

白首乌愈伤组织的诱导与增殖

徐 飞, 于元杰

(山东农业大学 农学院, 山东 泰安 271018)

摘 要:以白首乌的叶片、茎段、种子为外植体, 进行愈伤组织诱导与增殖研究。结果表明: 白首乌叶片、茎段、种子均能诱导出愈伤组织; 茎段是诱导愈伤组织的最佳外植体, 诱导率可达 100%, 最适培养基为: MS+2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L; 愈伤组织在蔗糖浓度为 30 g/L、pH 5.8~5.9、光照 12 h/d 的培养条件下, 增殖最快, 并且褐化时间最慢。

关键词: 愈伤组织; 白首乌; 诱导; 正交设计

中图分类号: S 567.7⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)14-0140-03

白首乌(*Cynanchum auriculatum*)为萝藦科鹅绒藤属植物, 白首乌以块根入药, 味甘、苦, 性微温, 白首乌主要有效成分为 C₂₁甾苷^[1], 还含有丰富的淀粉、蛋白质、多种维生素和矿物质等。白首乌具补血、补气、抗衰老、降血脂、降胆固醇以及促进乌发生长的作用, 且无毒^[2]。在生产上白首乌用于制取优质淀粉, 经济价值高。一般白首乌来自野生资源。随着生产的发展及生活水平的不断提高, 人们对医疗保健品的需求量与日俱增, 野生资源不能满足需要, 而且会很快导致枯竭。目前, 白首乌的人工栽培主要靠块根的营养繁殖和种子育苗, 易受病毒浸染, 导致种性退化, 产量和品质下降, 不能适应规模化和标准化生产的需要。无论是在快繁、良种选育, 还是在其药理研究中, 运用组织培养的方法都必将能起到事半功倍作用。但目前关于白首乌组织培养方面的报道较少, 为此有必要进行一系列的试验以探求用组织培养的方法快速繁殖白首乌的成套技术, 同时对白首乌进行生理生化分析, 为以后进一步研究白首乌提供理论基础。该试验研究了白首乌愈伤组织诱导的最佳外植体、激素组合, 以及增殖培养条件, 为白首乌的快速繁殖和生理生化分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

泰山白首乌的叶片、茎段、种子, 采集于泰安市大津口乡紫藤庄园。

1.2 试验方法

1.2.1 材料灭菌及外植体的制备 在晴天从田间采取白首乌的叶片、茎段作为外植体, 分别用 75% 的酒精消毒 30 s, 再用 0.1% 的升汞消毒 8 min, 用无菌水冲洗 3

次; 种子用 75% 的酒精消毒 1 min, 再用 0.1% 的升汞消毒 15 min, 用无菌水冲洗 3 次。接种于愈伤诱导培养基上。在无菌操作台上将茎尖切取 0.5 cm 左右, 茎段切成 1.0 cm 左右长, 叶片切成约 0.5 cm² 大小, 然后接种于愈伤诱导培养基上。

1.2.2 愈伤诱导培养基最佳激素组合的筛选 诱导愈伤培养基的激素采用三因素三水平正交设计: 2, 4-D 设 1.0、2.0、3.0 mg/L 3 个浓度; 6-BA 设置 0、0.5、1.0 mg/L 3 个浓度; NAA 设 0、1.0、2.0 mg/L 3 个浓度。每瓶接种 10 个外植体, 每处理重复 6 次。上述各诱导培养基均采用 MS 基本培养基, 添加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂, pH 5.8, 温度(25±1)℃, 暗培养。外植体接种 30 d 后观察各种愈伤组织的质地、颜色和生长势, 并计算愈伤组织的诱导率。诱导率=(形成愈伤组织的外植体块数/接种外植体总块数)×100%。

1.2.3 不同外植体诱导愈伤组织的比较 将 3 种外植体分别接种于最佳激素组合的培养基中培养, 30 d 后比较以下 4 个方面: 诱导率, 以最高诱导率进行比较; 出愈时间; 生长速度(mg/d)=愈伤组织生长 30 d 时的重量(mg)/30 d; 形态特征, 主要包括颜色和质地。

1.2.4 光照、pH、蔗糖对愈伤组织增殖的影响 选取生长旺盛的愈伤组织继代培养。继代培养基为 MS+2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L, 蔗糖浓度设置为 15、30、45、50、60 g/L 5 个处理; pH 设 5.6、5.7、5.8、5.9、6.0 共 5 个处理; 光照时间设 4、8、12、16 h/d。确定适于白首乌增殖培养的蔗糖浓度、光照时间和 pH。每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 5 个愈伤组织。愈伤组织增殖培养 30 d 后, 称其质量, 统计愈伤组织生长速度和褐化时间。愈伤组织形态指标: 愈伤组织颜色; 质地分为疏松和致密; 将生长势氛围极好(++++)、好(++++)、较好(+++), 一般(++), 较差(—)。

第一作者简介: 徐飞(1986-), 女, 在读硕士, 现主要从事生物技术在植物育种上的应用研究工作。E-mail: xufeixf2004@163.com。

收稿日期: 2010-04-15

2 结果与分析

2.1 愈伤诱导培养基最佳激素组合的筛选

将白首乌叶片茎段种子分别接种在 3 种不同激素组合的培养基中, 30 d 后统计结果见表 1。

表 1 白首乌愈伤组织诱导率

编号	2 4-D	6 BA	NAA	诱导率/%		
	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	叶片	茎段	种子
1	1.0	0	0	11.7	21.7	0
2	1.0	0.5	1.0	25.0	31.7	11.7
3	1.0	1.0	2.0	58.3	50.0	21.7
4	2.0	0	1.0	63.3	100.0	35.0
5	2.0	0.5	2.0	96.7	93.3	45.0
6	2.0	1.0	0	90.0	100.0	30.0
7	3.0	0	2.0	68.3	83.3	50.0
8	3.0	0.5	0	81.7	96.7	46.7
9	3.0	1.0	1.0	71.7	98.3	41.7

采用极差分析(表 2)和方差分析(表 3)研究 3 种生长调节剂对白首乌愈伤组织诱导率的影响效应及其差异显著性。结果表明, 不同生长调节剂对愈伤组织的诱导影响不同, 3 个因素对叶片、茎段的愈伤组织诱导率的影响顺序均为: 2, 4-D> 6-BA> NAA; 对种子的影响为: 2, 4-D> NAA> 6-BA。2, 4-D 对 3 种外植体的诱导均达到显著水平, 而 6-BA 与 NAA 不显著。因此, 再根据极差分析平均值的大小以及愈伤组织的颜色以及形态可得出, 诱导白首乌叶片、茎段、种子愈伤组织形成的适宜培养基分别为: 2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L; 2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L; 2, 4-D 3.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L。



图 1 茎段愈伤组织



图 2 种子愈伤组织

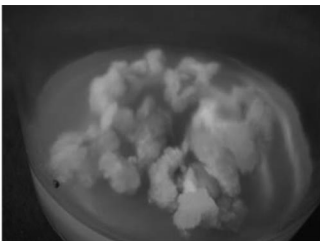


图 3 叶片愈伤组织



图 4 继代培养

片和茎段诱导的愈伤组织为淡黄色, 疏松; 种子愈伤组织为黄色致密, 生长很缓慢。综合以上个方面, 茎段是诱导愈伤组织最佳外植体, 其次是叶片, 而种子不适合作为外植体。

2.3 蔗糖浓度对愈伤组织增殖的影响

以 MS+2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 为 mg/L 培养基, 研究蔗糖浓度对愈伤组织增殖的影响。表 5 表明, 随着蔗糖浓度的升高, 愈伤组织的生长速度先增快后变慢, 褐化时间先变长后变短; 在蔗糖浓度为 30 g/L 时, 愈伤组织的生长速度最快, 褐化时间

表 2 愈伤组织诱导率的极差分析

均值	叶片			茎段			种子		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
X1	31.667	47.767	61.133	34.467	68.333	72.800	11.133	28.333	25.567
X2	83.333	67.800	53.333	97.767	73.900	76.667	36.667	34.467	29.467
X3	73.900	73.333	74.433	92.767	82.767	75.533	46.133	31.133	38.900
极差 R	51.666	25.566	21.100	63.300	14.434	3.867	35.000	6.134	13.333

表 3 愈伤组织诱导率的方差分析

因素	自由度	叶片		茎段		种子		F _{0.05}
		平方和	F	平方和	F	平方和	F	
A	2	4 542.087	43.099	7 430.780	31.496	1 966.569	40.154	19
B	2	1 085.607	10.301	317.927	1.348	56.569	1.155	19
C	2	682.940	6.480	23.707	0.100	281.976	5.757	19
误差		48.35		235.93		48.98		

2.2 不同外植体愈伤组织诱导效果

3 种外植体在最适培养基中培养 2 d 后, 叶片叶缘向下翘起开始膨胀, 茎段两端开始翘起。5 d 后, 叶片开始变得透明, 茎段膨胀。10 d 后茎段两端产生淡绿色愈伤组织。15 d 以后叶片卷曲透明, 并有少量愈伤组织产生, 种子开始产生愈伤组织, 但是生长很慢。20 d 后整个叶片变成愈伤组织。

由表 4 可知, 出愈率最高、生长速度最快以及出愈最快的是茎段, 其次是叶片, 种子的各项指标最差。叶

表 4 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

外植体	出愈率 / %	出愈时间 / d	生长速度 / mg · d ⁻¹	形态特征
叶片	96.7	20	6.7	淡黄色 疏松
茎段	100.0	14	8.6	淡黄色 疏松
种子	68.3	28	0.6	黄色 致密

也最慢, 生长形态也最好。因此 30 g/L 的蔗糖浓度适合白首乌愈伤组织的增殖生长。

表 5 蔗糖浓度对白首乌愈伤组织增殖的影响

蔗糖 / g · L ⁻¹	生长速度 / mg · d ⁻¹	褐化时间 / d	愈伤组织形态	
			质地	生长势
15	3.5	33	疏松	+++
30	7.9	35	疏松	++++
45	5.4	30	疏松	++++
50	3.6	25	疏松	++
60	2.1	18	致密	+

2.4 pH 对愈伤组织增殖的影响

以 MS+2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 为培养基, 研究了光照对愈伤组织增殖的影响。表 6 表明, 随着 pH 的增高, 愈伤组织的生长速度先增快后变慢, 褐化时间先变长后变短; 在 pH 5.9 时, 愈伤组织的生长速度最快; 在 pH 5.8 时, 愈伤组织的褐化时间最长。在生长速度与褐化时间方面, pH 5.9 与 pH 5.8 对愈伤组织的增殖无显著差异。pH 5.8~5.9 适宜于白首乌愈伤组织的生长与保存。

表 6 pH 对白首乌愈伤组织增殖的影响

pH	生长速度 / mg · d ⁻¹	褐化时间 / d	愈伤组织形态	
			质地	生长势
5.6	4.6	20	疏松	+++
5.7	7.2	25	疏松	++++
5.8	8.5	35	疏松	++++
5.9	8.9	33	疏松	+++
6.0	5.6	22	疏松	+++

2.5 光照对愈伤组织增殖的影响

以 MS+2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 为培养基, 研究了光照对愈伤组织增殖的影响。表 7 表明, 光照时间在 12 h/d 愈伤组织的生长速度与褐化时间达到最高, 生长最旺盛。因此 12 h/d 的光照适合白首乌愈伤组织的增殖培养。

表 7 光照对白首乌愈伤组织增殖的影响

光照时间 / h · d ⁻¹	生长速度 / mg · d ⁻¹	褐化时间 / d	愈伤组织形态	
			质地	生长势
4	5.6	35	疏松	+++
8	7.4	30	疏松	+++
12	8.0	35	疏松	++++
16	5.9	22	疏松	+++

3 结论与讨论

愈伤组织的形成是由生长调节剂, 培养基成分、外植体、光照及温度等各要素相互作用的复杂过程^[3-5], 其中生长调节剂是调控愈伤组织形成的关键因素, 在组织

培养中起重要的作用。该试验研究表明, 不同浓度、不同配比的激素对愈伤组织的诱导有明显的不同。在愈伤组织诱导中被公认为常用的、效果较好的是 2, 4-D, 研究发现 2, 4-D 也是诱导白首乌愈伤组织的最有效的生长调节剂, 单独作用时可以诱导出愈伤组织, 但诱导率较低, 与 6-BA 共同作用后诱导率较高, 超过 3.0 mg/L 对愈伤组织诱导有抑制作用。外植体类型也是影响愈伤组织的重要因素, 在植物组织培养中常用的外植体有器官、胚胎、单细胞、原生质体等^[6]。该试验发现, 叶片、茎段、种子均可诱导产生愈伤组织, 其中茎段的诱导效果最好, 是最适宜的外植体。叶片的诱导效果也比较好的, 并且取材比较方便, 材料多, 也是比较适宜的外植体, 越靠近叶柄和叶脉处越容易形成愈伤组织。种子的诱导率太低, 生长慢, 不适合作为外植体。

白首乌愈伤组织在不同的培养条件下生长的速度也不同, 在蔗糖浓度为 30 g/L、pH 5.8~5.9、光照 12 h/d 的培养条件下, 增殖最快, 并且褐化时间最慢。蔗糖与 pH 对维持培养基的渗透压, 保证培养材料的正常生长至关重要, 其用量的选择也很关键。

参考文献

[1] 喻樊. 白首乌的化学成份及药理活性研究[J]. 海峡药学, 2008, 20 (10): 86-89.
[2] 刘成娣 龚树生. 抗衰老中药白首乌研究的进展[J]. 北京中医学院学报, 1990, 13(1): 45-47.
[3] 梁一池 杨华. 植物组织培养技术的研究进展[J]. 福建林学院学报 2002, 22(1): 1-3.
[4] 郝会军 陈美霞 丁雪珍, 等. 半夏组织培养方法的比较研究[J]. 北方园艺 2008(8): 188-190.
[5] 徐秀泉 严春艳 于荣敏. 明党参愈伤组织诱导及植株再生[J]. 中药材, 2005, 28(11): 971-972.
[6] 梁一池. 树木育种原理与方法[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1997: 60-66.

Induction and Proliferation of *Cynanchum auriculatum*

XU Fei, YU Yuan-jie

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018)

Abstract: The leaves, stems and seeds of *Cynanchum auriculatum* were used as explants to study callus induction and proliferation of *Cynanchum auriculatum*. The results showed that all kind of explants could induce callus, but the stems were the ideal explants of callus induction, and the highest induction rate was 100.0%. The best culture medium was 2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L. Callus grew fastest and delay their browning time when the calluses were cultured with sucrose at 30 g/L, pH at 5.8~5.9 and light at 12 hours per day to proliferate.

Key words: callus; *Cynanchum auriculatum*; induction; orthogonal design