

# 星点木愈伤组织诱导及植株再生研究

管 艳, 梁 国 平, 李 玲, 桂 明 春, 黄 凤 翔, 田 海

(云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

**摘 要:**以星点木幼嫩茎段为外植体, 对其愈伤组织诱导和植株再生进行试验, 以期筛选出其在组织培养过程中较合适的激素组合。结果表明: 诱导愈伤组织最佳培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L, 其诱导率为 88.9%; 诱导不定芽分化最佳培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L, 其诱导率为 59.26%; 不定芽增殖最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.8 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L, 其增殖系数为 1.91; 最佳生根培养基为 1/2 MS+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 15 g/L+琼脂 6 g/L, 其生根率达 81.2%。

**关键词:**星点木; 茎段; 愈伤组织; 植株再生

**中图分类号:**S 688 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0109-04

星点木(*Dracaena godseffiana*)属龙舌兰科龙血树属多年生草本植物, 又名星虎斑木、星点千年木。植株高达 1 m, 叶对生或 3 叶轮生椭圆状披针形或卵形。星点木叶革质, 叶面泛布许多黄白色斑点, 状如繁星点点, 轻快柔和, 清新悦目, 因形而得名。此种植物耐旱、耐阴, 可庭院丛植或盆栽, 且枝叶又是优美的花材, 深受人们的喜爱, 具有较大的市场空间。但因其生长缓慢, 常规繁殖扦插法速度慢, 故无法满足市场需求。采用植物组织培养技术可大量繁殖苗木, 解决苗木紧缺问题, 而目前尚鲜见利用组织培养技术扩繁星点木的报道<sup>[1]</sup>。鉴于此, 该试验以星点木幼嫩茎段为外植体, 对其愈伤组织诱导及其植株再生进行了试验, 以期优化星点木组培苗再生体系, 为大规模繁殖星点木提供有力的支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试星点木采自云南省西双版纳热带作物科学研究所的花卉试验大棚, 以星点木当年生幼嫩茎段为外植体。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体处理与消毒** 取当年春季新抽出长约 10~20 cm 未展叶的嫩枝条, 洗净, 剪成约 3~5 cm 长的茎段。在无菌条件下先用 75% 乙醇摇晃消毒 30 s, 无菌水清洗 1 次, 再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min, 无菌水冲洗 4~5 次备用。

**1.2.2 愈伤组织的诱导** 在超净台上将已灭好菌的外植体切成长约 1.0 cm 的茎段接种于含有不同浓度 2,4-D (0.2、0.5、1.0 mg/L) 和 TDZ (0.5、1.0 mg/L) 的愈伤组织诱导培养基上, 均附加 6-BA 2.0 mg/L, 培养 50 d 后统计不同培养基上愈伤组织的诱导率, 愈伤组织的诱导率(%) = 脱分化外植体总数/接种的总外植体数 × 100%。

**1.2.3 不定芽的诱导** 将生长良好的愈伤组织转接至添加不同浓度 6-BA (2.0、3.0、4.0 mg/L) 的不定芽诱导培养基上, 均附加 NAA 0.5 mg/L, 培养 45 d 后统计不定芽的诱导率, 不定芽的诱导率(%) = 产生不定芽的愈伤块数/接种的总愈伤块数 × 100%。

**1.2.4 不定芽的增殖** 单因素试验: 将分化出的不定芽切成单芽转接至分别添加 6-BA (0.5、1.0、2.0 mg/L) 和 NAA (0.2、0.4、0.6 mg/L) 的增殖培养基上, 每种处理接 10 瓶, 每瓶接 3 个, 45 d 后统计芽的增殖系数(芽的增殖系数 = 增殖芽的总数/接种单芽总数, 下同)和成苗数(成苗数是指高度大于 3 cm 不定芽的数量, 下同), 3 次重复。正交实验: 以 NAA、6-BA、GA<sub>3</sub> 为试验因素(只考虑 NAA 与 6-BA 之间的交互作用, 其它因素间的交互作用忽略不计), 进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验设计(表 1), 研究不同激素组合对星点木不定芽增殖的影响。每种处理接 10 瓶, 每瓶接 3 个单芽, 45 d 后统计芽的增殖系数, 3 次重复。

**1.2.5 生根培养** 将高度大于 3 cm 的不定芽接种至添加不同浓度的 IBA (0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L) 的生根培养基上, 每种处理接 10 管, 每管接 1 个不定芽, 培养 30 d 后统计生根率、生根数, 并观察苗的生长势, 3 次重复。

**第一作者简介:**管艳(1968-), 女, 农艺师, 现主要从事植物组织培养等研究工作。E-mail: 1098898036@qq.com.

**收稿日期:**2013-09-10

1.2.6 培养条件 该试验除生根培养基采用 1/2 MS 基本培养基外,均以 MS 为基本培养基,附加蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L,pH 5.8~6.2,培养温度为(26±0.5)℃,光照强度为 1 000~1 500 lx,光照时间 10 h/d。

表 1 正交实验的因素与水平

水平	因素		
	A NAA/mg · L <sup>-1</sup>	B 6-BA/mg · L <sup>-1</sup>	C GA <sub>3</sub> /mg · L <sup>-1</sup>
1	0.4	0.5	0.2
2	0.6	1.0	0.6
3	0.8	2.0	1.0

### 1.3 数据分析

试验数据用 Microsoft Excel 2003 软件处理,用 DPS v 7.05 版数据处理系统进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 TDZ 和 2,4-D 不同浓度组合对星点木茎段愈伤组织诱导的影响

试验观察表明,星点木茎段产生愈伤组织的速度较慢,培养 10 d 左右,仅茎节处开始膨大,无愈伤组织产生,20 d 后膨大处产生少许浅黄色的愈伤组织,随着培养时间的推移,这些愈伤组织逐渐长大。由表 2 可看出,在不含 TDZ 的处理中,愈伤组织诱导率较低,这充分说明 TDZ 在星点木茎段愈伤组织诱导中起到关键性作用;TDZ 和 2,4-D 适当浓度组合有利于星点木茎段愈伤组织的诱导,当 TDZ 为 0.5 mg/L,2,4-D 为 1.0 mg/L 时,茎段愈伤组织的诱导率最高,可达 88.9%。

表 2 不同浓度的 TDZ 和 2,4-D 组合对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of TDZ and 2,4-D treatments on inductions of callus of <i>Dracaena godseffiana</i>				
TDZ 浓度 TDZ concentration /mg · L <sup>-1</sup>	2,4-D 浓度 2,4-D concentration /mg · L <sup>-1</sup>	接种外植体数 Vaccinations explants number /个	愈伤组织诱导数 Adventitions callus number /个	愈伤组织诱导率 Frequency of callus induction /%
0.0	0.2	40	0	0.0
0.0	0.5	50	3	6.0
0.0	1.0	40	5	12.5
0.5	0.2	45	24	53.3
0.5	0.5	50	38	76.0
0.5	1.0	45	40	88.9
1.0	0.2	35	13	47.3
1.0	0.5	47	37	78.7
1.0	1.0	40	32	80.0

### 2.2 6-BA 对星点木不定芽诱导的影响

愈伤组织在星点木不定芽诱导培养基中培养 15 d 后,由浅黄色变为黄绿色,质地疏松。培养 30 d 后,愈伤组织表面有绿色芽点出现,此时,仅有芽点产生,还没有形成不定芽,继续培养 15 d 后,可清晰看到愈伤组织表面有许多不定芽。由表 3 可知,相对较低浓度的 6-BA 有利于不定芽的分化,较高浓度的 6-BA 则不利于不定芽的分

化,即当 6-BA 浓度为 2.0~3.0 mg/L 时能提高不定芽的分化率,且不定芽粗大,长势较好,当 6-BA 浓度大于 3.0 mg/L 时,对不定芽的形成有抑制作用,且不定芽细弱,长势极差。由此可知,在星点木不定芽的分化中,6-BA 的浓度不易超过 3.0 mg/L。

表 3 不同浓度 6-BA 对星点木不定芽分化的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA on differentiation of adventitious buds of <i>Dracaena godseffiana</i>			
6-BA 浓度 6-BA concentration /mg · L <sup>-1</sup>	接种愈伤数 Vaccinations callus number/个	不定芽分化率 Frequency of adventitious buds differentiation/%	生长情况 Growth status
2.0	90	59.26	嫩绿,粗大,长势好
3.0	90	56.93	嫩绿,粗大,长势好
4.0	90	21.59	嫩黄,细弱,长势差

### 2.3 6-BA 对星点木不定芽增殖的影响

不定芽的增殖情况与 6-BA 的浓度密切相关,6-BA 能促进芽的产生,同时亦能抑制芽的生长。由表 4 可见,增殖系数随其浓度的增加而增加,而成苗数随其浓度的增加而减少,经方差分析可知,6-BA 对增殖系数和成苗数的影响均达极显著水平( $P_{\text{增殖系数}} = 0.0001 < 0.01$ ,  $P_{\text{成苗数}} = 0.0029 < 0.01$ )。对数据进一步做多重比较可知,对增殖系数来说,当浓度为 2.0 mg/L 时,为最大值(3.37),不添加 6-BA 的处理中,仅为 1.19;对于成苗数而言,不添加 6-BA 的处理成苗数最多,为 0.650 株,6-BA 为 2.0 mg/L 时最差,无苗生成。当浓度高于 1.0 mg/L 时,不定芽虽多,但小而细弱,长势较差,难以成苗;不添加 6-BA 的处理中,成苗数虽多,但细弱,长势稍弱。因此,6-BA 浓度为 0.5 mg/L 较适合星点木不定芽的增殖。

表 4 6-BA 对星点木不定芽增殖的影响

Table 4 Effects of different concentrations of 6-BA on proliferation of buds of <i>Dracaena godseffiana</i>			
6-BA 浓度 6-BA concentration /mg · L <sup>-1</sup>	增殖系数 Proliferation coefficient	成苗数 Seedlings number	不定芽生势 Growth status of buds
0.0	1.19 <sup>d</sup>	0.650 <sup>a</sup>	有根生成,细弱
0.5	2.33 <sup>c</sup>	0.397 <sup>ab</sup>	无根生成,芽粗大,苗粗壮
1.0	2.92 <sup>b</sup>	0.237 <sup>bc</sup>	无根生成,芽细弱,苗粗壮
2.0	3.37 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	无根生成,芽细弱

注:表中同一列不同小写字母表示在 0.05 水平下差异显著。下同。

Note: Different small letters indicate significant difference at the 0.05 level. The same below.

### 2.4 NAA 对星点木不定芽增殖的影响

由表 5 可见,NAA 对不定芽的增殖具有一定的影响,这种影响主要表现在长势上,芽的长势随其用量的增加而增强,较高浓度(0.4、0.6 mg/L)的 NAA 能够促进芽的伸长及苗木的增粗;经方差分析可知,NAA 对增殖系数和成苗数的影响均不显著( $P_{\text{增殖系数}} = 0.11 > 0.05$ ,  $P_{\text{成苗数}} = 0.74 > 0.05$ )。4 个处理中,增殖系数均在 1.90~2.30,成苗数在 0.30~0.36 株。

表 5 NAA 对星点木丛芽的继代增殖的影响

Table 5 Effects of different concentrations of NAA on proliferaton of bub of *Dracaena godseffiana*

NAA 浓度 NAA concentration /mg · L <sup>-1</sup>	增殖系数 Prolifetation coefficient	成苗数 Seedlings number/株	不定芽生势 Growth status of bubs
0.0	2.22	0.36	伸长不明显,长势较差
0.2	2.27	0.33	伸长明显,长势一般
0.4	1.92	0.31	伸长明显,长势好
0.6	2.06	0.30	伸长明显,长势好

2.5 激素组合对星点木不定芽增殖的影响

不同激素组合对不定芽的增殖效果存在一定的差异。表 6 表明,NAA、6-BA 及其交互作用对增殖系数的影响达差异极显著水平,而 GA<sub>3</sub> 对增殖系数无显著影响。

表 6 方差分析结果

Table 6 Results of analysis of variance

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	F 值 F value
NAA	2	8.1248 **
6-BA	2	19.4609 **
GA <sub>3</sub>	2	3.3994
NAA×6-BA	2	33.2466 **
误差	18	

注: \*\* 表示在 0.01 水平上差异显著。

Note: \*\* indicate significant difference at the 0.01 level.

由表 7 可知,增殖系数最高的组合是 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>,为 1.91,不定芽粗大,长势较好。增殖系数最低为(A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>)组合,仅为 0.86;由 *k* 值大小可知,各因子水平的最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>;从极差 *R* 值的大小可以看出,3 个因子对增殖系数影响的主次关系为 NAA×6-BA>6-BA>NAA>GA<sub>3</sub>。

表 7 激素组合对星点木不定芽增殖的影响

Table 7 The results of hormone combination on proliferation of bub of *Dracaena godseffiana* mg/L

试验编号 Test number	因素 Factors				增殖系数 Prolifetation coefficient
	A	B	C	A×B	
1	1	1	1	1	1.40 <sup>bc</sup>
2	1	2	2	2	1.06 <sup>ef</sup>
3	1	3	3	3	1.15 <sup>de</sup>
4	2	1	2	3	1.57 <sup>b</sup>
5	2	2	3	1	1.36 <sup>bcd</sup>
6	2	3	1	2	0.86 <sup>f</sup>
7	3	1	3	2	1.19 <sup>cde</sup>
8	3	2	1	3	1.91 <sup>a</sup>
9	3	3	2	1	1.23 <sup>cde</sup>
K <sub>1</sub>	10.88	12.51	12.58	12.00	
K <sub>2</sub>	11.37	13.05	11.60	9.350	
K <sub>3</sub>	13.06	9.750	11.13	13.96	
k <sub>1</sub>	1.209	1.390	1.398	1.333	
k <sub>2</sub>	1.263	1.450	1.289	1.039	
k <sub>3</sub>	1.451	1.083	1.237	1.551	
R	0.242	0.367	0.161	0.512	
主次顺序	A×B>B>A>C				
优组合	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>				

2.6 IBA 不同浓度对生根的影响

由表 8 可知,生根率随其浓度的增加先增加后降低,浓度为 1.0 mg/L 时生根率最高,为 81.2%,浓度为 0.2 mg/L 时最低,为 67.6%;平均生根数随 IBA 浓度的增加而增加,浓度为 2.0 mg/L 时最高,为 4.99 根,最低是 0.2 mg/L,仅为 2.30 根;在平均根长方面,以浓度为 0.2 mg/L 和 0.5 mg/L 的处理最好,分别为 4.07 cm 和 3.98 cm,浓度为 2.0 mg/L 时最差,为 2.96 cm。因此,IBA 浓度为 1.0 mg/L 最利于根的生长。

表 8 不同浓度 IBA 对生根的影响

Table 8 Effects of different concentrations of IBA on Rooting of *Dracaena godseffiana*

IBA 浓度 IBA concentration /mg · L <sup>-1</sup>	生根率 Rooting rate/%	平均生根数 Average root number/根	平均根长 Average length/cm	最长根长 The longest /cm
0.2	67.6 <sup>b</sup>	2.30 <sup>b</sup>	4.07 <sup>a</sup>	5.26 <sup>a</sup>
0.5	76.8 <sup>ab</sup>	3.46 <sup>ab</sup>	3.98 <sup>a</sup>	5.06 <sup>a</sup>
1.0	81.2 <sup>a</sup>	4.00 <sup>ab</sup>	3.34 <sup>ab</sup>	4.63 <sup>a</sup>
2.0	73.0 <sup>ab</sup>	4.99 <sup>a</sup>	2.96 <sup>b</sup>	3.22 <sup>b</sup>

3 讨论

在植株组织培养中,植株再生受植物基因型、外植体来源、培养基成分、培养条件等诸多因素影响<sup>[2]</sup>,其中生长调节剂物质的种类、含量及组成比例是控制植物器官脱分化和再分化的主导因素。试验中发现,TDZ 和 2,4-D 这 2 种激素适当浓度的配比是提高茎段愈伤组织诱导率的重要因素,其中 TDZ 对愈伤组织的形成起关键性作用,不添加 TDZ 的处理中,愈伤组织的诱导率极低,均小于 14.0%;相对较低浓度的 6-BA(2.0~3.0 mg/L)利于不定芽的分化,较高浓度的 6-BA 则不利于不定芽的分化。这可能是由于 6-BA 浓度过高,促进芽原基产生大量芽点,过多的芽点在营养物质和激素供应方面形成剧烈竞争,从而使部分芽点不能进一步生长形成不定芽。

由单因素试验可知,6-BA 对芽增殖系数具有极显著的影响,而 NAA 对芽增殖系数无显著影响,由此可知,6-BA 对芽增殖系数的影响大于 NAA。同样,从正交实验的极差 *R* 值得大小可以看出 6-BA 对芽增殖系数的影响大于 NAA。由此可知,单复因子试验的结果是一致的。

星点木茎段植株再生主要包括愈伤组织的诱导,不定芽的分化和生根成苗 3 个过程,其中愈伤组织和不定芽的诱导率的高低直接影响到植株再生率的高低。试验结果表明,愈伤组织和不定芽的诱导率普遍不高,愈伤组织的诱导率不超过 90%,不定芽的诱导率不超过 60%。这对星点木植株再生带来严重的影响。鉴于此,要优化星点木组培苗再生体系,愈伤组织诱导率和不定芽诱导率有待提高。

# 苦瓜 MAP30 基因的密码子优化及在毕赤酵母中的表达

王 芳, 王 丽 媛, 乔 禹, 韩 旭, 丁 国 华

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江省高等院校植物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150025)

**摘 要:**以苦瓜为试材,采用 SDS-PAGE 和 Western-blot 的方法,研究经密码子优化后的苦瓜 MAP30(Momordica anti-HIV protein of 30 kDa)基因在新型毕赤酵母中的表达。结果表明:与未优化基因相比,优化基因在新型毕赤酵母中的表达量有所提高。pGAPH $\alpha$ 与甲醇诱导型启动子(pPIC9)相比提高了安全性,适合应用到医药领域。

**关键词:**苦瓜;MAP30;毕赤酵母;pGAPH $\alpha$ ;优化基因

**中图分类号:**S 642.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0112-04

MAP30(Momordica anti-HIV protein of 30 kDa)是 Lee-Huang 等<sup>[1]</sup>首次从苦瓜种子和果实中分离得到的单

链核糖体失活蛋白。研究表明 MAP30 具有抗病毒、抗肿瘤的活性,对 HIV、疱疹病毒具有很强的抑制作用<sup>[2-3]</sup>。此外,MAP30 还可以特异的诱导肿瘤或肿瘤转化细胞的凋亡,但对正常细胞无任何毒副作用,因此具有巨大的临床应用价值<sup>[4-5]</sup>。

MAP30 基因的全长是 861 bp,没有内含子,能编码 286 个氨基酸。MAP30 可以在大肠杆菌表达系统中表达,其优点是可以快速大量的繁殖,但其表达产物不能正确的折叠和糖基化修饰<sup>[6]</sup>。伴随着生物技术的不断发展,甲醇营养型酵母-巴斯德毕赤酵母表达系统被广泛应用。巴斯德毕赤酵母可以在甲醇作为唯一碳源和能

**第一作者简介:**王芳(1987-),女,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail:291392224@qq.com.

**责任作者:**丁国华(1963-),男,博士,教授,研究方向为植物分子生物学。E-mail:hsddgh@hrbnu.edu.cn.

**基金项目:**黑龙江省教育厅科研资助项目(11551142);黑龙江省高校科技创新团队研究计划资助项目;哈尔滨师范大学科技创新团队研究计划资助项目(KJTD-2011-2)。

**收稿日期:**2013-09-16

## 参考文献

[1] 曾宋君,陈之林,段俊.星点木的组织培养和快速繁殖[J].植物生理通讯,2003(6):632.

[2] 李浚明,朱登云,编译.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,2009:25-42.

## Study on Callus Induction and Plantlet Regeneration of *Dracaena godseffiana*

GUAN Yan, LIANG Guo-ping, LI Ling, GUI Ming-chun, HUANG Feng-xiang, TIAN Hai  
(Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100)

**Abstract:** Taking the stem segments of *Dracaena godseffiana* as explant, the callus induction and plantlet regeneration were studied, in order to select the suitable hormone combination in the process of tissue culture. The results indicated that: the optimum medium for callus induction was MS+6-BA 2.0 mg/L+TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L, induction rate was 88.9%; the optimum medium for adventitious bud differentiation was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L, induction rate was 59.26%; The optimum medium for adventitious bud proliferating was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.8 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.2 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L, proliferation coefficient was 1.91; The optimum medium for rooting was 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+sucrose 15 g/L+agar 6 g/L, rooting rate was 81.2%.

**Key words:** *Dracaena godseffiana*; stems; callus; plant regeneration