



# 不同激素浓度组合对甜叶菊幼叶诱导愈伤和芽分化的影响

苏彩霞,李惠芝,王玉泉,宝牡丹,赵文博

(兴安职业技术学院 农牧与生物工程系,内蒙古 乌兰浩特 137400)

**摘要:**为提高甜叶菊的组织培养效率,以甜叶菊幼叶为外植体,研究 75%消毒酒精和 0.1%氯化汞的不同消毒时间组合对外植体的消毒效果;以及不同激素浓度组合对外植体愈伤组织的诱导和芽分化的影响。结果表明:甜叶菊幼叶外植体材料的最佳灭菌条件为 75%消毒酒精 30 s,0.1%氯化汞 2 min;最佳诱导愈伤组织和分化芽培养基为  $MS+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ ,此时不定芽增长率为 85.7%,外植体适宜的生根培养基为  $1/2\text{ MS}+0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$ ,生根率为 88.6%。

**关键词:**激素浓度组合;甜叶菊;诱导愈伤和分化芽

甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)又名甜菊,为菊科甜菊属多年生草本植物。甜菊糖是甜叶菊的主要化学成分之一,其甜度约为蔗糖的 300~400 倍,热量却仅为蔗糖的 1/300,是一种低热量、高甜度的天然甜味剂,享有“巴拉圭甜茶”之美名<sup>[1-2]</sup>。由于此糖可预防肥胖症、高血压、小儿龋齿等疾病<sup>[3]</sup>,所以,近年来甜叶菊已被广泛地应用于医药与饮食业,深受人们青睐。甜叶菊在兴安盟地区栽培多年后,可知它的经济效益远远高于水稻、小麦、玉米等粮食作物,甜叶菊产业将是兴安盟的重要支柱性产业,但是甜叶菊外购苗的质量、价格等问题是影响它在兴安盟发展的瓶颈,而利用组培苗技术为农民提供大量甜叶菊苗,能够大大提高其产量和质量<sup>[4-8]</sup>,对兴安盟经济的发展有巨大的推动作用,据此,对本地区引进的甜叶菊栽培品种进行了组培快繁技术研究,以期得到甜

叶菊组培苗,旨在为本地区甜叶菊的组织培养育苗及规模化生产提供重要科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采用兴安职业技术学院试验基地内种植的甜叶菊大田品种。

MS,蔗糖,琼脂,植物生长激素(6-BA、NAA、IAA)均由杭州木木生物科技有限公司提供。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体消毒时间筛选 从生长健壮、无病虫害的甜叶菊植株上选取幼叶,首先在清水中漂洗 3~5 次,然后进行消毒处理,采用 3 个处理:① 75%酒精 10 s,0.1%  $\text{HgCl}_2$  2 min;② 75%酒精 30 s,0.1%  $\text{HgCl}_2$  2 min;③ 75%酒精 60 s,0.1%  $\text{HgCl}_2$  4 min。消毒后的外植体最后在超净工作台内用无菌水冲洗 5~6 次备用。

1.2.2 诱导愈伤及芽分化 首先将消毒好的幼叶去掉叶尖和叶柄,其次将其余部分切成约  $0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$  的小块接种于诱导愈伤和分化芽培养基上,试验以 MS 为基础培养基,附加不同浓度 6-BA 和 NAA 激素组合,进行诱导愈伤和分

收稿日期:2018-01-20

基金项目:2015 年内蒙古兴安盟科技处重点资助项目。

第一作者简介:苏彩霞(1980-),女,硕士,副教授,从事园艺植物遗传育种与生物技术研究。E-mail: sucaixia2004@126.com。

**Abstract:** In order to establish the rapid breeding and efficient regeneration system of Hongyang Kiwifruit, the stem with axillary bud was used as explants to be cultured in the MS medium with different concentrations of hormones. The effects of different concentrations of hormones on axillary bud sprouting, multiplication and rooting were examined in this study. The results showed that the optimum medium for axillary bud sprouting was  $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ , the germination rate was 88.37%. The medium with  $MS+1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ ZT}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$  had best effect on adventitious bud multiplication. The rooting effect was best on the rooting medium with  $1/2\text{ MS}+0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IBA}$ , roots developed well and plants grew vigorous.

**Keywords:** Hongyang kiwifruit (*Actinidia chinensis*); tissue culture; stem with axillary bud

化芽。6-BA 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg·L<sup>-1</sup>，NAA 浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg·L<sup>-1</sup>，增殖培养基共设置 20 个处理。蔗糖 30 mg·L<sup>-1</sup>，琼脂 7 mg·L<sup>-1</sup>，pH 调至 5.8~6.0。每处理接种 10 瓶，每瓶 5 个外植体，3 次重复，最后将接种瓶放入培养室培养，培养温度为 24~28 ℃，光照时间为 16 h·d<sup>-1</sup>，光照强度为 2 000 lx。接种后 40 d 内观察外植体生长状况，并计算愈伤组织的诱导率，愈伤组织的诱导率(%)=(诱导愈伤组织的外植体数/接种外植体数)×100，芽分化率(%)=(分化芽的外植体数/接种外植体数)×100。

1.2.3 生根诱导 待不定芽长至 1.0~1.5 cm 时，将生长健壮的不定芽剪下接种于生根培养基，培养基设置分别为：MS+NAA(0.2 mg·L<sup>-1</sup>)；1/2MS+NAA(0.2、0.5 mg·L<sup>-1</sup>)；MS+IAA(0.2 mg·L<sup>-1</sup>)；1/2MS+IAA(0.2、0.5 mg·L<sup>-1</sup>)。20 d 后统计生根结果。生根率(%)=(生根幼芽数/接种幼芽数)×100；同时观察根的形态，目测法测根长。

1.2.4 组培苗的移栽 待形成根系发达、生长健壮的再生苗时，揭去分口膜炼苗 7 d 后移栽于钵钵中(钵钵中的培养基质经高温高压灭菌)，移栽后套塑料袋保湿，室温下 20~25 ℃ 生长。

1.2.5 数据分析 所有数据均采用 Excel 2007 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒时间对不定芽诱导的影响

由表 1 可知，当消毒条件为 75%酒精 10 s，0.1% HgCl<sub>2</sub> 2 min 时，外植体材料灭菌不彻底，外植体容易带菌、污染，甚至死亡；当消毒条件为 75%酒精 60 s，0.1% HgCl<sub>2</sub> 4 min 时，灭菌时间过长，灭菌材料生长缓慢，甚至褐化死亡，很难诱

导出不定芽，且每个外植体上长出的不定芽数量较少；75%酒精 30 s，0.1% HgCl<sub>2</sub> 2 min 为最佳消毒条件，此时外植体灭菌彻底，易诱导出不定芽，且每个外植体上长出的不定芽数量较多。

2.2 愈伤组织的诱导与芽的分化

培养 3~4 d 后，叶片开始褪色，周围逐渐萌动产生愈伤组织，后逐渐分化芽，起初为白色略带黄色，渐转为淡黄绿色，形成主芽。由表 2 可知，在 6-BA 添加量小于 1.0 mg·L<sup>-1</sup>，其增殖率出现上升趋势，但芽弱，少，颜色发白；在添加量大于 1.5 mg·L<sup>-1</sup>时，其增殖率出现上升趋势，芽较壮，芽数增多，颜色变绿。NAA 对甜叶菊不定芽的诱导与增殖具有明显的促进作用，随着 NAA 浓度的增加，不定芽增殖率增加，当 6-BA 浓度为 1.5 或 2.0 mg·L<sup>-1</sup>，NAA 浓度为 0.5 mg·L<sup>-1</sup>时，芽增殖率都高，分别为 85.7%和 83.3%，且芽壮，颜色较绿。综合成本等因素考虑，确定该试验中甜叶菊不定芽增殖的最佳培养基为 MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA，其次，MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA。

2.3 不同生根培养基对甜叶菊生根的影响

由表 3 可知，芽长小于 1.0 cm 不利于生根，6 种生根培养基均可生根但生根效果明显不同。培养 5 d 后，在培养基 1/2 MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IAA 和 1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IAA 上的幼芽基部最先分化出根，1/2MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 次之。培养 40 d 后，培养基 1/2MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 上的根数少、纤细，白色，根长仅有 1.0~2.0 mm，生根率为 78.4%；而培养基 1/2 MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IAA 上的根数多、粗壮，根长在 2.0~5.0 mm，生根率高达 88.6%，由此筛选出适宜的生根培养基为 1/2MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IAA。

表 1 不同灭菌条件对不定芽诱导的影响

Table 1 The effect of different sterilization time on shooting

| 灭菌时间<br>Sterilization time |                            | 接种数<br>Inoculation | 萌发不定芽块数<br>Shoot number | 萌发率/%<br>Germination | 芽体生长状况<br>Germination |
|----------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| 75%Ethanol/s               | 0.1%HgCl <sub>2</sub> /min | number             |                         | rate                 | growth status         |
| 10                         | 2                          | 50                 | 42                      | 84.0                 | 芽数多，容易带菌、污染           |
| 30                         | 2                          | 50                 | 47                      | 94.0                 | 芽数较多，生长旺盛             |
| 60                         | 4                          | 50                 | 15                      | 30.0                 | 芽数少，生长缓慢              |

表 2 不同激素浓度对甜叶菊不定芽增殖的影响

Table 2 The effect of different hormone concentration on differentiation of *Stevia rebaudiana* Bertoni

| 处理<br>Treatments | 激素浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )<br>Hormone constitution |     | 接种块数<br>Inoculation<br>number | 分化芽块数<br>Differentiation<br>number | 芽分化率/%<br>Differentiation<br>rate | 芽体生长状况<br>Germination<br>growth status |
|------------------|--|-----|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--|
|                  | 6-BA   | NAA |                               |                                    |                                   |  |
|                  |  |     |                               |                                    |                                   |  |
| 1                | 0.5  | 0.1 | 30                            | 6                                  | 20.0                              | 芽少、变褐                                  |
| 2                | 0.5  | 0.2 | 25                            | 5                                  | 20.0                              | 芽少、变褐                                  |
| 3                | 0.5  | 0.3 | 30                            | 8                                  | 26.7                              | 芽少、弱                                   |
| 4                | 0.5  | 0.4 | 30                            | 10                                 | 33.3                              | 芽少、弱                                   |
| 5                | 0.5  | 0.5 | 35                            | 12                                 | 34.2                              | 芽少、弱、颜色发白                              |
| 6                | 1.0  | 0.1 | 45                            | 23                                 | 51.1                              | 芽弱、颜色较发白                               |
| 7                | 1.0  | 0.2 | 33                            | 17                                 | 51.5                              | 芽弱、颜色较发白                               |
| 8                | 1.0  | 0.3 | 45                            | 26                                 | 57.8                              | 芽较弱、颜色变绿                               |
| 9                | 1.0  | 0.4 | 42                            | 25                                 | 59.5                              | 芽较弱、颜色变绿                               |
| 10               | 1.0  | 0.5 | 35                            | 22                                 | 62.9                              | 芽较弱、颜色变绿                               |
| 11               | 1.5  | 0.1 | 30                            | 21                                 | 70.0                              | 芽较壮、颜色较绿                               |
| 12               | 1.5  | 0.2 | 32                            | 23                                 | 71.9                              | 芽较壮、颜色较绿                               |
| 13               | 1.5  | 0.3 | 35                            | 27                                 | 77.1                              | 芽壮、颜色较绿                                |
| 14               | 1.5  | 0.4 | 33                            | 26                                 | 78.8                              | 芽壮、多、颜色较绿                              |
| 15               | 1.5  | 0.5 | 35                            | 30                                 | 85.7                              | 芽壮、多、颜色较绿                              |
| 16               | 2.0  | 0.1 | 35                            | 25                                 | 71.4                              | 芽较壮、颜色较绿                               |
| 17               | 2.0  | 0.2 | 35                            | 25                                 | 71.4                              | 芽较壮、颜色较绿                               |
| 18               | 2.0  | 0.3 | 33                            | 25                                 | 75.8                              | 芽壮、颜色较绿                                |
| 19               | 2.0  | 0.4 | 33                            | 26                                 | 78.8                              | 芽壮、颜色较绿                                |
| 20               | 2.0  | 0.5 | 30                            | 25                                 | 83.3                              | 芽壮、颜色较绿                                |

表 3 再生芽的生根培养基筛选

Table 3 The select of rooting medium on regenerative shoots

| 处理         |                            | 接种芽数               | 生根数            | 生根率/%        | 根的形态             | 根长/mm       |
|------------|----------------------------|--------------------|----------------|--------------|------------------|-------------|
| Treatments |                            | Inoculation number | Rooting number | Rooting rate | The form of root | Root length |
| MS         | 0.2 mg•L <sup>-1</sup> NAA | 36                 | 25             | 69.4         | 根少,纤细,白色         | 1.0 左右      |
| 1/2MS      | 0.2 mg•L <sup>-1</sup> NAA | 37                 | 29             | 78.4         | 根少,纤细,白色         | 1.0~2.0     |
| 1/2MS      | 0.5 mg•L <sup>-1</sup> NAA | 36                 | 27             | 75.0         | 根较多,细长,白色        | 2.0~3.0     |
| MS         | 0.2 mg•L <sup>-1</sup> IAA | 30                 | 23             | 76.7         | 根较多,细长,白色        | 2.0~3.0     |
| 1/2MS      | 0.2 mg•L <sup>-1</sup> IAA | 35                 | 31             | 88.6         | 根多,粗壮,白中带有浅褐色    | 2.0~5.0     |
| 1/2MS      | 0.5 mg•L <sup>-1</sup> IAA | 35                 | 29             | 82.9         | 根较多,较粗壮,白色       | 2.0~5.0     |

3 结论与讨论

3.1 为当地甜叶菊的规模化生产奠定基础

近年来,兴安盟扎赉特旗引进种植甜叶菊,经过几年的发展壮大,种植面积和种植技术水平都有了快速提升。由历年的效益分析可知,兴安盟种植甜叶菊的效益远远高于种植玉米、水稻的效益,甜叶菊产业将是兴安盟的重要支柱性产业,若解决了兴安盟甜叶菊外购苗等问题,则解决了甜

叶菊在兴安盟发展的瓶颈,而利用组培苗技术为农民提供大量甜叶菊苗,能够大大提高其产量和质量,对兴安盟经济的发展有巨大的推动作用,使兴安盟种植甜叶菊的农民进一步增产、增收。

3.2 消毒液对甜叶菊材料消毒的影响

该试验得出,甜叶菊外植体材料的灭菌最佳条件为 75%酒精 30 s,0.1%升汞 2 min,此时外植体灭菌彻底,且易诱导出不定芽,而灭菌时间过长或过短都不适宜外植体的不定芽诱导。蔡永智

等<sup>[9]</sup>以甜叶菊叶片为外植体进行研究,表明最佳消毒条件为 0.1% 升汞 3 min,成活率为 81.7%。

### 3.3 激素对甜叶菊诱导芽和生根的影响

该试验以甜叶菊的幼叶为外植体进行培养,最佳分化芽培养基为 MS + 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA,增殖率较高,达 88.6%,此浓度分化的芽壮,多,颜色较绿。这与蔡永智等<sup>[9]</sup>研究结果一致,他们以甜叶菊叶片为外植体进行研究表明,最佳诱导培养基为 MS + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IAA + 300 mg·L<sup>-1</sup> 水解酪蛋白,平均诱导率为 80.0%。但是崔光荣等<sup>[10]</sup>以甜叶菊为外植体进行研究表明,最佳诱导培养基和继代增殖培养基为 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + (0.1~0.2)mg·L<sup>-1</sup> NAA 适合试管苗增殖,增殖系数可达 7.4。娄玉霞等<sup>[11]</sup>以甜叶菊叶片为外植体进行研究,结果表明:最佳诱导培养基为 MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 300 mg·L<sup>-1</sup> 水解酪蛋白,平均诱导率为 100.0%。沈秀丽等<sup>[12]</sup>研究表明 MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 适合丛生芽生长。这说明 6-BA 和 NAA 是甜叶菊诱导芽最常用的生长调节剂,其添加量影响不定芽增殖多少和效果,但种源、基因型也会影响不定芽的增殖多少和效果。

本试验筛选出适宜的生根培养基为 1/2 MS + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> IAA,这与蔡永智等<sup>[9]</sup>研究结果一致。但是袁学军等<sup>[13]</sup>研究表明 MS + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 为最佳生根培养基,生根率达 99.5%,这与本试验结果不同,可能与甜叶菊的种源、基因型不同或激素有关。有文献记载,添加适量的细胞分

裂素也有利于根的形成,由于本试验的生根率还未达到理想状态,为了规模化组织培养工厂育苗,还需进一步试验,以期进一步提高诱导率。

### 参考文献:

- [1] 崔德才,徐培文.植物组织培养与工厂化育苗[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [2] 蒋光月,李帆,朱宏斌,等.安徽省明光市甜叶菊产业提升探讨[J].园艺与种苗,2011(3):107-110.
- [3] 马琴玉,楼凤昌,李翱.甜叶菊的研究进展[J].国外医学药学分册,1992,19(1):5-9.
- [4] 朱东顺,宋晴晴,傅在秋,等.山东省甜叶菊的主要病害及防治措施[J].中国糖料,2002(3):27-29.
- [5] 赫福霞,于晶,李茫雪,等.多因子正交试验对甜叶菊丛生芽诱导条件的筛选[J].中国农学通报,2005,21(7):80-81.
- [6] 李启任,刘娟,董立华,等.甜叶菊茎尖组织培养快繁技术[J].云南大学学报:自然科学版,1992,14(4):425-426.
- [7] Lan Yu Tian, Liu Shi Yong, Luo Yu Ting, et al. Sterile germination of *Dendrobium chrysotoxum* seeds and rapid propagation of its plantlets[J]. Agricultural Science & Technology, 2010, 11(11/12): 89-91.
- [8] 沈秀丽,徐仲.甜叶菊组织培养条件的研究Ⅱ.不同基本培养基、不同碳源对愈伤组织形成及芽诱导的影响[J].中国糖料,1997(4):9-10.
- [9] 蔡永智,王爱英,沈海涛,等.甜叶菊叶片高频再生体系的建立[J].北方园艺,2013(9):134-137.
- [10] 崔光荣,何克勤,胡能兵,等.甜叶菊的组织培养[J].安徽科技学院学报,2011,25(5):23-28.
- [11] 娄玉霞,宋磊,李新国,等.甜叶菊叶片离体培养及试管无性系的建立[J].上海师范大学学报,2000,29(4):74-77.
- [12] 沈秀丽,胡昌林,姜浩奎,等.甜叶菊试管苗的研究[J].中国甜菜,1993(3):46-49.
- [13] 袁学军,陈光宙,李艳丽,等.甜叶菊种子丛生芽诱导和植株再生[J].草原与草坪,2010,30(6):55-57.

## Effect of Different Hormone Combinations on Callus Initiation and Shooting of *Stevia rebaudiana* Bertoni

SU Cai-xia, LI Hui-zhi, WANG Yu-quan, BAO Mu-dan, ZHAO Wen-bo

(Department of Agriculture, Animal Husbandry and Bioengineering, XingAn Vocational and Technical College, Ulanhot 137400, China)

**Abstract:** In order to improve the culture efficiency of *Stevia rebaudiana* Bertoni, taking the young leaves as materials to study the effect different disinfection time of 75% disinfected alcohol and 0.1% mercuric chloride, and different hormone combinations on callus initiation and shooting. The results showed that the optimum sterilization conditions for the leaves of *Stevia rebaudiana* were 75% sterile alcohol 30 s and 0.1% mercuric chloride for 2 min. The best shooting medium was MS + 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA, and the ratio of inducing was 85.7%. The optimum rooting medium was 1/2 MS + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> IAA, and the ratio of rooting was 88.6%.

**Keywords:** hormone combination; *Stevia rebaudiana* Bertoni; callus initiation and shooting