



多肉植物大和锦的组织培养

石振杰¹,金一锋¹,陈 阳¹,汪 迅¹,程美玲¹,孙华山²

(1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院/抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室,黑龙江 齐齐哈尔 161006;2. 东北农业大学 园艺园林学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以大和锦叶片为外植体材料,研究不同消毒措施、不同激素浓度配比对大和锦愈伤组织诱导、分化新芽的影响,以期为大和锦快速再生体系的建立,改良大和锦提供一定的参考依据。结果表明,最佳的消毒方式为健康的大和锦叶片用无菌水冲洗 1 h,75%乙醇浸泡 30 s,1%次氯酸钠浸泡 17 min,污染率低至 10.00%;诱导大和锦叶片愈伤组织的最佳培养基为 MS+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ KT;大和锦愈伤组织分化新芽的最佳培养基为 MS+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA。

关键词:大和锦;愈伤组织;消毒措施

大和锦(*Echeveria purpurorum* Berger)是景天科(Sedum)拟石莲花属(*Echeveria*)的多肉植物。外观肉质叶排成紧密的莲座状,植株肥厚多汁,背面突起呈龙骨状,叶长 3~4 cm,宽约 3 cm,叶片呈先端急尖状。由于外观造型独特,质感特殊,备受多肉植物爱好者收集和栽培。

多肉植物育性较差,大多采用扦插、分株、嫁接等方法繁殖,但存在繁殖周期较长、繁殖系数低等缺点^[1-3]。植物组织培养技术,具有人为控制培养条件,生长周期短、繁殖率高,经济效益高等优点,可用于多肉植物的繁殖。近年来,多肉植物的组织培养相关研究报道的有景天科的劳尔、褐斑伽蓝,百合科的西山寿,日光兰科的水晶掌等^[4-6],但尚未见大和锦组组织培养再生体系研究相关报道。多肉植物不同种类、品种间对于培养基的要求差异较大,本研究以多肉植物大和锦叶片为外植体,研究不同消毒方式、植物生长激素配比对大和锦愈伤组织诱导、分化过程的影响,以期为大和锦的生物学研究及推广利用提供参考依据及技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为大和锦,选取大和锦叶片为外植

体(图 1),采自于齐齐哈尔大学生命科学与农林学院植物培养室中。



图 1 大和锦植株与叶片

Fig.1 The plant and leaf of *Echeveria purpurorum* Berger

1.2 方法

1.2.1 培养基的配置 采用 MS 培养基为基本培养基,pH 为 5.8~6.0,煮沸后分装到锥形瓶,放入灭菌锅 121 ℃,灭菌 20 min。

1.2.2 外植体的消毒 为了选择较为适宜的消毒方式,本试验通过对消毒时间和消毒试剂的调整,观察其对污染率的影响。配制出基本 MS 培养基,采用 10 组不同的消毒方式进行消毒(表 1),接种后每隔 5 d 观察并记录,培养 40 d 后统计污染率,污染率(%)=污染数/接种数×100,重复 5 次,选择出最适宜的消毒方式。

1.2.3 愈伤组织诱导条件的筛选 将无菌的大和锦叶片切分成 4 瓣,分别接种于不同配方培养基上诱导萌芽,诱导培养基以 MS 为基本培养基,加入不同浓度的 6-BA、NAA、KT,采用正交法进行了三因素三水平试验筛选。将消毒好的叶片接

收稿日期:2018-03-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31701958);黑龙江省大学生创新创业资助项目(201610221018);黑龙江省高等教育学会“十三五”高等教育科研课题资助项目(16Q154,16Q159)。

第一作者简介:石振杰(1995-),在读学士,从事园林植物逆境生理研究。E-mail:18814665541@163.com。

通讯作者:金一锋(1984-),男,硕士,讲师,从事园林植物抗逆生理研究。E-mail:jinyifeng8368215@126.com。

种于上述培养基中。每瓶接种 2 个叶片,设 15 次重复。观察愈伤组织的生长情况并记录,计算每个处理组合下愈伤组织的诱导率,并拍摄照片。愈伤组织诱导率(%)=(愈伤组织数/总植物叶片数)×100。

1.2.4 数据分析 采用 Excel 2007 进行数据处理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对大和锦愈伤组织诱导的影响

在 MS 基本培养基上进行接种,接种 7 d 后

观察污染率、叶片的颜色以及叶片的生长状况,由表 1 可知,随着 NaClO 消毒时间的增长,污染率逐渐降低,但是第 5 组 75%乙醇 30 s+1%NaClO 20 min会导致叶片发黑、生长状况不佳即叶片死亡;随着酒精的消毒时间增长,污染率降低,但是叶片的生长状况不如 75%酒精 30 s 的生长状况良好,而且第 8 组 75%乙醇 40 s+1%NaClO 17 min也出现了叶片死亡。综上所述,得到最佳消毒叶片的消毒方式为 75%乙醇 30 s+1%NaClO 17 min 污染率最低,为 10.00%。

表 1 不同消毒方式对愈伤组织诱导的影响

Table 1 The effect of different disinfection methods on callus induction

序号 No.	消毒时间 Disinfection time		接种数 Inoculation No.	污染数 Pollution No.	污染率/% Pollution rate	生长状态 Growth state
	75%乙醇/s	1%NaClO/min				
1	30	10	30	21	70.00	+
2	30	13	30	16	53.33	+
3	30	15	30	8	26.67	+
4	30	17	30	3	10.00	+
5	30	20	30	0	0	-
6	40	10	30	18	60.00	+
7	40	13	30	14	46.67	+
8	40	15	30	7	23.33	+
9	40	17	30	0	0	-
10	40	20	30	0	0	-

“+”代表叶片正常;“-”代表叶片死亡。
‘+’represent normal leaves;‘-’represent dead leaves.

2.2 不同激素浓度对大和锦愈伤组织诱导的影响

由表 2 可知,在培养基中添加不同激素浓度配比下愈伤组织诱导率不同,不同浓度的 6-BA、NAA、KT 混合对叶片产生愈伤组织有较大影响,当 3.0 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹KT 时,愈伤组织诱导率最低,为 13.33%,且愈伤组织质量差;当 2.0 mg·L⁻¹6-BA+0.2 mg·L⁻¹NAA+1.0 mg·L⁻¹KT 时,愈伤组织诱导率最高,为 76.67%,愈伤组织生长长势良好;当 3.0 mg·L⁻¹6-BA+0.1 mg·L⁻¹NAA+1.0 mg·L⁻¹KT 时,愈伤组织诱导率 70.00%,但愈伤组织质量最优(图 2)。综上得出,3.0 mg·L⁻¹6-BA+0.1 mg·L⁻¹NAA+1.0 mg·L⁻¹KT 培养下,出愈

率与质量都较好,适于诱导大和锦愈伤组织,为后续分化出芽做准备。

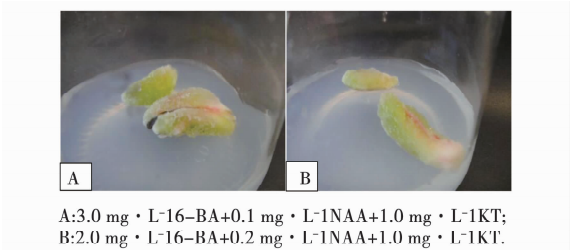


图 2 不同激素浓度对大和锦叶片诱导愈伤组织的影响
Fig.2 The effect of different hormone concentrations on callus induction

2.3 不同生长调节剂对大和锦愈伤组织分化新芽的影响

由表 3 可知,当 6-BA 浓度为 3.0 mg·L⁻¹,随

着 NAA 浓度的增加,愈伤组织分化新芽的分化率呈上升的趋势。培养 45 d 后,MS + 3.0 mg·L⁻¹6-BA+0.2 mg·L⁻¹NAA 的分化效果最好,平均分化率达 53.33%,愈伤组织块可生成

多个芽,且分化出的新芽翠绿健壮,生长十分旺盛(图 3)。综上可知,本试验中大和锦愈伤组织新芽分化率较高的组合为 MS + 3.0 mg·L⁻¹6-BA+0.2 mg·L⁻¹NAA。

表 2 不同激素浓度对大和锦愈伤组织诱导的影响

Table 2 The effect of different hormone concentrations on callus induction

编号 No.	浓度/(mg·L ⁻¹) Concentration			接种数 Inoculation No.	诱导数 Induced No.	诱导率/% Induced rate	生长状态 Growth state
	6-BA	NAA	KT				
1	2.0	0	0	30	8	26.67	+
2	2.0	0.1	0.5	30	11	36.67	++
3	2.0	0.2	1.0	30	23	76.67	++
4	3.0	0	0.5	30	4	13.33	+
5	3.0	0.1	1.0	30	21	70.00	+++
6	3.0	0.2	0	30	7	23.33	+
7	4.0	0	1.0	30	5	16.66	+
8	4.0	0.1	0	30	10	30.00	++
9	4.0	0.2	0.5	30	6	20.00	+

“+”代表长势一般;“++”代表长势良好;“+++”代表长势优。
‘+’represent general growth;‘++’represent favourable growth;‘+++’represent good growth.

表 3 不同激素浓度组合对愈伤组织新芽分化的影响

Table 3 The effect of different hormone concentrations on callus differentiation

编号 No.	6-BA 浓度/ (mg·L ⁻¹)	NAA 浓度/ (mg·L ⁻¹)	分化率/% Differentiation rate
	6-BA concentration	NAA concentration	
1	2.0	0	0
2	2.0	0.1	6.67
3	2.0	0.2	20.00
4	3.0	0	0
5	3.0	0.1	13.33
6	3.0	0.2	53.33

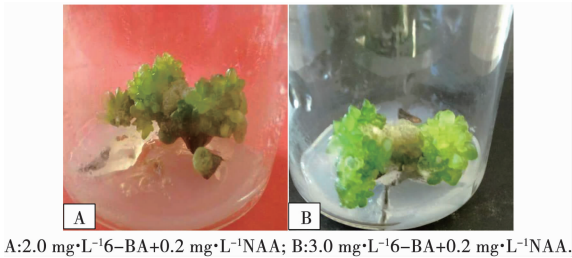


图 3 不同激素浓度对愈伤组织新芽分化的影响
Fig. 3 The effect of different hormone concentrations on callus differentiation

3 讨论与结论

植物组织培养通过无菌操作可快速便捷的获得再生的完整植株^[7-8],多肉植物其植株肥厚多汁、形状多样,实际操作中对多肉植物外植体材料需要进行严密的消毒处理,以便获得无菌的愈伤组织。外植体的消毒过程应该进行有效的筛选,不同的消毒处理对外植体产生的效果不同,不当的消毒方法有可能造成外植体表面的微生物未彻底杀死导致其污染率得不到有效控制,若消毒时间过多,不仅外植体表面微生物彻底杀死,也会影响外植体自身的细胞活性,使外植体失去活力不能诱导产生愈伤组织。本研究中针对外植体消毒方法进行了有效筛选,最终 75%乙醇浸泡 30 s、1% NaClO 浸泡 17 min 处理后,污染率得到有效的控制,外植体活力也较好。研究洋甘菊^[9]的外植体消毒发现污染率与外植体活力受 5% NaClO 的消毒时间的影响,延长消毒时间会造成组织细胞被杀死,严重影响诱导率,这与本研究消毒处理筛选结果相似。

植物生理生化过程受到生长调节物质的调控影响,其中生长素和细胞分裂素两类激素起主要

作用,不同的激素配比对愈伤组织的诱导与分化结果影响显著^[10-13]。在激素及其配比方面,本研究表明 MS+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ KT,获得的愈伤组织质量最佳,其中仅 6-BA 和 NAA 配比时出愈率较低,含有适宜配比的 6-BA、NAA、KT 培养基有利于愈伤组织的形成,这与多肉植物劳尔、克里克特寿、美吉寿、寿锦等叶片诱导愈伤组织研究结果一致^[14-15]。本研究 6-BA 和 NAA 对大和锦愈伤组织分化芽的效果显著,当 6-BA 浓度一定时分化率随着 NAA 浓度增加而增加,NAA 浓度的增加有助于分化出新芽,最佳的分化培养基为 MS+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA。本研究利用大和锦叶片为外植体诱导产生大量愈伤组织,愈伤组织再分化形成新芽,得到大量再生芽,为后续扩大大和锦无菌植株数量的生产奠定一定理论基础。

参考文献:

- [1] 胡莹冰,沈守云. 多肉植物的景观应用及发展趋势[J]. 广东农业科学,2013(12):46-48.
- [2] 刘与明,张淑娟. 珍稀多肉植物种质资源组培保存和快速繁殖技术[J]. 园林科技,2012(1):8-11.
- [3] 袁同印. 多肉植物的应用及发展[J]. 现代园艺,2014(15):86-87.
- [4] 刘芳,唐映红,袁有美,等. 多肉植物劳尔的组织培养[J]. 植物学报,2016,51(2):251-256.
- [5] 左志宇,李建希,安晓云,等. 克里克特寿的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2007(2):311-312.
- [6] 黄清俊,丁雨龙,谢维荪. 水晶掌花萼离体培养及其试管苗无性系的建立[J]. 上海农业学报,2004(20):19-23.
- [7] 龙文兴,杨小波,戚美英,等. 芦荟组织培养研究进展[J]. 亚热带植物科学,2007,36(1):70-74.
- [8] 高越,王娅欣,孙涛,等. 毛玉露的组织培养与快速繁殖[J]. 生物学通报,2010,45(6):54-55.
- [9] 刘晓梦,孟想想,张威威,等. 洋甘菊的组织培养技术[J]. 北方园艺,2018(2):72-76.
- [10] 王紫珊,王广东,王雁. 多肉植物白银寿‘奇迹’的离体培养与快速繁殖[J]. 基因组学与应用生物学,2014,33(6):1329-1335.
- [11] 孙涛,李德森. 截形十二卷的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2002,38(6):586.
- [12] 黄清俊,肖祥春,丁雨龙,等. 多肉植物米邦塔仙人掌微型繁殖[J]. 江西林业科技,2003(1):2-3.
- [13] 王冬梅,黄学林,黄上志. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学报,1996,32(5):373-377.
- [14] 王泉,左志宇,宋晓涛,等. 百合科多肉植物美吉寿的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2008,44(1):123-124.
- [15] 王燕,牟豪杰,吕永平,等. 寿锦的离体植株再生及组培产业化增殖[J]. 植物学报,2017,52(3):331-336.

Tissue Culture Technique for Succulent Plant *Echeveria purpurorum* Berger

SHI Zhen-jie¹, JIN Yi-feng¹, CHEN Yang¹, WANG Xun¹, CHENG Mei-ling¹, SUN Hua-shan²

(1. College of Life Science and Agriculture, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Preservation of Biodiversity in Cold Areas, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 2. College of Horticulture and Garden, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: With *Echeveria purpurorum* Berger leaves as explant materials, this study investigated the effect of different disinfection measures and different hormone concentration ratios on callus induction and bud differentiation of *Echeveria purpurorum* Berger, so as to provide a certain reference for the establishment of a rapid regeneration system of *Echeveria purpurorum* Berger and the modification of *Echeveria purpurorum* Berger. The results showed that the optimal disinfection measure was washing with sterile water for 1 h, immersion with 75% ethanol for 30 s and immersion with 1% sodium hypochlorite for 17 min for healthy *Echeveria purpurorum* Berger leaves, with a contamination rate of 10.00%. The optimal culture medium for inducing callus of *Echeveria purpurorum* Berger was MS+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ KT, and the optimal culture medium for differentiating callus to buds was MS+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA.

Keywords: *Echeveria purpurorum* Berger; callus; disinfection measures