

# “勿忘我”丛生芽诱导及植株再生

王淑敏, 高永闯, 李晓云 (廊坊师范学院生命科学学院, 河北廊坊 065000)

**摘要** [目的] 研究“勿忘我”丛生芽诱导及植株再生。[方法] 以勿忘我为试材, 取其茎尖、叶片和下胚轴为外植体, 进行丛生芽诱导试验。[结果] 用茎尖作外植体产生丛生芽数量最多; 以 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 诱导成苗率最高, 芽苗健壮; 生根阶段以 1/2MS + IBA 0.2 mg/L 生根效果最好, 生根率可达 100%。[结论] 研究勿忘我丛生芽诱导及植株再生具有一定的实践意义和应用价值。

**关键词** 勿忘我; 丛生芽; 再生植株

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)31-10842-03

## Study on Cluster Bud Induction and Plant Regeneration of *Myosotis sylvatica*

WANG Shu-min, GAO Yong-chuang, LI Xiao-yun (College of Life Science, Langfang Teachers University, Langfang, Hebei 065000)

**Abstract** [Objective] The aim was to study cluster bud induction and plant regeneration of *Myosotis sylvatica*. [Method] Using *Myosotis sylvatica* as test materials, cluster bud induction was carried out taking its stem tip, leaf and hypocotyl as explant. [Result] Cluster bud induction number was the largest using stem tip as explant. MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L induction rate was highest, and bud seedling was strong; 1/2 ms + IBA 0.2 mg/L rooting effect was best in rooting stage, and rooting rate could reach 100%. [Conclusion] Studying cluster bud induction and plant regeneration of *Myosotis sylvatica* had certain practical.

**Key words** *Myosotis sylvatica*; Cluster bud; Plant regeneration

勿忘我 (*Limonium sinuatum* (L.) Mill) 属蓝雪科 (Plumbaginaceae) 补血草属 (*Limonium*) 多年生或二年生草本植物, 原产地中海沿岸地区, 株高可达 1.1 m, 花色繁多, 具有天然干花的特性, 花瓣含水量低, 富有蜡质, 在植株体上呈现出干燥的蜡质或纸质的特色, 可以长期保持美丽的花色和花型, 是目前天然干花类中作切花批量生产的花之一<sup>[1]</sup>, 也可在野生园林中作露地栽培, 或剪下作小插花中主花的配花<sup>[2]</sup>。药理研究表明, 勿忘我花茶含有丰富的维生素 C, 可延缓细胞衰老, 提高机体免疫能力, 抗病毒, 抗癌防癌并能美白肌肤, 具有护肤养颜、补肾提神、健胃开胃、调节血脂减肥、促进新陈代谢等功能<sup>[3]</sup>。

补血草属植物具有大量的不孕枝和同型杂交不孕的特性, 种子结实少, 若用种子繁殖, 种子来源的可靠性限制了批量生产<sup>[2]</sup>。因此研究勿忘我丛生芽诱导及植株再生具有一定的实践意义和应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及处理

**1.1.1 试验材料。** 选取饱满无虫害的勿忘我种子。

**1.1.2 消毒方法。** 将勿忘我种子, 用无菌水冲洗 3 次, 再用 75% 乙醇消毒 30~40 s, 无菌水冲洗 5 次, 分别用 0.1% 升汞、2% 次氯酸钠消毒处理, 具体为: ① 0.1% 升汞 5 min; ② 0.1% 升汞 7 min; ③ 0.1% 升汞 9 min; ④ 2% 次氯酸钠 8 min; ⑤ 2% 次氯酸钠 13 min; ⑥ 2% 次氯酸钠 18 min。

每次处理完用无菌水冲洗 8~10 次, 每次 1 min。然后将无菌种子种植在放有滤纸的无菌瓶和 MS 固体培养基中, 置恒温培养室中 23 ℃ 培养, 待发育成无菌苗。15 d 后统计发芽率、污染率。

发芽率 = (发芽种子数/接种种子数) × 100%

污染率 = (污染种子数/接种种子数) × 100%

## 1.2 培养基

**1.2.1 丛生芽诱导培养基。** A<sub>1</sub>: MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L; A<sub>2</sub>: MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L; A<sub>3</sub>: MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L。

**1.2.2 生根培养基。** B<sub>0</sub>: 1/2 MS; B<sub>1</sub>: 1/2 MS + IBA 0.2 mg/L; B<sub>2</sub>: 1/2 MS + IBA 0.4 mg/L; B<sub>3</sub>: 1/2 MS + IBA 0.6 mg/L。

**1.3 丛生芽诱导** 分别取勿忘我的下胚轴 (长 0.5 cm)、茎尖 (长 1 cm)、子叶 (0.5 cm × 0.5 cm) 作为外植体, 3 种外植体均接种到 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 培养基上, 在各培养基上接种 30 个, 接种后在 24 ℃ 下培养进行丛生芽诱导<sup>[4-6]</sup>。

**1.4 生根与植株再生** 剪取健壮的单芽 (长 1.5~2.0 cm), 分别接种到 B<sub>0</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 培养基上进行生根。

## 2 结果与分析

**2.1 种子消毒结果** 不同材料所用消毒液不同, 消毒效果也不同。对于勿忘我种子而言, 消毒效果最好的是升汞, 但处理时间过长易把种子杀死。首先取空白对照组, 不加处理的勿忘我种子的发芽率为 69%, 污染率为 71%。由表 1 可知, 0.1% 的升汞和 2% 的次氯酸钠对勿忘我种子的消毒效果都很好, 没有污染, 并在特定的消毒时间段内, 对种子的活性影响也较小。由此可知, 使用次氯酸钠对勿忘我种子消毒更适宜, 尤以消毒 8 min 为宜, 处理后对种子萌发率影响不大。勿忘我种子在接种 15 d 后即可长成绿色健壮的无菌苗。

表 1 不同消毒时间的灭菌效果

处理	消毒方法	接种数	污染率	萌发率
			%	%
①	75% 乙醇 30 s + 0.1% 升汞 5 min	30	0	63
②	75% 乙醇 30 s + 0.1% 升汞 7 min	30	0	61
③	75% 乙醇 30 s + 0.1% 升汞 9 min	30	0	58
④	75% 乙醇 30 s + 2% 次氯酸钠 8 min	30	0	67
⑤	75% 乙醇 30 s + 2% 次氯酸钠 13 min	30	0	65
⑥	75% 乙醇 30 s + 2% 次氯酸钠 18 min	30	0	62

注: 表中数据为 14 d 后统计结果。

**作者简介** 王淑敏 (1965-), 女, 河北安国人, 副教授, 从事植物学方面的研究。

**收稿日期** 2014-09-17

**2.2 不同外植体对不定芽形成的影响** 以茎尖为外植体,在基部膨大形成球状愈伤组织,随后产生大量丛生芽,速度最快的接种 20 d 后即有芽点形成;以茎段为外植体,茎段整体膨大,未产生丛生芽;以子叶为外植体,未形成芽。不同外植体对不定芽诱导效果影响很大,出芽情况以茎尖出芽率最高,而茎段和子叶则不能诱导出丛生芽。

**2.3 不同浓度的 6-BA 对茎尖丛生芽诱导的影响** 接种后茎尖在下端边缘开始膨大增厚,继而周围出现浅绿色颗粒状突起,约 25 d 后,这些突起继续生长成淡绿色小芽。由表 2 可知,茎尖丛生芽发生数量随 6-BA 浓度的升高而增多。从生长状态来看, A<sub>3</sub> 培养基所诱导的芽虽然在所有培养基中的芽数最多,但其芽的质量较其他培养基而言不高(图 2),表明虽然 6-BA 打破了其顶端优势,但其各个丛生芽的生长点不突出,芽的健壮程度也较低。综合来看, A<sub>2</sub> 培养基上的芽生长最好,出芽率适中,芽也健壮(图 1)。故在茎尖丛生芽的诱导中,6-BA 的浓度以 1.0 mg/L 为宜。

表 2 不同浓度 6-BA 对勿忘我茎尖丛生芽诱导的影响

培养基	外植体数	诱导率//%	平均芽数
A <sub>1</sub>	30	100	3.8
A <sub>2</sub>	30	100	4.5
A <sub>3</sub>	30	100	5.1

注:表中数据为 35 d 后统计结果。

**2.4 不同浓度的 6-BA 对子叶丛生芽诱导的影响** 子叶作为外植体接种到培养基上后无变化,随着时间的推移子叶出现不同程度的褐化。在 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 和 A<sub>3</sub> 培养基中,子叶均没有诱导出丛生芽,最后褐化干枯死亡。

**2.5 不同浓度的 6-BA 对茎段丛生芽诱导的影响** 茎段作为外植体在丛生芽诱导过程中,膨大,但没有产生愈伤组织,随着时间的推移膨大的茎段褐化而死,最终没有丛生芽的诱导;这可能是因为产生了大量次级代谢物,这些次级代谢物最后导致茎段死亡,没有诱导出丛生芽。茎段丛生芽的诱导率也为 0。

**2.6 诱导芽苗生根效果** 生根诱导以 1/2MS 为基本培养基,附加 IBA,设计 4 个浓度水平。将继代培养后高度达 1.5~2.0 cm,生长健壮的芽苗进行生根诱导。无根苗在生根培养基中,约 9 d 后分化形成根。

表 4 不同浓度 IBA 对生根的影响

IBA 浓度//mg/L	接种不定芽数	14 d 后生根率//%
0	30	82
0.2	30	100
0.4	30	67
0.6	30	21

注:表中数据为 15 d 后统计结果。

### 3 讨论

**3.1 外植体消毒** 从外界取得的外植体进行接种时,常含有较多的杂菌,对其消毒时间太短不易除去,时间太长又会对外植体造成较大的伤害。该试验选取种子进行消毒较容易,基本解决了上述问题,污染率降低,适合选用。在试验中



图 1 诱导培养基 A<sub>2</sub> 中产生的丛生芽



图 2 诱导培养基 A<sub>3</sub> 中产生的丛生芽



图 3 在诱导生根培养基 B<sub>1</sub> 中产生的根

采用 2 种方式进行消毒,最终结果都很好,没有出现污染,而且在种子萌发率上差别也不大。综合简单易行的原则和环境友好性原则,推荐使用次氯酸钠作为消毒剂,处理时间以 8 min 为宜。

**3.2 外植体选择** 该试验选取茎尖、茎段(不带腋芽)、子叶作外植体,通过诱导,3 种外植体都可诱导出愈伤。但茎段和子叶不能诱导出丛生芽,茎段膨大出现愈伤后再培养则会褐化死亡。茎尖作为外植体诱导速度最快,芽苗健壮,增殖率高,是勿忘我进行离体快速繁殖的最佳外植体。

**3.3 最佳丛生芽诱导培养基** 冯晓英在对 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、激动素(KT)和苯基噻二唑脲(TDZ)在勿忘我芽增殖上的效果进行了比较。苯基噻二唑脲(TDZ)是一种具有

高度细胞分裂素活性的棉花脱叶剂,当 TDZ 浓度为 0.01 mg/L 时,勿忘我离体培养芽增殖的能力相当于 6-BA 0.4 mg/L 时的增殖能力。当 TDZ 浓度为 0.04 和 0.06 mg/L 时,芽的增殖效果与不加任何试剂差异不大。

**3.4 最佳生根培养基** 观察发现,NAA 诱导生根,根基部愈伤组织较少,根粗壮,数量多,且有一定的长度;IBA 则根少细长。结果表明,试管苗生根以 0.4 mg/L NAA 效果较好,其次是 0.6 mg/L NAA 和 0.2 mg/L IBA。在植物试管苗微型繁殖诱导生根阶段,由于培养环境的高温、高湿和弱光等因素的影响,常使得芽苗徒长和根系纤弱,导致再生小植株的抗逆性差和移栽成活率低。这表明,低浓度的 PP333 对根的生长有促进作用,生根率与对照组只加 0.4 mg/L NAA 差异

不大,但可以使根加粗,而高浓度时所需根长时间明显缩短,生根率降低,根特粗。从苗长势来看,以在生根培养基中附加 0.02% PP333 的长势为好。

### 参考文献

- [1] 金波. 鲜切花栽培技术手册 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 50-65.
- [2] 周昆华, 易栽培. 久不凋的花卉勿忘我 [J]. 云南农业科技, 1993(6): 36.
- [3] 高丽霞, 邢柏芝. 补血草组织培养试验 [J]. 北方园艺, 1999(2): 5.
- [4] 陈佳瀛, 杜秀达. 补血草的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 12(6): 594.
- [5] 王秀丽, 杨煜, 徐平丽, 等. 植物组织培养的应用及进展 [J]. 山东农业科学, 2005(3): 78-80.
- [6] 王文静, 袁道强, 高松洁. 植物组织培养的应用现状 [J]. 河南师范大学学报, 2000(3): 137-139.

(上接第 10841 页)

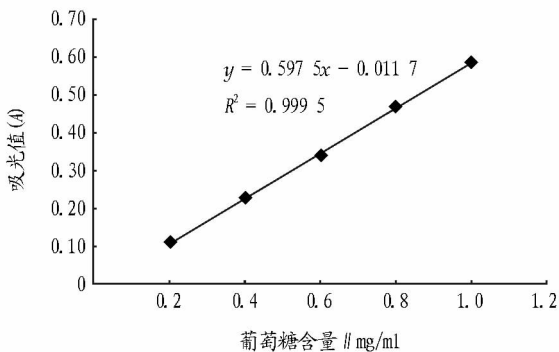


图1 纤维素酶标准曲线

表1 不同浓度的褐藻寡糖对杏鲍菇菌丝体生长的影响

试验组别 mg/ml	生长速度 cm/d	菌丝体干重 g/L	纤维素酶活 U/ml
0.001	0.56 aA	9.1 aA	36.42 aA
0.010	0.46 bB	7.2 bB	26.25 bB
0.100	0.42 bB	4.8 dD	11.93 dD
空白对照	0.36 cC	6.2 cC	17.68 cC

注: 同列不同大小写字母分别表示差异在 0.01、0.05 水平显著。

**2.2 不同浓度的褐藻寡糖对杏鲍菇液体发酵菌丝体生物量的影响** 由表 1 可知,不同浓度的褐藻寡糖对杏鲍菇液体发酵菌丝体生物量的影响差异在 0.05 水平显著,其中添加量为 0.001 mg/ml 的试验组菌丝体生物量与对照组相比差异在 0.01 水平显著,菌丝体干重为 9.1 g/L,添加量为 0.100 mg/ml 的试验组与对照组相比对菌丝体生长的有一定的抑制作用,菌丝体干重为 4.8 g/L。

**2.3 不同浓度的褐藻寡糖对杏鲍菇液体发酵纤维素酶活的影响** 由表 1 可知,试验组与对照组之间存在 0.01 水平显著性差异,添加量为 0.001 mg/ml 的试验组褐藻寡糖对杏鲍菇产生纤维素酶的促进作用最明显,纤维素酶活为 36.42 U/ml,添加量为 0.100 mg/ml 的试验组相比空白对照组对杏鲍菇纤维素酶的分泌有一定的抑制作用,纤维素酶活只有

11.93 U/ml,相对于空白对照组下降 48.19%。由此可知,高浓度的褐藻寡糖对杏鲍菇产纤维素酶有一定的抑制作用,随着浓度的降低,对纤维素酶分泌的促进作用越明显。

### 3 结论与讨论

研究表明,褐藻寡糖对杏鲍菇菌丝体生长、液体发酵菌丝体生物量及发酵液中纤维素酶活在一定的浓度下具有促进作用,如平板培养浓度为 0.001 mg/ml 褐藻寡糖试验组杏鲍菇菌丝体生长速度最快,而 0.100 与 0.010 mg/ml 的试验组菌丝体生长速度无明显差异;在液体培养中添加 0.001 mg/ml 试验组液体发酵培养菌丝体生长最快,菌丝体生物量较其他试验组差异在 0.01 水平显著,为 9.1 g/L,而 0.100 mg/ml 的试验组对液体发酵菌丝体的生长有一定的抑制作用,菌丝体干重为 4.8 g/L;添加 0.010 mg/ml 的褐藻寡糖可明显提高杏鲍菇产纤维素酶的活性;添加 0.001 g/ml 的褐藻寡糖对杏鲍菇生长的各个性能指标均有明显的促进作用。由此可知,褐藻寡糖对杏鲍菇菌丝体生长速度、菌丝体生物量、纤维素酶活性具有促进作用,低浓度的试验组较高浓度的试验组的促进作用明显。目前,褐藻寡糖对杏鲍菇菌丝体作用机理尚在研究中,但褐藻寡糖在食药菌的应用中具有较好的前景。

### 参考文献

- [1] HU X K, JIANG X L, WANG H M. Antitumour activities of alginate-derived oligosaccharides and their sulphated substitution derivatives [J]. European Journal of Phycology, 2004, 39(1): 67-71.
- [2] IWAMOTO Y, XU X, TAMURA T, et al. Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytosine production in human mononuclear cells [J]. Biosci Biotech Biochem, 2003, 67(2): 258-263.
- [3] 陈丽, 张林维, 薛婉立. 褐藻寡糖的制备及其抑菌性研究 [J]. 中国饲料, 2007(9): 34-35.
- [4] 刘端志, 江晓路, 管华诗. 褐藻寡糖激发诱导烟草抗低温作用的研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(2): 243-248.
- [5] 周绪霞, 徐盛, 丁玉庭. 酶解制备褐藻胶寡糖及其产物的抗氧化活性分析 [J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(2): 116-120.
- [6] 袁建平, 刘小杰, 高永闯, 等. 壳寡糖对杏鲍菇菌丝生长的影响 [J]. 广东农业科学, 2010(8): 58-59.
- [7] 张龙翔, 张庭芳. 生化试验方法和技术 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1982: 9-10.
- [8] 杨新美. 食用菌研究法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 12.