

# 多肉植物雪国万象叶片诱导组培苗生产体系的建立

轩华强 朱方平 张 伟

(山东省聊城市农业科学研究院,聊城 252000)

**摘要:**探讨了利用雪国万象叶片来进行组织培养生产种苗。选取雪国万象成熟叶片为材料,在MS培养基中添加不同浓度和比例的激素来进行组织培养。结果表明,适于叶片诱导愈伤组织的培养基是MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L;适于愈伤组织继代培养的培养基为MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;适于愈伤组织分化的培养基为MS+NAA 0.15 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;适于生根的培养基为MS+NAA 0.3~0.5 mg/L。

**关键词:**万象;雪国;叶片诱导;组培苗

万象(*Haworthia maughanii*)是百合科瓦苇属珍稀名种,又名象脚草、毛汉十二卷。万象株高4~8cm,无茎,有粗壮的肉质根,叶肉质圆筒状,成松散莲座状排列,叶顶端截形,大多数呈圆形,“窗”半透明,位于叶顶端的截面处,“窗”面布有白色条纹。万象株型奇特,有很好的观赏性<sup>[1]</sup>。雪国万象是由日本育种家通过杂交改良繁殖出的万象品种,其特征是大窗和发散状的白纹,具有很高的观赏价值。

因万象自交不亲和,利用种子繁殖比较困难。常规繁殖方法有分株、叶插,但繁殖速度慢,而且对母体的损伤比较大,小苗的成活率也不高<sup>[2]</sup>,年繁殖率只有1:3左右,这使得种苗稀缺,另外由于分株、叶插获得的小苗生长较为缓慢,致使供求失衡<sup>[3]</sup>,行业发展受到限制。采用组织培养的方式能够快速获得大量优质种苗,而且能够保持品种纯度,增加市场竞争力。关于万象组培国内外已有不少报道,但是大都是用花梗作为外植体进行组培,用雪国万象叶片作为外植体进行组培的尚未见报道。

本研究通过对雪国万象的叶片组织培养,寻找最适宜的培养基及各激素水平,以期部分多肉植物的工厂化生产育苗与品种改良提供理论基础和实践依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 试验材料** 雪国万象取自山东省聊城市农业科学院生物工程中心一号温室,取长势良好的健康叶片为外植体。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体消毒** 将洗涤处理好的叶片在超净

台上先用75%的酒精快速浸泡30s,用无菌水洗涤2次,再用加有2滴吐温-80的升汞处理8min。然后用无菌水洗涤5次,每次洗涤时间控制在3~4min。消毒后,用消毒镊子和刀片将叶片切成1cm左右的小块,接种到不同激素配比的诱导培养基上。

**1.2.2 愈伤组织诱导** 将不同浓度的NAA(萘乙酸)、6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)组合与不同浓度的6-BA、2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)组合添加于MS基本培养基(MS+3.0%蔗糖+0.55%琼脂,pH5.86)中进行试验。NAA设置3个浓度,分别是0.10mg/L、0.20mg/L、0.30mg/L;6-BA设置3个浓度,分别是1.50mg/L、2.00mg/L、2.50mg/L;2,4-D设置3个浓度,分别是0.20mg/L、0.50mg/L、1.00mg/L。

**1.2.3 愈伤组织继代培养** 将不同浓度的NAA、6-BA组合添加于MS基本培养基(MS+3.0%蔗糖+0.55%琼脂,pH5.86)中进行试验。NAA设置4个浓度,分别是0.05mg/L、0.10mg/L、0.15mg/L、0.20mg/L;6-BA设置4个浓度,分别是0.50mg/L、1.00mg/L、1.50mg/L、2.00mg/L。

**1.2.4 愈伤组织分化** 愈伤组织中颜色较绿的部分增殖能力较强<sup>[4]</sup>,在愈伤组织继代培养中可得到大量愈伤组织,将其绿色较深部位切成小块,接种到诱导不定芽分化的培养基中。分化培养基中添加NAA和6-BA。NAA设置3个浓度,分别是0.05mg/L、0.10mg/L、0.15mg/L;6-BA设置3个浓度,分别是0.50mg/L、1.00mg/L、1.50mg/L。

**1.2.5 生根培养基筛选** 当苗长到1.5~2.0cm时,

将苗移到生根培养基上进行诱导生根<sup>[5]</sup>。本试验研究不同浓度 NAA 和 IBA (吲哚丁酸) 2 种生长素对雪国万象组培苗生根的影响。分别将不同浓度的 NAA 和 IBA 添加于 1/2 MS 基本培养基(1/2 MS+3.0% 蔗糖 +0.55% 琼脂, pH5.86) 中进行试验, NAA 和 IBA 均设置 7 个浓度, 分别是 0.10mg/L、0.20mg/L、0.30mg/L、0.40mg/L、0.50mg/L、0.60mg/L、0.70mg/L。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素配比对叶片愈伤组织的诱导的影响

在叶片诱导愈伤组织培养基中接种灭菌后的叶片, 最初叶片会有一定程度的生长, 约 10d 后叶片开始膨大, 25d 后会有黄绿色的颗粒状愈伤组织在叶片的伤口或者边缘处产生。之后, 愈伤组织不断增加, 逐渐覆盖整个叶片, 30d 后统计叶片愈伤组织的诱导情况, 结果见表 1。

表 1 不同浓度 NAA、6-BA 组合与 6-BA、2,4-D 组合对叶片愈伤组织诱导的影响

激素浓度 (mg/L)			接种数	形成愈伤数	愈伤诱导率 (%)
NAA	6-BA	2,4-D			
0.10	1.50	0	50	26	52
0.20	1.50	0	50	36	72
0.30	1.50	0	50	45	90
0.10	2.00	0	50	46	92
0.20	2.00	0	50	40	80
0.30	2.00	0	50	35	70
0.10	2.50	0	50	26	52
0.20	2.50	0	50	49	98
0.30	2.50	0	50	32	64
0	1.50	0.20	50	23	46
0	1.50	0.50	50	34	68
0	1.50	1.00	50	32	64
0	2.00	0.20	50	42	84
0	2.00	0.50	50	41	82
0	2.00	1.00	50	35	70
0	2.50	0.20	50	32	64
0	2.50	0.50	50	27	54
0	2.50	1.00	50	24	48

通过表 1 可以看出, 当 NAA 和 6-BA 以不同浓度组合时, 叶片均能在 9 种培养基中诱导出愈伤组织, 但愈伤组织在生长情况和诱导率方面有明显差异。其中 NAA 0.20mg/L+6-BA 2.50mg/L 培养基诱导出的愈伤组织长势最好, 诱导率也最高, 达到 98%。该处理愈伤组织颜色为深绿色且排列紧密,

有的已经分化出芽。

当 6-BA 和 2,4-D 以不同浓度组合时, 这 9 种培养基均能诱导产生愈伤组织, 而且可以看出 6-BA 2.00mg/L+2,4-D 0.20mg/L 培养基的诱导率比其他培养基高。

比较这 2 种组合, NAA 和 6-BA 配比其愈伤组织诱导率的平均效果明显好于 6-BA 和 2,4-D 配比。

### 2.2 不同浓度的激素比对叶片愈伤组织继代培养的影响

将诱导出的愈伤组织切成小块转移到继代培养基上进行继代培养, 60d 后观察不同浓度生长激素组合的培养基中愈伤组织的生长情况, 见表 2。

表 2 不同浓度 NAA、6-BA 组合对叶片愈伤组织继代培养的影响

激素浓度 (mg/L)		接种愈伤数	增殖的愈伤数	增殖率 (%)
NAA	6-BA			
0.05	0.50	50	9	18.0
0.10	0.50	50	16	32.0
0.15	0.50	50	20	40.0
0.20	0.50	50	22	44.0
0.05	1.00	50	30	60.0
0.10	1.00	50	38	76.0
0.15	1.00	50	32	64.0
0.20	1.00	50	31	62.0
0.05	1.50	50	30	60.0
0.10	1.50	50	28	56.0
0.15	1.50	50	26	52.0
0.20	1.50	50	22	44.0
0.05	2.00	50	18	36.0
0.10	2.00	50	15	30.0
0.15	2.00	50	10	20.0
0.20	2.00	50	8	16.0

从表 2 中看出, 一方面, 愈伤组织的增殖率随着 NAA 浓度的增加, 平均增殖率先升高后逐渐降低, 在浓度为 0.05mg/L 时平均增殖率为 43.5%, 当浓度为 0.10mg/L 时平均增殖率最高为 48.5%, 当浓度为 0.20mg/L 时平均增殖率最低为 41.5%; 另一方面, 愈伤组织的增殖率随着 6-BA 的浓度从 0.50mg/L 增加到 2.00mg/L, 先增加后降低, 在浓度为 1.00mg/L 时, 平均增殖率最高为 65.5%。结合上述分析, 当 NAA 浓度为 0.10mg/L、6-BA 浓度为 1.00mg/L 时, 增殖率最高, 为愈伤组织最佳的增殖培养基。

### 2.3 不同浓度的激素对比对愈伤组织分化的影响

将诱导出的健康的愈伤组织切成小块,转移到分化培养基上进行培养。经过 30d 培养后,愈伤组织上先是长出颗粒状浅绿色芽点,之后随培养时间的增

加,芽点不断生长,成为不定芽,接着不定芽继续生长,逐渐长成叶片。在不定芽生长过程中,有根从基部长出,不定芽即成长为一株幼苗。再培养 30d,不定芽叶腋中长出丛生芽成为丛生苗(表 3)。

表 3 不同浓度 NAA、6-BA 组合对愈伤组织分化的影响

激素浓度(mg/L)		接种愈伤数	愈伤分化数	分化率(%)	诱导愈伤组织分化情况
NAA	6-BA				
0.05	0.5	50	3	6	愈伤组织分化较慢,颜色偏黄,基本无不定芽分化
0.10	0.5	50	4	8	愈伤组织分化较慢,颜色偏黄,基本无不定芽分化
0.15	0.5	50	9	18	愈伤组织分化较慢、较少,颜色偏黄,很少有不定芽发生
0.05	1.00	50	25	50	愈伤组织分化较慢、较少,颜色偏黄,有不定芽发生
0.10	1.00	50	38	76	愈伤组织分化较快、较多,颜色黄绿,不定芽分化较多,苗较细
0.15	1.00	50	41	82	愈伤组织分化较快、较多,颜色黄绿,不定芽分化也较多,苗较健壮
0.05	1.50	50	35	70	愈伤组织分化较快、较好,颜色偏黄,不定芽分化多,生长快,苗较细
0.10	1.50	50	22	44	愈伤组织分化较慢、较少,颜色偏黄,有不定芽发生,苗较细
0.15	1.50	50	18	36	愈伤组织分化较慢,颜色偏黄,不定芽分化少,苗细弱

由表 3 可见,在 6-BA 与 NAA 配合使用的培养基上,愈伤组织颗粒都有不同程度的分化。以 MS 基本培养基+NAA 0.15mg/L+6-BA 1.00mg/L 培养基上培养的愈伤组织分化效果最好,其分化率达到 82%,而且不定芽的长势较好。

### 2.4 不同浓度的生根激素对不定根诱导的影响

选用 1/2 MS 培养基,当无菌芽增殖形成丛生芽,每株约有 2~4 个芽,且高度达到 1.5~2.0cm 时,分别接入不同浓度的 NAA 和 IBA 生根培养基中,进行生根诱导试验,结果见表 4。

表 4 不同浓度 NAA 和 IBA 对生根的影响

激素	激素浓度(mg/L)	处理株数	平均生根数	生根率(%)
NAA	0.10	50	1	88
	0.20	50	2	91
	0.30	50	5	96
	0.40	50	6	94
	0.50	50	7	95
	0.60	50	2	90
	0.70	50	1	89
IBA	0.10	50	2	85
	0.20	50	2	90
	0.30	50	4	93
	0.40	50	6	96
	0.50	50	6	95
	0.60	50	3	90
	0.70	50	1	90

观察发现,NAA 和 IBA 2 种生长素诱导生根的生根率最高的均是 96%,在 IBA 浓度为 0.10mg/L 时最低生根率为 85%,生根率达到 90% 的有 11 个处理。试验表明,当 NAA 和 IBA 浓度为 0.30~0.50mg/L 时,生根率均高于其他浓度。在接种 10d 后,有些是从接种芽的基部切口处开始长出黄白色的愈伤组织,继而再生出幼根,此外,还有些接种后不产生愈伤组织而直接长出乳白色的幼根,呈鸡爪状,一般在 3 条以上,多的可达到 6~7 条。因此表明在 NAA 或 IBA 浓度为 0.30~0.50mg/L 条件下,1/2 MS 基本培养基+NAA 或者 1/2 MS 基本培养基+IBA 都适宜组培苗生根培养。

## 3 结论与讨论

**3.1 主要结论** (1)适于叶片诱导愈伤组织的培养基是 MS 基本培养基+NAA 0.20 mg/L+6-BA 2.50mg/L。(2)在对愈伤组织进行继代培养过程中发现,最适培养基为 MS 基本培养基+NAA 0.10mg/L+6-BA 1.00mg/L。(3)在愈伤组织的分化过程中发现,愈伤组织分化培养的最适培养基为 MS 基本培养基+NAA 0.15mg/L+6-BA 1.00mg/L,愈伤组织的分化率达 82%。(4)适于生根的培养基为 1/2 MS 基本培养基+NAA 0.30~0.50mg/L 或者 1/2 MS 基本培养基+IBA 0.30~0.50mg/L,生根率达 93% 及以上。

**3.2 讨论** (1)愈伤组织的增殖数对愈伤组织的

# 大豆不育系及其同型保持系生殖 生长期生理特性比较研究

迟晓雪 郑根昌 李志刚 张冬梅 刘鹏

(内蒙古民族大学农学院,通辽 028000)

**摘要:**为分析不育系及其同型保持系生殖生长期的生理特性差异,选用高、中、低异交率的大豆不育系及其同型保持系为材料,通过测量各时期叶片的超氧化物歧化酶活性、可溶性蛋白含量、可溶性糖含量以及淀粉含量,比较分析不育系及其同型保持系各生理指标在各时期的差异。结果表明:R5期后,大豆不育系的各生理指标开始与其同型保持系产生差异;R7期,不育系的超氧化物歧化酶活性低于其同型保持系,可溶性蛋白含量高于其同型保持系,中异交率和低异交率不育系可溶性糖含量以及淀粉含量显著高于高异交率不育系和3个相应的保持系。这些差异与大豆不育系的源大库小、持绿、子粒皱缩等现象等密切相关。

**关键词:**大豆不育系;生理指标;生育时期

大豆起源于中国,中国是世界上种植和利用大豆历史最悠久的国家。孙寰等<sup>[1-3]</sup>,赵丽梅等<sup>[4]</sup>于1985年在地方品种“汝南天鹅蛋”中发现不育细胞质,在1993年育成雄性不育系及其同型保持系,并

**基金项目:**内蒙古自治区科技计划项目2017;内蒙古自治区饲用作物工程技术研究中心开放课题(MDK2017004);通辽市与内蒙古民族大学合作项目(SXZX2017006);内蒙古民族大学硕士研究生科研创新项目(NMDSS1758)

**通信作者:**刘鹏

影响。从相关资料(R.M.Gosulsonda等<sup>[6]</sup>,K.Kaul等<sup>[7]</sup>)来看,诱导形成的愈伤组织会在转接到新的培养基上之后继续进行增殖,但这种增殖不是无限进行的,它会在一段时间后停止,甚至会受到损伤,这时就需要将愈伤组织切成小块,继续转接到新鲜的培养基上进行增殖生长,这可能与愈伤组织在增殖过程中分泌的代谢产物有关,这些代谢产物积累之后会影响愈伤组织对营养物质的吸收,甚至会对愈伤组织产生毒害作用,从而使愈伤组织停止增殖,更严重者可能会老化、褐化,甚至死亡。这与本试验中的现象基本上是一致的。(2)在试验过程中,虽然探讨了利用万象叶片在不同激素配比和不同激素浓度下对组培成功率的影响,但是没有探讨温度、光照等环境因素的影响,在以后的研究中,还要继续探讨温度、光照等环境因素对组培过程的影响。

于1995年实现三系配套。至此,中国在杂交大豆育种领域又跨上了一个新的阶梯。之后,李磊等<sup>[5]</sup>、赵丽梅等<sup>[6]</sup>、彭宝等<sup>[7-9]</sup>、盖钧镒等<sup>[10]</sup>也陆续发现了不育细胞质并育成了雄性不育系,实现了三系配套。所以,我国大豆杂种优势的利用在世界杂交大豆育种中占有绝对的优势。本研究选用3种异交率的不育系及其同型保持系作为材料,对不同材料生殖生长期的生理特性进行比较分析,揭示不育系与其同

## 参考文献

- [1] Xu Z H, Chong K. Plant developmental biology in China : past, present and future[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44 ( 9 ): 1085-1095
- [2] 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
- [3] 朱天华, 陆锦明, 孙清, 等. 十二卷类植物的离体培养技术研究[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30 ( 3 ): 45-48
- [4] 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]. 植物生理学报, 2007, 43 ( 2 ): 311-312
- [5] 韩文璞, 袁明莲. 黄金梨的组织培养和快繁研究[J]. 落叶果树, 2001, 33 ( 2 ): 7-8
- [6] Gosukonda R M, Porobodessai A, Blay E, et al. Thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration of sweetpotato (Ipomoea batatas) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1995, 31 ( 2 ): 65-71
- [7] Kaul K, Sabharwal P S. In vitro induction of vegetative buds on inflorescence segments of Haworthia[J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 1970, 26 ( 4 ): 433-434

(收稿日期: 2018-05-18)