

激素和外植体类型对新疆雪莲愈伤组织诱导的影响

庞红霞 祝长青 覃建兵 * *

新疆师范大学生命科学与化学学院, 乌鲁木齐 830054

摘要 以新疆雪莲叶片、叶柄和根为试验材料,研究了 MS 基本培养基附加不同质量浓度的植物激素对新疆雪莲愈伤组织诱导的影响。结果表明:单因素诱导中,NAA 的诱导效果显著优于其它激素;以 NAA 为诱导激素,叶片与根,叶柄与根之间的诱导率存在极显著性差异,诱导效果:根 > 叶柄 > 叶片,最高诱导率分别为 100%、98%、44%;NAA 与 6-BA 激素组合对 3 种外植体愈伤组织的诱导中,叶片与叶柄诱导率之间存在极显著性差异,叶片、叶柄与根的诱导率之间存在显著性差异,诱导效果:叶片 > 叶柄 > 根,最高诱导率分别为 98%、64%、23%。

关键词 新疆雪莲;愈伤组织;诱导;植物激素;外植体

中图分类号 Q 943.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0131-04

新疆雪莲 (*Saussurea involucrate* Kar et Kir.) 系菊科风毛菊属高山草本植物,一般生长在海拔 2 400 m 以上生态环境非常恶劣的高山冰碛石、流石滩石隙中。目前已被列为国家 3 级濒危物种^[1],是高山地区民间常用的一类名贵中草药,此类药材主要含有黄酮类、生物碱、内酯甾醇、多糖及挥发油等多种化学成分,主要的次生代谢物是黄酮及黄酮苷类^[2],具有重要的药用价值^[3],在我国已经有 1 300 多年的使用历史。

新疆雪莲目前尚未形成规模种植,主要依靠野生资源,野生新疆雪莲成活率极低,加上人们对其毫无节制地毁灭性盗采和非法收购,造成野生新疆雪莲生长速度远远低于采挖速度,使这一珍贵物种资源遭受严重破坏,原生地资源日益枯竭,区域性资源枯萎,难以满足市场的需求。随着组织培养技术的不断成熟,为新疆雪莲快速繁殖和种质资源的保存提供了行之有效的途径。因此,开展新疆雪莲组织培养技术的研究,探索适合新疆雪莲植株再生的培养条件,对实现新疆雪莲合理开发利用具有重要的参考意义。关于新疆雪莲的组织培养研究早在 20 世纪 90 年代就有报道^[4],朴日子等^[5]在新疆雪莲离体培养中愈伤组织诱导率为 90.48%,赵海清等^[6]、杨林等^[7]、胡雪梅等^[8]建立了新疆雪莲组织培养体

系,但均未提到愈伤组织诱导率,而对不同外植体和植物激素对新疆雪莲愈伤组织诱导的影响还缺乏系统的研究。笔者以新疆雪莲叶片、叶柄和根为外植体,研究不同植物激素及激素组合对新疆雪莲愈伤组织诱导的影响,为基于愈伤组织所进行的离体培养、遗传转化等研究提供参考。

材料与amp;方法

野生新疆雪莲种子采集于 1 号冰川,选取生长健壮、无病虫害的新疆雪莲种子,用蒸馏水浸泡 6 h 后,70%的乙醇消毒 20 s,无菌蒸馏水冲洗 4~6 次,0.1%的 HgCl₂ 消毒 10 min,再用无菌蒸馏水冲洗 3~5 次,接种到铺有 3 层滤纸的培养皿中,每皿加无菌蒸馏水 7 mL,在 (25 ± 2) °C 萌发,7 d 后将萌发后的种子接种到 1/2 MS₀ 培养基上生长。新疆雪莲成苗后,取无菌苗叶片,叶柄和根,剪成 0.3~0.4 cm² 大小的外植体,接种到 MS 附加不同激素的诱导培养基上,(25 ± 2) °C 暗培养,18 d 左右统计诱导率。

诱导率 (%) = (产生愈伤组织的外植体块数 / 总接种的外植体块数) × 100。

统计分析:愈伤组织诱导率的每组数据以平均值 ± 标准误差 (SD) 表示。数据采用 SPSS 软件进行变量分析 (ANOVA),在确定 F 值下,以 0.001 水平

收稿日期:2009-05-05;修回日期:2009-11-02

* 国家自然科学基金 (30960092, 30960044)、科技部援疆计划项目 (200840102-39)、新疆维吾尔自治区高校科研计划重点项目 (XJEDU2007S27)、新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题 (XJYS0203-2008-01)、新疆师范大学研究生创新基金资助

* * 通讯作者。E-mail: jianbingqin@tom.com

庞红霞,女,1983 年生,硕士研究生。研究方向:植物分子生物学。E-mail: 150059599@qq.com

为最小显著性差异(Duncan)。

结果与分析

单一激素对新疆雪莲愈伤组织诱导的影响

以新疆雪莲无菌苗叶片、叶柄、根为外植体,考察单一激素对愈伤组织诱导的影响。结果显示:不同外植体在 NAA、IAA、IBA、6-BA 的适当浓度下,18 d 左右均可诱导出愈伤组织。

NAA 对新疆雪莲不同外植体愈伤组织的诱导效果见表 1。不同质量浓度的 NAA 对新疆雪莲叶片、叶柄和根的诱导率存在极显著性差异,其中对根的诱导率最高,可达 100%。对根的诱导率显著高于其它 2 种外植体且适应范围较宽,以叶片为外植体,NAA 质量浓度在 1.00~7.00 mg/L 范围内均不能诱导出愈伤组织;以叶柄和根为外植体,NAA 质量浓度在 8.00~20.00 mg/L 范围内可诱导形成球状胚(见图 1A),球状胚可直接分化出根。3 种外植体诱导率之间,叶片与根,叶柄与根之间的诱导率存在极显著性差异,而叶片与叶柄之间的诱导率不存在显著性差异。

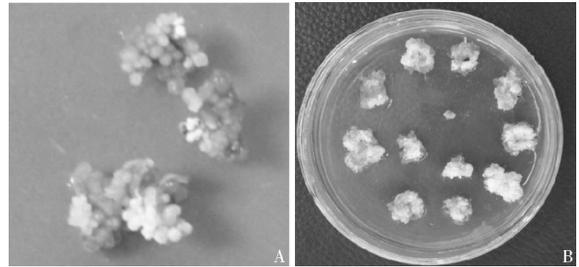
表 1 NAA 对新疆雪莲不同外植体愈伤组织的诱导¹⁾

Table 1 Effect of NAA on callus induction of *Saussurea involucrate* with different explants

NAA/ (mg/L)	叶片诱导率/ Callus inductivity of leaves %	叶柄诱导率/ Callus inductivity of petioles %	根诱导率/ Callus inductivity of roots %
2	0 ±3.14 d	38 ±6.02 b	98 ±4.14 a
3	0 ±3.14 d	20 ±6.02 b	98 ±4.14 a
4	0 ±3.14 d	40 ±6.02 b	98 ±4.14 a
5	0 ±3.14 d	20 ±6.02 b	100 ±4.14 a
6	0 ±3.14 d	29 ±6.02 b	100 ±4.14 a
7	18 ±3.14 cd	29 ±6.02 b	62 ±4.14 b
8	13 ±3.14 cd	20 ±6.02 b	80 ±4.14 b
9	38 ±3.14 ab	29 ±6.02 b	100 ±4.14 a
10	0 ±3.14 d	24 ±6.02 b	100 ±4.14 a
15	27 ±3.14 bc	33 ±6.02 b	100 ±4.14 a
20	44 ±3.14 a	98 ±6.02 a	45 ±4.14 b

1) Duncan 新复极差测验,同列数据间具有相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),下同。Means in each column followed by the same letter are not significantly different at ($P > 0.05$) according to Duncan's multiple range test, the same as below.

2,4-D 浓度在 0.50~20.00 mg/L 之间,3 种外植体均未诱导出愈伤组织,改变基本培养基为 L7-V、MSS 3AA/2 后仍未能诱导出愈伤组织。以 IAA、IBA、6-BA 为诱导激素,质量浓度在 2.00、3.00、4.00 mg/L 时,IAA、IBA 仅叶柄可诱导出愈伤组织,6-BA 均未诱导出愈伤组织。方差分析



A. 胚性愈伤组织 Embryoid callus; B. 愈伤组织 Callus.

图 1 新疆雪莲愈伤组织图

Fig. 1 *Saussurea involucrate* callus Induction

表明:3 种激素的不同浓度对愈伤组织的诱导不存在显著性差异,3 种外植体诱导率之间不存在显著性差异(见表 2)。

比较 NAA 和 2,4-D 的诱导效果,2,4-D 不能诱导出愈伤组织,NAA 对愈伤组织的诱导效果比 2,4-D、IAA 和 IBA 要好,且对不同外植体的反应有所差别。

表 2 IAA、IBA 与 6-BA 对新疆雪莲不同外植体愈伤组织的诱导

Table 2 Effect of IAA, IBA and 6-BA on callus induction of *Saussurea involucrate* with different explants

激素 Hormones	质量浓度/ (mg/L) Concentration	叶片诱导率/ Callus inductivity of leaves %	叶柄诱导率/ Callus inductivity of petioles %	根诱导率/ Callus inductivity of roots %
IAA	2.00	0	25	0
	3.00	0	10	0
	4.00	0	0	0
IBA	2.00	0	0	0
	3.00	0	0	0
	4.00	0	13	0
6-BA	2.00	0	0	0
	3.00	0	0	0
	4.00	0	0	0

不同激素组合对新疆雪莲愈伤组织诱导的影响

不同质量浓度的 NAA 与 6-BA 激素组合对新疆雪莲叶片、叶柄和根愈伤组织诱导,结果见表 3。NAA 与 6-BA 不同质量浓度组合对叶柄诱导率有极显著性差异,诱导率最高达 90%;对叶片的诱导率有显著性差异,诱导率最高达 98%;而对根诱导率不存在显著性差异。对叶片与叶柄的诱导率之间存在极显著性差异,而对叶片、叶柄与根的诱导率之间存在显著性差异,诱导效果:叶片 > 叶柄 > 根。NAA 与 6-BA 不同质量浓度的激素组合之间对外植体诱导率存在显著性差异,其中 NAA 4.00 mg/L 与 6-BA 4.00 mg/L 激素组合对愈伤组织的诱导率最高,可达 98%。

表 3 NAA 与 6-BA 激素组合对新疆雪莲不同外植体愈伤组织的诱导

Table 3 Effect of NAA and 6-BA on callus induction of *Saussurea involucrate* with different explants

6-BA/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)	叶片诱导率/ % Callus inductivity of leaves	叶柄诱导率/ % Callus inductivity of petioles	根诱导率/ % Callus inductivity of roots
4.00	3.00	87 ±14.10 ab	20 ±4.63 c	34 ±4.29 a
4.00	4.00	98 ±14.10 a	64 ±4.63 b	23 ±4.29 ab
4.00	5.00	27 ±14.10 b	90 ±4.63 a	0 ±4.29 b
4.00	6.00	48 ±14.10 ab	0 ±4.63 c	20 ±4.29 ab

不同质量浓度的 NAA 与 6-BA 激素组合对新疆雪莲叶片愈伤组织的诱导结果见表 4。NAA 0.30 mg/L 与 6-BA 0.50 mg/L 组合对愈伤组织诱导率最高,达 97%,不同质量浓度的 NAA 与 6-BA 激素组合对新疆雪莲叶片的诱导率差异不显著。多重比较结果表明:NAA 0.30 mg/L 和 6-BA 0.50 mg/L 组合培养基与 NAA 2.00 mg/L 和 6-BA 3.00 mg/L 组合培养基诱导率之间存在显著性差异。

表 4 不同质量浓度 NAA 与 6-BA 激素组合对新疆雪莲叶片愈伤组织的诱导

Table 4 Effect of different concentration NAA and 6-BA on callus induction of *Saussurea involucrate* leaves

编号 Serial number	NAA/ (mg/L)	6-BA/ (mg/L)	接种数 Numbers of inoculation	出愈率/ % Callus inductivity
1	0.05	0.50	36	86 ±12.74 abc
2	0.30	0.50	36	97 ±7.70 a
3	0.50	1.00	36	75 ±10.96 abcd
4	1.00	1.00	36	83 ±5.32 abcd
5	2.00	1.00	36	81 ±7.20 abcd
6	0.50	2.00	36	92 ±13.80 ab
7	1.00	2.00	36	64 ±4.37 cd
8	2.00	2.00	36	69 ±19.20 abcd
9	0.50	3.00	36	64 ±5.45 cd
10	1.00	3.00	36	92 ±10.00 abc
11	2.00	3.00	36	50 ±5.74 d
12	0.50	4.00	36	81 ±6.11 abcd
13	1.00	4.00	36	69 ±6.09 bcd
14	2.00	4.00	36	89 ±11.300 abc

不同质量浓度的 2,4-D 与 6-BA 激素组合对新疆雪莲叶片愈伤组织诱导中结果见表 5。2,4-D 0.20 mg/L 与 6-BA 0.50 mg/L 组合对愈伤组织诱导率最高,达 95%,不同质量浓度的 2,4-D 与 6-BA 激素组合对新疆雪莲愈伤组织的诱导率有显著性差异。多重比较结果表明:2,4-D 0.20 mg/L 和 6-BA 0.50 mg/L 组合培养基及 2,4-D 1.00 mg/L 和 6-BA 0.50 mg/L 组合培养基与 2,4-D 0.20 mg/L 和 6-BA 1.00 mg/L 组合培养基的诱导率之间存在显著性差异。

表 5 不同质量浓度的 2,4-D 与 6-BA 激素组合对新疆雪莲叶片愈伤组织的诱导

Table 5 Effect of different concentration 2,4-D and 6-BA on callus induction of *Saussurea involucrate* leaves

编号 Serial number	6-BA/ (mg/L)	2,4-D/ (mg/L)	接种数 Numbers of inoculation	出愈率/ % Callus inductivity
1	0.50	0.01	60	33 ±20.50 bc
2	0.50	0.20	60	95 ±7.66 a
3	0.50	0.50	60	72 ±12.65 ab
4	0.50	1.00	60	12 ±7.10 c
5	0.50	2.00	60	42 ±10.72 bc
6	1.00	0.01	60	35 ±4.93 bc
7	1.00	0.20	60	13 ±4.20 c
8	1.00	0.50	60	62 ±7.69 bc
9	1.00	1.00	60	28 ±10.72 bc

讨 论

植物激素是植物体内产生的能调节植物的细胞分化、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和生长以及根、芽的分化等变化^[9]。据报道,2,4-D 诱导愈伤组织的能力高于 NAA^[10],本研究中,单因素试验中仅 NAA 可以诱导出大量的愈伤组织,且诱导出的均为胚性愈伤组织,这与贾利芳等^[11]报道的单独使用 NAA 比单独使用 6-BA、2,4-D 诱导出的愈伤组织生长状态好的结果相同。在新疆雪莲植株再生的报道中有通过 2,4-D 诱导体细胞胚胎发生的途径获得再生植株^[5]的结果,而本研究中,在仅含 2,4-D 的培养基中,均不能诱导出愈伤组织,更换基本培养基并没有改善诱导效果,原因可能是 2,4-D 的作用效果因作物的不同而不同^[10]。6-BA 是活性较强的细胞分裂素,在植物组织培养中的主要功能是促进细胞的分裂和芽的形成,6-BA 和 NAA 之间有协同作用,即细胞分裂素促进细胞分裂的效应只有在生长素存在的前提下才得以表现^[9]。本研究中,单独使用 6-BA 不能诱导愈伤组织的发生,而单独使用 NAA 却可以,并且在 NAA 存在的情况下,添加 6-BA 可明显提高愈伤组织诱导率。有关新疆雪莲组织培养的报道中,大多以 NAA 与 6-BA 组合诱导产生愈伤组织,将 NAA 和 6-BA 组合与 2,4-D 和 6-BA 组合诱导效果进行对比,发现 NAA 与 6-BA 组合优于 2,4-D 与 6-BA 组合,这可能与 2,4-D 可以通过改变细胞内源 IAA 代谢而起作用^[10]有关。

植物愈伤组织的诱导、增殖主要受植物体的基因型、外植体的生长发育状况、培养基和培养条件等

因素的影响。在高等植物体内,植物幼嫩、生长旺盛的部位生长素类激素水平较高;分化程度较高的茎段、叶片等内源激素水平较低,脱分化的诱导较困难,因此,在愈伤组织诱导过程中,不同外植体所需的最适生长素浓度不同,叶片的离体程度较高,再生能力较弱,在诱导其形成愈伤时不仅需要生长素,还需要添加一定种类和浓度的细胞分裂素^[12]。本研究表明,外植体种类对愈伤组织的诱导率有明显的影响。单独使用 NAA 时,根的诱导效果优于叶片和叶柄,而在 NAA 中添加 6-BA 后,叶片的愈伤组织诱导效果优于叶柄和根,这与刘艳丽等^[12]的研究结果相同。

新疆雪莲组织培养还仅限于试验研究和天山小规模生产,需要探索组织培养苗移栽条件,以实现新疆雪莲种苗产业化,满足市场需求。

参 考 文 献

- [1] 李燕,郭顺星,王春兰.新疆雪莲黄酮类化学成分的研究[J].中国药学杂志,2007,42(8):19-21.
- [2] 陈发菊,李志红,涂璇.雪兔子叶的组织培养及植株再生[J].湖北三峡学院学报,2000,22(5):66-67.
- [3] 庄丽,李卫红,孟丽红.新疆雪莲资源的利用、研发与保护[J].干旱区资源与环境,2006,20(2):195-200.
- [4] 瓦·古巴诺娃,刘杰龙,石玉湖.新疆雪莲的组织培养[J].新疆农业科学,1990(5):221-222.
- [5] 朴日子,曹后男,陈艳秋,等.新疆雪莲的离体培养及其快速繁殖[J].延边大学农学学报,2003,25(2):117-121.
- [6] 赵海清,王晓军.新疆天山雪莲组培快繁技术的建立[J].安徽农业科学,2008,36(7):2743-2746.
- [7] 杨林,覃筱燕.新疆雪莲的组织培养及植株再生[J].中央民族大学学报,2006,15(1):26-29.
- [8] 胡雪梅,秦丽,贺宾,等.新疆雪莲组织培养体系的优化[J].新疆农业科学,2007,44(3):333-335.
- [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.
- [10] 韩磊,汪旭东,吴先军.植物组织培养技术及其应用研究进展[J].种子,2005,24(1):38-43.
- [11] 贾莉芳,王晓军,赵民安.新疆雪莲的体细胞胚胎发生及植株再生[J].安徽农业科学,2007,35(15):4509.
- [12] 刘艳丽,姚家玲,张友德.盾叶薯蓣愈伤组织诱导研究[J].华中农业大学学报,2004,23(4):389-392.

Effect of Plant Hormones and Different Explants on Callus Induction of *Saussurea involucrate*

PANG Hong-xia ZHU Chang-qing QIN Jian-bing

School of Life Science and Chemistry, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China

Abstract Using leaves, petioles and roots of *Saussurea involucrate* as explants, the effect of plant hormones on callus induction in MS medium was studied. The results showed that the medium containing NAA was better than other media. Comparing with whole explants, callus induction of leaves and roots, petioles and roots differed significantly. The inducing effect of roots, leaves and petioles was 100%, 98% and 44%, respectively. Using the combination of NAA and 6-BA, callus induction of leaves, petioles and roots differs significantly as well. The induction effect of leaves, petioles and roots was 98%, 64% and 23%, respectively.

Key words *Saussurea involucrate*; callus; induction; plant hormones; explants

(责任编辑:陆文昌)