

波棱瓜愈伤组织诱导及植株再生研究

幸福梅¹, 臧建成², 兰小中^{3*}, 嘎珍³

1. 西藏农牧学院资源与环境学院, 西藏 林芝 860000

2. 西藏农牧学院植物科学学院, 西藏 林芝 860000

3. 西藏农牧学院食品科学学院, 西藏 林芝 860000

摘要: **目的** 研究波棱瓜愈伤组织诱导、分化及生根的条件, 探讨波棱瓜快速繁殖新途径, 为波棱瓜组织培养与离体植株再生奠定基础。**方法** 以波棱瓜幼嫩茎段和叶片为材料, 比较不同外植体、基本培养基及植物生长调节剂对波棱瓜愈伤组织诱导、分化及生根的影响。**结果** 幼嫩茎段作为外植体时, 其出愈率较叶片高, 愈伤量大; MS 基本培养基能够产生明显的愈伤组织, 出愈率较高; 幼嫩茎段愈伤组织诱导适宜的培养基为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 出愈率达 93.3%。愈伤组织的最佳分化培养基为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 3.0 mg/L, 分化率达 87.2%。生根培养的适宜培养基为 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L, 生根率达 95%。**结论** 波棱瓜幼嫩茎段在适宜的培养基中可通过愈伤组织途径分化不定芽, 且极易生根, 能够得到正常生长发育的再生植株。

关键词: 波棱瓜; 离体培养; 愈伤组织诱导; 分化; 植株再生

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)02-0360-04

Callus induction and plant regeneration in *Herpetospermum pedunculatum*

XIN Fu-mei¹, ZANG Jian-cheng², LAN Xiao-zhong³, GA Zhen³

1. Institute of Resources and Environment, Tibet Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China

2. Institute of Plant Science, Tibet Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China

3. Institute of Food Science, Tibet Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China

Abstract: **Objective** To investigate the conditions influencing the induction, differentiation, and rooting of callus in *Herpetospermum pedunculatum*, establish a new method for rapid propagation, and lay a foundation for plant tissue culture and regeneration. **Methods** With the young stems and leaves of *H. pedunculatum* as materials, effects of different explants, basic medium, and plant growth regulators on callus induction, differentiation, and rooting were compared. **Results** When young stems were used as explants, the induction rate was higher than that of leaves. MS medium could produce obvious callus with high induction rate. The optimum compositions for callus induction, differentiation, and rooting were MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L, MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 3.0 mg/L, and 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L. The callus induction rate, differentiation rate, and rooting rate were 93.3%, 87.2%, and 95%, respectively. **Conclusion** The young stems of *H. pedunculatum* could differentiate the adventitious buds in a suitable medium through callus, and be easy to take root. The regeneration plantlets with normal growth and development could be obtained.

Key words: *Herpetospermum pedunculatum* (Ser.) Baill.; *in vitro* cultivation; callus induction; differentiation; plant regeneration

波棱瓜 *Herpetospermum pedunculatum* (Ser.) Baill. 为葫芦科波棱瓜属一年生攀援状藤本植物, 又名塞季美朵、塞美塞古。主要分布在西藏东南地区海拔 2 600~3 000 m 的山坡林缘及村寨等附近^[1]。作为藏药中一种重要的药用植物, 波棱瓜主要以种子晒干入药。其味苦, 具有清热解毒, 柔肝, 治黄疸性传染性肝炎, 胆囊炎, 消化不良等症的作

用^[2-3]。近年来市场对波棱瓜籽的需求逐渐加大, 生产上需要大量的优良雌株以保证其经济产量, 但受西藏特殊的地理气候条件和波棱瓜自身雌雄异株的限制, 其产量远不能满足市场需求, 因此, 人工种植栽培已势在必行, 成功地进行波棱瓜组织培养与植株再生, 对于其进行大规模种植及转基因十分必要。在葫芦科及其他科物种中已进行的组织培养国

收稿日期: 2011-06-19

基金项目: 西藏自治区科技厅项目 (2010KJGX01-36)

作者简介: 幸福梅 (1981—), 女, 硕士, 讲师, 甘肃武威人, 主要从事有关遗传育种与生物技术的研究所。E-mail: xzxinfumei@163.com

*通讯作者 兰小中 Tel: (0894)5822924 E-mail: lanxiaozhong@163.com

内外均有较多报道^[4-10]。本研究以波棱瓜幼嫩茎段和叶片为材料,对其愈伤组织诱导及植株再生影响因素进行系统研究,初步建立其快繁体系,为波棱瓜人工快繁、遗传转化等奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

波棱瓜采集于西藏农牧学院濒危藏药材示范基地,经西藏农牧学院副教授兰小中鉴定为波棱瓜 *Herpetospermum pedunculatum* (Ser.) Baill., 4 月下旬播种,经萌发、生长至 5 月下旬时取叶片和幼嫩茎段作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得 幼嫩茎段先用清水清洗后,用剪刀剪成约 2 cm 的小段,流水冲洗 1~2 h。无菌条件下,先用 75%乙醇消毒 10 s,再用 0.1%氯化汞消毒 10 min,用无菌水冲洗 4~5 次后接种。

幼嫩叶片用毛刷蘸取洗洁精清洗干净后,流水冲洗 1~2 h,无菌条件下,先用 75%乙醇消毒 8 s,再用 0.1%氯化汞消毒 8 min,无菌水冲洗 4~5 次后剪成约 1 cm² 小块后接种。

1.2.2 基本培养基筛选 将消毒过的外植体,分别接种于 MS、1/2 MS、B₅ 和 WPM 基本培养基上,附加 2.0 mg/L 6-BA、0.5 mg/L NAA,观察生长情况,确定其最佳基本培养基。

1.2.3 愈伤组织的诱导 在选定的基本培养基上分别添加不同质量浓度 6-BA (0、1.0、2.0、4.0 mg/L) 和 NAA (0、0.5、1.0 mg/L),25 d 后统计各处理出愈率,40 d 后观察生长状况及产生愈伤量(愈伤量=产生愈伤组织的个数/接种总个数)。

1.2.4 丛生芽的诱导 在愈伤组织诱导培养基的基础上调节 6-BA 和 NAA 质量浓度,另配合增加 KT (1.0、2.0、3.0 mg/L),采用 3 因素 3 水平试验设计。25 d 后统计产生丛生芽数,筛选丛生芽诱导最佳激素组合,计算增殖系数(增殖系数=增殖周期结束时的芽苗数/增殖周期起始时的芽苗数)。

1.2.5 生根培养 挑选由茎段愈伤组织分化出的长势好且生长均一的丛生芽,切成单芽,接入添加不同浓度 NAA (0、1.0、2.0 mg/L) 的 MS、1/2 MS 培养基中诱导生根。培养 30 d 后观察根生长情况,统计生根率(生根率=生根苗数/培养总苗数)。

1.2.6 培养条件 以上培养基均附加 4.5 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖, pH 值 5.8。温度为 (25±2) °C,光照 12 h/d,除愈伤组织诱导在 1 200 lx 下培养外;丛生

芽诱导及生根均在 2 000 lx 下进行培养。

1.2.7 统计分析 数据采用 DPS 软件进行统计处理。

2 结果与分析

2.1 不同外植体类型对愈伤组织诱导的影响

将波棱瓜幼嫩茎段和叶片均接种于添加 2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的 MS 培养基上。接种 1 周左右幼嫩茎段上即有愈伤组织开始产生,呈浅黄绿色或淡黄色。疏松且生长旺盛,25 d 时愈伤量基本达到最大(图 1);以幼嫩叶片为外植体时,叶片膨大极明显,后期发生严重卷曲、失绿,部分叶片直接生根,只有个别外植体表面有极少量愈伤组织产生(图 2)。茎段诱导时出愈率、愈伤量明显高于叶片,且污染率较低。具体见表 1。

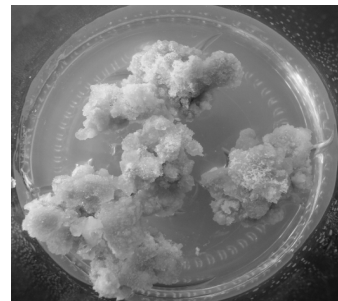


图 1 幼嫩茎段诱导的愈伤组织

Fig. 1 Callus induced from young stems



图 2 叶片诱导的愈伤组织

Fig. 2 Callus induced from leaves

2.2 基本培养基对愈伤组织诱导的影响

从表 1 可以看出,MS 培养基对波棱瓜幼嫩茎段愈伤组织的诱导效果最好,诱导率达到 93.3%,1/2 MS 次之,B₅ 和 WPM 较差。波棱瓜幼嫩茎段在 MS 培养基上生长良好,有大量浅黄绿色或淡黄色愈伤组织产生;1/2 MS 培养基培养时波棱瓜幼嫩茎段的出愈率为 66.7%,外植体生长一般,产生的愈伤量明显减少;而在 B₅ 和 WPM 培养基上外植体逐渐失绿,出愈率仅为 25.6%和 6.7%,产生的愈伤量极少。

2.3 激素对比对愈伤组织诱导的影响

从表 2 可以看出,在不添加任何激素的 MS 培

表 1 基本培养基与外植体类型对波棱瓜愈伤组织诱导的影响 ($n=3$)Table 1 Influences of basic medium and types of explants on callus of *H. pedunculatum* ($n=3$)

基本培养基	外植体	出愈率 / %	污染率 / %	愈伤量	表 现
MS	叶片	10.0	11.1	+	叶片膨大、卷曲、失绿
	茎段	93.3	2.2	++++	淡黄绿色, 淡黄色, 润泽, 表面光滑
1/2MS	叶片	7.8	15.6	+	叶片膨大、卷曲、失绿
	茎段	66.7	3.3	++	黄色, 细胞紧致, 润泽
B ₅	叶片	7.8	4.4	+	叶片膨大、卷曲、失绿
	茎段	25.6	3.3	+	黄绿色, 质地较硬
WPM	叶片	2.2	8.9	—	叶片膨大、卷曲、失绿, 生根
	茎段	6.7	2.2	+	黄绿色, 质地较硬

愈伤组织大小顺序为++++>+++>++>+, 下同

Sequence of callus size: +++++ > ++++ > ++ > +, same as below

表 2 激素比对波棱瓜幼嫩茎段愈伤组织诱导的影响 ($n=3$)Table 2 Influences of various combinations of 6-BA and NAA on callus of *H. pedunculatum* ($n=3$)

处 理	激素配比 / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		出愈率 / %	愈伤量
	6-BA	NAA		
1	0	0	40 ef	+
2	1	0	48.9 de	+
3	2	0	93.3 a	+
4	4	0	63.3 bcd	++
5	0	0.5	32.2 ef	+
6	1	0.5	56.7 cd	+
7	2	0.5	94.4 a	++++
8	4	0.5	77.8 b	+++
9	0	1.0	31.1 f	+
10	1	1.0	41.1 ef	+
11	2	1.0	68.9 bc	++
12	4	1.0	57.8 cd	++

不同字母间表示差异显著 ($P<0.05$), 下表同Different letters show significant differences ($P<0.05$), same as below

培养基上也能诱导产生愈伤组织, 但出愈率较低, 添加激素可以显著提高幼嫩茎段的出愈率。培养基中只添加 6-BA 时, 不同质量浓度所对应的出愈率差别较大, 当 6-BA 为 2 mg/L 时, 出愈率达到 93.3%。培养基中只添加不同质量浓度的 NAA 时所对应的出愈率几乎无差别。6-BA 与 NAA 配合使用时, 茎段的出愈率较高, 愈伤量也相应增加。其中 6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L 时诱导效果最好。因此确定最佳愈伤组织诱导的培养基为: MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

2.4 激素比对丛生芽诱导的影响

波棱瓜茎段产生的愈伤组织接种于丛生芽诱导培养基上, 一周后愈伤组织表面出现淡绿色的小突起, 15 d 后即可看到明显的丛生芽 (图 3)。各个处理下愈伤组织的分化率差异较大, 其中在 6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L+KT 1.0 mg/L 组合中分化率



图 3 愈伤组织分化产生的丛生芽

Fig. 3 Multiple shoots from callus differentiation

最高达 87%, 与其他处理间差异显著 ($P<0.05$)。从产生丛生芽的数量及质量来看 6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 3.0 mg/L 组合中丛生芽数量较多, 平均 4.1 个, 且芽较粗壮。结合丛生芽的分化率, 最优丛生芽诱导组合为 6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 3.0 mg/L, 见表 3。

表 3 激素对比对波棱瓜愈伤组织分化的影响 ($n=3$)Table 3 Influence of various combinations of 6-BA, NAA, and KT on callus differentiation of *H. pedunculatum* ($n=3$)

处理	激素配比 / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			分化率 / %
	6-BA	NAA	KT	
1	0.5	0.1	1.0	37.8 ef
2	1.0	0.1	2.0	49.3 de
3	2.0	0.1	3.0	75.3 b
4	0.5	0.2	2.0	49.5 de
5	1.0	0.2	3.0	49.5 de
6	2.0	0.2	1.0	87.2 a
7	0.5	0.5	3.0	56.3 cd
8	1.0	0.5	1.0	56.3 cd
9	2.0	0.5	2.0	27.8 f

2.5 试管苗的生根试验

将诱导产生的丛生芽切成单芽后接入不同的生根培养基进行生根培养, 15 d 后开始生根, 40 d 后大多数根生长趋于稳定 (图 4)。各个处理下生根率、生根数及平均根长见表 4。从表中可以看出, 在不同处理下波棱瓜的生根都是极其容易的, 生根率均高于 85%, 生根数为 1.3~3.6 条, 根长为 0.8~4.8 cm。其中 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L 时生根效果最佳。



图 4 再生植株

Fig. 4 Regeneration plant

表 4 不同培养基对试管苗生根的影响

Table 4 Influence of different media on rooting of plantlets

培养基	NAA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	生根率 / %	生根数 / 条	根长 / cm
1/2 MS	0.0	92.3	3.1	4.3
	1.0	95.1	3.6	4.8
	2.0	90.2	3.1	4.0
MS	0.0	87.6	2.4	1.1
	1.0	89.4	2.9	1.3
	2.0	87.8	1.3	0.8

3 讨论

波棱瓜幼嫩茎段在 MS 基本培养基上愈伤组织诱导率最高, 这与他人的研究结果一致^[11]。这可能是因为 MS 基本培养基所含无机盐量高, 微量元素

种类齐全^[12], 能够保证培养物的生存和最低生理活动需要。本实验以叶片与幼嫩茎段为两种外植体, 从实验结果来看幼嫩茎段作为外植体时其出愈率与愈伤量远远大于叶片。

激素是影响愈伤组织和丛生芽诱导的重要因素之一。培养基中不同激素的种类与对比对波棱瓜愈伤组织和丛生芽的诱导影响显著。在波棱瓜生根培养过程中, 不同处理下波棱瓜的生根均极其容易。

波棱瓜幼嫩茎段在适宜的培养基条件下可经过愈伤组织阶段分化出不定芽, 且极易生根, 进而得到生长健壮、根系相对发达的再生植株进行扩大繁殖。但作为雌雄异株的植物, 雌雄株在生长过程中是否发生转化, 如何有效提高雌株比例还有待于进一步研究。而这些问题的逐步深入和解决都将进一步完善波棱瓜组织培养快繁体系, 为波棱瓜的快速繁殖和人工规模化种植提供了有力的理论依据。

参考文献

- [1] 李隆云, 德吉拉姆, 卫莹芳, 等. 藏药波棱瓜子的文献查考 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 893-895.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [3] 青海省药品检验所, 青海省藏医药研究所. 中国藏药 (第 2 卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [4] Mohiuddin A K M, Chowdhury M K U. Influence of silver nitrate on cucumber *in vitro* shoot regeneration [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, 51: 75-78.
- [5] Plader W, Malepszy S, Burza W, et al. The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Euphytica*, 1998, 103: 9-15.
- [6] 唐琳, 苟小平, 陈放, 等. 用离体培养无性繁殖苦瓜 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 1999, 36(1): 144-147.
- [7] Adelberg J, Rhodes B B, Skorupaka H. Generating tetraploid melons from tissue culture [J]. *Hort Sci*, 1990, 25(9): 1073-1075.
- [8] 张忠池, 耿明建, 杨特武, 等. 林荫银莲花组织培养研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1168-1172.
- [9] 王慧中, 周晓云, 赵培洁. 西瓜基因转化及其转基因再生的研究 [J]. 实验生物学报, 1997, 30(4): 453-456.
- [10] 栗孟飞, 李唯. 桃儿七组织培养体系的建立及鬼臼毒素的检测 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1366-1370.
- [11] 王宏霞, 陈垣, 郭凤霞, 等. 波棱瓜叶片愈伤组织诱导研究初报 [J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 8(4): 74-76.
- [12] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1992.