

苦豆子愈伤组织的诱导及去褐化处理

陈亚萍, 高 媛, 顾沛雯

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以苦豆子为试材,采用组织培养的方法,研究了外植体种类、激素水平、水解酪蛋白浓度等不同因子对愈伤组织生长状态的影响,同时对愈伤组织进行了去褐化处理。结果表明:苦豆子子叶为诱导愈伤组织的最佳外植体;最佳诱导培养基为 MS+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;最佳继代培养基为 MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+CH 1 000 mg/L;添加 3%蔗糖的条件下快速继代是较好的去褐化措施。

关键词:苦豆子;愈伤组织;继代培养;去褐化处理

中图分类号:Q 946.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0096-04

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)属豆科槐属多年生半灌木或小灌木植物,别名苦甘草、苦豆根、西豆根、欧苦参、苦豆草等,其根系发达,耐干旱盐碱^[1],抗严寒风沙,在荒漠和沙性土壤上具有极强的防风抗蚀能力,主要分布在我国西北、华北地区以及中亚一带^[2],是我国西北荒漠化地区广泛分布的一种防风固沙和改良盐碱地的重要野生植物^[3]。苦豆子植株和种子中富含 20 多种生物碱,还包括黄酮类物质、有机酸、氨基酸、蛋白质和多糖等^[4],具有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀虫、增强免疫等多种生理活性^[5],是克泻灵、止痢宁、妇炎栓、苦生素注射液等多种药物的主要原料,其需求量很大^[4]。

第一作者简介:陈亚萍(1990-),女,宁夏固原人,本科,研究方向为植物保护。E-mail:1248577621@qq.com

责任作者:顾沛雯(1969-),女,宁夏银川人,博士,教授,现主要从事植物病理学等教学与科研工作。E-mail:gupeiwen2013@126.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260452)。

收稿日期:2014-03-13

目前,国内主要是通过刈割苦豆子植株直接提取活性物质,但是苦豆子野生资源有限,滥采滥用将导致其枯竭,使大量野生草场沙化,影响生态平衡^[2]。与此同时,苦豆子生长缓慢,不利于人工栽培。因此,合理开发利用苦豆子资源是其长足发展的重要途径。生物技术的快速发展为解决这一问题带来曙光,通过植物细胞培养可以生产天然的植物成分并提高其含量,这一技术在红豆杉^[6]、杜仲^[7]、人参^[8]等植物中应用较为成熟。

李晓莺等^[9]率先进行苦豆子再生植株的培养研究,但出愈率较低且不系统;2008年,王立强等^[5]对苦豆子愈伤组织诱导及继代培养进行了研究,得到诱导愈伤组织及继代培养的最佳培养基,但愈伤组织容易褐化;曹有龙等^[6]对苦豆子的组织培养及植株再生进行了研究,愈伤组织出愈率高达 100%,但褐化提前。该试验在已有研究基础上,开展苦豆子愈伤组织培养试验,得到生长状态良好且褐化率低的愈伤组织,以期建立大规模细胞培养提供重要的技术手段和理论依据,为生产苦豆子生物碱提供优质原料和必要的技术依据。

(1. Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097; 2. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 3. Agricultural Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: Taking the onion embryo as explants, the tillered-onion regeneration system was established with MS as the basic culture induction, the effect factors, such as different onion varieties and different combination of hormone treatment on the regeneration process was analiped. The results showed that 'Fenhuang Jingiu' onion varieties was suitable for culture induction with the highest callus induction rate; MS+4 mg/L 2-4, D+1 mg/L 6-BA was the most suitable for callus induction, the rate of callus induction reached 72.1%. Different varieties had the highest rate of callus with 72.1%; addition of 1.0 mg/L TDZ and 0.5 mg/L NAA to the MS medium promoted a the highest frequency of regeneration (78.3%); the medium which contained 1/2MS+0.01 mg/L NAA induced white strong roots, rooting rate reached 100%; the regenerated plantlets were domesticated and transplanted in greenhouse; the survival rate was 95%.

Key words: onion; callus; tissue culture

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料:采自宁夏灵武白芨滩国家自然保护区的健康苦豆子豆荚。

供试试剂:MS培养基、萘乙酸(NAA)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、活性炭、维生素C、3%蔗糖、75%酒精、5%次氯酸钠和无菌水。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 挑选饱满、圆润、无病害、虫蛀的苦豆子籽粒,用砂纸打磨。磨薄种皮的种子用蒸馏水冲洗3~4次,将表面杂质冲洗干净。在室温下将处理好的种子浸泡1~2 h,软化种皮后,用75%的酒精消毒1 min,无菌水冲洗3次,再用5%的次氯酸钠溶液浸泡3 min,无菌水冲洗3~5次,置于铺有无菌滤纸的培养皿中,加无菌水,放入25℃培养箱中,培养3~5 d催芽。

1.2.2 不同外植体对苦豆子愈伤组织诱导的影响 苦豆子的芽长到1~2 cm时,按1.2.1方法将发芽的籽粒去皮并消毒,切取子叶、胚轴和胚根接种于愈伤组织诱导培养基MS+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L上培养,光周期为16 h/d,光照强度1 000 lx,温度25℃,25 d后统计愈伤组织诱导情况并计算出愈率。出愈率(%)=诱导愈伤组织数/接种数×100%。

1.2.3 不同激素对比对苦豆子愈伤组织诱导的影响 将苦豆子子叶一分为二,接种在添加不同浓度激素(2,4-D、6-BA和NAA)的MS培养基上(表2),每个处理接种70个外植体,培养条件如1.2.1方法,25 d后统计愈伤组织诱导情况。

1.2.4 愈伤组织继代培养 选生长状况良好的愈伤组

织,切成边长为0.5 cm的愈伤组织块,分别转接至添加不同激素配比和水解酪蛋白浓度的继代培养基上,研究不同激素配比(表3)及水解酪蛋白(表4)对苦豆子继代增殖的影响,25 d左右观察愈伤组织增殖情况,确定最佳苦豆子继代培养基配方和最适的水解酪蛋白浓度。增殖系数=收获鲜重/接种鲜重。

1.2.5 愈伤组织去褐化处理 选择生长状态良好的愈伤组织小块,分别接种于添加3%蔗糖、1%维生素C、3%蔗糖+1%维生素C、0.5%和0.8%活性炭的5种处理的继代培养基上,25 d后观察愈伤组织的褐化情况,统计褐化率。褐化率(%)=褐化组织数/接种数×100%。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对苦豆子愈伤组织诱导的影响

苦豆子不同外植体对愈伤组织的诱导情况不同,由表1和图1可知,以子叶为外植体诱导愈伤组织效果最好,25 d后出愈率达到87.1%,且生长状态良好,愈伤组织呈嫩绿色,组织块大且致密(图1-A)。以胚轴为外植体诱导愈伤组织的出愈率为84.3%,组织膨大及出愈速度较慢,颜色浅绿且透明,结构疏松(图1-B)。以胚根为外植体诱导愈伤组织出愈率仅为22.9%,生长速度慢,分化困难,颜色由白色向浅黄色递进,生长状态不佳,不易进行继代培养(图1-C)。

表1 不同外植体诱导愈伤组织的效果

外植体	接种数/个	出愈数/个	出愈率/%	愈伤组织生长情况
子叶	70	61	87.1	嫩绿,致密
胚轴	70	59	84.3	浅绿,透明,疏松
胚根	70	16	22.9	浅黄色,松散

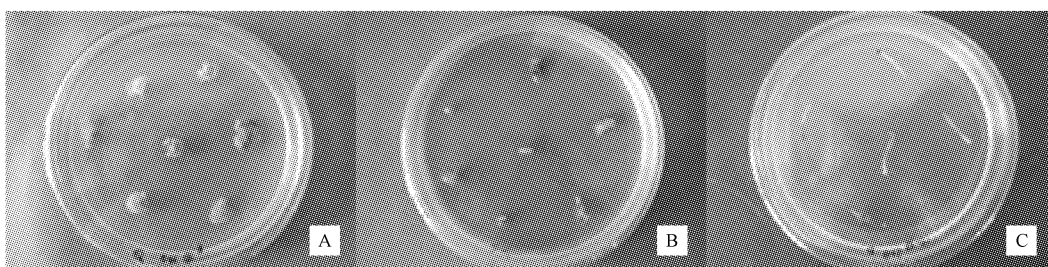


图1 苦豆子不同外植体培养愈伤组织生长情况

注:A:子叶诱导愈伤组织;B:胚轴诱导愈伤组织;C:胚根诱导愈伤组织。

2.2 不同激素对比对苦豆子愈伤组织诱导的影响

将苦豆子子叶接种在添加不同浓度激素2,4-D、6-BA及NAA的MS培养基上,培养7 d部分子叶开始膨大,12 d子叶切口处出现愈伤组织。由表2培养25 d的愈伤组织生长状况可知,不同植物生长调节剂对苦豆子愈伤组织诱导有显著差异。在2,4-D和6-BA配比为1:2时,出愈率为80%(图2-A),再添加0.5 mg/L NAA诱导效果显著增加,出愈率高达98.6%,且愈伤组织生长状态良好(图2-B)。随着激素浓度增加,出愈率不断降低。

表2 不同激素对比对愈伤组织诱导的影响

编号	激素/mg·L ⁻¹			外植体数/个	愈伤组织数/块	出愈率/%
	2,4-D	6-BA	NAA			
1	0.5	0.5	0	70	45	64.3
2	0.5	1.0	0	70	56	80.0
3	0.5	1.0	0.5	70	69	98.6
4	1.0	1.0	0.5	70	55	78.6
5	1.0	1.5	0.5	70	58	82.9
6	1.5	1.0	0.5	70	21	41.4
7	1.5	1.0	1.0	70	12	17.1
8	2.0	1.5	1.0	70	6	8.6

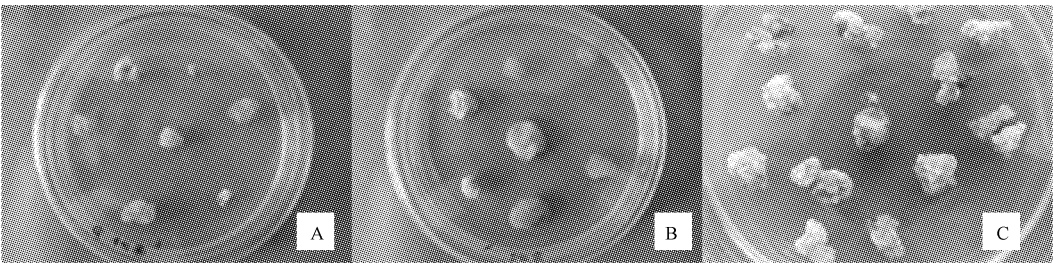


图2 愈伤组织生长情况

注:A;MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 培养基 25 d 诱导愈伤组织生长情况;B;MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基 25 d 诱导愈伤组织生长情况;C;苦豆子愈伤组织继代增殖。

综上,诱导苦豆子愈伤组织生成的最佳培养基是 MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

2.3 愈伤组织继代培养

2.3.1 不同激素比对愈伤组织继代培养的影响 由表 3 可知,不同浓度激素对比对愈伤组织增殖的影响明

显,低浓度激素不利于苦豆子愈伤组织的增殖,适当提高激素浓度可促进愈伤组织增殖。继代培养基为 MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L,增殖系数达 2.4,愈伤组织生长状态良好(图 2-C)。

表 3 不同激素对比对愈伤组织增殖的影响

培养基	培养成分及浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	平均接种鲜重/g	平均收获鲜重/g	增殖系数	愈伤组织生长情况
1	MS+2,4-D 0.5+6-BA 2.0+NAA 0.5	4.5	9.1	2.0	淡黄疏松
2	MS+2,4-D 1.0+6-BA 4.0+NAA 1.0	4.6	11.0	2.4	翠绿致密
3	MS+2,4-D 1.0+6-BA 1.0+NAA 0.5	5.1	9.2	1.8	深绿致密
4	MS+2,4-D 0.2+6-BA 4.0+NAA 1.0	7.4	9.3	1.3	泛黄疏松

2.3.2 添加不同浓度水解酪蛋白(CH)对愈伤组织生长的影响 在苦豆子愈伤组织继代培养中,添加不同浓度的水解酪蛋白(CH)对愈伤组织的生长有一定的影响,由表 4 可知,当 CH 浓度增至 1 000 mg/L 时,增殖系数

达到最大,为 4.97;以后随着 CH 浓度增加,增殖系数变小,当 CH 浓度为 2 000 mg/L 时,增殖系数为 3.59,且愈伤组织褐化率高,部分组织死亡。

表 4 不同酪蛋白(CH)浓度对愈伤组织增殖的影响

培养基	培养成分及浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	平均接种鲜重/g	平均收获鲜重/g	增殖系数	生长情况
1	MS+2,4-D 0.5+6-BA 2.0+NAA 0.5+CH 0	0.47	1.85	3.92	愈伤组织生长缓慢
2	MS+2,4-D 1.0+6-BA 4.0+NAA 1.0+CH 300	0.27	1.27	4.67	愈伤组织生长缓慢,出现褐化
3	MS+2,4-D 1.0+6-BA 1.0+NAA 0.5+CH 500	0.57	1.97	3.46	愈伤组织生长状况一般,部分褐化
4	MS+2,4-D 0.2+6-BA 4.0+NAA 1.0+CH 1 000	0.34	1.68	4.97	愈伤组织生长状况好,绿色,松散
5	MS+2,4-D 1.0+6-BA 4.0+NAA 1.0+CH 1 500	0.44	2.10	4.77	愈伤组织黄绿色,底部褐化严重
6	MS+2,4-D 1.0+6-BA 1.0+NAA 0.5+CH 2 000	0.37	1.34	3.59	愈伤组织褐化,部分组织死亡

2.4 愈伤组织去褐化处理

在愈伤组织继代培养中,随着培养时间的增长,褐化现象越来越严重,成为继代培养的最大障碍。该研究通过添加 3%蔗糖、1%维生素 C 和活性炭等措施,降低

了褐化率,且取得良好效果。如表 5 所示,添加 3%蔗糖对愈伤组织去褐化效果明显(图 3-A),褐化率仅为 28.3%,与对照(图 3-B)相比褐化率降低 56.7 个百分点;其次,添加 0.5%活性炭对愈伤组织的褐化也有一定的

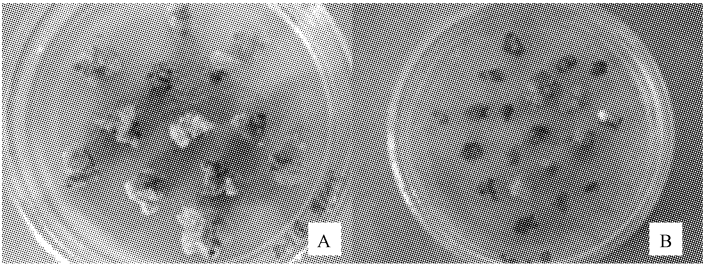


图3 继代培养去褐化处理

注:A;3%蔗糖处理 15 d 后的愈伤组织;B:无添加物继代培养 15 d 后的愈伤组织。

抑制作用,褐化率为 49.2%,与对照相比降低 35.8 个百分点。此外,结合快速继代(每 3 d 继代 1 次)和暗培养等措施,褐化率亦明显减低。

表 5 不同添加物对愈伤组织去褐化的影响

编号	添加物	接种数/块	褐化数/块	褐化率/%
1	3%蔗糖	120	34	28.3
2	1%维生素 C	120	82	68.3
3	3%蔗糖+1%维生素 C	120	26	28.7
4	0.5%活性炭	120	59	49.2
5	0.8%活性炭	120	75	62.5
6	无添加物	120	102	85.0

3 讨论

愈伤组织的诱导受基本培养基、外植体、激素、碳源、pH 值等因素的影响,其中生长调节物质对愈伤组织诱导的影响最为复杂^[10]。在植物离体培养的过程中,外植体的内源激素水平不断变化,在培养基中添加不同种类、浓度的生长调节物质可以改变和影响内源激素的水平,从而影响到外植体的生长状况^[4]。

该试验在已有研究的基础上,验证了外植体种类及激素配比对苦豆子愈伤组织的影响。研究表明,子叶最适合诱导愈伤组织,在形成愈伤组织的过程中,要经历启动期、分裂期和形成期。子叶小块逐渐膨胀变大,在切面上形成愈伤组织,进入分裂期,直至形成紧密的愈伤组织。NAA 是植物生长调节剂,添加 NAA 诱导愈伤组织效果明显,能促进细胞分裂与生长,但浓度不宜过高。在愈伤组织继代培养中,需要提高细胞分裂素 6-BA 的浓度,研究发现 6-BA 能有效加快植物细胞生长,延缓蛋白质和叶绿素降解。此外,添加 1 000 mg/L 浓度的酪蛋白可促进愈伤组织的生长,酪蛋白中除含有动植物生长所必需的营养成分外,还含有氨基酸等含氮量高的营养物质,对植物的生长具有长期补氮作用,促进植物组织生长。

褐化现象是苦豆子离体再生体系建立的一大问题,尤其在继代培养的中后期易出现。酶促反应和光照均

影响愈伤组织褐化。一旦外植体或愈伤组织发生褐化现象,褐化的切面使外植体和愈伤组织无法吸收养分而死亡。

在愈伤组织继代培养过程中,激素浓度过高易使愈伤组织褐化死亡,然而在继代培养中适度提高激素浓度会降低褐化率。1 000 mg/L 浓度的酪蛋白不仅能促进愈伤组织的生长,同时能防止褐化。3%的蔗糖和 0.5%活性炭都能明显抑制愈伤组织中酚类物质的氧化,从而能在一定程度上起到抑制褐化的作用^[11-12],但活性炭会吸收培养基中的激素和营养成分,从而影响了愈伤组织的生长。

参考文献

- [1] 祁燕蓉,何生虎,史光亮. 苦豆子的研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医, 2008,38(6):36-38.
- [2] 曹有龙,李晓莺,罗青,等. 苦豆子的组织培养及植株再生的研究[J]. 广西植物,2010,30(1):102-105.
- [3] 张守润,纪璞,蔺海明. 施氮对苦豆子生物性状和生物量积累动态的响应[J]. 草业科学,2008,25(3):37-42.
- [4] 杨春霞,黄丽莉,章挺,等. 苦豆子愈伤组织培养及其药用成分含量测定[J]. 中药材,2011,27(18):153-157.
- [5] 王立强,杨军,王光碧,等. 苦豆子愈伤组织的诱导与继代培养的去褐化研究[J]. 西华师范大学学报(自然科学版),2008,29(4):421-430.
- [6] Homare T. Paclitaxel Production by Plant-Cell-Culture Technology[J]. Adv Biochem Engin/Biotechnol,2004(7):1-23.
- [7] 王亚琴,朱媛. 杜仲细胞悬浮培养桃叶珊瑚苷的研究[J]. 广西植物, 2007,27(2):236-239.
- [8] 岳才军,何彦平. 人参胚愈伤组织诱导和悬浮培养的研究[J]. 安徽农业科学,2010(14):7193-7194.
- [9] 李晓莺,曹有龙,贝盛临,等. 苦豆子组织培养初步研究[J]. 甘肃农业科技,2004(12):12-14.
- [10] 古力娜·沙比儿,吴韬,阿吉艾克拜尔·艾萨,等. 苦豆子 HPLC 色谱指纹图研究[J]. 中药材,2008,1(31):38-41.
- [11] Nguyen T P T, Yukio O. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental A locasia micholitzana[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003,73:285-289.
- [12] 田志宏,李小丽,严寒. 不同生物调节剂对马蹄金愈伤组织诱导的影响[J]. 广西植物,2004,24(3):253-258.

Callus Induction and Antibrowning in Subculture of *Sophora alopecuroides* L.

CHEN Ya-ping,GAO Yuan,GU Pei-wen

(Agricultural College,Ningxia University,Yinchuan,Ningxia 750021)

Abstract: Taking *Sophora alopecuroides* as material,the effect of explants type,hormone levels,casein hydrolysate on the growth of callus were measured by tissue culture method. Meanwhile many measures were carried out to prevent browning. The results showed that the cotyledon was the optimum explants of callus induction,the best medium of callus induction was MS+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;and the best subculture medium was MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+CH 1 000 mg/L;the best proposal was frequent subculture with 3% sucrose.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.;callus;subculture;antibrowning