

苏慧慧,韩兴杰,李同建,等. 三叶木通下胚轴愈伤组织诱导及分化[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):50-52.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.014

# 三叶木通下胚轴愈伤组织诱导及分化

苏慧慧<sup>1,2</sup>, 韩兴杰<sup>2</sup>, 李同建<sup>2</sup>, 徐玲玲<sup>2</sup>, 徐小青<sup>3</sup>, 胡兰英<sup>3</sup>, 廖亮<sup>1,2</sup>

(1. 江西中医药大学, 江西南昌 330000; 2. 九江学院, 江西九江 332000; 3. 江西省湖口县三里林场, 江西湖口 332500)

**摘要:**以三叶木通试管苗下胚轴为材料,研究不同激素配比对三叶木通下胚轴愈伤组织诱导、分化的影响,比较光照及不同抗褐化剂对防止愈伤组织褐化的影响。结果表明,当2,4-D浓度为2.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L时,愈伤组织诱导率高达96.5%;黑暗处理比光照更有利于愈伤组织的诱导,0.6 g/L PVP对预防愈伤组织褐化具有较好的效果;TDZ的浓度对愈伤组织的分化有着重要的影响,适合愈伤组织分化的最佳培养基为:MS + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVP 0.6 g/L。

**关键词:**三叶木通;愈伤组织;分化

**中图分类号:**S567.904.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0050-03

三叶木通 [*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz] 是木通科 (Lardizabalaceae) 木通属 (*Akebia*) 的一种果实营养价值较高的半落叶藤本野生果树<sup>[1]</sup>, 别称八月瓜、八月扎、炸瓜。主要分布于中国甘肃南部、陕西南部, 湖南、湖北、山西、河南等地也有少量分布<sup>[2]</sup>。研究发现, 三叶木通种子脂肪酸含量较高, 且主要以不饱和脂肪酸为主<sup>[3]</sup>; 果实味美、营养丰富, 蛋白质、氨基酸、可溶性糖、有机酸和矿物质含量也很高, 被誉为果中之王<sup>[4]</sup>, 具有较高的经济价值和开发价值。三叶木通是中国传统中药, 有清心火、利小便、通经下乳作用<sup>[5]</sup>。近年来, 国内学者对三叶木通的研究主要集中在药用成分分析以及扦插栽培等方面<sup>[6-7]</sup>, 组织培养方面研究较少, 目前, 只有愈伤组织诱导的研究, 且诱导率较低, 尚无关于三叶木通愈伤组织分化成苗的相关报道。本试验对三叶木通下胚轴愈伤组织诱导及分化进行了研究, 研究不同生长调节剂种类、浓度组合对三叶木通下胚轴再生的影响, 以期建立三叶木通下胚轴高效离体再生体系, 为其遗传转化体系的建立奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

三叶木通种子由湖南怀化种植基地提供。

### 1.2 方 法

1.2.1 无菌外植体的获取 挑选富有光泽、饱满的种子, 置于超净工作台内, 无菌水浸泡 24 h, 使其充分膨胀。75% 的乙醇浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 0.1% 的氯化汞浸泡 10 min, 无菌水冲洗 3 次, 置于无菌滤纸上吸干多余水分, 用解剖针划开种皮, 将胚取出, 分别接种于 MS 培养基、1/2 MS 培养基、MS +

6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.1 mg/L 和 1/2 MS + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基中诱导种子萌发, 24 h 光照培养 7 d, 统计试验结果。

1.2.2 愈伤组织诱导培养基的筛选 切取长度约为 5 mm 的三叶木通下胚轴, 以 MS 为基本培养基, 选用 3 因素 3 水平正交试验设计  $L_9(3^3)$  方案, 观察 2,4-D、NAA、KT 3 种植物激素的浓度及对比对愈伤组织诱导的影响(黑暗培养), 每瓶接 5 个材料, 每组处理 10 瓶, 40 d 后统计愈伤组织诱导结果。

1.2.3 光照对愈伤组织诱导影响及抗褐化剂的筛选 切取长度约为 5 mm 的下胚轴, 接种于 MS + 2,4-D 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 中, 分别进行黑暗、光照、黑暗 20 d 再光照 20 d 3 种处理方案培养, 定期观察并记录生长情况, 40 d 后统计试验结果。将约 5 mm 大小的外植体接种于愈伤诱导培养基 MS + 2,4-D 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 中, 分别添加维生素 C 10、20、50 mg/L, AC(活性炭) 0.5、0.8、1.0 g/L, PVP(聚乙烯吡咯烷酮) 0.6、0.8、1.0 g/L 的抗氧化剂和吸附剂, 以不添加任何抗褐化剂和吸附剂作为空白对照, 黑暗处理, 40 d 后统计愈伤组织的褐化程度及生长状态。

1.2.4 愈伤组织分化培养基的筛选 将长势较好的愈伤组织转移于培养基: (1) MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVP 0.6 g/L; (2) MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVP 0.6 g/L; (3) MS + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVP 0.6 g/L; (4) MS + TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVP 0.6 g/L, 每瓶接 5 个材料, 每个处理重复 10 瓶。黑暗处理 10 d 后, 光照培养, 50 d 后分别观察并记录愈伤组织分化结果。

1.2.5 培养条件 培养基 pH 值为 5.8~5.9, 琼脂 8 g/L, 蔗糖 30 g/L, 培养温度(24±1) °C, 培养室湿度为 60%~70%, 光照时间为 24 h/d(黑暗处理及光照试验除外), 光照度为 1 200~1 500 lx。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对无菌外植体获得的影响

观察发现, 3 d 后接种在 MS 和 1/2MS 培养基中的种胚变

收稿日期: 2014-08-01

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31460073); 江西省科技支撑计划(编号: 20142BBF60055); 江西省科技重大项目(编号: 2014BBF60055、20143ACF60010)。

作者简介: 苏慧慧(1989—), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 从事中药资源及组织培养技术研究。

通信作者: 徐玲玲, 教授, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: 13907021710@163.com。

绿且子叶张开,下胚轴开始伸长;另外2组培养基几乎没有变化。7 d后不同培养基中的下胚轴长度存在差异,子叶形态也不同(表1)。接种于MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L和1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基中的种胚不能形成健壮幼苗,发育畸形。因此,将MS培养基作为获得外植体的最佳培养基。

表1 不同培养基对三叶木通下胚轴长度及形态的影响

| 培养基                              | 下胚轴长度(mm) | 子叶形态 |
|----------------------------------|-----------|------|
| MS                               | 11.37     | 正常   |
| 1/2MS                            | 9.86      | 正常   |
| MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L    | 4.25      | 畸形   |
| 1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L | 3.79      | 畸形   |

## 2.2 愈伤组织诱导培养基的选择

观察发现,接种7 d左右下胚轴两端切口处开始膨大,40 d后愈伤组织形成,愈伤组织诱导结果见表2。当激素配比为2,4-D 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L时,愈伤诱导率最高,为96.5%。为进一步观察各控制变量是否对观测变量产生影响,利用SPSS软件进行多因素多水平的方差分析,结果见表3。

表2 不同激素组合培养基愈伤组织诱导率

| 序号 | 激素浓度(mg/L) |     |     | 诱导率(%) |
|----|------------|-----|-----|--------|
|    | 2,4-D      | NAA | KT  |        |
| 1  | 2.0        | 0.2 | 0   | 96.5   |
| 2  | 2.0        | 0.4 | 0.2 | 92.7   |
| 3  | 2.0        | 0.6 | 0.4 | 76.9   |
| 4  | 3.0        | 0.2 | 0.4 | 82.1   |
| 5  | 3.0        | 0.4 | 0   | 75.9   |
| 6  | 3.0        | 0.6 | 0.2 | 67.2   |
| 7  | 4.0        | 0.2 | 0.2 | 50.6   |
| 8  | 4.0        | 0.4 | 0.4 | 31.4   |
| 9  | 4.0        | 0.6 | 0   | 23.5   |

表3 三叶木通愈伤组织诱导率的方差分析

| 方差来源  | 平方和       | 自由度 | 均方差       | F       | P     |
|-------|-----------|-----|-----------|---------|-------|
| 2,4-D | 4 643.696 | 2   | 2 321.848 | 397.501 | 0.003 |
| NAA   | 632.996   | 2   | 316.498   | 54.185  | 0.018 |
| KT    | 71.936    | 2   | 35.968    | 6.158   | 0.140 |
| 误差    | 11.682    | 2   | 5.841     |         |       |

由表3可知,2,4-D、NAA 2个因素对愈伤组织诱导率的影响都极为显著,KT则不显著。即2,4-D、NAA 2种激素的3种浓度处理间差异均为显著;KT的3种浓度处理间差异不显著。为了筛选2,4-D、NAA的最佳浓度,对2因素进行Duncan检验,结果见表4、表5。

2.2.1 2,4-D 3个浓度水平的Duncan检验 多重分析比较结果见表4,2,4-D 3个浓度间差异显著;2,4-D 3.0 mg/L与4.0 mg/L差异极显著,就平均值来看,2,4-D 2.0 mg/L的诱导平均值最高,因此,确定三叶木通下胚轴愈伤组织诱导适宜的2,4-D浓度为2.0 mg/L。

2.2.2 NAA 3个浓度水平的Duncan检验 多重分析比较结果见表5,NAA的3个浓度间差异显著;而NAA 0.2 mg/L与0.6 mg/L间差异极显著。就平均值来看,NAA 0.2 mg/L平

表4 不同浓度2,4-D对三叶木通下胚轴愈伤组织诱导

| 浓度(mg/L) | 平均诱导率(%) |
|----------|----------|
| 2        | 88.700aA |
| 3        | 75.067bA |
| 4        | 35.167cB |

注:同列数据后小写、大写字母不同者表示差异显著( $P < 0.05$ )、极显著( $P < 0.01$ )。表5同。

表5 不同浓度NAA对三叶木通下胚轴愈伤组织诱导

| 浓度(mg/L) | 平均诱导率(%)  |
|----------|-----------|
| 0.2      | 76.400aA  |
| 0.4      | 66.667bAB |
| 0.6      | 55.867cB  |

均值最高,因此,确定三叶木通下胚轴愈伤组织诱导适宜的NAA浓度为0.2 mg/L。

试验结果表明,2,4-D、NAA 2种植物激素及其配比对愈伤组织的诱导率有极显著影响,当2,4-D浓度为2.0 mg/L,NAA浓度为0.2 mg/L时愈伤组织诱导率最高。

## 2.3 光照时间及不同抗褐化剂对愈伤组织的影响

试验结果表明,黑暗处理条件下愈伤组织诱导率最高,且生长状态好,呈浅黄色;光照条件下的愈伤组织褐化率高达100%,愈伤组织呈深褐色;黑暗20 d再光照20 d培养的愈伤组织开始时呈浅黄色,当进行光照培养5 d后观察到约40%愈伤组织开始慢慢变成褐色,20 d后愈伤组织的褐化率高达60%。表明黑暗条件下培养可很大程度上降低三叶木通的褐化。不同抗褐化剂对愈伤组织的影响见表6。

表6 不同抗褐化剂种类对愈伤组织的影响

| 抗褐化剂种类 | 浓度      | 褐化率(%) | 生长状况  |
|--------|---------|--------|-------|
| 维生素C   | 10 mg/L | 95.38  | 褐色水渍化 |
|        | 20 mg/L | 87.21  | 褐色致密  |
|        | 50 mg/L | 88.50  | 褐色致密  |
| AC     | 0.5 g/L | 100    | 褐色水渍化 |
|        | 0.8 g/L | 85.25  | 褐色致密  |
|        | 1.0 g/L | 73.96  | 黄色致密  |
| PVP    | 0.6 g/L | 26.24  | 绿白色疏松 |
|        | 0.8 g/L | 55.27  | 浅黄色疏松 |
|        | 1.0 g/L | 57.18  | 黄色疏松  |
| 无      | 无       | 100    | 褐色水渍化 |

常用抗氧化剂维生素C及吸附剂AC并没有起到很好的抗褐化作用,而PVP 0.6 g/L对防止褐化有相对较好作用,本结果与刘香在超声对三叶木通叶片愈伤组织生长及代谢影响得出的结论<sup>[8]</sup>一致。

## 2.4 愈伤组织分化培养基的筛选

将愈伤组织接种于培养基后,定期观察分化情况。培养30 d后观察到2号和4号培养基仍未分化且愈伤组织呈黑褐色,35 d后愈伤组织表面有芽点冒出。接种到1号和3号培养基的愈伤组织也有少量呈黑褐色,但已明显分化,呈团簇状。50 d后愈伤分化情况见表7。由表7可以看出,3号培养基MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+PVP 0.6 g/L的长势最好,芽分化程度最高,为适宜分化培养基,分化情况见图1。

表7 三叶木通愈伤组织分化情况

| 培养基编号 | 长势         | 芽的分化程度 |
|-------|------------|--------|
| 1     | 生长缓慢,芽弱小   | +++    |
| 2     | 生长极缓慢,长势不好 | +      |
| 3     | 芽健壮,长势均匀   | +++++  |
| 4     | 芽弱小,发黄     | ++     |



A. 20 d 后愈伤组织的分化



B. 50 d 后愈伤组织的分化

图1 三叶木通愈伤组织分化

### 3 结论与讨论

本试验中种胚接种于不同的培养基时下胚轴长度存在很大差异,在添加植物激素的培养基中下胚轴的长度较短,可能是由于外源激素与种胚本身内源激素相互作用抑制了生长。种胚接种于 1/2 MS 培养基中下胚轴长度也较短,可能是大量元素减半而导致种胚在萌发过程中大量元素不足的原因。

三叶木通中含有丰富的酚类物质,因此在愈伤组织培养过程中易发生褐化现象,从而影响培养的效果<sup>[9-11]</sup>,丰富的酚类物质还会在三叶木通果汁饮料的加工过程导致果汁色泽褐变<sup>[12]</sup>。光照对愈伤组织诱导过程中的褐化现象有着很强的诱导作用<sup>[13]</sup>。试验结果,PVP 0.6 g/L 对防止褐化有着较好的作用,褐化程度明显降低,可能是与 PVP 吸附了酚类氧化物质有关。李然红等在甘蓝组织培养中也发现 PVP 对褐化抑制作用明显<sup>[14]</sup>。

在组织培养中,外植体的类型以及适当浓度配比的细胞

分裂素和生长素都对愈伤组织形成有着很重要的影响<sup>[15-16]</sup>,本试验以下胚轴为外植体,通过正交设计筛选出适宜诱导愈伤组织的培养基为:MS + 2,4 - D 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L。沈国林等以三叶木通叶片为外植体,筛选出最适宜诱导愈伤组织的培养基为 MS + 2,4 - D 4.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L + KT 1.0 mg/L<sup>[5]</sup>,但愈伤诱导率只有 87.5%,低于本研究的 96.5%,且没有进行分化研究。

本试验在解决了三叶木通愈伤诱导及褐化问题后,利用得到的愈伤组织进行了分化的初步研究,筛选出适宜的分化培养基为 MS + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVP 0.6 g/L,为后续快繁体系的建立奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 马玉华,王荔. 三叶木通特性研究进展[J]. 江西农业学报, 2011,23(5):71-73.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第29卷[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [3] 彭涤非,王中炎. 三叶木通种子脂肪酸成分的 GC-MS 分析[J]. 植物资源与环境学报,2006,15(4):71-72.
- [4] 马玉华,王荔. 三叶木通特性研究进展[J]. 江西农业学报, 2011,23(5):71-73.
- [5] 沈国林,邵爱娟,黄璐琦,等. 三叶木通愈伤组织培养研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(10):899-901.
- [6] 张铮,王喆之. 三叶木通不同部位有效成分含量比较研究[J]. 中药材,2005,28(11):983-984.
- [7] 田定科,余志民. 影响三叶木通扦插成活的栽培因素[J]. 湖南农业科学,2009(7):129-131.
- [8] 刘香. 超声对三叶木通叶片愈伤组织生长及代谢影响的研究[D]. 西安:陕西师范大学,2009.
- [9] 郑颖,秦红玫,黎云祥. 台湾椴木组织培养中污染和褐化的防止[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):64-65,117.
- [10] 黎世龄,汤晓红,陈云凤,等. 八月瓜胚乳愈伤组织诱导研究初报[J]. 中国南方果树,2008,37(2):46-48.
- [11] 陈永胜,邵志敏,李国瑞,等. 蓖麻花药愈伤组织诱导及防褐化研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):39-40.
- [12] 曹庸,熊大胜,朱金桃. 八月瓜果汁饮料加工中褐变及沉淀的研究[J]. 中南林学院学报,1999,19(3):48-50,54.
- [13] 邵志敏,陈永胜,黄凤兰,等. 低温预处理与光照条件对蓖麻花药愈伤组织诱导的影响[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2012,27(2):189-193.
- [14] 李然红,于丽杰,李晓东. 甘蓝组织培养中防止外植体褐化的研究[J]. 北方园艺,2009(11):96-99.
- [15] 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.
- [16] 王忠敏,付淑琴,张莉华,等. 迎春花无菌体系的建立以及茎段和叶片愈伤组织的诱导[J]. 上饶师范学院学报,2008,28(3):61-66.