

胡选萍. 不同生长调节因子对西洋参胚轴愈伤组织的诱导效应[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 55-57.

不同生长调节因子对西洋参胚轴愈伤组织的诱导效应

胡选萍

(陕西理工学院生物科学与工程学院/陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723000)

摘要:以西洋参胚轴为试验材料,研究了不同浓度的 NAA、2,4-D、IBA、6-BA 对西洋参胚轴愈伤组织诱导的影响作用。结果表明:(1)NAA、2,4-D、IBA、6-BA 对西洋参胚轴外植体的启动脱分化与愈伤组织诱导具有重要效应,4种生长调节因子对膨大率、出愈率、出愈速度的综合贡献率分别为 98.3%、95.1%、98.0%。(2)4种生长调节因子对西洋参胚轴膨大率、出愈率与出愈速度的效应大小依次为 IBA > NAA > 6-BA > 2,4-D、NAA > 6-BA > IBA > 2,4-D、2,4-D > NAA > 6-BA > IBA。(3)综合考虑测量指标效应,对于西洋参胚轴诱导形成愈伤组织的最适生长调节因子组合配比为 2,4-D 1.0 mg/L + NAA 3.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L。

关键词:西洋参;胚轴;生长调节因子;愈伤组织

中图分类号:S567.5⁺30.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)08-0055-02

西洋参(*Panax quiquefolium* L.)隶属五加科人参属,多年生草本植物,原产美洲,后引入中国北京、吉林、陕西、山东等地栽培^[1]。我国自20世纪80年代成功大面积引种西洋参以来,已发展成为世界第三大西洋参生产国和世界第一大消费国。西洋参中含有皂苷、多糖、黄酮类等多种化学活性物质^[2],对人体有补益作用,在免疫调节、抗癌与抗衰老等方面的效果尤为独特,因此常用于保健药物与食品加工^[3]。目前利用西洋参愈伤组织细胞培养生产有效代谢产物已有相关报道^[4-5],但是由于西洋参初始愈伤组织的品质与特性差异,往往生产量偏低,很难满足实际需要。根据西洋参种子胚的胚轴愈伤组织形成相对较快且品质较好的特点^[6],本研究以汉中留坝西洋参胚轴为试材,分析不同生长调节因子对西洋参胚轴外植体脱分化启动与愈伤诱导的效应方式与效应大小,为提升西洋参愈伤组织诱导效率,促进其大规模细胞悬浮培养生产有效次生代谢产物提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本研究所使用从陕西汉中留坝西洋参栽培地区当年采集并在沙土中保存良好的成熟西洋参种子作为研究试材。

1.2 试验方法

1.2.1 材料预处理 挑选沙土中保存的饱满、圆润并出现裂口的露胚西洋参种子,去掉外种皮,在超净工作台上,对去种皮西洋参种子采用乙醇与氯化汞配合消毒。70%的乙醇漂洗30 s,0.1%的氯化汞浸泡10 min,并用无菌蒸馏水冲洗5~6次。将经过消毒处理的西洋参去皮种子接种在MS + GA₃ 2.0 mg/L的培养基上,(25±2)℃培养20 d。

1.2.2 培养基设计 以MS为基本培养基,内含蔗糖30 g/L,琼脂粉6 g/L,附加以4种不同种类与浓度配比的生

长调节因子。4种生长调节因子分别选择3个水平,按照L₉(3⁴)正交表设计9种组合配比(表1),调节pH值为5.8。

1.2.3 材料处理与诱导 无菌操作条件下,将西洋参胚轴切分为长度约为0.5 cm的切段,随机接种于9种培养基中,在温度(25±2)℃、相对湿度50%~60%条件下培养,定期统计外植体膨大数与出愈数,并依此计算出相应的二级变量。

1.2.4 计算方法 膨大率=膨大外植体数/接种外植体总数×100%。出愈率=诱导出愈伤组织的外植体数/接种外植体总数×100%。出愈速度=(N_x-N_y)/[(x-y)×K];N_x代表第x天出愈的外植体数,N_y代表第y天出愈的外植体数,K代表接种外植体总数。

1.2.5 数据统计分析 采用SPSS 16.0统计分析软件平台,对试验数据进行多因素方差分析,探索不同生长调节因子对西洋参胚轴愈伤组织诱导的效应方式与效应大小。

2 结果与分析

2.1 西洋参胚轴愈伤组织诱导基本情况

将西洋参胚轴接种到试验设计的不同培养基后,第3天部分外植体出现明显可见膨大,1周左右在胚轴一端或两端形成乳白色或淡绿色的愈伤组织。不同试验处理条件下,外植体的膨大率、出愈率与出愈速度差异较大(表1)。

表1 西洋参胚轴愈伤组织诱导试验设计与结果表

处理编号	生长调节因子组合配比				愈伤组织诱导效应变量		
	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	6-BA (mg/L)	膨大率 (%)	出愈率 (%)	出愈速度 (个/d)
YS1	1.0	1.0	0.0	0.0	73.53	85.30	0.084 0
YS2	1.0	2.0	0.5	0.5	55.26	55.26	0.056 4
YS3	1.0	3.0	1.0	1.0	75.00	97.22	0.071 4
YS4	2.0	1.0	0.5	1.0	52.78	97.22	0.051 6
YS5	2.0	2.0	1.0	0.0	75.00	58.34	0.071 4
YS6	2.0	3.0	0.0	0.5	97.37	94.74	0.097 7
YS7	3.0	1.0	1.0	0.5	47.22	91.67	0.055 6
YS8	3.0	2.0	0.0	1.0	100.00	97.73	0.068 2
YS9	3.0	3.0	0.5	0.0	85.42	83.33	0.101 2

收稿日期:2013-01-14

基金项目:陕西省教育厅重点实验室科研计划(编号:09JS048)。

作者简介:胡选萍(1975—),女,硕士,讲师,主要从事植物细胞工程研究。E-mail:huxuanping@163.com。

2.2 不同生长调节因子对西洋参胚轴膨大的效应

膨大是外植体对特定培养条件所作出的最初的形态反应特征,它在一定程度上反映外植体细胞启动脱分化的潜力与能力。以4种生长调节因子为自变量,以西洋参胚轴外植体膨大率为因变量作多因素方差分析,结果见表2。

表2 各种生长调节因子对西洋参胚轴膨大率的多因素方差分析

因素	均方	<i>F</i>	<i>Sig</i>	η^2
模型	0.072	64.611	0.000	0.983
2,4-D	0.015	13.445	0.002	0.749
NAA	0.123	110.776	0.000	0.961
IBA	0.127	114.417	0.000	0.962
6-BA	0.022	19.805	0.001	0.815

由表2可以看出,试验选择的4种生长调节因子对西洋参胚轴启动脱分化起着重要的调控作用,其总贡献率达98.3% ($r^2 = 0.983$)。而每种因素对西洋参胚轴膨大的单独贡献作用也十分明显,均表现在99%水平上差异显著 ($P < 0.01$)。另外,由 $\eta_{IBA}^2 (0.962) > \eta_{NAA}^2 (0.961) > \eta_{6-BA}^2 (0.815) > \eta_{2,4-D}^2 (0.749)$ 可知,4种因素对于西洋参胚轴启动脱分化的贡献程度,从大到小依次为 IBA、NAA、6-BA、2,4-D。

2.3 不同生长调节因子对西洋参胚轴出愈率的效应

出愈率是衡量外植体愈伤组织诱导效果的一项重要指标,它能够从数量角度确定愈伤组织发生的最佳条件^[7]。以4种不同生长调节因子为自变量,以西洋参胚轴外植体的出愈率为因变量,进行多因素方差分析,分析不同生长调节因子对西洋参胚轴外植体愈伤组织诱导的效应大小与贡献程度(表3)。

表3 各种生长调节因子对西洋参胚轴出愈率的多因素方差分析

因素	均方	<i>F</i>	<i>Sig</i>	η^2
模型	0.055	21.801	0.000	0.951
2,4-D	0.021	8.300	0.009	0.648
NAA	0.089	35.490	0.000	0.887
IBA	0.031	12.447	0.003	0.743
6-BA	0.078	30.968	0.000	0.873

由表3可知,试验选择的4种生长调节因子对西洋参胚轴脱分化诱导愈伤组织均表现出明显的生理调控作用,4种生长调节因子对西洋参胚轴出愈率的贡献率达到95.1% ($r^2 = 0.951$)。从4种生长调节因子的独立贡献程度上分析,虽然NAA与6-BA的贡献程度基本相当 ($\eta_{NAA}^2 = 0.887$, $\eta_{6-BA}^2 = 0.873$),但是总体上各生长调节因子对西洋参胚轴出愈率的贡献程度差异明显,存在主次差别,4种因子的相对贡献顺序为 NAA > 6-BA > IBA > 2,4-D。

2.4 不同生长调节因子对西洋参胚轴出愈速度的效应

出愈速度是评价西洋参胚轴外植体在特定培养条件下,诱导产生愈伤组织的外植体数量动态增长程度的一个重要变量,能够从动态变化的角度衡量外植体愈伤形成与积累快慢程度。以4种生长调节因子为自变量,出愈速度为因变量,作多因素方差分析,结果如表4。

同样,由多因素方差分析结果可知,4种生长调节因子对西洋参胚轴出愈速度的效应非常明显,影响作用统计学上极

表4 各种生长调节因子对出愈速度的多因素方差分析

因素	均方	<i>F</i>	<i>Sig</i>	η^2
模型	0.000	54.075	0.000	0.980
2,4-D	0.001	90.458	0.000	0.953
NAA	0.000	62.893	0.000	0.933
IBA	0.000	17.988	0.001	0.800
6-BA	0.000	44.962	0.000	0.909

其显著 ($P < 0.01$);且四者的综合贡献效应程度为98.0%,属于典型的高综合效应状态,由此可见4种因子对西洋参胚轴脱分化形成愈伤组织的动态增长过程同样具有显著的生理调控效应,这一点与其对膨大率与出愈率的效应从总体上表现出良好的一致性。另外,4种因子对西洋参胚轴愈伤诱导速度的综合贡献主次顺序为 2,4-D > NAA > 6-BA > IBA。

2.5 西洋参胚轴愈伤组织诱导条件的综合选择

对西洋参胚轴不同生长调节因子组合配比培养胚轴外植体的膨大率、出愈率和出愈速度,采用归一化法进行极值标准化法处理,对西洋参胚轴愈伤组织诱导效果进行综合评价。

表5 3种效应变量的归一化综合计算表

处理编号	膨大率	出愈率	出愈速度	总和
YS1	0.17	0.23	0.29	0.69
YS2	0.05	0.00	0.19	0.24
YS3	0.18	0.33	0.33	0.84
YS4	0.04	0.33	0.33	0.70
YS5	0.18	0.02	0.14	0.34
YS6	0.32	0.31	0.19	0.82
YS7	0.00	0.29	0.00	0.29
YS8	0.33	0.33	0.00	0.67
YS9	0.24	0.22	0.24	0.70

由表5可以看出,西洋参胚轴外植体在试验处理YS3的综合指数高于其余8种。因此,从宏观上综合膨大率、出愈率与出愈速度3个测量指标效应,对于西洋参胚轴外植体而言,诱导形成愈伤组织的最适生长调节因子组合配比为 2,4-D 1.0 mg/L + NAA 3.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L。

3 讨论

愈伤组织的诱导形成是西洋参离体细胞悬浮培养生产次生代谢产物的基本前提,也是脱分化并进一步分化成苗的关键环节。相关报道愈伤组织的形成过程是一个受培养基成分、外植体类型、光照条件、植物基因型等诸多因素之间相互作用影响的复杂过程^[8]。其中植物生长调节物质是细胞分化、分裂、形态建成等过程的关键因子,只有在培养基中加入适当的植物生长调节剂后,才能诱导细胞分裂启动愈伤组织的形成^[9]。本研究通过2,4-D、NAA、IBA、6-BA 4种生长调节因子组合配比,分析其对西洋参胚轴外植体脱分化诱导愈伤组织的效应程度与效应大小。结果表明:4种生长调节因子对西洋参胚轴启动脱分化与脱分化诱导愈伤组织形成的作用非常显著,无论是静态的膨大率或者出愈率,还是动态的出愈速度,均表现出明显的生理调控效应,其综合效应程度均在95%以上。虽然4种生长调节因子对西洋参胚轴膨大率、出愈率与出愈速度的单独贡献作用极其显著,但是其贡献

刘洋. 欧李组培苗增殖扩繁培养基筛选试验[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 57-58.

欧李组培苗增殖扩繁培养基筛选试验

刘洋

(吉林农业科技学院, 吉林吉林 132101)

摘要:以芽培养的欧李组培苗为试验材料, 研究4个基本培养基配比、6个TDZ激素浓度配比、5种pH值配比对欧李组培苗增殖扩繁的影响。结果表明, 基本培养基选用B5最好, 添加TDZ的浓度以0.4 mg/L最好, 培养基pH值调节至5.4最好。

关键词:欧李; 基本培养基; 激素浓度; pH值

中图分类号: S662.304+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0057-02

欧李 (*Prunus humilis*) 为蔷薇科李属落叶灌木, 高1~1.5 m, 主要分布于我国山西、河北、陕西、内蒙古、东北等中西部地区。果实为核果, 近球形, 直径约1.5 cm, 熟时鲜红色, 花期4~5月, 果期6~7月^[1]。该果实营养丰富, 含有多对人体有益的矿物质元素, 尤其是钙元素的含量较高, 因此有商品名称“中华钙果”。果实可生食, 亦可酿酒、制作果酱或饮料等, 具有广阔的市场前景。目前欧李生产上常见的繁殖方法为扦插、播种和组织培养, 扦插和播种的繁殖速度比较慢, 规模化生产有一定的困难, 另外培育出的苗木无论是苗木的长势还是果实品质都不及组培繁殖苗木^[2-3]。在欧李的组织培养过程中, 组培苗增殖扩繁的速度是规模化生产的保证, 本试验以芽培养的欧李组培苗为材料, 通过比较不同的基本培养基、添加TDZ激素浓度、培养基pH值对增殖扩繁的影响, 为欧李组培苗增殖扩繁培养提供了依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

欧李组培苗以芽为外植体, 由吉林农业科技学院花卉组培室培养^[4]。从培养室中挑选生长健壮、旺盛、无任何污染及玻璃化的苗木若干, 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基配方的筛选 选用MS、White、N₆、B₅等4种基本培养基作配比, 每个配比分别添加0.2 mg/L TDZ激素, 添加30 g/L糖、6 g/L琼脂, 培养基pH值调节至5.8, 进行基本培养基筛选试验。

1.2.2 激素浓度的筛选 经过“1.2.1”基本培养基的筛选, 选择最佳的基本培养基, 分别添加0(对照)、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L TDZ, 6个配比中添加的糖均为30 g/L, 琼脂为6 g/L, 培养基pH值调节至5.8, 进行激素浓度筛选试验。

1.2.3 配方pH值的筛选 经过“1.2.2”激素浓度的筛选, 在最佳基本培养基及该激素浓度下, 把pH值分别调整至5.2、5.4、5.6、5.8、6.0, 5个配比中添加的糖均为30 g/L, 琼脂为6 g/L, 进行pH值筛选试验。

收稿日期: 2013-01-16

作者简介: 刘洋(1979—), 女, 吉林吉林人, 硕士, 讲师, 主要从事园艺植物学方面的教学与研究工作。E-mail: 82642444@qq.com。

程度存在差异。对于西洋参胚轴启动脱分化而言, NAA与IBA具有贡献优势, 对于脱分化愈伤组织诱导而言, NAA与6-BA的效应作用相对最强, 而对于愈伤组织动态积累变化过程而言, 2,4-D则表现出优势调控作用。西洋参胚轴脱分化诱导愈伤组织是一个复杂的生理调控过程, 涉及到各种生长调节因子的综合作用, 诱导结果也表现在多方面的效应指标变化, 因此实际操作过程中, 往往需要对变量的效应进行简约化、统一化处理, 综合分析各种因变量的综合效应, 协调考虑、优势互补, 筛选综合效应相对最佳的生长调节因子组合配比。通过3种因变量归一化处理, 综合效应最高的生长调节因子组配为2,4-D 1.0 mg/L + NAA 3.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L。另外, 不同生长调节因子对西洋参胚轴外植体诱导形成的愈伤组织的质地、生长能力、胚性程度与分化潜力等方面还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Liu T C. Introduction and cultivation of American ginseng in China

[J]. *J Chin Med Mater*, 1990, 13: 42-45.

[2] 王蕾, 王英平, 许世泉等. 西洋参化学成分及药理活性研究进展[J]. *特产研究*, 2007(3): 73-75.

[3] 黄亚伟, 王加华, Shan J J, 等. 近红外光谱测定人参与西洋参的主要皂甙总量[J]. *分析化学*, 2011(3): 377-381.

[4] 张美萍, 王义, 孙春玉, 等. 不同培养基及其元素组成对西洋参愈伤组织悬浮培养物生长和皂苷含量的影响[J]. *植物资源与环境学报*, 2003, 12(2): 14-16.

[5] 张美萍, 王义, 孙春玉, 等. 西洋参愈伤组织悬浮培养物细胞分化与皂苷合成关系的研究[J]. *核农学报*, 2004, 18(2): 152-154.

[6] 胡选萍, 曹小勇, 秦公伟, 等. 西洋参不同外植体诱导愈伤组织研究[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(3): 48-50.

[7] 胡选萍. 山药不同外植体诱导愈伤组织研究[J]. *江苏农业科学*, 2009(4): 75-76.

[8] 申秋秀, 胡根海, 赵伟伟, 等. 3不同浓度激素处理对棉花愈伤组织诱导的影响[J]. *种子*, 2009, 28(7): 101-104.

[9] 严姜黎, 张翼, 邢梅. 红肉猕猴桃离体快速繁殖技术研究[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(1): 101-104.