

安焕霞,王占林,侯宪宽. 不同激素对青杞 1 号枸杞叶片愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):59-61.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.019

不同激素对青杞 1 号枸杞叶片愈伤组织诱导和生长的影响

安焕霞,王占林,侯宪宽

(青海大学,青海西宁 810016)

摘要:以枸杞品种青杞 1 号叶片为外植体,比较不同激素浓度和配比对叶片愈伤组织诱导、愈伤组织生长的影响。结果表明,诱导叶片产生愈伤组织最佳的激素浓度与配比是 $0.7\text{mg/L NAA} + 0.7\text{mg/L 6-BA}$;对愈伤组织增殖效果最好的激素浓度与配比是 $1.0\text{mg/L 6-BA} + 0.8\text{mg/L IBA} + 0.2\text{mg/L NAA}$;对愈伤组织分化效果最好的激素浓度与配比是 $1.3\text{mg/L KT} + 0.02\text{mg/L NAA}$ 。

关键词:青杞 1 号;枸杞;叶片;激素;愈伤组织诱导

中图分类号:S567.1⁺90.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)04-0059-03

枸杞(*Lycium barbarum* L.)在植物学分类学上属被子植物门双子叶植物纲茄科枸杞亚属。既具有防风固沙、保持水土的作用,又是名贵的中药材,应用前景十分广阔^[1-5]。青海省柴达木地区平均海拔 2 600~3 000 m,日照时间长,昼夜温差大,空气湿度低,独特的气候条件使得枸杞具有粒大饱满、肉质肥厚、色泽鲜艳且味甘等特性,但枸杞产区存在品种混乱,高产高抗大果型品种匮乏现象,针对此问题,青海省农林科学院经辐射育种培育出枸杞品种青杞 1 号。在栽培繁殖过程中,须保持枸杞木本优良性状,受繁殖材料限制,采用植物组织培养的方式进行快速繁育,是一种极为经济有效的途径。

植物组织培养建立在植物细胞的全能性、植物的再生作用的基础上^[6],而植物再生主要是离体的细胞、组织或器官恢复分生状态,形成愈伤组织,进而再分化的过程^[7]。一般认为,培养环境是能否成功诱导出愈伤组织的重要因素,而在诱导愈伤组织、分化过程中激素是关键^[8-9]。

目前,众多学者对枸杞组织培养和快速繁殖进行了研

究^[10-12],但还不够系统和完善,本研究以青杞 1 号枸杞叶片为试验材料,通过设置不同激素浓度和配比,统计分析愈伤组织生长情况,筛选出最佳的激素配比,为青杞 1 号快速扩繁提供可靠的依据,也可为其他木本植物的相关研究提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

为防止材料污染现象发生而影响试验结果,本试验从无菌组培苗(由柴达木枸杞产业升级关键技术开发与示范项目提供)上采集叶片。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 主要是温度和照度,温度均为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照时间 16 h/d,照度 1 000~1 600 lx。另外 MS 培养基为基本培养基,并添加蔗糖 30 g/L、琼脂 6.0 g/L,调节 pH 值为 5.8~6.0,在容量为 150 mL 的三角瓶中装入 50 mL,在手提式高压灭菌锅中,于 121°C 灭菌 23 min。

1.2.2 激素配制 1mg/mL NAA 、 IBA 、 6-BA 的配制:称取 0.1 g 药粉,加 1 mL 蒸馏水,滴入 0.1 mol/L NaOH 反复摇晃,再滴入 NaOH,一直到药物全部溶解,然后用 100 mL 容量瓶加水定容,盖塞后摇匀。

1mg/mL KT 的配制:称取 0.1 g 药粉,加 2~3 mL 蒸馏水,滴入 0.1 mol/L NaOH 反复摇晃,再滴入 NaOH,一直到药

收稿日期:2014-12-17

基金项目:国家星火计划重大项目(编号:2012GA870001)。

作者简介:安焕霞(1988—),女,河北邯郸人,硕士研究生,研究方向为森林培育。E-mail:m13086272187@163.com。

通信作者:王占林,研究员,研究方向为森林培育。E-mail:1735105720@qq.com。

[14] Mitchell G, Brouillette E, Séguin D L, et al. A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides[J]. Microbial Pathogenesis, 2010, 48(1):18-27.

[15] Geoghegan J A, Corrigan R M, Gruszka D T, et al. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(21):5663-5673.

[16] Lim Y, Jana M, Luong T T, et al. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(3):722-729.

[17] Reyes D, Andrey D O, Monod A, et al. Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control agr expression in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(21):6020-6031.

[18] Latasa C, Solano C, Penadés J R, et al. Biofilm-associated proteins [J]. Comptes Rendus Biologies, 2006, 329(11):849-857.

[19] Pförtner H, Burian M S, Michalik S, et al. Activation of the alternative sigma factor SigB of *Staphylococcus aureus* following internalization by epithelial cells: an *in vivo* proteomics perspective [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2014, 304(2):177-187.

物全部溶解,然后用 100 mL 容量瓶加水定容,盖塞后摇匀。

1.2.3 试验设计

1.2.3.1 叶片愈伤组织诱导 将处理好的叶片切成长 1.5 cm、宽 0.5 cm 左右的小块,置于不同愈伤组织诱导培养基上培养,定期观察其生长情况,叶片愈伤组织诱导培养基溶配比见表 1。每瓶接种 3 块叶片,每处理接种 3 瓶,重复 3 次。

表 1 叶片愈伤组织诱导		
处理	培养基 (mg/L)	
	NAA	6 - BA
1	0.2	0.2
2	0.5	0.5
3	0.7	0.7
4	1.0	1.0

1.2.3.2 愈伤组织增殖 将叶片诱导健康的愈伤组织接入到增殖培养基中,愈伤组织增殖培养基溶液配比见表 2。每瓶接种 3 个愈伤组织,每处理接种 3 瓶,重复 3 次。

表 2 愈伤组织增殖试验设计			
处理	增殖培养基 (mg/L)		
	6 - BA	IBA	NAA
1	0.5	0.5	0
2	0.5	0.3	0.2
3	1.0	0.5	0.5
4	1.0	0.8	0.2
5	1.5	1.0	0.5
6	1.5	0.5	1.0

1.2.3.3 愈伤组织分化 溶液配比将大量增殖的愈伤组织接入到愈伤组织分化培养基中,进行愈伤组织分化试验,愈伤组织分化培养基溶液配比见表 3。每瓶接种 3 块愈伤组织,每处理接种 3 瓶,重复 3 次。

表 4 叶片愈伤组织诱导结果				
处理	叶片卷曲、变形时间 (d)	愈伤组织形成高峰期时间 (d)	愈伤化程度	愈伤组织等级及颜色
1	10	39 ~ 44	2 + + + + , 4 + + , 3 +	少量,浅黄绿
2	9	37 ~ 41	3 + + + + , 4 + + + , 2 + +	中等,绿
3	7	35 ~ 39	5 + + + + , 3 + + + , 1 + +	大量,绿
4	6	35 ~ 39	7 + + + + , 2 + + +	大量、部分黄褐色,其他绿色

注:“+”表示 1 张叶子有 1/4、“++”表示有 1/2、“+++”表示有 3/4、“++++”表示完全愈伤化;“7++++,2+++”表示接种的 9 块叶片中有 7 块愈伤化程度为 + + + + , 2 块愈伤化程度为 + + + , 以此类推;叶片愈伤组织等级划分:体积小于 0.1 cm³ 为少量,体积 0.1 ~ 0.5 cm³ 为中等,大于 0.5 cm³ 为大量。

2.2 愈伤组织增殖

叶片在适宜的诱导培养基上形成愈伤组织后,虽然愈伤化程度较高,但数量较少,须进一步扩大繁殖,因此剥离原来残余的外植体,将愈伤组织切成固定大小,在增殖培养基上进行培养,结果见图 1。刚接入的第 1 天,各处理愈伤组织体积相差不大,至 5 d 后已有明显差异,生长 35 d 时,各处理愈伤组织体积大小为处理 4 > 处理 3 > 处理 1 > 处理 2 > 处理 5 > 处理 6。其中,处理 4 在生长 15 ~ 20 d 时增殖达到高峰期;处理 5、处理 6 愈伤组织体积在整个生长过程中都相差不大,明显低于其他处理。对生长 35 d 愈伤组织体积进行方差分析(表 5),处理 4、处理 3、处理 1、处理 2、处理 5、处理 6,处理 1 与处理 2 处于同水平,其他两者间均存在极显著差异。体积

表 3 愈伤组织分化试验设计			
处理	愈伤组织分化培养基 (mg/L)		
	KT	NAA	6 - BA
1	1.0	0	0
2	1.3	0.02	0
3	1.3	0.05	0
4	1.6	0.02	0
5	0	0	1.0
6	0	0.02	1.0
7	0	0.02	1.3

1.3 数据分析

材料接种培养后,定期观察记录并进行统计。采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行分析,数据以平均值表示,差异显著性分别在 0.05、0.01 水平上进行比较。愈伤组织分化率 = 出芽点愈伤组织块数/接种愈伤组织块数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 叶片愈伤组织诱导

叶片愈伤组织诱导试验的 4 个处理中,都能形成愈伤组织,但形成时间、愈伤化程度及颜色状态不同(表 4)。叶片最早开始卷曲、变形的为处理 4,其次为处理 3,最晚的是处理 1;愈伤组织形成高峰期出现在 35 d 以后,处理 3、处理 4 高峰期最先开始;愈伤化程度最高的是处理 4,其次为处理 3,最低的是处理 1;从愈伤组织颜色来看,处理 1 为浅黄绿色,处理 4 部分黄褐色,处理 2、处理 3 为正常颜色,绿色。主要原因是不同处理激素浓度不同,处理 1 浓度太低,愈伤组织形成时间和颜色都不理想,处理 4 浓度太高,对愈伤组织造成了伤害。处理 3 是最佳的激素浓度,即 0.7 mg/L NAA + 0.7 mg/L 6 - BA。

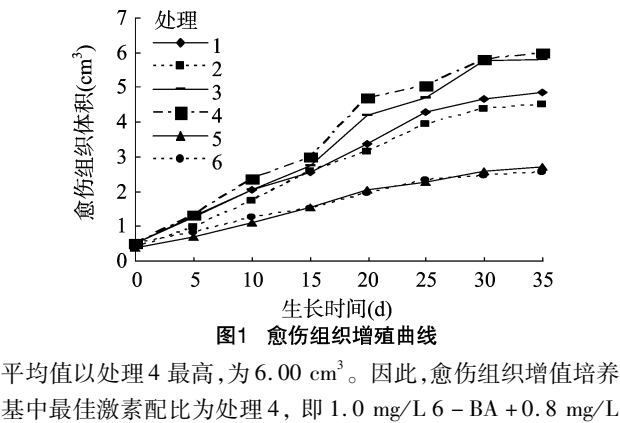


图1 愈伤组织增殖曲线

平均值以处理 4 最高,为 6.00 cm³。因此,愈伤组织增殖培养基中最佳激素配比为处理 4,即 1.0 mg/L 6 - BA + 0.8 mg/L

表 5 35 d 愈伤组织体积方差分析

处理	体积均值 (cm ³)
4	6.00aA
3	5.80aA
1	4.87abAB
2	3.50bcBC
5	2.70cC
6	2.55cC

注:愈伤组织体积测定:100 mL 量筒内放入 50 mL 无菌水,将待测愈伤组织放入量筒内,使之完全浸没到液面以下,观察此时量筒内无菌水体积,愈伤组织体积=放入愈伤组织后液面体积-50;同列数据后标有不同小写、大写字母者分别表示差异显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)。

IBA +0.2 mg/L NAA。

2.3 愈伤组织分化

将增殖后的愈伤组织切成体积为 1 cm³ 左右的小块,分别接种到愈伤组织分化培养基中,定期观察、统计愈伤组织分化情况,结果见表 8,芽点形成时间排序为处理 4 < 处理 2 = 处理 3 < 处理 1 = 处理 7 < 处理 5 = 处理 6,处理 4 从 8 d 后开始大量形成不定芽,其次是处理 2、处理 3、处理 7,最晚的是处理 1、处理 5、处理 6。分化率最高的是处理 3、处理 2,处理 4、处理 7 的分化率为 0(试验中不定芽长到 0.3 cm 左右,并且褐化、枯萎),在 20 d 时大部分愈伤组织死亡,死亡率分别达到了 88.9%、77.8%,处理 3 虽然分化率较高,但死亡率也达到 11.1%。因此,结合各项指标,处理 2 是最佳诱导愈伤组织分化的培养基激素配比,即 1.3 mg/L KT + 0.02 mg/L NAA。

表 6 愈伤组织分化结果

处理	芽点开始形成时间(d)	芽点大量形成时间(d)	分化率(%)	死亡率(%)
1	7	10~14	55.5	0
2	6	9~14	88.9	0
3	6	9~14	88.9	11.1
4	5	8~13	0	88.9
5	8	10~13	22.2	0
6	8	10~13	44.4	0
7	7	9~13	0	77.8

3 结论与讨论

自植物激素被发现以来,细胞分裂素和生长素就被广泛应用于生产中。6-BA 能够使愈伤组织变得致密,并增加分生细胞数目,较好保持愈伤组织的诱导和再生能力;KT 在诱导培养中的作用很小,但可以提高外植体的分化能力进而使其再生率得到提高;NAA、IBA 被广泛用于生根,但与一定量的分裂素结合,可促进愈伤组织诱导和分化^[13-16]。各种激素作用的特异性都是相对的,但培养中各种生理现象出现是各

种激素互相影响的结果,诱导和分化完成也必须是由多种激素共同作用才能很好地实现^[17-18]。

本试验中,诱导叶片产生愈伤组织最佳的的激素浓度与配比是 0.7 mg/L NAA + 0.7 mg/L 6-BA;对愈伤组织增殖效果最好的激素浓度与配比是 1.0 mg/L 6-BA + 0.8 mg/L IBA + 0.2 mg/L NAA;对愈伤组织分化效果最好的激素浓度与配比是 1.3 mg/L KT + 0.02 mg/L NAA。

参考文献:

[1] 雷 蕾,袁国强,刘健锋,等. 枸杞叶中总黄酮对人肝癌细胞 HepG2 增殖与凋亡的影响[J]. 宁夏大学学报:自然科学版, 2014,35(3):255-260.

[2] 刘英娟,杜金梁,贾 睿,等. 枸杞多糖对四氯化碳诱导建鲤原代肝细胞损伤的保护作用研究[J]. 上海海洋大学学报,2014,23(5):718-725.

[3] 高春燕. 枸杞多糖的提取分离技术及其特性研究[D]. 西安:陕西师范大学,2006.

[4] 张东旭,周增产,卜云龙,等. 植物组织培养技术应用研究进展[J]. 北方园艺,2011,4(6):209-213.

[5] 张云霞,刘敦华. 枸杞功能性成分研究进展及深加工发展趋势[J]. 食品与药品,2009,11(5):67-69.

[6] 曾洪学,张小华. 植物细胞全能性理论在中国的研究与实践[J]. 分子植物育种,2004,2(6):885-889.

[7] 王 蒂,陈劲枫. 植物组织培养[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2014:40-41.

[8] 朴莲玉. 玉米不同外植体愈伤组织诱导及分化的研究[D]. 延吉:延边大学,2013.

[9] 陈荣敏,温书敏,郎明林,等. 脱落酸(ABA)对小麦花药培养的影响[J]. 河北农业大学学报,1999,22(2):24-26.

[10] 唐晓杰,孙 萍,马德宝. 枸杞组织培养快速繁殖技术[J]. 北华大学学报:自然科学版,2011,12(2):204-207.

[11] 马和平. 枸杞组织培养关键技术的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2005.

[12] 包振华. 枸杞的组织培养与脱毒技术研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010.

[13] 余桂红,张 旭,孙晓波,等. 大麦苏啤 4 号幼胚愈伤组织的诱导及植株的高频再生[J]. 江苏农业学报,2013,29(5):953-956.

[14] Narayanan S L, Ibrahim S M, Ashok S, et al. Effect of abscisic acid in enhancing plant regenerability in rice[J]. Rice Biotechnology Quarterly, 2000, 41(4):10-16.

[15] 陈 豫,胡 伟,何 磊. 不同浓度激素对胡萝愈伤组织诱导的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):54-56.

[16] 王冬梅,黄学林,黄上志. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学通讯,1996,32(5):373-377.

[17] 林丽飞,夏瑞娥,刘春国,等. 不同因素对短葶飞蓬愈伤组织的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):52-54.

[18] 李宗霖,周 燮. 植物激素及其免疫检测技术[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1996.