

王跃华,段茂华,任三军,等.山葵愈伤组织诱导与增殖研究[J].江苏农业科学,2015,43(1):53-54.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.016

山葵愈伤组织诱导与增殖研究

王跃华¹,段茂华¹,任三军²,陈传凤¹,彭双¹,严幸林¹,孙燕霞¹

(1.成都大学生物产业学院,四川成都 610016; 2.广元市玺府开发有限公司,四川广元 648017)

摘要:为了获得山葵愈伤组织诱导和增殖的最佳培养条件,选择山葵真叶片、真叶柄和胚轴为外植体,以 MS 为基本培养基,配以不同浓度的 2,4-D 和 6-BA 植物激素进行愈伤组织诱导,并将诱导的愈伤组织接种于增殖培养基中进行培养。结果表明:诱导山葵愈伤组织的最佳培养基配方为 MS + 4 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA,培养 25 d 后真叶片、真叶柄、胚轴的愈伤组织诱导率分别为(100.0 ± 0.00)%、(60.5 ± 3.29)%、(62.5 ± 3.74)%;山葵胚轴外植体产生的愈伤组织增殖倍数最高,培养 35 d 后的愈伤组织增殖倍数可达(2.48 ± 0.93)倍。

关键词:山葵;愈伤组织;配方;外植体;诱导率;增殖倍数

中图分类号:S567.23+9.043 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)01-0053-02

山葵(*Wasabia japonica*)别称山嵛菜,为十字花科山嵛菜属多年生草本半阴生植物,原产中国和日本,被誉为“绿色黄金”^[1-2]。山葵具有强烈的辛辣味及特殊的芳香,不仅具有很强的杀菌和助消化功能^[3],而且能促进淀粉性食物的消化,稳定胃肠中的维生素 C 和消灭消化道中的寄生虫,具有很好的防病治病作用^[4-5]。目前山葵多采用分株繁殖和种子繁殖,分株繁殖存在品种退化、繁殖系数低和种苗带菌等问题,极易导致病害大面积发生^[6]。种子繁殖具有速度快、数量多和能部分减少病害发生的特点,但是由于山葵种子属顽拗性种子,失水过多极易导致种子活力丧失,因此常采用低温高湿保存;同时,山葵种子存在休眠,需有效破除休眠才能促使种子尽快萌发^[7-9]。本研究采用植物组培快繁技术,通过筛选培养基配方和外植体种类,以获得山葵愈伤组织诱导的最佳条件,为山葵后续的生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

山葵种子采自四川省广元市;试验材料山葵植物的真叶片、真叶柄、胚轴外植体均取自山葵种子萌发所得的幼苗。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒和培养 选取山葵种子萌发 25 d 的幼苗,取其真叶片、真叶柄和胚轴外植体,将其放在超净工作台上用浓度为 0.1 g/L 的氯化汞消毒处理 3 min 后,用无菌水清洗 5 次,再用无菌滤纸吸干材料表面的水分,将其接入愈伤组织诱导培养基中。

1.2.2 培养基和培养条件 愈伤组织诱导培养基以 MS 为基本培养基,激素 6-BA 的浓度均为 0.5 mg/L,2,4-D 的浓度设定为 0、2、4、6、8 mg/L,分别记作 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅ 处理;在 20 ℃、12 h/d 的光照时长、2 000 lx 的光照强度条件下培养

25 d 后统计各外植体的愈伤组织诱导率。

1.2.3 不同外植体诱导的愈伤组织增殖 选取由山葵真叶片、真叶柄、胚轴外植体诱导产生的愈伤组织,接种于 MS + 2 mg/L NAA + 0.3 mg/L 6-BA 培养基中,分别记作 B₁、B₂、B₃ 处理,在 20 ℃、10 h/d 光照时长、1 800 lx 的光照强度条件下增殖培养 35 d 后统计其愈伤组织的增殖倍数。

1.3 数据统计及计算公式

上述试验均重复 3 次,数据用 SPSS 13.0 统计学软件进行方差分析,并采用新复极差(Duncan's)法进行多重比较, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异,数据统计结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。愈伤组织的诱导率、增殖倍数的计算公式如下:愈伤组织诱导率 = (诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体数) × 100%;愈伤组织的增殖倍数 = 收获时质量/接种时质量。

2 结果与分析

2.1 山葵不同部位外植体的愈伤组织诱导

由表 1 可知,随着 2,4-D 浓度增高,山葵真叶片、真叶柄、胚轴的愈伤组织诱导率均呈现先提高后降低的趋势;其中未添加 2,4-D 激素的 A₁ 处理,即培养基配方为 MS + 0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA,均不适宜山葵各外植体的愈伤组织诱导,3 种外植体的愈伤组织诱导率均为最低,真叶片的愈伤组织诱导率为(37.5 ± 2.73)%,真叶柄为(0.0 ± 0.00)%,胚轴为(0.0 ± 0.00)%。由此说明,在培养基中添加生长素 2,4-D 对山葵愈伤组织的诱导非常重要。培养基配方为 MS + 4 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA 的 A₃ 处理,最适宜 3 种外植体的愈伤组织诱导,愈伤组织的诱导率均为最高,真叶片的愈伤组织诱导率为(100 ± 0.00)%,真叶柄为(60.5 ± 3.29)%,胚轴为(62.5 ± 3.74)%。然而,随着 2,4-D 浓度进一步升高到 6 mg/L 以上时,山葵各外植体的愈伤组织诱导率均呈现出下降趋势,以 2,4-D 浓度升高到 8 mg/L 时的各外植体愈伤组织诱导率下降最为显著,其中真叶柄外植体的愈伤组织诱导率降低了 35.5 个百分点,表明针对不同的植物,选择适宜的 2,4-D 浓度显得尤为重要。

收稿日期:2014-03-04

基金项目:四川省广元市科技支撑计划(编号:2013-25)。

作者简介:王跃华(1963—),女,山东青岛人,硕士,教授,主要从事药用植物栽培与生药学研究。E-mail:1961689636@qq.com。

表 1 山葵不同部位外植体的愈伤组织诱导

处理编号	激素浓度配比 (mg/L)		愈伤组织诱导率 (%)		
	2,4 - D	6 - BA	胚轴	真叶片	真叶柄
A ₁	0	0.5	0.0 ± 0.00	37.5 ± 2.73	0.0 ± 0.00
A ₂	2	0.5	25.0 ± 2.34	87.5 ± 2.16	12.5 ± 1.78
A ₃	4	0.5	62.5 ± 3.74	100.0 ± 0.00	60.5 ± 3.29
A ₄	6	0.5	50.2 ± 1.57	87.5 ± 1.75	37.5 ± 2.13
A ₅	8	0.5	37.5 ± 1.63	62.5 ± 1.26	25.0 ± 1.46

在试验中观察各外植体产生愈伤组织的情况,发现真叶片外植体在接种 3 d 后叶片开始卷曲,并且真叶片切口处开始变为嫩绿色且增厚,随后在切口和叶脉处都开始产生黄绿色的愈伤组织;试验中无论是将真叶片正接或反接到培养基上,愈伤组织最先在叶片的切口和与培养基接触的一面长出浅绿色颗粒状愈伤组织,而叶片的游离面产生愈伤组织的时间较晚,并且产生的愈伤组织颜色也多为绿色。真叶柄外植体在插入培养基中培养 4 d 后,其游离端出现膨大,随后膨大明显并胀裂表皮,接着从表皮的内层细胞长出浅黄色愈伤组织;而将真叶柄直接平放在培养基上的处理,其真叶柄是从中间开始产生膨大,最后整个叶柄膨大后也发生胀裂表皮的情况,随后也从表皮里面产生出愈伤组织。胚轴外植体正接和反接的情况一样,均是先从培养基上部的游离端长出黄绿色和浅黄色颗粒状愈伤组织;而直接将胚轴平接于培养基中则是从胚轴两端长出黄绿色愈伤组织,随后整个胚轴愈伤化,长出愈伤组织。

2.2 山葵不同部位愈伤组织的增殖

将培养生长 25 d 的上述各愈伤组织接种于 MS + 2 mg/L NAA + 0.3 mg/L 6 - BA 培养基中,在 20 ℃、10 h/d 光照时长、1 800 lx 光照强度条件下增殖培养 35 d 后统计其愈伤组织的增殖倍数(表 2)。

表 2 不同外植体愈伤组织的增殖

处理编号	愈伤组织来源	增殖倍数	生长状况
B ₁	真叶片	0.86 ± 1.24	质地紧密;深绿色和褐色,褐变严重
B ₂	真叶柄	1.57 ± 1.15	质地较疏松;黄绿色和黄褐色,少量褐变
B ₃	胚轴	2.48 ± 0.93	质地较紧密;黄绿色和浅绿色,无褐变

由表 2 愈伤组织的增殖倍数和生长状况可知,由胚轴外植体产生的愈伤组织的继代增殖效果最好,在增殖培养 35 d 后,其愈伤组织的增殖倍数可达(2.48 ± 0.93)倍,并且增殖产生的愈伤组织多为浅绿色和黄绿色,未出现有愈伤组织褐变的情况。真叶柄外植体产生的愈伤组织增殖倍数为(1.57 ± 1.15)倍,增殖培养的愈伤组织多为黄绿色,但也有少量的愈伤组织产生了褐变并呈现为黄褐色。真叶片外植体产生的愈伤组织在继代增殖生长过程中,不仅生长速度慢,愈伤组织的增殖倍数低,仅为(0.86 ± 1.24)倍,而且愈伤组织在增殖生长过程中易产生褐化,非常不利于愈伤组织的快速增殖生长。

3 结论与讨论

本试验采用山葵的真叶片、真叶柄、胚轴为外植体,在添加了不同浓度的 2,4 - D 生长激素的 MS 培养基中诱导愈伤,

获得了适宜山葵 3 种外植体的愈伤组织诱导的最佳培养基配方,即 MS + 4 mg/L 2,4 - D + 0.5 mg/L 6 - BA;通过增殖培养研究,表明由胚轴外植体产生的愈伤组织继代生长速度最快,增殖倍数最高。通过对不同外植体的诱导比较,发现真叶片外植体的愈伤组织诱导率明显地高于真叶柄、胚轴的外植体,然而在后续愈伤组织增殖生长过程中,真叶片愈伤组织的生长速度却最慢,增殖倍数也最低。组成真叶片外植体的细胞组织在适宜的激素配比条件下,易成功脱分化进而产生愈伤组织,但又由于其产生的愈伤组织细胞中含有较高的多酚类物质,造成在后续愈伤组织的增殖过程中极易发生氧化。因而在山葵真叶片诱导的愈伤组织增殖培养过程中,常出现增殖材料的严重褐变,使得山葵愈伤组织在大量增殖过程中由于严重褐变而造成增殖材料的增殖倍数明显降低。

防止培养的细胞产生褐变可从外植体的选择、在培养基中添加抗褐化物质以及改变培养条件等多个途径实现。笔者针对山葵真叶片愈伤组织易产生褐变的问题,采用了低培养温度的方法(另一篇论文报道),收到了很好的试验效果。这主要是因为低温可有效地降低愈伤组织细胞中多酚氧化酶的活性并抑制酚类化合物被氧化^[10-11],从而很好地解决了山葵愈伤组织产生褐变的问题。

参考文献:

[1]朱 进. 湖北高山地区引种山葵的关键技术[J]. 长江蔬菜, 2011(15):7-8.

[2]林梅西. 山葵低温保鲜及干燥工艺的研究[J]. 中国食品学报, 2008,8(1):83-88.

[3]王安虎,何天祥,邓建平,等. 山葵叶片愈伤组织诱导分析[J]. 西昌农业高等专科学校学报,2003,17(2):73-75.

[4]崔 翠,何凤发. 山葵的核型分析研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2008,30(4):135-138.

[5]张建佳,何凤发. 山葵愈伤组织培养及其风味物质的研究[J]. 药物生物技术,2011,18(1):21-25.

[6]王 俐,龙春林. 山葵试管繁殖技术[J]. 中国蔬菜,2002(2):15-16.

[7]蔡光泽. 山葵种子的采集、处理及贮藏[J]. 种子,2002(6):106.

[8]吴明根,全炳武,朴凤植,等. 山葵生物生态特性的研究[J]. 延边大学农学学报,2000,22(3):211-216.

[9]吴 震,王广东,翁忙玲,等. 山葵(*Wasabi japonica*)种子萌发特性的研究[J]. 园艺学报,2003,30(3):287-290.

[10]宋吉轩,陈 超,雷尊国,等. 马铃薯加工过程中褐变机理及其抑制效果研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(1):329-331.

[11]李应彪,黄佐蓉,刘建成,等. 库尔勒雪梨贮藏期间酶促褐变机理的研究[J]. 冷饮与速冻食品工业,2005,11(4):12-14,23.