

燕子掌叶片再生体系的建立

李庆伟, 侯殿明, 申顺先

(河南农业职业学院 园艺园林学院, 河南 郑州 451450)

摘要:以燕子掌叶片为试材,采用植物组织培养方法,研究了消毒时间、不同浓度 2,4-D、6-BA、NAA 对燕子掌再生的影响。结果表明:叶片用 70%~75% 的酒精浸泡 10~15 s,再用 0.1% HgCl_2 消毒 12~15 min,具有较低污染率和较高的存活率;用 $\text{MS}+1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 进行不定芽诱导,平均可以产生 13.7 个不定芽;不定芽在 $\text{MS}+6\text{-BA } 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+\text{GA}_3 \text{ } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中增殖倍数为 11.0;在 $1/2\text{MS}+\text{IBA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $\text{MS}+\text{IBA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中平均能产生 9~11 条根。

关键词:燕子掌;叶片;不定芽;再生

中图分类号:S 682.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)17-0107-04

燕子掌(*Crassula arborescens*)属景天科青锁龙属多年生植物^[1],别名玉树景天、玉树、金钱树、玻璃翠、肉质万年青,原产非洲南部干旱地区,现在我国各地广泛栽培。其植株灌木状,形态俊美,叶片肉质,长卵圆形,较耐荫、耐旱,因此常作室内观叶植物栽培,对改善室内空气质量具有明显效果^[2]。燕子掌植株体内含有 β -谷甾醇、D-甘露醇、N-3-2-丁烯基胍、 β -胡萝卜素等化合物^[3],临床研究表明,其提取物对 II 型糖尿病及其并发症的治疗效果明显^[4-5]。随着国家对中药行业的重视,以燕子掌为原料的中药制剂不断开发,尤其是“燕子掌中药材及其制剂”国家新药的申报^[6],使其种苗的需求量不断增加。但由于我国没有野生燕子掌资源,只能依靠人工种植满足其需求,而燕子掌只能依靠扦插和分株方式进行繁殖^[7],繁殖速度慢且受环境条件影响较大。目前,关于燕子掌植物组织培养的研究,仅有蒲仕明等^[8]以叶片为外植体,通过愈伤组织诱导再生植株的报道。为进一步探索燕子掌种苗快速繁育方法,现以燕子掌叶片为外植体,研究了不同消毒时间及添加不同浓度 2,4-D、6-BA、NAA 对燕子掌叶片愈伤组织再生的影响,进而探索出燕子掌叶片诱导、增殖、生根的最佳培养基,以期为燕子掌大规模培养育苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为河南省农业高新科技园花卉中心提供

盆栽燕子掌植株,2014 年 9 月剪取植株中部叶片为外植体,备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 将燕子掌叶片用自来水冲洗干净,置于洗洁精液中漂洗 5~10 min,再用自来水冲洗 20 min,用吸水纸吸干表面水分,置于灭菌的塑料瓶中。在无菌环境下,用 70%~75% 的酒精浸泡 10~15 s,再用 0.1% HgCl_2 分别消毒 3、6、9、12、15、18 min,最后用无菌水冲洗 3~5 次,无菌滤纸吸干水分,切成 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的小块,接种到 MS 培养基上进行培养。每个处理接种 30 瓶,每瓶接种 1 个。接种后置于培养室中培养。培养条件:光照时间 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$,光照度 $22 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,温度 $24 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$,以下同。30 d 后统计外植体污染率及存活率。污染率(%)=污染外植体个数/接种外植体总数 $\times 100$,存活率(%)=存活外植体个数/接种外植体总数 $\times 100$ 。

1.2.2 不定芽诱导 以 MS 为基本培养基,添加不同浓度 2,4-D 和 6-BA(表 1),此外还添加 3%蔗糖及 0.7%琼脂。培养基 pH 5.8,在 $1.1 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 压力下湿热灭菌 20 min(下同)。叶片正面向上摆放到培养基中,每瓶接种 1 个叶片小块,每处理接种 6 瓶。30 d 之后统计平均不定芽诱导数。平均不定芽诱导数=形成不定芽的总数/调查外植体总数。

1.2.3 不定芽增殖 选生长健壮的不定芽,接种到丛生芽诱导培养基中。以 MS 为基本培养基,采用 $\text{L}_9(3^4)$ 3 因素 3 水平正交实验设计 6-BA、NAA、蔗糖的使用浓度配比(表 2),添加到 MS 培养基中。每瓶接种 3 个材料,每个处理接种 8 瓶。30 d 之后调查不定芽诱导形成的丛生芽个数、丛生芽生理状态,统计不定芽增殖倍数。不定芽增殖倍数=形成丛生芽的总数/接种芽苗总数。

第一作者简介:李庆伟(1979-),男,河南封丘人,硕士,讲师,研究方向为种苗繁育与大蒜生产。E-mail:liqingwei2003@163.com.

收稿日期:2016-04-15

表 1 燕子掌的不定芽诱导培养基

Table 1 Adventitious bud induction medium of *Crassula arborescens*

处理 Treatment	6-BA /(mg · L ⁻¹)	2,4-D /(mg · L ⁻¹)
1	—	—
2	0.5	—
3	1.0	—
4	1.5	—
5	0.5	0.2
6	1.0	0.2
7	1.5	0.2
8	0.5	0.5
9	1.0	0.5
10	1.5	0.5
11	0.5	1.0
12	1.0	1.0
13	1.5	1.0

表 2 正交实验设计的因素及水平

Table 2 Factor and level of orthogonal test mg · L⁻¹

水平 Level	因素 Factor		
	A 6-BA	B NAA	C GA ₃
1	0.5	0.1	0.5
2	1.0	0.2	0.8
3	1.5	0.3	1.1

1.2.4 不定芽生根 将诱导形成的丛生芽切分成单芽,选健壮芽,接种到生根培养基中(表 3),每瓶接种 3 个芽,每处理接种 10 瓶。30 d 之后调查生根数量,计算平均生根数。平均生根数=所有生根数之和/生根苗数。

表 3 燕子掌的生根培养基

Table 3 Rooting medium of *Crassula arborescens*

处理 Treatment	基本培养基 Basal medium	IBA /(mg · L ⁻¹)
1	1/2MS	0.0
2	1/2MS	0.1
3	1/2MS	0.3
4	1/2MS	0.5
5	1/2MS	0.8
6	MS	0.0
7	MS	0.1
8	MS	0.3
9	MS	0.5
10	MS	0.8

1.3 数据分析

试验数据采用 DPS 7.5 进行分析,Excel 2007 作图,采用 SSR 法进行差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对燕子掌无菌体系建立的影响

由图 1 可知,随着消毒时间的增加,污染率和存活率同时下降。消毒 3 min 和 6 min 存活率为 100%,而污染率也接近 100%;消毒 18 min 的污染率最低,同时存活率也为最低。可见,消毒剂浸泡时间增加,虽对微生物的消灭有明显作用,但对植物组织也造成了伤害。综合污染率和

存活率曲线,可以看出,消毒 15 min 的叶片污染率不足 10%,但存活率在 70%以上,消毒 12 min 的污染率约为 40%,存活率约为 90%,对于燕子掌叶片来说,消毒时间在 12~15 min 时,具有较低污染率和较高的存活率。

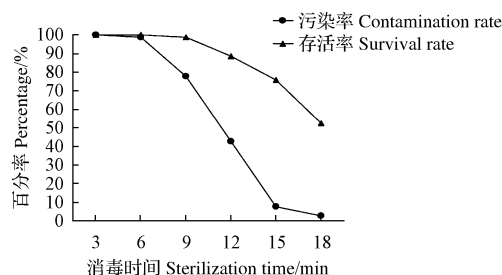


图 1 不同消毒时间对燕子掌外植体污染率及存活率的影响

Fig. 1 Effect of sterilization time on contamination rate and survival rate of *Crassula arborescens* explant

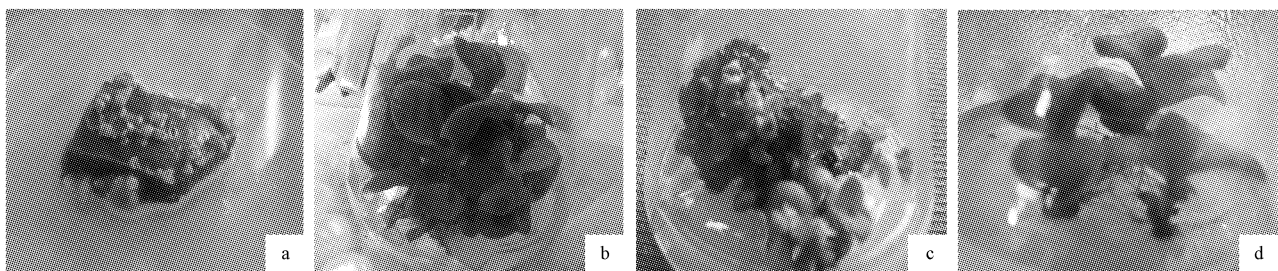
2.2 不同激素对比对燕子掌叶片不定芽诱导的影响

由表 4 可知,不添加任何生长调节物质的培养基,叶片没有再生不定芽。仅添加 6-BA 的培养基,可以诱导产生不定芽,说明 6-BA 能促进燕子掌叶片不定芽的诱导;随培养基中 6-BA 浓度的增加,不定芽的诱导数量明显增加,0.5 mg · L⁻¹ 的 6-BA 平均诱导产生 0.3 个芽,添加 1.5 mg · L⁻¹ 的 6-BA 平均诱导产生 8.8 个芽。随着 2,4-D 浓度的增加(0.2~0.5 mg · L⁻¹),诱导芽数显著增加。但当 2,4-D 浓度增加至 1.0 mg · L⁻¹ 时,诱导芽数开始降低,说明相对高浓度的 2,4-D 对燕子掌叶片的不定芽诱导有一定制约作用。在 6-BA 浓度相同的条件下,随 2,4-D 浓度的增加,不定芽的诱导数量呈先增后降变化趋势。由方差分析可以看出,处理 10 诱导的平均芽数最多,为 13.7 个,与其它处理达到极显著差异,因此 MS+1.5 mg · L⁻¹ 6-BA+0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D 为燕子掌叶片不定芽诱导的最适培养基(图 2a)。

表 4 6-BA 和 2,4-D 对比对燕子掌叶片不定芽诱导的影响

Table 4 Effect of 6-BA and 2,4-D ratio on induction of *Crassula arborescens* leaf adventitious shoots

处理 Treatment	材料 Material individual/个	芽数 No. of total buds/个	平均芽数 Average of buds/个
1	6	0	0.0I
2	6	2	0.3I
3	6	33	5.5E
4	6	53	8.8C
5	6	6	1.0H
6	6	35	5.8E
7	6	58	9.7B
8	6	13	2.2G
9	6	49	8.2C
10	6	82	13.7A
11	6	8	1.3G
12	6	26	4.3F
13	6	38	6.3D



注:a.再生不定芽;b.丛生芽;c.玻璃化丛生芽;d.生根苗。
Note:a. Adventitious buds;b. Buds;c. Vitrification buds;d. Rooting seedlings.

图2 燕子掌叶片再生

Fig.2 Regeneration of the *Crassula arborescens* leaf

2.3 不同激素对比对燕子掌不定芽增殖的影响

由表5可知,A因素(6-BA)浓度从0.5 mg·L⁻¹增加到1.5 mg·L⁻¹,不定芽的增殖倍数从3.6增加到11.5,不同水平间差异显著;B因素(NAA)的从0.1 mg·L⁻¹增加到0.3 mg·L⁻¹,不定芽的增殖倍数从7.9减低到7.2,各浓度间差异不显著;C因素(GA₃)的浓度由0.5 mg·L⁻¹增加到1.1 mg·L⁻¹,不定芽的增殖倍数由8.1降低到6.9,然后又升高至7.6,各浓度间差异不显著。比较各因素间的极差(R)可以看出,A因素的极差最大,为7.9;其次为C因素,为1.2;B因素最小,仅为0.7,说明各因素对不定芽的增殖影响不同。分析各因素不同水平间增殖倍数时可以看出,A因素各水平增殖倍数顺序为A₃>A₂>A₁,B因素为B₁>B₂>B₃,C因素为C₁>C₃>C₂。综合分析各试验组合间丛生芽的生长情况,认为组合A₃B₁C₁、A₃B₂C₁可能是最优试验组合,但试验组合A₃B₂C₁就是试验中的处理8,试验结果表现为轻度玻璃化苗发生,故舍弃。

表5 不同激素组合对燕子掌不定芽增殖的影响

Table 5 Effect of different hormone combinations on *Crassula arborescens* leaf buds proliferation

处理 Treatment	因子代号 Factor	增殖倍数 Multiplication rate	生长情况 Growth state
	A B C		
1	0.5(1) 0.1(1) 0.5(1)	4.6	芽壮
2	0.5(1) 0.2(2) 0.8(2)	3.4	芽壮
3	0.5(1) 0.3(3) 1.1(3)	2.8	芽壮
4	1.0(2) 0.1(1) 0.8(2)	6.8	芽多且壮
5	1.0(2) 0.2(2) 1.1(3)	7.8	芽多且壮
6	1.0(2) 0.3(3) 0.5(1)	8.2	芽多且壮
7	1.5(3) 0.1(1) 1.1(3)	12.3	芽多,玻璃化重(图2c)
8	1.5(3) 0.2(2) 0.5(1)	11.5	芽多,轻微玻璃化
9	1.5(3) 0.3(3) 0.8(2)	10.6	芽多,较壮
T ₁	3.6c 7.9a 8.1a		
T ₂	7.6b 7.6a 6.9a		
T ₃	11.5a 7.2a 7.6a		
极差 R	7.9 0.7 1.2		

因组合A₃B₁C₁未出现在试验中,需进行验证,以试验中处理9(没发生玻璃化,且丛生芽数量多)为对照,进行验证。由表6可知,组合A₃B₁C₁(MS+6-BA

1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+GA₃ 0.5 mg·L⁻¹)的增殖倍数为11.0(图2b),且没有出现玻璃化,为燕子掌丛生芽增殖的最佳培养基。

表6 2种组合的增殖比较

Table 6 Comparison of two combinations of proliferation

组合 Combination	接种数 Inoculation number /个	增殖数 Multiplication number /个	增殖倍数 Multiplication rate	生长情况 Growth state
A ₃ B ₁ C ₁	30	331	11.0	芽多,较壮
A ₃ B ₃ C ₂	30	316	10.5	芽多,较壮

2.4 不同激素组合对燕子掌诱导生根的影响

由表7可知,燕子掌的生根数先增后降。IBA浓度变化从0.0~0.5 mg·L⁻¹,1/2MS中的生根数量比MS中的多,但0.8 mg·L⁻¹,1/2MS中的生根数量则比MS中的少。比较各处理间的差异显著性可以看出,处理4平均生根数最高,但与处理9不存在显著性差异,与其它各处理均达到显著性差异;处理9与处理10不存在显著性差异,与其它各处理间存在显著性差异。可以认为,1/2MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹、MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹作为燕子掌的生根培养基比较适宜(图2d)。

表7 不同培养基对生根的影响

Table 7 Effect of different media on rooting

处理 Treatment	接种数 Inoculation number/个	平均生根数 Average rooting number/条
1	30	3.3g
2	30	6.8e
3	30	8.6cd
4	30	10.6a
5	30	8.4cd
6	30	2.1h
7	30	5.8f
8	30	7.7de
9	30	9.8ab
10	30	9.2bc

3 讨论

建立无菌体系是开展植物组织培养的关键因素,材料不同的生理状态^[9]、取材时期^[10]、消毒剂种类^[11]、消毒

时间^[12]、消毒方法^[13]都直接影响植物无菌体系的建立,但可以肯定的是无菌体系建立过程中以相对较低的污染和相对较高的存活率来均衡评价消毒剂及消毒方法是否合理^[14]。唐军荣等^[15]的研究指出,延长消毒时间能够降低污染,但也会使外植体材料的存活率下降,故消毒过程中要减少消毒时间过长造成的伤害,把握污染率和存活率的平衡关系。该试验通过延长消毒时间同样也发现,外植体的污染率虽然降低了,但材料的死亡率明显增加,受伤害的外植体叶片对培养基中激素的响应速度也相应减缓,甚至没有反应。

蒲仕明等^[8]在培养基中添加不同浓度的 IBA 和 6-BA 进行燕子掌叶片的诱导中发现,40 d 左右时叶片边缘产生乳白色粒状愈伤组织后,逐渐生长成为愈伤组织块,随着培养时间延长,愈伤组织上分化形成不定芽。愈伤组织经转接培养,在 IBA 浓度一定时随 6-BA 浓度的增加,愈伤组织分化形成的芽数量也在明显增加。LIU 等^[16]用玉树的茎、叶为外植体材料,在 $0.2 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $2.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 共同作用下,通过愈伤组织阶段形成不定芽,每个材料上可形成 10 个以上芽。该试验中,通过 2,4-D 和 6-BA 的相互配比,没有经过愈伤组织阶段成功从叶片上产生不定芽,在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 的作用下,30 d 后每个材料平均可以产生 13.7 个不定芽,这与蒲仕明等^[8]、LIU 等^[16]通过愈伤组织阶段形成不定芽明显不同,且诱导速度快,所用生长调节物质浓度较低。高燕等^[17]用贝母为材料,进行不定芽诱导时发现,6-BA 和 2,4-D 的组合是不定芽诱导的最佳培养基,与该研究结果相近,但其内部生理变化有待进一步研究。

参考文献

- [1] 毛洪玉. 花卉学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 薛白标. 懒汉花卉: 燕子掌[J]. 中国花卉盆景, 2007(7): 23.
- [3] 王福东, 万尧德, 杨家友, 等. 燕子掌化学成分研究[J]. 中药材, 2009, 29(11): 1184-1185.
- [4] 王福东, 杨家友, 万尧德, 等. 燕子掌中药降糖制剂及其制备方法: ZL00135886[P]. 2004-03-10.
- [5] 周远. 绿色降糖植物: 燕子掌[J]. 糖尿病之友, 2007(10): 98.
- [6] 王福东, 汪涛, 汪汉卿. 燕子掌的驯化栽培[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 341-342.
- [7] 宋建华, 杜纪格. 燕子掌的盆栽技术[J]. 农业科技通讯, 2004(6): 24.
- [8] 蒲仕明, 李荣峰, 方利娟, 等. 燕子掌的组织培养与植株再生[J]. 北方园艺, 2012(23): 125-128.
- [9] 李庆伟, 梁明勤, 樊亚敏, 等. 不同取材时期和处理方法对瓦松无菌体系建立的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 55-58.
- [10] 李瑞梅, 胡新文, 郭建春. 木薯外植体快速、高效消毒的简易方法[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(4): 775-778.
- [11] 姜艳, 高燕, 耿秀英, 等. 辣木外植体消毒试验研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(17): 232-234.
- [12] 张振霞, 张惠婷, 庞立志, 等. 暗紫贝母鳞茎的组织培养[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 17-19.
- [13] 蔡月琴, 陆鑫眉, 黄志丹, 等. 火焰树的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2015, 51(5): 709-714.
- [14] 马琳, 何丽娜, 姜岩, 等. 锯叶斑克木 *Banksia serrata* 外植体的选择及消毒方法的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(12): 133-137.
- [15] 唐军荣, 高柱, 刘腾云, 等. 红花山玉兰组织培养外植体的选择及其消毒方法[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(11): 42-45.
- [16] 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(Agri and Life Sci), 2007, 33(6): 591-596.
- [17] 高燕, 贺宾, 范弢, 等. 贝母愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 新疆农业科学, 2005, 42(1): 35-37.

Establishment of Leaf Regeneration System of *Crassula arborescens*

LI Qingwei, HOU Dianming, SHEN Shunxian

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Vocational College of Agriculture, Zhengzhou, Henan 451450)

Abstract: Taking *Crassula arborescens* leaves as materials, using plant tissue culture method, the effects of sterilizing time and different concentration of 2, 4-D, 6-BA, NAA on regeneration of *Crassula arborescens* were studied. The results showed that soaking the leaf in 70%—75% alcohol for 10—15 seconds, then 0.1% HgCl_2 disinfection 12—15 minutes, the callus had low contamination rate and high survival rate. $\text{MS} + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D was optimum medium for inducing adventitious buds with an average of 13.7 adventitious buds; adventitious buds in $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{GA}_3 \text{ } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the proliferation coefficient was 11.0; multiple shoots could produce an average of 9—11 roots in the $1/2\text{MS} + \text{IBA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ or $\text{MS} + \text{IBA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ medium.

Keywords: *Crassula arborescens*; leaf; adventitious buds; regeneration