

· 基础研究 ·

植物激素对大岩桐愈伤组织 诱导和芽分化增殖的影响

朱苏文, 马 庆, 刘康武

(安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

摘 要:以大岩桐(*Sinningia speciosa*)的幼嫩茎、叶片为外植体,通过正交实验的方法探讨不同浓度和比例的植物激素对愈伤组织诱导和芽分化增殖的影响。实验结果表明:大岩桐愈伤组织的形成最佳激素组合为 2,4-二氯苯氧乙酸 2.0 mg/L + 6-苄基嘌呤 0.1 mg/L + 萘乙酸 0.3 mg/L;芽分化的最佳激素组合为 6-苄基嘌呤 0.5 mg/L + 萘乙酸 0.1 mg/L。

关键词:大岩桐; 组织培养; 植物激素; 正交实验

中图分类号:Q813.1⁺2; S681.9

文献标识码:A

文章编号:1007-7146(2006)04-0394-05

Effects of Hormone on Callus and Bud Differentiation of *Sinningia speciosa*

ZHU Su-wen, MA Qing, LIU Kang-wu

(College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China)

Abstract: The paper reported the effects of different explants and hormones contents on callus and bud differentiation of *Sinningia speciosa* through positive cross experiments. The results indicated that medium composition, 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.3 mg/L, is the best for callus introducing; and 6-BA 0.5mg/L + NAA 0.1mg/L is best for bud differentiating.

Key words: *Sinningia speciosa*; tissue culture; hormone; positive cross experiment

大岩桐(*Sinningia speciosa*)为苦苣苔科苦苣苔属的多年生肉质草本植物,春末至秋初开花,栽培良好的植株可开花数十朵,是良好的观花赏叶植物。我国大岩桐的引种始于在 20 世纪 30 年代,由当时的金陵大学农学院和中山陵园纪念植物园从美国引进;直到 90 年代才有小批量生产,至今还没有形成规模^[1]。近年引进不少杂交新品种,花色彩丰富,有红色、蓝色、紫色、各色镶边等;花大、阔钟形,花瓣有丝绒质感,亦有重瓣品种等^[2]。传统上,大岩桐以播

种、扦插、分球进行繁殖。大岩桐种子极小,每克约 2.8 万粒,播种时对土壤要求高,播种产生的后代易发生性状分离;扦插繁殖系数低,不能满足大批量生产的要求;分球繁殖有株形不整齐的缺点。大岩桐杂交种的观赏价值较高,要保持其优良性状,进行工厂化生产,组织培养成了最有效的繁殖途径。目前,虽然大岩桐的组织培养及快繁的研究很多,但是培养基中植物激素的浓度和比例对大岩桐愈伤组织的诱导和芽的分化、增殖的报道较少^[3-8],因此我们利

收稿日期:2006-03-17

作者简介:朱苏文(1961—),女,副教授,硕士生导师。从事专业:生物物理与分子生物学。(电话)13855197800;
(电子信箱)swzhu@mail.hf.ah.cn

用正交实验探讨不同浓度和比例的植物激素对大岩桐愈伤组织的诱导、芽的分化和增殖的影响,为其快速体系的建立提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大岩桐 (*Sinningia speciosa*), 品种为重瓣大岩桐。

1.2 实验方法

1.2.1 外植体的选取及消毒灭菌 为了获得更多的幼嫩器官, 本实验采取对成苗打头的方法, 促使植株萌发更多侧芽。从健壮的植株上取下嫩叶嫩茎, 用自来水冲洗 30 min, 用 1.0 % 的中性洗衣粉溶液搅动漂洗 15 min, 洗涤过程中注意不要用力过猛, 尽量避免造成机械损伤, 自来水冲洗干净后置于超净工作台上备用, 用 70 % 酒精消毒 30 s, 无菌水漂洗后, 再用 0.1 % HgCl_2 消毒, 叶片消毒 3 min ~ 5 min, 嫩茎消毒 6 min ~ 10 min, 消毒后用无菌水冲洗 4 次 ~ 5 次。

1.2.2 愈伤组织的诱导 在无菌条件下, 嫩叶切成 0.5 cm ~ 1 cm 宽的条状, 嫩茎切成 1 cm 左右的小段, 然后接种在加入按照 L_{3^3} 的正交设计的含不同激素的 MS (Murashige and Skoog, 1962 年) 培养基^[9]上, 进行愈伤组织的诱导。每个处理组合重复 3 次。结果见表 1。

表 1 诱导愈伤组织的培养基激素配比

Tab. 1 Effects of different phytohormone combination for callus formation

培养基 Medium	激素 Phytohormone (mg/L)		
	2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D	6-苄基嘌呤 6-BA	萘乙酸 NAA
1	1.0	0.1	0.1
2	1.0	0.5	0.2
3	1.0	1.0	0.3
4	1.5	0.1	0.2
5	1.5	0.5	0.3
6	1.5	1.0	0.1
7	2.0	0.1	0.3
8	2.0	0.5	0.1
9	2.0	1.0	0.2

1.2.3 芽的分化与增殖 愈伤组织进行芽的分化与增殖时, 选用 MS 培养基添加 6-苄基嘌呤 (6-benzyl adenine, 6-BA)、萘乙酸 (naphthalene acetic acid, NAA)、激动素 (kinetin, KT) 三种激素, 按照 L_{3^3} 的正交实验方法设计了不同激素水平, 观察不同处理组合 (表 2) 对大岩桐芽分化的影响。每组处理组合重复 3 次。

表 2 诱导芽分化与增殖的培养基激素配比

Tab. 2 Effects of different phytohormone combination for bud differentiation

培养基 Medium	激素 Phytohormone (mg/L)		
	6-苄基嘌呤 6-BA	萘乙酸 NAA	激动素 KT
1	0.5	0.1	0
2	0.5	0.2	0.1
3	0.5	0.3	0.2
4	1.0	0.1	0.1
5	1.0	0.2	0.2
6	1.0	0.3	0
7	1.5	0.1	0.2
8	1.5	0.2	0
9	1.5	0.3	0.1

1.3 培养条件

将刚接入的外植体的培养基置于 14 ℃ ~ 15 ℃ 的暗室中暗培养 7 天左右, 然后转入愈伤组织和芽诱导培养, 培养条件为温度 24 ± 1 ℃, 光照时间 12 h, 光照强度 2 000 Lx。

2 结果与分析

2.1 激素水平对大岩桐愈伤组织形成的影响

从表 3 和表 5 可见, 培养基 7 对大岩桐愈伤组织诱导的频率最高 (图 1、图 2), 平均为 90.00 %; 培养基 1 对大岩桐愈伤组织诱导的频率最低, 平均为 6.67 %。采用了 DPS 数据分析系统对表 3 不同激素处理水平对愈伤组织的诱导的数据进行分析。单一激素处理的影响可以从极差分析的数据 (表 4) 看出, 2,4-D 的水平 3 无论在总和还是均值都是最大的; 6-BA 的水平 1 在均值和总和是最大的; 同样可以看出 NAA 水平 3 在均值和总和是最大的。从而可以选出对愈伤组织的诱导最佳的激素组合是: 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.3 mg/L。

表 3 激素水平对大岩桐愈伤组织形成的影响

Tab. 3 Effect of different phytohormone combination for formation of callus

培养基 Medium	外植体数 No. of explant	愈 伤 组 织 Callus			诱导频率 Frequency(%)		
		块数	No. of piece				
1	30	2	1	2	6.67	6.67	6.67
2	30	3	3	3	10.00	10.00	10.00
3	30	5	7	6	16.67	23.33	20.00
4	30	8	9	9	26.67	30.00	30.00
5	30	10	11	11	33.33	36.67	36.67
6	30	17	16	16	56.67	53.33	53.33
7	30	27	25	29	90.00	83.33	96.67
8	30	16	17	18	53.33	56.67	66.67
9	30	15	15	13	50.00	50.00	43.33

表 4 激素水平对大岩桐愈伤组织形成的极差分析表

Tab. 4 Range analyses of callus formation of different phytohormone combination for formation of callus

激素 Phytohormone	均值 Average			总和 Total			极小值 Minimum value	极大值 Maximum value	极差 R Range R	调整 R' Regulate R'
	水平 1	水平 2	水平 3	水平 1	水平 2	水平 3				
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3				
A	0.122333	0.393	0.655556	1.101	3.537	5.9	0.122333	0.6556	0.5332	0.480255
B	0.415333	0.348222	0.407333	3.738	3.134	3.666	0.348222	0.4153	0.0671	0.060445
C	0.400111	0.285556	0.485222	3.601	2.57	4.367	0.285556	0.4852	0.1997	0.179833

A = 2,4-D; B = 6-BA; C = NAA.

表 5 Duncan's 新复极差测验的多重比较

Tab. 5 Duncan's new multiplerange test of different model

处理 Treatment	平均 Average	5 % 显著水平 5 % level	1 % 极显著水平 1 % level	处理 Treatment	平均 Average	5 % 显著水平 5 % level	1 % 极显著水平 1 % level
7	0.9000	a	A	4	0.2889	e	DE
8	0.5889	b	B	3	0.200	f	E
6	0.5444	bc	BC	2	0.100	g	F
9	0.4777	c	C	1	0.067	g	F
5	0.3557	d	D				

同时我们从表 4 可以看出,不同因子的极差值是不同的,极差值越大表示该因素的影响也是最大的。2,4-D、6-BA、NAA 的极差分别为:0.5332、0.0671 和 0.1997,因此这三种激素在愈伤的形成与保持中的作用大小依次为:2,4-D、NAA、6-BA。因此在对大岩桐的愈伤形成和保持中要严格注意 2,4-D 的用量,极小的差异就很有可能造成极大的差异。从表 5 可见,7 号培养基与其它培养基的差异均达到 0.05 显著水平和 0.01 极显著水平。

2.2 激素水平对大岩桐芽分化与增殖的影响

从表 6 和表 8 可见,1 号培养基对大岩桐芽分化

的频率最高,平均为 60.00 % (图 3);培养基 9 号对大岩桐芽分化的频率最低,平均为 2.22 %。从极差分析的结果(表 7)可以看出,A 的水平 1、B 的水平 1 和 C 的水平 1 在总和与均值中分别都是最大的,可以选出最佳的组合为 A1B1C1,也就是 6-BA:0.5 mg/L, NAA:0.1 mg/L, KT:0 mg/L。极差的大小依次为: A > B > C,也就是在芽的分化过程中 A 的影响因素是最大的。适当的控制 A 的量,从而可以在芽分化过程中达到不同的预期目的。从表 8 的分析可以看出用于芽分化的培养基组合 1 与其它培养基的差异均达到 0.05 显著水平和 0.01 极显著水平。

表6 激素水平对大岩桐芽分化与增殖的影响

Tab.6 Effect of different phytohormone combination for bud differentiation

培养基 Medium	愈伤组织块 Pieces of callus	愈伤组织 Callus					
		分化块数			分化频率(%)		
		Pieces of differentiate			Frequency of differentiation(%)		
1	30	17	19	18	56.67	63.33	60.00
2	30	12	14	13	40.00	46.67	43.33
3	30	9	11	9	30.00	36.67	30.00
4	30	8	9	8	26.67	30.00	26.67
5	30	6	8	7	20.00	26.67	23.33
6	30	6	5	4	20.00	16.67	13.33
7	30	1	2	2	3.33	6.67	6.67
8	30	2	2	1	6.67	6.67	3.33
9	30	0	1	1	0.00	3.33	3.33

表7 大岩桐芽的分化与增殖的极差分析

Tab.7 Range analyses of bud differentiation of different phytohormone combination for bud differentiation

激素 Phytohormone	总利 Total			均值 Average			极小值 Minimum value	极大值 Maximum value	极差 R Range R	调整 R' Regulate R'
	水平 1	水平 2	水平 3	水平 1	水平 2	水平 3				
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3				
A	4.067	2.034	0.4	0.452	0.226	0.044	0.044	0.452	0.408	0.366972
B	2.801	2.167	1.533	0.311	0.241	0.170	0.170	0.311	0.141	0.126894
C	2.467	2.2	1.834	0.274	0.244	0.204	0.204	0.274	0.070	0.063347

A = 6-BA; B = NAA; C = KT.

表8 Duncan's 新复极差测验的多重比较

Tab.8 Duncan's new multiplerange test of different model

处理 Treatment	平均 Average	5 % 显著水平 5 % level	1 % 极显著水平 1 % level	处理 Treatment	平均 Average	5 % 显著水平 5 % level	1 % 极显著水平 1 % level
1	0.6	a	A	6	0.1667	f	E
2	0.4333	b	B	7	0.0557	g	F
3	0.3223	c	C	8	0.0557	g	F
4	0.2778	d	CD	9	0.022	g	F
5	0.2333	e	D				

3 结论与讨论

生长调节物质对大岩桐愈伤组织的形成和芽的分化诱导有非常重要的影响,添加不同的激素对愈伤组织的形成和芽的分化诱导的影响是不同的。对愈伤组织的形成和芽的分化诱导影响的因素很多,也很复杂。本文通过正交实验来选择大岩桐愈伤组织形成和芽分化诱导的最佳激素处理组合,大大的简化了繁复实验处理与数据整理。

大岩桐外植体接种 10 天后,已经在外植体的边缘发现有愈伤组织的迹象,部分叶片开始失色变脆。

第 15 天后,不同处理之间已渐渐出现了较明显的差别。本实验筛选的大岩桐愈伤组织的形成最佳激素组合为:2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.3 mg/L;芽分化的最佳激素组合为是 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L。

从实验中发现 2,4-D 在大岩桐愈伤组织形成中的作用影响最大,因此在诱导大岩桐愈伤组织形成时要严格注意 2,4-D 的用量,培养基中 2,4-D 极小的差异就有可能造成愈伤组织形成的极大差异。此外,大岩桐外植体接种后,在最初的一段时间里几乎没有任何变化,这与周根余^[10]报道的大岩桐组培中

的休眠现象一致。为此本研究在大岩桐外植体接种后7天都采取了低温黑暗的预处理,从而在一定程度上抑制了大岩桐的休眠现象,加快了繁殖速度。以上研究结果为大岩桐离体快繁体系的建立提供了实验基础。



图1 刚接入不久的外植体

Fig.1 Explants on medium



图2 最佳激素组合7处理的愈伤组织

Fig.2 Callus formation on hormone combination 7



图3 最佳激素组合1处理的芽分化

Fig.3 Bud differentiation on hormone combination 1

References

- [1] 曾宋君. 大岩桐的观赏价值及繁殖栽培[J]. 园林, 1997(5): 19.
ZENG Song-jun. Value of View, Propagate and Growth for *Sinningia speciosa* [J]. Gardens, 1997(5): 19.
- [2] 卢聪. 室内盆栽花卉[M]. 北京: 金盾出版社, 1991: 107-109.
LU Cong. Inside Potted of Plant Flower [M]. Beijing: Jindun Press, 1991: 107-109.
- [3] 曹桂萍, 王建美. 大岩桐的组织培养与快速繁殖研究[J]. 山东农业科学, 2002(5): 16-22.
CAO Gui-ping, WANG Jian-mei. Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Sinningia speciosa* [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2002(5): 16-22.
- [4] 周仲信, 李建科, 朱惠珍, 等. 大岩桐开花生物学的观察及快繁技术的研究[J]. 天津农学院学报, 1998, 2(1): 1-8.
ZHOU Zhong-xin, LI Jian-ke, ZHU Hui-zhen, et al. Study on Blooming Biological Characteristics and Rapid Propagation Technique of *Sinningia speciosa* [J]. Journal of Tianjin Agricultural College, 1998, 2(1): 1-8.
- [5] 杨振堂, 胡桂珍, 刘春华. 重瓣大岩桐的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(3): 41-42.
YANG Zhen-tang, HU Gui-zhen, LIU Chun-hua. Tissue Culture and Rapid Propagation of *Sinningia speciosa* [J]. Plant Physiology Communications, 1997, 33(3): 41-42.
- [6] 王金平, 袁正仿, 赵兴兵. 杜衡的组织培养研究[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2000, 13(3): 310-312.
WANG Jin-ping, YUAN Zheng-fang, ZHAO Xing-bing. Studies on the Tissue Culture of *Asarum forbesii* [J]. Journal of Xinyang Teachers College (Natural Science Edition), 2000, 13(3): 310-312.
- [7] 周玉珍. 金叶风箱果离体快繁技术的研究[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 148-150.
ZHOU Yu-zhen. Studies on the Propagation *in vitro* of *Physocarpus opulifolius* Lutein [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(2): 148-150.
- [8] 曹效东, 曹孜义. 植物试管繁殖的成本与效益浅析[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(4): 284-291.
CAO Xiao-dong, CAO Zi-yi. Analysis of Cost and Benefit for Plant Cuvette Propagate [J]. Plant Physiology Communications, 1996, 32(4): 284-291.
- [9] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
TAN Wen-cheng, DAI Ce-gang. Tissue Culture Technology of Ornamental [M]. Beijing: Chinese Forest Publishing Company, 1991.
- [10] 周根余, 周卫华, 程磊. 大岩桐组培中休眠现象的初步研究[J]. 上海农业学报, 2000, 16(2): 69-72.
ZHOU Gen-yu, ZHOU Wei-hua, CHENG Lei. Preliminary Study on Dormancy of *Gloxinia* (*Sinningia speciosa*) *in vitro* [J]. Acta Agricultural Shanghai, 2000, 16(2): 69-72.