

文章编号: 1674-7054(2017)04-0419-05

不同激素配比对南非叶茎愈伤组织诱导的影响

黄伟¹ 黎秀琼² 刘娇² 魏青² 吴金山²

(1. 海南大学档案馆, 海口 570228; 2. 海南大学热带农林学院, 海南 儋州 571737)

摘要: 以南非叶(*Vernonia amygdalina* Del) 的嫩茎为外植体, 1/2 MS 为基本培养基, 每个培养皿中加入 50.0 g · L⁻¹ 蔗糖 + 1.0 g · L⁻¹ 花宝, 以不同激素(NAA, 6-BA, 2, 4-D) 不同浓度配比诱导产生愈伤组织, 筛选出最佳浓度配比。结果表明: 在 NAA 和 6-BA 组合中 2.0 mg · L⁻¹ NAA + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA 诱导率最高, 达 97.8%。在 NAA 和 2, 4-D 组合中 1.5 mg · L⁻¹ NAA + 1.0 mg · L⁻¹ 2, 4-D 诱导率最高, 达 97.7%。

关键词: 南非叶; 外植体茎; 不同激素; 愈伤组织; 诱导率

中图分类号: Q 813.1⁺2 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.04.008

南非叶(*Vernonia amygdalina* Del) 又名将军叶、苦叶树、苦胆叶、苦叶、苦茶、苦杏叶等, 原产于非洲热带地区, 为菊科斑鸠菊属多年生植物。小灌木, 生命力旺盛, 在高温高湿、雨水充沛的环境下, 四季均可种植。在我国中南部地区的海边、山地、坡地以及一些荒地均可见到。南非叶是重要的中草药, 平时多用治疗伤寒感冒等疾病, 也可作为保健品来食用。在我国南方地区房前屋后常见种植, 其叶味苦涩性凉, 具有清热解毒、凉血、清血、降血压的功效, 对治疗癌症也有非常好的功效^[1]。在东南亚, 民间常用来治疗鼻咽癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌等多种癌症。在尼日利亚等地区, 常作为蔬菜食用, 颇受当地人们欢迎。南非叶富含抗氧化剂, 具有抗自由基、防止细胞氧化等功效, 可煮水或直接鲜用, 而且长期食用没什么副作用。南非叶可见开花, 但很难收获到种子。目前, 生产上主要以扦插等营养繁殖为主。由于繁殖存在一定局限性, 在用苗量大的情况下, 苗木就会存在供不应求的情况。笔者利用南非叶的嫩茎作为外植体, 通过不同激素配比诱导产生愈伤组织, 筛选出最优浓度组合, 建立其无性快繁技术体系^[2-4], 旨在为大量快速繁殖优质苗木提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料 所选用的南非叶扦插茎来自于海南省儋州市中国热带农业科学院科技园区。选择 1 年生枝条, 剪成 15~25 cm 长茎段, 剪去部分叶片, 扦插在沙床中, 每隔 1 d 喷水 1 次, 尽量保持土壤湿润, 待扦插枝条叶芽叶片完全展开时(约 30 d), 取先端幼嫩茎进行消毒接种^[5]。

1.2 外植体的消毒与接种 取扦插苗顶端新生嫩枝, 剪成 0.5 cm 的短条, 用清洁剂浸泡 3 min, 取出用自来水冲洗干净, 再用无菌水冲洗 3 次, 之后进行如下处理: 在 75% 乙醇中浸泡 25 s, 然后迅速取出→用无菌水冲洗 3 次→再用 0.1 mg · L⁻¹ 升汞消毒 7 min→用无菌水冲洗 3 次→取出待用^[6]。每个培养皿中放 2~3 个外植体, 全程均需无菌操作, 之后将接种好的外植体放入光照培养室进行培养。分别在 1, 7, 15, 30 d 观察愈伤组织生长情况, 30 d 时统计愈伤组织诱导率。

1.3 激素配比 以 1/2 MS 培养基为基本培养基, 通过不同激素(6-BA, NAA, 2, 4-D) 不同浓度比对愈伤组织进行诱导, 其中 NAA 和 2, 4-D 分别取 5 个浓度差(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg · L⁻¹), 6-BA 分别取 5

收稿日期: 2017-09-25

修回日期: 2017-10-30

基金项目: 海南省普通高等学校研究生创新科研课题(Hyb2016-09)

作者简介: 黄伟(1978-), 女, 助教, 研究方向: 植物生理生化, E-mail: 990304@hainu.edu.cn

通信作者: 吴金山(1984-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 植物生理生化, E-mail: wujsh2007@163.com

个浓度差(0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ,通过正交实验设计 $L_{25}^{5 \times 6}$ 筛选最优组合 25 个处理,每组处理重复 3 次。并在培养基中加入 50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖,1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 花宝。配制好后进行高压灭菌 0.5 h,之后在无菌超净工作台中进行倒板分装。

1.4 培养条件 培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度约 80% ,光照强度 3 000 ~ 4 000 lx ,每天光照 12 h。

1.5 数据分析 选用 Excel2010 进行数据统计。

2 结果与分析

2.1 6-BA 与 NAA 不同浓度对比对南非叶茎愈伤组织诱导的影响 从表 1 可知 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 组合诱导效果最最好,愈伤诱导率高达 97.8%。当 6-BA 浓度为 0 时,组合中不能产生愈伤组织。当 6-BA 浓度为 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着 NAA 浓度增高,愈伤组织诱导率呈上升逐渐趋势。当 6-BA 浓度为 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,NAA 浓度在 0 ~ 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导率呈上升趋势,在 1.5 ~ 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,反而下降;当 6-BA 浓度在 1.5 ~ 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着 NAA 浓度梯度增高,诱导率反而呈下降趋势。

表 1 6-BA 与 NAA 不同浓度对比对南非叶茎愈伤组织诱导的影响

Tab. 1 Effect of 6-BA and NAA at different concentrations on callus inducing of *Vernonia amygdallina* Del

6-BA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数/个 Number of explants	诱导率/% Callus inducing rate	愈伤组织生长情况 Callus growth	备 注 remark
0	0	45	0	/	无
	0.5	45	0	/	无
	1.0	45	0	/	无
	1.5	45	0	/	无
	2.0	45	0	/	无
0.5	0	45	24.4	*	9 d ,直径约 0.5 cm
	0.5	45	37.7	*	7 d ,直径约 0.8 cm
	1.0	45	53.3	**	8 d ,直径 1.0 ~ 1.5 cm
	1.5	45	88.9	***	5 d ,直径 1.0 ~ 2.0 cm
	2.0	45	97.8	****	4 d ,直径约 3.0 cm
1.0	0	45	62.2	**	7 d ,直径 1.0 ~ 1.5 cm
	0.5	45	82.2	***	8 d ,直径 1.0 ~ 2.0 cm
	1.0	45	88.9	***	7 d ,直径 1.5 ~ 2 cm
	1.5	45	71.1	**	13 d ,直径约 1.0 cm
	2.0	45	77.8	**	10 d ,直径 0.5 ~ 0.8 cm
1.5	0	45	64.5	**	11 d ,直径 0.6 ~ 0.7 cm
	0.5	45	37.8	*	10 d ,直径 0.3 ~ 0.5 cm
	1.0	45	10	*	10 d ,直径 0.1 ~ 0.3 cm
	1.5	45	4.4	*	14 d 较小
	2.0	45	15.6	*	16 d 较小
2.0	0	45	33.4	*	20 d 很小
	0.5	45	10	*	10 d ,直径 0.1 ~ 0.3 cm
	1.0	45	24.6	*	11 d ,直径约 0.5 cm
	1.5	45	20	*	22 d 很小
	2.0	45	24.5	*	10 d 很小

注 “***”表示愈伤组织的情况较好,“****”表示愈伤组织的情况最好,下同

Noté “***” indicates good callus growth, “****” best calli growth, similarly hereinafter

实验全程严格无菌操作,接种后第 4 ~ 5 天,在外植体茎周围可看见少量的愈伤组织,之后逐渐增多。第 7 天,外植体茎基部布满新长出来的愈伤组织,第 15 天,完全布满新生愈伤组织(图 1),第 30 天,已基本呈块状。

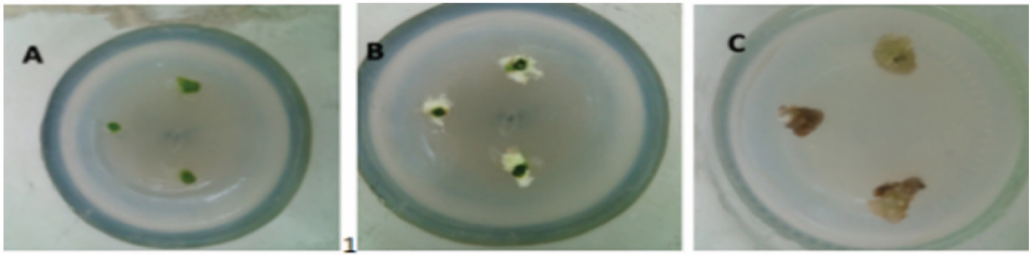


图 1 南非叶茎诱导产生愈伤组织的过程
A: 接种 1 d; B: 接种 7 d; C: 接种 15 d

Fig. 1 The process of inducing calli of *Vernonia amygdallina* Del

A: Inoculated at day 1; B: Inoculated at day 7; C: Inoculated at day 15

2.2 2 4-D 和 NAA 不同浓度配比对南非叶茎愈伤组织诱导率影响 从表 2 可见,1.0 mg · L⁻¹ 2 4-D + 1.5 mg · L⁻¹ NAA 的组合,愈伤组织诱导率最高,达 97.7%。当 2 4-D 浓度为 0 时,不能诱导产生愈伤组织。当 2 4-D 浓度在 0.5 ~ 1.0 mg · L⁻¹ 时,随着 NAA 浓度的增加,愈伤组织诱导率基本也呈上升趋势。当 2 4-D 浓度为 1.0 mg · L⁻¹,NAA 浓度为 1.5 mg · L⁻¹ 时,诱导率达到最高,之后呈下降趋势。当 2 4-D 浓度在 1.5 mg · L⁻¹ ~ 2.0 mg · L⁻¹ 之间时,NAA 各浓度梯度的增加,诱导率反而呈下降趋势。当 1.5 mg · L⁻¹ 2 4-D + 2.0 mg · L⁻¹ NAA 和 2.0 mg · L⁻¹ 2 4-D + 1.0 mg · L⁻¹ NAA 时,愈伤组织诱导率为零,可能是 2 种激素浓度过高时起到相互抑制的作用。

表 2 2 4-D 与 NAA 不同浓度配比对南非茎愈伤组织诱导率影响

Tab. 2 Effect of 2 4-D and NAA at different concentrations on callus inducing of <i>Vernonia amygdallina</i> Del					
2 4-D/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	接种数/个 Number of explants	愈伤组织诱导率/% Callus inducing rate	愈伤组织生长情况 Callus growth	备 注 Remark
0	0	45	0	/	无 No
	0.5	45	0	/	无 No
	1.0	45	0	/	无 No
	1.5	45	0	/	无 No
	2.0	45	0	/	无 No
0.5	0	45	20	*	9 d 0.3 cm
	0.5	45	28.9	*	11 d 0.5 cm
	1.0	45	37.8	* *	9 d 0.5 ~ 0.7 cm
	1.5	45	57.8	* * *	6 d 1.0 cm
	2.0	45	57.7	* *	7 d 0.5 ~ 0.8 cm
1.0	0	45	53.3	* *	8 d 0.5 ~ 0.8 cm
	0.5	45	80	* * *	5 d 1.0 ~ 2 cm
	1.0	45	93.3	* * *	5 d 1.0 ~ 2.0 cm
	1.5	45	97.7	* * * *	5 d 2.0 cm
	2.0	45	88.9	* * *	5 d 1.0 ~ 2.0 cm
1.5	0	45	42.2	* *	6 d 1.0 cm
	0.5	45	73.3	* * *	5 d 1.0 ~ 2.0 cm
	1.0	45	24.4	*	8 d 较小
	1.5	45	57.7	* *	12 d 很小
	2.0	45	0	/	无
2.0	0	45	51.1	* *	9 d 0.5 ~ 0.9 cm
	0.5	45	31.1	*	14 d 很小
	1.0	45	0	/	无
	1.5	45	24.4	*	16 d 特小
	2.0	45	33.3	*	14 d 特小

3 讨 论

植物激素的种类和浓度对愈伤组织的诱导起至关重要的作用^[7-9]。不同种类的激素在诱导产生愈伤组织过程中的作用各不相同,如生长素在促进植物的生长、细胞的分裂和扩大,诱导产生不定根方面作用明显。植物细胞分裂素,在促进细胞分裂、促进非分化组织分化、促进生物体内物质的积累、侧芽的发生等生理作用方面作用明显。生长素主要促进植物细胞核的分裂(如 DNA 的合成等),而细胞分裂素主要促进细胞质的分裂,二者结合使用,对诱导愈伤组织的形成、促进生根与芽增殖等方面起着增效作用。

本研究主要在本实验室前期南非叶组培实验的基础上进行,目的在于得出不同的外植体在不同激素不同浓度配比条件下诱导产生愈伤组织的能力,从而筛选出最优外植体的最优激素浓度配比。本实验以南非叶的嫩茎为外植体,通过不同激素(NAA、6-BA、2,4-D)不同浓度配比,诱导产生愈伤组织。由结果可知,在 6-BA 和 NAA 的组合中, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的配比诱导效果最好,愈伤诱导率高达 97.8%;在 2,4-D 和 NAA 的组合中, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的配比,愈伤组织诱导率最高,达 97.7%。在进行组培时,如果只加 NAA 一种激素,则不能诱导产生新的愈伤组织。本实验室前期以南非叶的叶为外植体,愈伤组织诱导率最高只有 95% ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA),如果只以诱导率的高低来比较,茎的诱导效果比叶好。植物体内的生长调节物质如生长素、赤霉素、细胞分裂素、乙烯等物质,在植物体内各自发挥着作用,各物质之间相互制约、相互促进、相互影响。不同激素不同浓度的 25 个组合中,诱导率高低不同。其主要原因有:1) 同一植物不同器官,同一器官不同生理状态,对外界诱导反应能力及分化再生能力是不同的;2) 不同外植体对激素刺激信号的反应和敏感程度不同,主要取决于外植体本身的内源激素水平,因外源激素最终是通过影响内源激素水平的调整变化而起作用的^[10-12];3) 各生长素间存在相互影响相互制约的关系。

参考文献:

- [1] 杨早. 南非叶化学成分及药理作用研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2013(4): 1-2.
- [2] 朱向涛, 王雁叶, 吴倩. 江南牡丹茎段愈伤组织诱导与植株再生[J]. 核农学报, 2015, 29(1): 56-62.
- [3] 刘英, 陈美霞, 郝会军. 半夏组织培养中降低成本的研究[J]. 安徽农业科学, 2009(3): 1-3.
- [4] 李艳敏, 罗晓芳. 牡丹离体培养与快速繁殖研究进展[J]. 西南林学院学报, 2004(1): 1-2.
- [5] 张梅坤. 南非叶扦插繁殖技术试验[J]. 防护林科技, 2015(8): 2-4.
- [6] 唐罗忠, 赵丹, 诸葛强, 等. 麻栎组织培养外植体选择与灭菌方法[J]. 江苏林业科技, 2010(5): 3-6.
- [7] 盛长忠, 毕浩, 胡铁强. 植物生长物质对红景天愈伤组织诱导和培养的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(16): 1237-1240.
- [8] 付伟, 叶嘉, 张浩. 不同因素对中华卷柏愈伤组织诱导的影响[J]. 江苏农业科学, 2014(1): 1-3.
- [9] 周禄斌, 连芳青. 培养条件对仙鹤草愈伤组织诱导、增殖及总黄酮含量的影响[J]. 江西农业大学学报, 2013(1): 2-3.
- [10] 袁宁, 何锐, 何俊蓉. 白芨组培快繁育苗技术研究[J]. 西南农业学报, 2009(3): 1-5.
- [11] 罗明, 谭敦炎, 张玉霞, 等. 高山红景天的组织培养[J]. 新疆农业科学, 1996(3): 1-2.
- [12] Dominique L., Jocelyne T. G., Jean C. C. Direct embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba* L. medicinal woody species [J]. Plant Cell Report, 1993, 12(9): 501-505.

Effects of Different Hormone Combinations on Callus Inducing of Shoot Explant from Bitter Leaf (*Vernonia amygdalina* Del)

HUANG Wei¹, LI Xiuqiong², LIU Jiao², WEI Qing², WU Jinshan²

(1. The Archives, Hainan University, Haikou, Hainan 570228;

2. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Young shoots of the stem of Bitter Leaf (*Vernonia amygdalina* Del) were used as explants and cultured in the 1/2 MS with supplements of combinations of three plant hormones, ie. NAA, 6-BA and 2 4-D, at different concentrations to screen the optimum hormone combinations for tissue culture. An orthogonal experimental design was arranged for the 3 plant hormones at 5 levels of concentration, and 25 optimal treatments were selected with 3 replicates each treatment for the experiment. The 1/2 MS with the combinations of the plant hormones was added with 50 g · L⁻¹ sucrose and 1.0 g · L⁻¹ Hyponex in each petri dish to induce calli from the explants. The results showed that in the combinations of NAA and 6-BA the callus inducing rate was the highest, upto 97.8%, in the medium supplemented with 2 mg · L⁻¹ NAA and 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA, and that in the combinations of NAA and 2 4-D the callus inducing was the highest in the medium supplemented with 1.5 mg · L⁻¹ NAA and 1.0 mg · L⁻¹ 2 4-D. No calli were induced in the medium supplemented only with NAA.

Keywords: *Vernonia amygdalina* Del; stem explants; different hormones; callus; inducing rate

(上接第408页)

Effect of Combined Ozone-Ultraviolet on the Total Colony Count and the Coliform Group in *Crassostrea rivularis*

LIN Qing, MA Qingtao, LI Chunxiao, XU Xiaoneng

(Shantou Ocean and Fisheries Research Institute, Shantou 515041, China)

Abstract: An experiment was carried out to reduce the number of the coliform group and the total colony count in *Crassostrea rivularis* cultured in sea water to ensure food safety. Sea water used for culture of *C. rivularis* was disinfected with ozone at concentrations of 0.4, 0.8 and 1.2 mg · L⁻¹ to select an appropriate ozone concentration for a combined ozone-ultraviolet system used for depuration of the seawater. The seawater was disinfected under the combined ozone-ultraviolet system for 24hrs at different temperatures, seawater exchange rate, and ratio of shellfish to water, and used to rear *C. rivularis* to find out a seawater depuration method for *C. rivularis*. The results indicated that the sea water when depurated for 24 hrs with ozone at a concentration of 0.8 mg · L⁻¹, a temperature at 25 °C, a ratio of shellfish to water at 1:15, salinity at 8 and an water exchange rate at 4 times/h, had a better depuration rate against the coliform group of bacteria in *Crassostrea rivularis*. This indicates that the combined ozone-ultraviolet system is effective to disinfect the coliform group in *Crassostrea rivularis*.

Keywords: *Crassostrea rivularis*; ozone-ultraviolet system; depuration; coliform group; total colony count