

# 紫龙角愈伤组织诱导与植株再生的研究

董社琴, 杨亚珍, 杨德良, 叶开温, 田志宏

(长江大学 生命科学院, 湖北 荆州 434025)

**摘 要:**以紫龙角的不同器官为试材,研究不同植物生长调节剂浓度及组合、培养基、光照、外植体等因素对其愈伤组织诱导和植株再生的影响。结果表明:愈伤组织诱导的最佳外植体是不带腋芽茎块,在麦基1号+CH+6-BA 1.0~1.8 mg/L+2,4-D 0.5~2.0 mg/L的培养基上,暗培养6 d时诱导率高达90%以上;质地紧密,有一定疏松度,是建立细胞无性系的优良材料。带腋芽茎块是直接诱导丛生芽的理想外植体,H+TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L培养基适合丛生芽生长、增殖诱导率达到91%。复壮增殖不定芽的培养基为改良的H+TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L;1/2MS+NAA 2.5 mg/L是最佳生根培养基,每个不定芽平均有效根数最高为6.17个。

**关键词:**紫龙角;愈伤组织;植株再生;外植体

**中图分类号:**S 682.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)06-0118-04

紫龙角(*Caralluma hesperidum*)是萝藦科水牛掌属中的一种多年生草本肉质植物,开着五星状黑紫色小花,有极高观赏价值。由于生理特殊,也是珍贵的药用植物,具有极大的商业开发价值。紫龙角用常规繁殖方法繁殖效率低,而且国内外还未曾有紫龙角组织培养的研究报道。该试验研究涉及到外植体的选择、愈伤组织的诱导、继代增殖、直接诱导丛生芽、丛生芽的继代增殖、再生根的诱导等诸多方面,目的是建立高效稳定的再生体系,为紫龙角快速繁殖及育种提供一条快捷有效的途径<sup>[1]</sup>,为新甾类药物的开发与生产提供离体培养技术平台<sup>[2]</sup>,为以后通过基因工程改良紫龙角的药用成分奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试材取自长江大学特种植物园。取带有紫褐色斑纹和不带紫褐色斑纹的植株上带腋芽茎块、不带腋芽茎块、刺突共6种外植体。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基筛选 选用MS、H、White为基本培养基<sup>[3]</sup>,细胞分裂素为TDZ 2.0 mg/L,生长素NAA 0.4 mg/L,培养条件为:pH为6,温度(23±2)℃,光周期为

14 h,光照强度为2 000 lx,光质为日光灯。3次重复,确定带腋芽茎块植株再生的最佳培养基。

1.2.2 供试材料及细胞分裂素的筛选 将带有紫褐色斑纹和不带紫褐色斑纹的植株,以腋芽为中心,横切茎干,切下约0.5 cm厚的茎段即为带腋芽茎块外植体,接种于H培养基上,细胞分裂素为6-BA、TDZ、2iP,生长素NAA<sup>[4]</sup>各设4个水平,弱散射光培养5 d后,转入光下正常培养,30 d后统计不定芽数。

1.2.3 不定芽的增殖复壮及再生根培养 再生的不定芽转至改良的H(降低H培养基中NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>浓度,用Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O代替CaCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O,硝态氮的总量基本不变,铵态氮的总量降低)培养基上,添加TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L和6-BA 6 mg/L+NAA 0.4 mg/L,30 d后统计增殖不定芽数,再生的不定芽经增殖复壮后切割分离再转接到1/2MS+不同浓度的NAA培养基上<sup>[5]</sup>,30 d后统计生根率和有效根数量。

1.2.4 暗培养和培养基对其愈伤组织生长的影响 将不带腋芽茎段的外植体接种于MS、H、麦基1号+CH培养基上,(25±2)℃暗培养2、4、6、8、10、12 d后,转入正常光下培养,30 d后统计出愈率。

1.2.5 不同外植体对其愈伤组织培养的影响 取已处理的植株茎干,去其两端,沿茎干表面纵横垂直切下刺突,即为刺突外植体,再横切茎干,切下约0.5 cm厚的不带腋芽茎段的外植体,接种于不同生长调节剂组合的麦基1号+CH培养基上。先暗培养6 d再转入光下培养,30 d后统计出愈率。

1.2.6 生长调节剂组合水平对其愈伤组织生长影响

**第一作者简介:**董社琴(1958-),女,硕士,教授,硕士生导师,研究方向为植物基因和细胞工程。E-mail:sheqindong@163.com。

**责任作者:**田志宏(1966-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为植物基因和细胞工程。E-mail:zhtian@yangtzeu.edu.cn。

**基金项目:**湖北省教育厅重大资助项目(99Z007)。

**收稿日期:**2011-11-16

将不带腋芽茎段的外植体接种于不同浓度组合的愈伤组织培养基中,30 d后统计出愈率。

### 1.3 数据处理

按照试验设计,随时记录不定芽的生长状态以及愈伤组织的形态,质地,再生不定芽率(%)=(再生不定芽外植体数/接种外植体数)×100。出愈率(%)=(出愈外植体数/接种外植体数)×100。数据处理采用 SAS 8.1 统计分析软件进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 带腋芽茎块植株再生

2.1.1 不同培养基的影响 将2种腋芽茎块分别接种至 MS、H、White 培养基上,培养条件同上,30 d后统计不定芽数,计算再生率。由表1、2可知,不论所加的细胞分裂素是 TDZ 还是 6-BA,在3种培养基中,H培养基上再生不定芽率均为最高,White 培养基上最低,说明 H 为紫龙角腋芽茎块再生植株的较适宜培养基。

表1 腋芽茎块培养中不同培养基对再生芽的影响

Table 1 Effects of different medium in stem tuber of axillary bud culture on the regeneration rate

培养基	TDZ	NAA	紫褐色斑纹的腋芽茎块 Purplish brown strip base of axillary bud	不带紫褐色斑纹的 腋芽茎块 Strip base of axillary bud
Medium /mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>		
MS	2	0.4	26.13±3.88b	21.11±5.22b
H	2	0.4	53.00±3.12a	51.12±2.71a
White	2	0.4	7.56±3.14c	9.46±4.11c

注:同一列中不同字母表示邓肯氏复极差测验在  $P<0.05$  水平下差异显著。下同。

Note: Different letters in the same column mean significance at  $P<0.05$  level by Duncan's SSR test. The same below.

表2 腋芽茎块培养中不同培养基对再生率的影响

Table 2 Effects of different medium in stem tuber of axillary bud culture on the regeneration rate

培养基	6-BA	NAA	紫褐色斑纹的腋芽茎块 Purplish brown strip base of axillary bud	不带紫褐色斑纹的 腋芽茎块 Strip base of axillary bud
Medium /mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>		
MS	4	0.4	20.10±1.56b	21.33±1.22b
H	4	0.4	50.11±4.23a	49.96±3.88a
White	4	0.4	6.49±2.98c	6.11±1.96c

2.1.2 不同外植体及细胞分裂素的影响 由表3可知,带有紫褐色斑纹和不带有紫褐色斑纹植株带腋芽茎块的外植体,再生不定芽能力差异不大,只是带有紫褐色斑纹的腋芽茎块启动时间晚1~3 d,30 d后,统计不定芽的形态和数量,几乎没有差异,再生率均为89%。细胞分裂素 TDZ 对腋芽再生作用明显高于 6-BA、2iP, TDZ 为 4 mg/L 时,2种腋芽的再生率都达到90%以上,再生不定芽最高可达6个(图1-1),但是随着用量的加大,再生不定芽的质量和数量越来越差;6-BA次之,随着用量的加大,再生不定芽数量逐渐增多,在6 mg/L 时,

再生率可达到85%以上,再生不定芽最高也达6个(图1-2);2iP 效果最差。

表3 带腋芽茎块培养中细胞分裂素对再生率的影响

Table 3 Effects of different cytokinins in stem tuber of axillary bud culture on regeneration rate

细胞分裂素		紫褐色斑纹的腋芽茎块	不带紫褐色斑纹的腋芽茎块
Cytokinin/ mg · L <sup>-1</sup>		Purple brown strip base of axillary bud	Strip base of axillary bud
6-BA	2	7.89±2.11e	8.90±1.56e
	4	49.68±5.10c	50.19±4.11c
	6	85.77±3.92a	88.76±5.32a
	8	68.30±1.01b	67.14±4.22b
TDZ	2	70.00±1.12b	70.17±4.33b
	4	90.75±3.10a	91.00±1.28a
	6	66.33±2.17b	68.12±1.40b
	8	41.00±2.94c	40.01±3.17c
2iP	2	0	0
	4	0	0
	6	4.36±2.11f	3.11±1.06f
	8	22.36±1.95d	20.19±3.11d

2.1.3 不定芽增殖复壮与生根培养 再生的不定芽转至增殖培养基 H、改良的 H 后,再分别添加 TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L 和 6-BA 6 mg/L+NAA 0.4 mg/L。由表4可知,改良 H 培养基中不论是加 TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L 还是 6-BA 6 mg/L+NAA 0.4 mg/L,茎相对粗些,这说明氮源的不同对不定芽复壮有影响,铵态氮的相对浓度低有利于不定芽的茎增粗,这与紫龙角所处的生长环境和条件以及与其内生激素水平变动有关<sup>[6]</sup>。不定芽在改良的 H+TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L 培养基上增殖效果最好,平均每个不定芽可增殖3~6个,且色鲜绿,部分高达2~4.5 cm 左右(图1-3),改良的 H 添加 6-BA 6 mg/L+NAA 0.4 mg/L 效果次之。从试验过程来看,可用 6-BA 代替 TDZ。将增殖复壮得到的不定芽接种至生根培养基上(表5)生根率可达90%以上。NAA 浓度为 2.5 mg/L 时,每个不定芽平均有效根数最高为 6.17 个(图1-4、5),与 NAA 0.5 和 1.5 mg/L 处理差异极显著。NAA 浓度

表4 不同氮源对不定芽复壮的影响

Table 4 The effect of different nitrogen source on adventitious bud strong

培养基 Medium	TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L 平均不定芽数 Means of number of adventitious bud/ 个	6-BA 6 mg/L+NAA 0.4 mg/L 平均不定芽数 Means of number of adventitious bud/ 个	平均不定芽数 Means of number of adventitious bud/ 个	平均不定芽数 Means of number of adventitious bud/ 个
H	2.5	0.28	1.9	0.25
改良 H	5.3	0.45	5.0	0.46

注:各处理取30个样本,取其平均数。

Note: All above treatments are means of 30 specimen.

为3.0 mg/L时,每个不定芽平均有效根数也达到 6.09 个,但是根特别脆。

表5 不同浓度 NAA 对不定芽生根的影响

Table 5 Effects of different NAA concentration on rooting of shoots

培养基 Medium	NAA /mg · L <sup>-1</sup>	平均生根数 Means of root number of shoot	生根率 Rate of rooting/%
1/2MS	0.5	3.42±0.50C	91.5
1/2MS	1.0	5.88±0.49CBA	91.9
1/2MS	1.5	4.17±0.21C	95.4
1/2MS	2.0	5.67±0.39CBA	92.5
1/2MS	2.5	6.17±0.34A	100
1/2MS	3.0	6.09±0.31AB	100

注:表中平均值后不同字母表示邓肯氏复极差测验差异极显著(P<0.01)。

Note: Different letters in the same column mean significance at P<0.01 level by Duncan's SSR test.

## 2.2 愈伤组织形成的条件

2.2.1 不同培养基的影响 将不带腋芽茎块分别接种至 MS、H、麦基 1 号+CH 培养基上,培养条件为:温度(25±2)℃,光周期为 14 h,光强为 2 000 lx,光质为日光灯。30 d 后统计发生愈伤组织的外植体数,计算出愈率。由表 6 可知,在 3 种培养基中,麦基 1 号+CH 培养基上出愈率最高,H 培养基上最低,说明麦基 1 号+CH 为培养愈伤组织比较适合的培养基。

表6 不带腋芽茎块培养中不同培养基对出愈率的影响

Table 6 Effects of different medium in stem tuber of non-axillary bud culture on calli rate

培养基 Medium	6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	2,4-D /mg · L <sup>-1</sup>	不带腋芽茎块 stem tuber of non-axillary bud
MS	4	2	28.15±3.11b
麦基 1 号+CH	4	2	65.00±5.11a
H	4	2	25.33±4.10b

2.2.2 紫龙角的不同部位形成愈伤组织能力的差异 在麦基 1 号+CH 的培养基中,4 种外植体的诱导率都较高,在 90%~100%,100%的诱导率居多,愈伤组织发生时间在 4~7 d,6 d 居多,生长都较快,刺突外植体的愈伤组织发生时间最早(4 d),诱导率达 100%,但愈伤组织为黄褐色,结构致密,出愈 10~12 d 时开始老化、衰败(图 1-6),这部分愈伤组织可早期收获,用来做有效成分分析<sup>[7-8]</sup>。紫褐色斑纹和不带紫褐色斑纹植株茎块,诱导愈伤组织的生长状况基本一致。愈伤组织刚开始为淡黄色,之后渐渐转至淡绿加点黄色,结构较紧密,增殖很快,没有老化现象(图 1-7、8),这部分愈伤组织继代培养后,可用来选择建立优良的细胞无性系。

2.2.3 不同暗培养时间的影响 将不带腋芽茎块接种于麦基 1 号+CH 培养基上,暗培养 2 d 时,茎块基部仅仅变黄,稍膨大,暗培养到 4 d 时划伤处出现明显膨大,先出愈,至 6 d 时外植体出愈越来越多,而且黄白带点

绿,增殖很快,7、8 d 时基本维持原状,到 10 d 和 12 d 时又有新愈出现,但长势不好,说明暗培养时间过长也不利于愈伤组织生长,因此暗培养时间初步确定为 6 d。

2.2.4 生长调节剂组合对愈伤组织生长的影响 6-BA 浓度设定为 0、0.5、1.5、2.0、3.0、4.0、4.5 mg/L,2,4-D 浓度设定为 0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/L,共 8 个处理,3 次重复,之后对理想的生长调节剂组合进一步验证,从试验结果来看,除 2,4-D 浓度为 0 的组合没有产生愈伤组织以外,其它组合都诱导出了愈伤组织,诱导率在 80%~100%,以 100%的诱导率居多。6-BA 浓度为 0 时,2,4-D 浓度只要不为 0 都可以诱导出愈伤组织,只是 6-BA 浓度为 0 的组合产生愈伤组织时间比较晚(18~20 d),其它组合都在 5~8 d 后产生了愈伤组织。说明生长素对愈伤组织的诱导是主因子。6-BA 有协同效用,

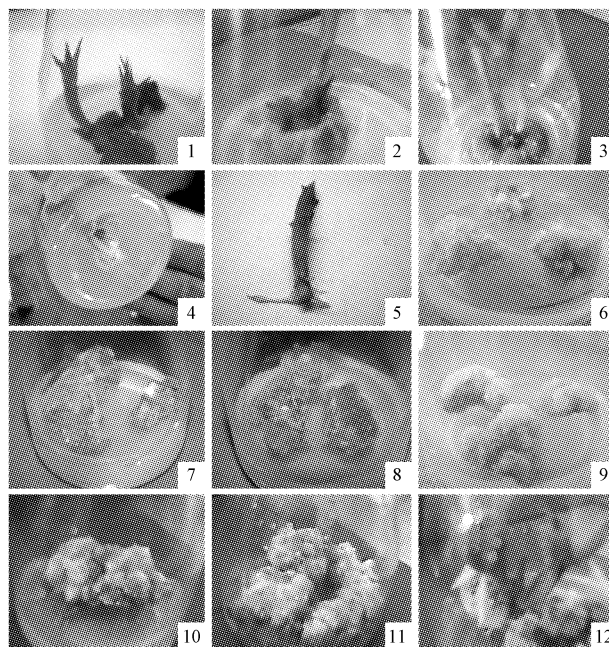


图1 愈伤组织诱导与植株再生

注:1. TDZ 4 mg/L 诱导丛生芽。2. 6-BA 6 mg/L 诱导丛生芽。3. 改良的 H+TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L 不定芽增殖。4、5. 1/2MS+2.5 mg/L 培养基上的生根。6. 刺突外植体的愈伤组织生长情况。7. 紫褐色斑纹植株茎块的愈伤组织生长情况。8. 不带紫褐色斑纹植株茎块的愈伤组织生长情况。9、10、11. 浓度组合为 6-BA 1.0~1.8 mg/L+2,4-D 0.5~2.0 mg/L 愈伤组织生长情况。12. 气生根生长情况。

Fig. 1 Induced calli and plant regeneration

Note: 1. TDZ 4 mg/L induced bundle gemmulation. 2. 6-BA 6 mg/L induced bundle gemmulation. 3. Adventitious bud proliferation on improved culture medium H+TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L. 4, 5. Development of rootage on the culture medium 1/2MS+2.5 mg/L. 6. Calus growing of the spike explant. 7. Callus growing of the purple brown stripe base of the plant. 8. Callus growing of the stripe base of the plant. 9, 10, 11. Callus growing during the concentration combination range 6-BA 1.0~1.8 mg/L+2,4-D 0.5~2.0 mg/L. 12. Growing of aerial root.



在 6-BA 浓度不变的情况下,随着 2,4-D 的浓度增大愈伤组织的生长速度增快,颜色由黄褐色→黄色→黄绿色转变,愈伤组织结构由蓬松向紧密转变,但当 2,4-D 浓度大于 2.0 mg/L 后结构反向转变。由紧密转向蓬松,说明 2,4-D 浓度过高及较低都不能使愈伤组织结构和质地达到理想的状态,在 2,4-D 浓度不变的情况下,随着 6-BA 浓度的增大,愈伤组织的结构先变紧密,然后再由紧密转向蓬松,也说明 6-BA 浓度过高及较低时不能使愈伤组织的结构和质地达到理想的状态,植物激素有抑制和促进的“二重性”,二者比值适中时,才能促进愈伤组织生长<sup>[9]</sup>,综合考虑理想的浓度组合范围应为 6-BA 1.0~1.8 mg/L+2,4-D 0.5~2.0 mg/L(图 1-9、10、11)。在整个诱导过程中,出愈时间无明显规律。

### 3 结论与讨论

该研究表明,愈伤组织诱导的最佳外植体是不带腋芽茎块,在麦基 1 号+CH+6-BA 1.0~1.8 mg/L+2,4-D 0.5~2.0 mg/L 的培养基上,暗培养 6 d 时诱导率高达 90%以上。而且质地紧密,有一定疏松度,是建立细胞无性系的优良材料;带腋芽茎块是直接诱导丛生芽的理想外植体,H+TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L 培养基适合丛生芽生长,增殖诱导率达到 91%;复壮增殖不定芽的培养基为改良的 H+TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L;1/2MS+NAA 2.5 mg/L 是最佳生根培养基,每个不定芽平均有效根数最高为 6.17 个。

在直接诱导丛生芽的过程中,先是从基部膨大长出愈伤组织,然后才有丛生芽的产生。最多生产 3~6 个不定芽,这里产生的愈伤组织呈绿色,结构致密,生长较快,但一直未见分化出芽,这种现象可能是由于产生的再生芽抑制了下面的愈伤组织分化。丛生芽复壮试验

时,有一部分培养瓶内,在再生芽的中下部极易从空中直接长出根,根细长,生长较快,如气生根一般(图 1-12)。这种现象说明湿度、温度、光照强度、光照时间均对再生根的发生产生较大的影响,这部分培养瓶内由于湿度较大,温差也大,光照强度又比较弱,光照时间短,容易长出这种根,镜检时绝大多数没有形成维管束,即使有维管束也不发达,这种不是由腋芽处发生的,又在无菌条件下空中生长的,是很好的无菌材料,可用来做其它方面的诱导和转化研究。生长调节剂组合是影响愈伤组织诱导、增殖的主因子,所有组合的愈伤组织长势良好,但生长速度差别较明显,2,4-D 对促进愈伤组织的增殖效用明显,对其质地和颜色改变也有效;6-BA 对愈伤组织的质地效用显著,对其生长效用不明显,对愈伤组织颜色和结构基本不起作用。

### 参考文献

- [1] 黄清俊,丁雨龙,谢维荪,等. 多肉植物离体种质研究的迫切性、可行性及研究现状[J]. 上海农业学报,2003,19(1):41-45.
- [2] 高山林,朱丹妮,徐德然,等. 组织培养技术的研究[J]. 药用生物技术,1995,2(4):33-36.
- [3] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社,2002:25-28.
- [4] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术[M]. 北京:金盾出版社,2003:105-113.
- [5] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2001:169-205.
- [6] 廖祥儒. 施  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NH}_4^+$  与植物抗盐性关系[J]. 土壤肥料,1997(1):14-16.
- [7] 姜明兰,刘声远. 组织培养生产高山红景天有效成分的研究[J]. 沈阳农业大学学报,1994,25(4):355-359.
- [8] 郑光植. 药用植物组织培养在工业生产上应用研究的进展[J]. 植物生理学通讯,1980(4):1-12.
- [9] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2001:60-66.

## Studies on Induced Calli and Plant Regeneration of *Caralluma hesperidum*

DONG She-qin, YANG Ya-zhen, YANG De-liang, YE Kai-wen, TIAN Zhi-hong

(College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

**Abstract:** The axillary bud of a stem tuber, non-axillary bud of a stem tuber and spiked, were cultured in order to study the factors affecting their regeneration and calli, such as density and combination of plant growth regulator, culture medium, days of dark culture and explant. The results showed that the best explant to induced calli was non-axillary bud of a stem tuber, and the calli ratio was 90% when they were cultured with No. 1. Maijin+CH+6-BA 1.0~1.8 mg/L+2,4-D 0.5~2.0 mg/L and 6 d of days in the dark, besides, compact quality and a certain extent looses, were built up best material of cell asexual line. The best explant to induced clumped bud was axillary bud of a stem tuber, and the bud ratio was 91% when the axillary bud of a stem tuber were cultured with H+TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L. The best culture medium of adventitious bud strong was improved H+TDZ 4 mg/L+NAA 0.4 mg/L. The best culture medium rooting was 1/2MS+NAA 0.5 mg/L.

**Key words:** *Caralluma hesperidum*; calli; plant regeneration; explant