于布置花坛或与其它花木形成花镜等,大大降低了绿化管理成本,具有广阔的应用前景^[3]。此外,鸭跖草全株可做药用,具有消肿解毒、活血利尿、抗流感病毒、降血糖等功效^[4-7]。由于鸭跖草具有重要的观赏和药用价值,其市场需求量巨大。

人工栽培的鸭跖草难以产生种子,因此其繁殖多采用扦插或分株^[8],但繁殖系数低,难以满足生产需求。有关鸭跖草组织培养方面尚鲜见报道,该研究拟通过组织培养途径建立高频无性繁殖体系,为今后鸭跖草的扩繁及再生体系的研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鸭跖草(*Commelina communis* L.)采自东北农业大学园艺试验站。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基成分及培养条件 以 MS 为基本培养基,

第一作者简介:时圣凤(1985-),女,山东单县人,在读硕士,研究方向为园林植物遗传育种与生物技术。E-mail: shishengfeng9@163.com.

责任作者:王金刚(1974-),男,博士,教授,现主要从事园林植物生物技术研究工作。E-mail: wangjingang99@yahoo.com.cn.

基金项目:黑龙江省博士后科研启动基金资助项目(LBH-Q10144);黑龙江省自然科学基金资助项目(C201112);东北农业大学博士研究基金资助项目(200830)。

收稿日期:2012-08-27

添加 3%蔗糖和 0.72%琼脂粉,pH 5.8,在 121℃的温度下灭菌 20 min。培养温度(25±2)℃,光照时间为 12 h/d,光照强度 25 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.2.2 外植体制备 选取幼嫩的茎、叶片,先用自来水冲洗干净。在超净工作台内,将茎段和叶片分别用 75%的酒精浸泡 10~30 s,无菌水冲洗 3 次,然后用 5%的 NaClO 浸泡 4~6 min,再用无菌水冲洗 4~5 次,用无菌滤纸把材料表面的水吸干。将带节茎段、节间茎段切成 0.5 cm 左右长小段,在其表面划 3~4 道伤口;叶片切成面积为 0.5 cm² 左右小块,叶片背面划 3~4 道伤口,以备接种处理。

1.2.3 愈伤组织诱导 采用 4 因素 3 水平 L₉(3⁴)正交实验设计愈伤诱导培养基。分别把外植体接种在诱导培养基上。带节茎段和节间茎段外植体平放,使其表面接触培养基;叶片外植体背面接触培养基。每个处理组接种 10 个外植体,每个处理组 5 次重复。20 d 继代 1 次,40 d 后统计诱导率,诱导率(%)=诱导出愈伤组织的外植体数量/接种外植体数量×100%。

1.2.4 丛生芽诱导 将愈伤组织分切成 0.2~0.3 cm² 小块,转接到丛生芽诱导培养基上。每处理组接种 10 块愈伤组织,5 次重复。20 d 继代 1 次,40 d 后统计丛生芽诱导率,丛生芽诱导率(%)=产生丛生芽的外植体数/接种外植体数×100%。

1.2.5 生根与练苗 待分化的不定芽长至 3 cm 左右时,转接到生根培养基中。诱导 40 d 后统计生根率,生根率(%)=生根株数/接种株数×100%。待苗高达 5 cm 左右时进行练苗驯化,练苗时先将封口膜松动,浇适量无菌水使其浸没培养基,4 d 后将封口膜完全打开,使幼苗逐渐适应外界环境。练苗 7 d 后取出组培苗,把根部的培养基清洗干净,移栽到混合基质(园土:珍珠

岩:木屑=3:1:1)中。用塑料薄膜扣棚保温保湿,并注意遮光,50%荫蔽度,经常通风换气,定期浇水。5 d后去除塑料薄膜,自然光照。幼苗长到一定程度可进行换盆移栽。

1.3 数据分析

数据采用 Excel 统计,正交设计助手Ⅱ v 3.1 软件进行均值、极差分析,DPS 9.50 标准版方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体愈伤组织形成结果比较

由表 1 可知,不同外植体诱导愈伤组织结果差异显著,带节茎段外植体诱导状况最好,节间茎段外植体次之,叶片外植体诱导状况最差。在诱导过程中带节茎段生长变化最快,接种 10 d 后茎节处生成黄绿色突起,逐渐产生腋芽,接种 25 d 后由此腋芽膨大形成块状愈伤组织,颜色呈嫩绿色、结构疏松、颗粒状(图 1-a),继代后易于分化出丛生芽(图 1-b);节间茎段外植体生长变化较慢,接种 30 d 后,仅在少数外植体伤口处产生浅黄色致密愈伤(图 1-c)和水渍状愈伤(图 1-d),此后愈伤组织生长较慢。致密的愈伤组织难以再分化,只有较疏松的愈伤组织能够进一步再分化;叶片外植体产生愈伤组织的数量最少,开始仅在伤口处产生少量的愈伤,培养 25 d 后愈伤组织颜色呈淡黄色、水渍状,难以再分化,最后绝大多数愈伤都褐化死掉。

由表 1 还可知,同一外植体在不同培养基上诱导状态差异显著,带节茎段在不含 2,4-D 的培养基上愈伤诱导率最高可达 80.8%(此诱导率 80.8%,经显著分析为 84.7416aA%),明显高于含有 2,4-D 的诱导培养基,且愈伤再分化出芽的比率也较高;节间茎段外植体愈伤诱导率最高仅为 37.2%,且愈伤组织的再分化能力降低;叶片外植体愈伤组织诱导率及芽再生率最低。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment results

试验号	外植体类型 (A)	NAA (B)	2,4-D (C)	6-BA (D)	接种数	诱导数	长势	诱导率 /%
1	带节茎段	0	0.2	1.0	50	18.2	++	37.7832cB
2	带节茎段	0.2	0	2.0	50	40.4	++++	84.7416aA
3	带节茎段	0.1	0.5	1.5	50	21.0	+	43.3458bB
4	节间茎段	0	0	1.5	50	4.4	+	8.5854fE
5	节间茎段	0.2	0.5	1.0	50	11.2	+	23.4528dC
6	节间茎段	0.1	0.2	2.0	50	18.6	++	39.6270cB
7	叶片	0	0.5	2.0	50	4.6	+	9.4484fE
8	叶片	0.2	0.2	1.5	50	7.8	++	16.5268eD
9	叶片	0.1	0	1.0	50	7.2	++	15.3000eD
均值 k_1	53.067	18.133	29.733	24.400				
均值 k_2	22.800	39.600	34.667	42.400				
均值 k_3	13.067	31.200	24.533	22.133				
极差 R	40.000	20.467	10.134	21.267				
优方案	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂				

注:同列大(小)写字母表示 1%(5%)差异显著性,下同。

$L_9(3^4)$ 正交实验结果分析(表 1),根据极差的大小顺序($R_A > R_B > R_D > R_C$),可以得出影响愈伤组织诱导率因素的主次顺序为外植体>6-BA>NAA>2,4-D,各因素的最优水平为 A₁、B₂、C₂、D₂,即最适外植体为带节茎段、6-BA 浓度为 2.0 mg/L、NAA 浓度为 0.2 mg/L。各因素中以外植体类型(带节茎段)对愈伤诱导形成作用极其明显。推测带节茎段在茎节处产生的新腋芽细胞代谢活跃,利于愈伤及新芽点的生成。由表 2 可知,4 个因素影响显著排序依次为外植体>6-BA>NAA>2,4-D,这与正交表中极差分析的结果一致。因此,以带节茎段为外植体,MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 是诱导鸭跖草组织培养再生的最优途径。

表 2 愈伤组织形成的方差分析结果

Table 2 Results of variance analysis on callus formation

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著水平
外植体	13 293.2434	2	6 614.7587	747.6650	0.0000	**
NAA	3 709.7423	2	1 861.9849	205.0325	0.0000	**
2,4-D	836.6652	2	408.9582	46.5335	0.0000	**
6-BA	3 826.5583	2	1 933.4576	218.5384	0.0000	**
误差	288.7733	33	9.2542			
总和	21 892.6653					

注:**表示差异极显著($P < 0.01$)。

2.2 不同浓度 6-BA 及 NAA 对增殖影响

由表 3 可知,不同类型的愈伤组织在不同浓度的 6-BA 及 NAA 的诱导下,丛生芽增殖存在显著差异。颜色呈嫩绿色、结构疏松、颗粒状愈伤(图 1-a),继代后易于分化出丛生芽(图 1-b),并且生长较快,继代 20 d 后,平均芽长可达 2 cm(图 1-e),丛生芽培养 45 d 后,芽长可达 3 cm(图 1-f);少许淡黄色颗粒状、结构较疏松的愈伤接种 10 d 后开始产生少量的芽点,分化能力较低,得到长势较弱的丛生芽;致密的愈伤组织无论在那种激素浓度的培养基上都难以再分化。由表 3 可以看出,6-BA 和 NAA 不同浓度组合对增殖生长影响较大。在几种培养基中丛生芽分化率显著,不同培养基之间丛生芽生长势及生长状态不同。当 6-BA 的浓度为 3 mg/L 时,6-BA:NAA 的比值为 30:1,单个外植体上丛生芽增殖倍数显著升高,但丛生芽诱导率较低、玻璃化现象严重,褐化较严重;6-BA:NAA 的比值为 15:1 时,分化率并不高,长势较弱,这可能是高浓度 6-BA 容易导致丛生芽出现玻璃化状态。当 6-BA 的浓度为 2.0 mg/L 时,通过表 3 可以看出,6-BA/NAA 的比值及浓度适宜时有利于分化,增殖率最高,可达 70.8%。6-BA 的浓度为 1.0 mg/L 时,此时浓度较低,不利于分化。6-BA/NAA 的比值对增殖的影响具有显著差异,并且对丛生芽长势影响较为明显。当 6-BA 的浓度为 2.0 mg/L、NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,丛生芽分化率最高,长势最好。因此,MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 是诱导丛生芽增殖的最佳培养基。

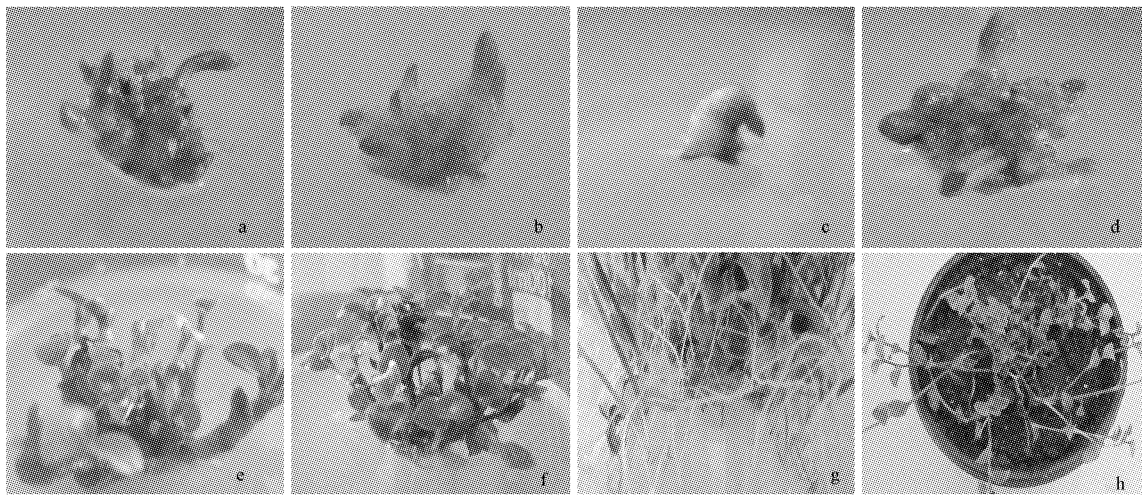


图 1 愈伤形成、增殖过程及练苗移栽各时期生长情况

注:a:嫩绿疏松颗粒状愈伤;b:愈伤继代后分化情况;c:致密愈伤;d:水渍状愈伤;e:丛生芽继代 20 d 后生长情况;f:丛生芽培养 45 d 后生长情况;g:生根培养 30 d 后生根情况;h:练苗 10 d 后幼苗生长情况。

Fig. 1 The growth of callus formation,proliferation process and transplanting

Note;a,Tender green,loose,granular callus;b,Differentiation of callus after subculture;c,Compact callus;d,Watery callus;e,Multiple shoot after subculture for 20 days;f,Multiple shoot after subculture for 45 days;g,Rooting culture for 30 days;h,Seedling training for 10 days.

表 3 不同浓度的 6-BA 与 NAA 对增殖生长的影响

Table 3 Effect of different concentrations of 6-BA and NAA on the proliferation growth

试验号	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	接种块数	分化块数	生长势	分化率/%
1	1.0	0.1	50	21.0	+++	43.8060±1.4199dC
2	1.0	0.2	50	13.6	++	29.5392±1.1075eD
3	2.0	0.1	50	35.4	+++++	73.6358±1.3320aA
4	2.0	0.2	50	27.4	++++	60.8820±2.3886bB
5	3.0	0.1	50	12.6	+	27.1500±1.0950 eD
6	3.0	0.2	50	23.6	++	47.3888±1.7548cC

2.3 不同培养基对生根诱导与移栽的影响

由表 4 可知,不同生根诱导培养基对试管苗生根诱导影响显著。诱导 15 d 后可见乳白色幼根生成。其后幼根系迅速生长,30 d 后产生大量白色的须根(图 1-g),须根大多数附在培养基表面,只有少数伸进培养基内,而其它植物组培苗的根大多深入培养基内,课题组初次见到该试验现象,生根诱导极差的大小顺序 $R_A > R_C > R_D > R_B$,得出影响生根诱导率因素的主次顺序为基本培养基>IBA>IAA>NAA。各因素的最优水平为 A_1 、 B_1 、 C_2 、 D_2 ,即最适基本培养基 1/2MS、IBA 0.2 mg/L、NAA 0.1 mg/L。在 1/2MS 的基本培养基上,苗生长旺盛;而在 MS 的基本培养基上,苗长势弱,褐化较严重,根短且细。因此,对该植物而言,培养基类型起着至关重要的作用。综合比较 IBA 与 NAA 混合使用效果较好,生根率最高可达 100%。方差分析表明(表 5),培养基类型、NAA、IBA、IAA 浓度对生根的影响达到显著差异, F 值大小为 $F_A > F_C > F_D > F_B$,与极差影响顺序相同,各因素对生根影响的主次顺序为基本培养基>IBA>IAA>

NAA,由此可知,培养基类型是影响生根的最主要因素,IBA 浓度影响其次,IAA 比 IBA 影响生根作用稍弱,

表 4 不同浓度的 NAA、IBA 和 IAA 对生根的影响

Table 4 Effects of different concentrations of NAA,6-BA and IAA on root growth

试验号	基本培养基 (A)	NAA (B)	IBA (C)	IAA (D)	试验数/株	生根数/株	每株生根数/株	生根率/%
1	1/2MS	0.1	0	0.2	31	28.2	8.6	94.4505bA
2	1/2MS	0.1	0.2	0	33	33.0	9.5	101.3688aA
3	1/2MS	0	0	0	35	26.0	6.7	76.9745cdBC
4	1/2MS	0	0.2	0.2	30	24.4	7.2	82.4681cB
5	MS	0.1	0	0	33	18.2	3.7	56.4379fEF
6	MS	0.1	0.2	0.2	35	17.8	4.9	51.3232fF
7	MS	0	0	0.2	34	21.0	4.5	64.7010eDE
8	MS	0	0.2	0	32	22.2	5.3	72.7586deCD
均值 k_1	86.625	74.275	70.550	71.250				
均值 k_2	59.300	71.650	75.375	74.675				
极差 R	27.325	2.625	4.825	3.425				
优方案	A_1	B_1	C_2	D_2				

表 5 不同浓度的 NAA、IBA 和 IAA 对生根影响的方差分析

Table 5 Variance analysis of the effects of different concentrations of NAA,6-BA and IAA on root growth

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
基本培养基(A)	7 394.4274	1	7 584.7507	233.0809	0.0000
NAA(B)	29.8328	1	29.0989	0.9778	0.3543
IBA(C)	146.5990	1	151.0284	5.7200	0.0412
IAA(D)	147.3757	1	147.5193	4.0409	0.0411
模型误差	50.5654	1	50.6147		
重复误差	873.5754	28	31.1991		
合并误差	924.1408	31	32.0222		
总和	10 954.2339				

NAA 浓度影响生根作用不大。这与正交实验中用极差 R 的判断结果一致。故选用 $1/2MS+IBA\ 0.2\ mg/L+NAA\ 0.1\ mg/L$ 作为鸭跖草组培苗的最佳诱导生根培养基。鸭跖草练苗较易成活,带根苗成活率达 95% 以上,移栽后恢复生长较快,练苗 10 d 后的情况见图 1-h。在适宜条件下,鸭跖草生长较为迅速,为便于生长,练苗 30 d 后需要换盆,换盆后生长更加旺盛。

3 讨论与结论

试验通过愈伤组织再生途径建立了鸭跖草无性繁殖体系,针对不同外植体、不同培养基种类进行了研究,结果表明以带节茎段为外植体,在 $MS+6-BA\ 2.0\ mg/L+NAA\ 0.2\ mg/L$ 的培养基上,诱导率最高,可达 80.8%;该愈伤组织在 $MS+6-BA\ 2\ mg/L+NAA\ 0.1\ mg/L$ 的培养基上,增殖率最高,可达 70.8%,这为今后鸭跖草无性再生体系的研究奠定了基础。该试验证实,细胞分裂素 6-BA $2.0\ mg/L$ 与 NAA $0.2\ mg/L$ 配合时的诱导效果最好,但该试验的诱导增殖率最高仅为 70.8%,激素配比需要进一步优化。

张孟仁^[9] 研究报道,吲哚丁酸 (IBA) 与萘乙酸 (NAA) 相比不易被光分解,比较稳定,并且有不易传导、不易伤害枝条、使用安全、生根作用强等特点,但产生的不定根长而细,最好与 NAA 混合使用。戴云新等^[10] 报道了 IBA 和 NAA 混合使用取得较好的效果,可能 IBA 和 NAA 均为生长素类物质,IBA 对促进植物发根有很好的效应,NAA 诱导形成不定根,试管苗诱导生根阶段,影响生根的因素取决于生长素的种类、浓度及其组合。该试验结果表明,IBA 和 NAA 混合使用生根率最高,与张孟仁^[9] 和戴云新等^[10] 的报道一致。

该试验证实鸭跖草在培养过程中易褐化。可能与

植物本身的内在因素有关,不同种类植物、同种植物的不同类型外植体和品种在组织培养中褐变程度有很大差别。外植体组织的受伤害程度直接影响褐变的发生。Bonga 等^[11] 认为,外植体越小,切面与体积的比率越大,伤害及褐化的程度越大。因此,该试验在切取外植体时,应尽可能减少其伤口面积,并采取多次转移及生根盐分降低等措施,有关防褐化方法还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 13 卷. 3 分册. 北京: 科学出版社, 1997: 127.
- [2] 陈建华, 刘承平. 鸭跖草的家庭盆栽培养[J]. 中国花卉盆景, 1995, 16 (3): 115-116.
- [3] Jing S R, Lin Y F, Wang T W, et al. Microcosm wetlands for wastewater treatment with different hydraulic loading rates and macrophyte [J]. J Environ Qual, 2002, 31(2): 690-696.
- [4] 王桂云, 方芳. 鸭跖草属药用植物的研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2008, 30(6): 474-476.
- [5] Zhang G B, Bing F H, Liu J, et al. Effect of total alkaloids from *Commelina communis* L. on lung damage by influenza virus infection[J]. Microbiol Immunol, 2010, 54(12): 754-757.
- [6] Bing F H, Liu J, Li Z, et al. Anti-influenza-virus activity of total alkaloids from *Commelina communis* L. [J]. Arch Virol, 2009, 154 (11): 1837-1840.
- [7] Youn J Y, Park H Y, Cho K H. Anti-hyperglycemic activity of *Commelina communis* L.: inhibition of alpha-glucosidase[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2004, 66(1): 149-155.
- [8] 马成亮. 鸭跖草的栽培[J]. 特种经济动植物, 2005, 32(5): 36-39.
- [9] 张孟仁. IBA 和 NAA 处理菊花扦插生根试验[J]. 北方园艺, 2008 (9): 130-131.
- [10] 戴云新, 张健, 李敏, 等. NAA 和 IBA 对非洲菊组培苗生根的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(19): 8845-8847.
- [11] Bonga J M, Durzan D J. 树木组织培养[M]. 阙国宁, 郭达初, 译. 北京: 中国林业出版社, 1988.

Establishment of Tissue Culture and Rapid Propagation of *Commelina communis* L.

SHI Sheng-feng^{1,2}, WANG Yong-zhi², LI Qi-yun², WANG Jin-gang¹

(1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033)

Abstract: Taking *Commelina communis* L as material, using the stem segments with node, internode stems and leaves as explants, the effect of different concentrations of hormone on the regeneration system of *Commelina communis* L were studied by orthogonal experiment, in order to get a large number of clonal seedlings rapidly. The results showed that the best explant was tender stem segments with node; the best compounding for explant growth was $MS+6-BA\ 2.0\ mg/L+NAA\ 0.2\ mg/L$; the best compounding for proliferation growth was $MS+6-BA\ 2.0\ mg/L+NAA\ 0.1\ mg/L$; and the best compounding for root growth was $1/2MS+IBA\ 0.2\ mg/L+NAA\ 0.1\ mg/L$.

Key words: *Commelina communis* L; tissue culture; orthogonal experiment; regeneration system