

不同激素组合对九眼独活嫩叶愈伤组织诱导的影响

刘向鸿, 侯大斌, 赵 纳

(西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

摘 要:以野生药用植物九眼独活的幼嫩叶片为材料,研究 2,4-D 分别与 KT,6-BA 的不同组合对九眼独活愈伤组织诱导的影响。结果表明:KT 和 6-BA 会明显降低九眼独活愈伤组织诱导频率,对愈伤组织的生长有明显的抑制作用,但能降低愈伤组织的褐化程度;低浓度的 2,4-D 在愈伤组织诱导中起着重要作用,并能获得生长状态好的愈伤组织,通过筛选获得诱导九眼独活愈伤组织的最适培养基,即 MS+2,4-D 0.2 mg/L。

关键词:九眼独活;KT;2,4-D;6-BA;组织培养;愈伤诱导

中图分类号:S 567.23⁺7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0161-03

九眼独活(*Aralia cordata* Thunb.)又名食用土当归,为药食两用传统中药,其根和根茎为主要药用部位,主要用于祛风除湿、腰膝酸软、舒筋活络、四肢痿痹、解热镇痛、利尿消肿、头痛目眩、骨折、牙痛、痢疾等症^[1-3]。在我国有着较为悠久的药用历史。试验以川产野生九眼独活为材料,对九眼独活愈伤组织的诱导、继代的培养基进行筛选,以期得到最优的愈伤组织生长条件,为其进一步利用生物工程技术手段,直接快速地获得药用植物的活性成分提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

九眼独活采自四川绵阳北川,为野生种。将其移栽至花盆中种植。

1.2 试验方法

在 50 mL 锥形瓶中进行,在培养室进行培养,培养条件为:温度(25±2)℃,光照 12 h/d,光照强度 2 000 lx,基本培养基为 MS,其中添加 0.6%琼脂,3.0%蔗糖,pH 值 5.8,高压灭菌 20 min。

1.2.1 外植体的处理 取九眼独活幼嫩叶片冲洗干净后,于 70%的酒精中浸泡 30 s 左右,无菌水洗 3~5 次,放入 0.1%升汞溶液中浸泡消毒 8 min,再用无菌水冲洗 5 次,把叶片切成 1 cm×1 cm 的小块,以备接种。

1.2.2 愈伤组织诱导 将叶片接种于 6-BA、KT 与

2,4-D、不同激素组合的锥形瓶中,不同激素组合见表 1、2,每个试验 5 次重复,每重复 4 个外植体,以不加入激素为对照,观察成愈数,计算愈伤组织诱导率和愈伤组织褐化率。筛选生长健壮的愈伤组织,并将生长健壮的愈伤组织继代增殖培养 2~3 次。愈伤组织诱导率(%)=(形成的愈伤组织数/接种外植体数)×100%;愈伤组织褐化率(%)=(愈伤组织的褐化数/接种外植体数)×100%。

| 表 1 2,4-D 和 6-BA 不同浓度组合 | | | | | |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|----|------------------------------|-----------------------------|
| 处理 | 2,4-D /mg·L ⁻¹ | 6-BA /mg·L ⁻¹ | 处理 | 2,4-D /mg·L ⁻¹ | 6-BA /mg·L ⁻¹ |
| 1 | 0 | 0 | 11 | 0 | 1.0 |
| 2 | 0.2 | 0 | 12 | 0.2 | 1.0 |
| 3 | 0.5 | 0 | 13 | 0.5 | 1.0 |
| 4 | 1.0 | 0 | 14 | 1.0 | 1.0 |
| 5 | 2.0 | 0 | 15 | 2.0 | 1.0 |
| 6 | 0 | 0.5 | 16 | 0 | 2.0 |
| 7 | 0.2 | 0.5 | 17 | 0.2 | 2.0 |
| 8 | 0.5 | 0.5 | 18 | 0.5 | 2.0 |
| 9 | 1.0 | 0.5 | 19 | 1.0 | 2.0 |
| 10 | 2.0 | 0.5 | 20 | 2.0 | 2.0 |

| 表 2 KT 和 2,4-D 不同浓度组合 | | | | | |
|-----------------------|---------------------------|------------------------------|----|---------------------------|------------------------------|
| 处理 | KT /mg·L ⁻¹ | 2,4-D /mg·L ⁻¹ | 处理 | KT /mg·L ⁻¹ | 2,4-D /mg·L ⁻¹ |
| 21 | 0 | 0 | 29 | 0.5 | 1.0 |
| 22 | 0.1 | 0 | 30 | 1.0 | 1.0 |
| 23 | 0.3 | 0 | 31 | 0 | 2.0 |
| 24 | 0.5 | 0 | 32 | 0.1 | 2.0 |
| 25 | 1.0 | 0 | 33 | 0.3 | 2.0 |
| 26 | 0 | 1.0 | 34 | 0.5 | 2.0 |
| 27 | 0.1 | 1.0 | 35 | 1.0 | 2.0 |
| 28 | 0.3 | 1.0 | | | |

1.2.3 愈伤组织的继代增殖培养 将上述外植体诱导出的长势良好的愈伤组织,分割后接种于愈伤组织的原始培养基中进行愈伤组织增殖培养。

第一作者简介:刘向鸿(1984-),男,甘肃庆阳人,硕士,研究方向为药用植物。E-mail:lxh_1017@163.com。
通讯作者:侯大斌(1965-),男,博士,教授,现主要从事植物分子生物学及药用植物学研究。E-mail:dbhou@126.com。
基金项目:四川省农作物育种攻关资助项目(2006YZGG12-22);绵阳市重点科技资助项目(06S041-05)。
收稿日期:2010-05-31

2 结果与分析

2.1 2,4-D 和 6-BA 激素组合对九眼独活愈伤诱导的影响

由表 1、3 可看出,利用 2,4-D 和 6-BA 激素组合诱导九眼独活愈伤组织 30 d 后,处理 2、3、8、9、13 的诱导率都超过了 50%,2、9 甚至达到了 100%,长势都较好,褐化程度较轻;处理 4、7、14、15、18、19 的诱导率在 20%~40%,褐化程度也较轻;处理 1、5、6、10、11、12、16、17、20 的诱导率都是零,褐化程度相对于诱导率的处理重。当无 2,4-D 时,即处理 1、6、11、16 随着 6-BA 浓度的增加,九眼独活愈伤组织的诱导率都是零,褐化率较高,在 40%~100%,褐化严重;当 2,4-D 浓度一定时,随着 6-BA 浓度的增加,其褐化程度基本上保持不变,且褐化较轻或无褐化。当无 6-BA 时,处理 1、2、3、4、5 随着 2,4-D 浓度的增加,除处理 2 以外,九眼独活愈伤组织的褐化率在 20%~50%,褐化程度逐渐增加;当 6-BA 浓度一定时,随着 2,4-D 浓度的增加,褐化程度反而相对减轻。

表 3 2,4-D 和 6-BA 激素组合对九眼独活愈伤诱导影响

| 处理 | 接种数 /个 | 成愈数 /个 | 褐化数 /个 | 褐化率 /% | 诱导率 /% | 褐化 程度 | 愈伤组织 增殖体积 |
|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|--------------|
| 1 | 20 | 0 | 10 | 50 | 0 | 较轻 | — |
| 2 | 20 | 20 | 0 | 0 | 100 | — | +++ |
| 3 | 20 | 19 | 4 | 20 | 95 | 较轻 | ++ |
| 4 | 16 | 4 | 4 | 25 | 25 | 轻 | + |
| 5 | 24 | 0 | 8 | 33.33 | 0 | 较重 | + |
| 6 | 20 | 0 | 20 | 100 | 0 | 严重 | — |
| 7 | 20 | 6 | 3 | 15 | 30 | 轻 | — |
| 8 | 20 | 11 | 1 | 5 | 55 | 较轻 | + |
| 9 | 20 | 20 | 0 | 0 | 100 | — | + |
| 10 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | — |
| 11 | 20 | 0 | 17 | 85 | 0 | 严重 | — |
| 12 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | — |
| 13 | 20 | 13 | 1 | 5 | 65 | 轻 | + |
| 14 | 20 | 4 | 0 | 0 | 20 | — | — |
| 15 | 20 | 7 | 0 | 0 | 35 | — | + |
| 16 | 20 | 0 | 8 | 40 | 0 | 严重 | — |
| 17 | 20 | 0 | 5 | 25 | 0 | 轻 | — |
| 18 | 20 | 5 | 5 | 25 | 25 | 轻 | — |
| 19 | 20 | 7 | 0 | 0 | 35 | — | + |
| 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | — |

注:+:愈伤组织长势一般,有愈伤组织,体积小,叶片边缘有愈伤;+:愈伤组织长势较好,愈伤组织较多,体积较大,叶片边缘和叶片均有愈伤组织;+:愈伤组织长势好,愈伤组织多,体积大,叶表面均有愈伤组织;—:没有愈伤组织,下同。

2.2 KT 和 2,4-D 激素组合对九眼独活愈伤诱导影响

从表 2、4 可看出,利用 KT 和 2,4-D 激素组合诱导九眼独活愈伤组织 30 d 后,处理 26、27、29 的诱导率都超过 50%,其中 27 的诱导率达到了 100%,褐化率除 29 外都较高,都超过了 60%,愈伤组织增殖体积一般;处理 30、32、33、34、35 的诱导率在 12.5%~40%,虽然褐化程度较轻,但是愈伤组织增殖体积一般;处理 21、22、23、24、25、28、31 的诱导率都是 0%,褐化程度都较重。

当无 2,4-D 时,即处理 21、22、23、24、25,随着 KT 浓

度的增加其九眼独活愈伤组织褐化率逐渐增加,褐化程度也逐渐的加深,诱导率都为 0%;当 2,4-D 浓度一定时,随着 KT 浓度的增加褐化程度相对减轻,诱导率在 0%~100%。当无 KT 时,即处理 21、26、31,随着 2,4-D 浓度的增加,其九眼独活愈伤组织褐化程度增加,诱导率在 0%~75%之间;当 KT 浓度一定时,随着 2,4-D 浓度的增加褐化程度相对减轻,诱导率也有一定程度的增加,在 0%~100%。

表 4 KT 和 2,4-D 激素组合对九眼独活愈伤诱导影响

| 处理 | 接种数 /个 | 成愈数 /个 | 褐化数 /个 | 褐化率 /% | 诱导率 /% | 褐化 程度 | 愈伤组织 增殖体积 |
|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|--------------|
| 21 | 20 | 0 | 9 | 45 | 0 | 较轻 | — |
| 22 | 12 | 0 | 6 | 50 | 0 | 重 | — |
| 23 | 28 | 0 | 14 | 50 | 0 | 较重 | — |
| 24 | 20 | 0 | 18 | 90 | 0 | 重 | — |
| 25 | 16 | 0 | 16 | 100 | 0 | 重 | — |
| 26 | 16 | 12 | 12 | 75 | 75 | 较重 | + |
| 27 | 16 | 16 | 10 | 62.5 | 100 | 较轻 | + |
| 28 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | — |
| 29 | 13 | 8 | 0 | 0 | 61.54 | — | + |
| 30 | 20 | 8 | 0 | 0 | 40 | — | + |
| 31 | 20 | 0 | 18 | 90 | 0 | 重 | — |
| 32 | 16 | 2 | 12 | 75 | 12.5 | 较轻 | + |
| 33 | 20 | 4 | 3 | 15 | 20 | 轻 | + |
| 34 | 16 | 3 | 3 | 18.75 | 18.75 | 轻 | + |
| 35 | 16 | 4 | 0 | 0 | 25 | — | + |

2.3 愈伤组织继代增殖培养

把各种初始培养基中诱导出的愈伤组织进行继代培养。以验证其诱导愈伤的良好可靠性。通过选择愈伤组织诱导率大于 50%,且长势较好的处理 2、3、8、9、13 在原始培养基中进行继代培养。从表 5 可看出,在 MS+0.5 mg/L 6-BA 的培养基扩增九眼独活愈伤组织,增殖率高,增殖效果好,其愈伤组织紧实,呈白淡黄绿色。处理 3、8、13 在 0.5 mg/L 2,4-D 浓度不变的条件下,随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织增殖速度相对减慢,但其褐化程度有所改善;处理 4、9 在 1.0 mg/L 2,4-D 浓度不变的条件下,随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织增殖速度也相对减慢;处理 2、3、4 在无 6-BA 的条件下,随着 2,4-D 浓度的增加,除处理 2 愈伤组织增殖速度快外,处理 3 和 4 增殖速度相当;处理 8、9 在 0.5 mg/L 6-BA 条件下,随着 2,4-D 浓度的增加愈伤组织增殖速度也基本一致。

表 5 九眼独活愈伤组织继代增殖培养结果

| 处理 | 愈伤组织生长状态 |
|----|--------------------------|
| 2 | 生长迅速,且长势好,呈白淡黄绿色,块状,紧实型 |
| 3 | 生长慢,且长势较好,呈黄褐色,颗粒状,紧实型 |
| 4 | 生长较快,且长势较好,呈白淡黄色,颗粒状,紧实型 |
| 8 | 生长很慢,且长势一般,呈淡黄色,颗粒状,紧实型 |
| 9 | 生长很慢,且长势一般,呈淡黄色,颗粒状,紧实型 |
| 13 | 生长很慢,且长势一般,呈淡黄色,颗粒状,紧实型 |

3 讨论

3.1 2,4-D 和 6-BA 与诱导九眼独活愈伤组织的关系
在 2,4-D 浓度是 0 mg/L 的处理中,九眼独活的愈

伤诱导率都是 0%,且褐化程度较重,且 2,4-D 浓度在 0~1.0 mg/L 范围时,随着 2,4-D 浓度的增加九眼独活的诱导率也相应的有所增加,这可能是由于低浓度 2,4-D 能促进九眼独活愈伤的诱导。在 6-BA 浓度是 0 mg/L 的处理中,九眼独活愈伤的诱导率先增加后逐渐减少至 0%,但褐化程度却逐渐的加重,随着 6-BA 浓度的增加,褐化程度逐渐减轻,这可能是由于 6-BA 对于九眼独活愈伤诱导过程的褐化程度有所减轻的作用。在 6-BA 浓度一定时,随着 2,4-D 浓度的增加,愈伤组织的诱导率都呈现出先增加后减少的趋势;在 2,4-D 浓度一定时,随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织的诱导率整体呈现出逐渐减少的趋势,这些说明在诱导九眼独活愈伤组织的过程中,2 种激素之间有相辅相成的作用,也就是说在提高诱导率和减少褐化程度之间存在一定的相互作用。由表 3 可看出,处理 2 和 9 的愈伤诱导率为 100%,褐化率为 0%,且愈伤组织长势比较好,可选为九眼独活愈伤组织诱导的培养基,即 MS+2,4-D 0.2 mg/L, MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L。

3.2 KT 和 2,4-D 与诱导九眼独活愈伤组织的关系

在 2,4-D 浓度是 0 mg/L 的处理中,九眼独活的愈伤诱导率为 0%,且褐化程度严重,随着 2,4-D 浓度的增加,九眼独活愈伤诱导率也相应的有所增加,这可能是由于 2,4-D 能促进九眼独活愈伤组织的诱导。在 KT 浓度为 0 mg/L 的处理中,九眼独活愈伤组织的诱导率先增加后减少,褐化程度较重,随着 KT 浓度的增加,褐化的程度逐渐的减轻,这可能是由于 KT 有助于减轻九眼独活愈伤诱导过程中褐化的程度。在 KT 一定时,随着 2,4-D 浓度的增加,愈伤组织的诱导率整体呈现先增加后减少的趋势,褐化程度也逐渐减轻;在 2,4-D 浓度一定时,随着 KT 浓度的增加,愈伤组织的诱导率整体呈现先增加后减少的趋势,褐化程度逐渐减轻,这说明 2,4-D 和 KT 在诱导九眼独活愈伤组织时,相互之间可能存在一定的联系,有一定的促进作用。由表 4 可看

出,在 KT 和 2,4-D 激素组合条件下,处理 27 诱导九眼独活愈伤组织其诱导率较高,达到了 100%,但由于白化现象严重,愈伤组织体积较小,不选择继代培养,其它处理的效果也不好,所以在 KT 和 2,4-D 激素组合条件下,未获得较好的愈伤组织培养条件。

3.3 2,4-D、6-BA、KT 与诱导九眼独活愈伤组织的关系

从上面分析可看出,2,4-D 在分别于 6-BA、KT 组合诱导愈伤的过程中都起到了重要的作用,在 2,4-D 浓度为 0 mg/L 的处理中,愈伤诱导率都是 0%,且褐化程度都较严重,随着 2,4-D 浓度的增加,愈伤的诱导率也相应的有所增加,这说明 2,4-D 在九眼独活愈伤的诱导中起到了积极的作用。在 2,4-D 浓度一定时,6-BA 低浓度褐化程度逐渐加重,高浓度褐化程度逐渐减轻,KT 褐化程度也逐渐减轻。

3.4 继代对九眼独活愈伤组织的影响

通过对处理 2、3、4、8、9、13 的继代培养,统计观察处理 2 继代后愈伤生长迅速,长势好,所以可以选为九眼独活嫩叶愈伤组织诱导的继代培养基。

4 结论

2,4-D 浓度一定时,增加 KT 可有效减轻褐化程度;在仅含有 2,4-D 的培养基中,随着 2,4-D 浓度增加会加深褐化程度;在 KT 浓度一定时,增加 2,4-D 能有效减轻愈伤组织的褐化程度。综上所述,处理 2 即 MS+2,4-D 0.2 mg/L 通过第一代和继代的统计分析,在诱导九眼独活嫩叶愈伤组织效果较好,可作为九眼独活嫩叶愈伤组织诱导的培养基。

参考文献

- [1] 四川省卫生厅. 四川中药材标准[M]. 成都: 四川科技出版社, 1987:1.
- [2] 王忠壮. 中药独活九眼独活及羌活的本草考证和资源调查[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(9): 515.
- [3] 彭腾, 涂永勤. 栽培食用土当归抗炎镇痛有效部位的实验研究[J]. 海峡药学, 2007, 19(11): 27-29.

Influence of Different Hormone Combinations on the Leaves Callus Induction of *Aralia cordata* Thunb.

LIU Xiang-hong, HOU Da-bin, ZHAO Na

(Life Science and Engineering College of Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010)

Abstract: Taking young leaves of wild medicinal plants *Aralia cordata* Thunb. as the material, the effect of 2,4-D and KT, 6-BA different combinations on the callus induction of *Aralia cordata* Thunb. were studied. The results showed that 6-BA and KT, added in induction media, decreased calli initiation frequency and their growth rate had been strained; but can reduce the degree of browning callus; low concentrations of 2,4-D in callus induction played an important role, and can get a good callus growth state, the results showed that the most suitable induction culture medium was MS + 2,4-D 0.2 mg/L.

Key words: *Aralia cordata* Thunb.; KT; 2,4-D; 6-BA; tissue culture; callus induction