

植物生长调节剂 对豆腐柴愈伤组织诱导的影响

程 华^{1,2}, 李琳玲^{1,2}, 姜德志^{1,2}, 袁红慧^{1,2}, 程水源^{1,2}

(1. 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 湖北 黄冈 438000; 2. 黄冈师范学院 化学与生命科学学院, 湖北 黄冈 438000)

摘 要:以湖北省罗田县野生豆腐柴叶片为材料,在 MS 培养基上附加不同浓度和比值的激素进行愈伤组织的诱导试验。结果表明:不同外源激素浓度及配对外植体愈伤组织诱导率的表现不同,NAA 比 IBA 更有利于豆腐柴愈伤组织的形成和生长;而低浓度 6-BA 更适于豆腐柴愈伤组织的分化与生长;外源激素的对比对愈伤组织诱导率有一定影响,浓度比为 0.2 的 6-BA/NAA 有利于豆腐柴愈伤的形成和生长;愈伤组织培养最终认为,诱导豆腐柴愈伤组织和生根的适宜培养基为 0.2 mg/L 6-BA 和 1 mg/L 的 NAA。

关键词:豆腐柴;组织培养;愈伤组织;植物生长调节剂

中图分类号:Q 813.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)18-0126-03

豆腐柴(*Premna microphylla* Turcz)属马鞭草科多年生落叶灌木^[1]。其叶片果胶、蛋白含量高,必需氨基酸组分全,富含维生素 C、β-胡萝卜素和多种矿质元素,有较高的食用价值,在医药、食品和饮料方面具有广泛的应用前景^[2-5]。野生豆腐柴在湖北分布广泛,但较为零散,种子繁殖困难,野外采集不能满足生产需要和市场需求^[6]。因此,豆腐柴的高效快速繁殖技术显得尤为重要,房江育等^[7]、李琳玲等^[8]、刘世彪等^[9]分别对豆腐柴扦插和水培生根进行了相关试验。目前,通过外植体诱导愈伤并发育为完整植株是野生植物保护繁殖的有效手段,而目前关于豆腐柴组织培养方面的报道较少。因此,有必要进行一系列的试验以探求快速繁殖豆腐柴的成套组织培养技术。早在 1957 年,Skog 等^[10]就在植物组织培养中发现生长素和细胞分裂素调控植物形态发生和植株发育的现象,并提出了“激素平衡”假说。该试验以湖北省罗田县野生豆腐柴为试材,研究了其愈伤组织诱导及生根的最佳激素配比组合,为豆腐柴的人工大规模快速繁殖和生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以湖北罗田野生豆腐柴叶片为试材。

第一作者简介:程华(1980-),男,湖北麻城人,在读博士,现从事经济林木种质资源评价与利用研究工作。E-mail: chenghua1437@126.com。

责任作者:程水源(1965-),男,教授,博士生导师,现从事经济林木种质资源评价与利用研究工作。E-mail: s_y_cheng@sina.com。

基金项目:湖北省教育厅高校产学研合作重点资助项目(CXY2009B045);湖北省自然科学基金资助项目(2008CDZ085)。

收稿日期:2011-06-11

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 取 1 a 生豆腐柴中部叶片,用自来水冲洗干净后,移入超净工作台,70%酒精浸泡 15 min,再用 0.1%升汞,2 滴吐温处理 3 min,最后倒去升汞液,用无菌水冲洗 3~4 次。

表 1 各种培养基中的激素配比

编号	分裂素/生长素	6-BA/mg · L ⁻¹	NAA/mg · L ⁻¹	IBA/mg · L ⁻¹
11	0.1	0.2	2	—
12		0.2	—	2
21		0.2	1	—
22	0.2	0.2	—	1
31		0.2	0.5	—
32		0.2	—	0.5
41	0.4	0.2	0.4	—
42		0.2	—	0.4
51		0.2	0.2	—
52	1	0.2	—	0.2
61		0.2	0.1	—
62		0.2	—	0.1
71	0.1	0.4	4	—
72		0.4	—	4
81		0.4	0.8	—
82	0.5	0.4	—	0.8
91		0.4	0.4	—
92		0.4	—	0.4
101	2	0.4	0.2	—
102		0.4	—	0.2
111		0.4	0.1	—
112	4	0.4	—	0.1
121		0.4	0.08	—
122		0.4	—	0.08
131	5	0.4	0.05	—
132		0.4	—	0.05
141		0.4	0.04	—
142	10	0.4	—	0.04
对照		0.4	0	0

注:“—”表示未加该激素。

1.2.2 培养基 以 MS 为基本培养基,附加不同浓度和比值的 6-BA、NAA 和 IBA(表 1),调节 pH 为 6.0,121℃灭菌 15 min。

1.2.3 接种和培养 将灭菌的叶片切成 1 cm×1 cm

大小,依次接种到含不同激素浓度和配比的培养基中,每瓶 20 个左右,24 h 光照培养,2 周后观察愈伤组织数量和生根数量,计算愈伤组织诱导百分率(出愈率)和生根率。

2 结果与分析

外植体培养 2 周以后,发现有少量污染。未污染的部分,大部分已萌动,并长出愈伤和根(图 1)。只有 62 号(MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.1 mg/L)、132 号

(MS+6-BA 0.4 mg/L+IBA 0.05 mg/L)和 142 号(MS+6-BA 0.4 mg/L+IBA 0.04 mg/L)培养基中接种的豆腐柴叶片未萌动。当 6-BA 浓度为 0.4 mg/L,生长素浓度低于 0.2 mg/L 时,愈伤组织就不再生根。当 6-BA 浓度为 0.2 mg/L,生长素为 IBA 时,愈伤组织也不生根。已长出的愈伤组织大部分都有白色的颗粒状愈伤;愈伤组织的颜色为翠绿色到透明;愈伤组织比较多,几乎包裹了原来的叶片(表 2)。

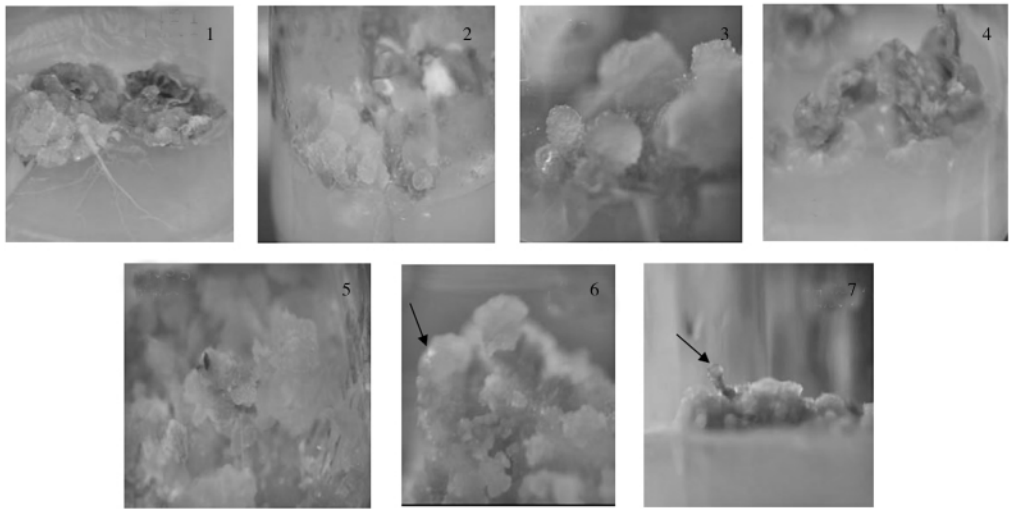


图 1 豆腐柴组培培养图片

注:1.豆腐柴愈伤组织生根;2.豆腐柴初代培养形成的愈伤组织;3.较高生长素和分裂素浓度(MS+4.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA)配比的初代愈伤组织;4.较高生长素和分裂素浓度(1/2MS+4.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA)配比的初代愈伤组织;5.较高生长素和分裂素浓度(MS+4.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA)配比的继代愈伤组织;6、7.豆腐柴胚性愈伤组织不同的发育形态(箭头标明)。

表 2 各种激素组合的培养基诱导的愈伤组织生长情况

编号	接种数	出愈率/%	生根率/%	生长量	愈伤组织生长情况
11	20	100	100	++++	叶几乎全被透明绿色的愈伤包裹,有大小不等的白色愈伤,有许多根,根较长
12	18	100	22	+++	叶片均有愈伤,略多于对照组,2/9 有根
21	20	80	75	++++	叶大部分被疏松的透明绿色愈伤包裹,有绿豆粒大小白色愈伤,愈伤已长根,根很长
22	20	100	11	+	叶片均有萌动愈伤,但不如对照组,1/9 有根,0.5 mm 长
31	20	85	55	++++	叶大部分被翠绿色愈伤包裹,每个叶片都有白色颗粒状愈伤,部分愈伤已长根
32	18	100	0	+	叶片略有萌动,愈伤萌动状态不如对照组
41	18	90	60	++++	叶上面部分绿色,下面大部分为透明愈伤,有许多白色愈伤,部分愈伤已长根,根毛多,根不长
42	19	100	0	+	叶翠绿,略有凸凹,边缘有萌动,大部分存活
51	18	100	75	+++	叶剧烈凸凹,上部分深绿色,下部分透明,均有白色愈伤,部分愈伤已长根,根长 1~2 cm
52	20	100	0	+	叶翠绿,略有凸凹,大部分存活
61	20	95	63	++++	叶剧烈凸凹,上部深绿色,下部分透明,有白色愈伤,部分愈伤已长根
62	20	0	0	+	叶绿色,颜色比对照组深,略有凸凹,边缘无萌动
71	20	100	100	+++	叶大部分被透明绿色的愈伤包裹,有许多大的白色愈伤,有许多根,根较长
72	20	100	100	+++	叶大部分被透明绿色的愈伤包裹,有大的白色愈伤,有许多根,根稍长
81	20	83	47	+++	叶上面部分绿色,下面大部分为透明愈伤,有较多白色愈伤,少部分愈伤已长根,根毛多,根不长
82	18	89	45	+++	叶上面部分绿色,下面部分为透明愈伤,有白色愈伤,部分愈伤已长根,根毛少,根不长
91	20	88	43	++	叶上面部分绿色,下面大部分为透明愈伤,部分有白色愈伤,少部分已生根,根长 2 cm
92	20	100	43	++	叶上面部分绿色,下面部分为透明愈伤,有少许白色愈伤,小部分已生根
101	20	80	43	+++	叶剧烈凸凹,上部深绿色,下部分透明,略有白色愈伤,少部分愈伤已长根,根很短
102	20	60	0	+	大部分有愈伤
111	20	30	0	-	少部分略有愈伤
112	20	100	0	++	均有愈伤,1/6 有白色愈伤
121	20	50	0	-	均有愈伤萌动的迹象
122	20	10	0	-	少许叶片有愈伤萌动的迹象
131	20	30	0	+	存活的豆腐柴有愈伤
132	20	0	0	-	叶绿色,无萌动,无愈伤
141	20	50	0	+	小部分叶片有少许愈伤
142	20	0	0	-	叶片无萌动状态
对照	20	100	0	++	叶边缘有萌动的愈伤

注:1.数据统计中除污染外,“-”表示未萌动,无愈伤;“+”表示刚开始萌动;“++”表示有萌动的愈伤;“+++”表示长势较旺盛,白色,质地紧密;“++++”表示大量,淡白色或透明状,质地疏松;2.出愈率=长出愈伤的个数/接种数×100%;3.生根率=长根的愈伤个数/存活的愈伤个数×100%。

2.1 生长素种类对愈伤组织诱导的影响

观察 11、12、21、22、31、32、41、42、51、52、61、62 这 12 组试验结果,11 和 12 比较,21 和 22 比较,31 和 32 比较,41 和 42 比较,51 和 52 比较,61 和 62 比较。12 组试验中都含 6-BA 0.2 mg/L,配以不同浓度 NAA 和 IBA。观察比较,发现 NAA 组比 IBA 组有更好的生长量,用 Spss 17.0 对 NAA 和 IBA 组的出愈率和生根率分别进行独立 *T* 检验,存在显著差异。表明 NAA 比 IBA 更有利于豆腐柴愈伤组织的形成和生长。

2.2 6-BA 的浓度对愈伤组织诱导的影响

观察 11、71、41、81、51、91、61、101 这 8 组试验,11 和 71 组、41 和 81 组、51 和 91 组、61 和 101 组,其 6-BA/NAA 浓度比值相同,生长素都是 NAA,但 6-BA 浓度不同,分别是 0.2 和 0.4 mg/L。用 Spss 17.0 对浓度分别为 0.2 mg/L(11、41、51、61)和 0.4 mg/L(71、81、91、101)的 6-BA 进行独立 *T* 检验,差异不显著。但 0.2 mg/L 6-BA 明显比 0.4 mg/L 6-BA 有更高的愈伤组织诱导量。因此,认为浓度 0.2 mg/L 的 6-BA 更适于豆腐柴愈伤组织的形成与生长。

2.3 分裂素与生长素的比值对愈伤组织诱导的影响

观察 11、21、31、41、51、61 这 6 组试验,6-BA 浓度都是 0.2 mg/L,但各组 6-BA 与 NAA 浓度的比值不同,依次是 0.1、0.2、0.4、0.5、1、2。在添加 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基上,出愈率不低于 80%,均能生根,但 11 号(0.2 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA)和 21 号(0.2 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA)叶几乎全部被愈伤包裹,愈伤质地疏松,根也很长,愈伤比其它比值搭配更为优质。但 11 号接种 2 周后生长缓慢,愈伤逐渐紧密,不利于后期继代培养,而 22 号愈伤结构疏松,接种 2 周后长势良好。因此在 0.2 mg/L 的 6-BA 下,浓度比为 0.2 的 6-BA/NAA 有利于豆腐柴愈伤的形成和生长。

3 结论与讨论

该研究表明,NAA 比 IBA 更有利于豆腐柴愈伤组织的形成和生长;0.2 mg/L 的 6-BA 更适于豆腐柴愈伤的形成与生长;在 0.2 mg/L 的 6-BA 下,浓度比为 0.2 的 6-BA/NAA 有利于豆腐柴愈伤的形成和生长。可以确定诱导豆腐柴愈伤组织生根的最佳激素搭

配为 0.2 mg/L 6-BA 和 1 mg/L NAA。

植物生长调节剂是植物培养基中的关键物质,在植物组织培养中起重要和明显调节作用^[1]。包括细胞分裂素、生长素和赤霉素等。分裂素和生长素的比值大小决定了愈伤组织根和芽的分化,较高的细胞分裂素和较低的生长素比有利于促进芽的分化,而较低的细胞分裂素和较高的生长素有利于促进根的分化^[12]。该试验中 6-BA 只设计了 0.2 和 0.4 mg/L 2 个浓度,而且对于较高浓度的 6-BA 和较低浓度的 NAA(和 IBA)浓度和配比存在设计不合理,可能 6-BA 浓度偏低,又或 6-BA 和 NAA(和 IBA)2 种激素搭配未处于芽分化的适宜条件,因而未能得到芽分化的愈伤组织。今后会进一步研究,以期通过诱导愈伤完成根和芽的分化进而获得完豆腐柴的完整再生植株。

参考文献

- [1] 中国科学院植物所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京:科学出版社,1985.
- [2] 曹稳根,焦庆才. 豆腐柴根提取物抗炎作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2002,9(4):223-224.
- [3] 高贵珍,曹稳根,蔡红,等. 野生豆腐柴叶营养成分分析及评价[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(1):60-61.
- [4] 林军,杨斌,陈家欢,等. 黄毛豆腐柴茎提取物改善微循环,保护坐骨神经和软组织损伤的实验研究[J]. 广西医科大学学报,2001,18(2):207-208.
- [5] 罗曼,杨永年. 豆腐柴叶蛋白营养及安全性研究[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(3):283-287.
- [6] 王燕,许锋,张凤霞,等. 豆腐柴研究进展[J]. 中国野生植物资源,2007,26(4):12-14.
- [7] 房江育,王世强,方建新,等. 冬季豆腐柴水培诱导不定根[J]. 中国农学通报,2008,24(11):244-246.
- [8] 李琳玲,曹晓娟,程华,等. 豆腐柴枝条水培生根的研究[J]. 湖北农业科学,2010,49(1):123-126.
- [9] 刘世彪,李雪丹,李德意. 豆腐柴扦插生根条件的初步研究[J]. 中国林副特产,2006,26(6):5-7.
- [10] Skoog F, Miller C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured: In vitro[J]. Symp. Soc. Exp. Biol, 1957, 11:118-131.
- [11] 张静,林毅,蔡永萍,等. 激素水平对 84K 杨组培快繁的影响[J]. 激光生物学报,2005,14(3):233-237.
- [12] 杨国会,米春江,缪承阳. 不同激素水平对虎眼万年青组织培养的影响[J]. 湖北农业科学,2011,9(1):183-184.

Effect of Plant Growth Regulator on Callus Induction of *Premna microphylla* Turcz

CHENG Hua^{1,2}, LI Lin-ling^{1,2}, JIANG De-zhi^{1,2}, YUAN Hong-hui^{1,2}, CHENG Shui-yuan^{1,2}

(1. Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Utilization of Resources of Hubei Key Laboratories, Huanggang, Hubei 438000; 2. College of Chemistry and Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000)

Abstract: *Premna microphylla* leaves were used as explant in MS medium, in which added different concentration and concentration ratio of hormones for callus induction frequencies. The results showed that the CIF of exogenous hormones showed that NAA was more valuable in the formation and upgrowth of callus. Callus had more tissue differentiation and grew faster when the calluses were cultured with a low concentration of 6-BA. Exogenous hormones proportion had certain effect on calluses induction, it's beneficial to form calluses and upgrowth when the ration of 6-BA/NAA was 0.2. This research considered that the best medium to induce differentiations and roots was MS+0.2 mg/L 6-BA +1 mg/L NAA.

Key words: *Premna microphylla* Turcz.; tissue culture; calluses; plant growth regulator