

箭叶秋葵愈伤组织诱导及增殖培养的激素组合筛选

胡能兵, 何克勤

(安徽科技学院植物科学学院, 安徽 凤阳 233100)

Selection of hormone combination for induction and proliferation cultures of callus from *Abelmoschus sagittifolius*

HU Neng-bing, HE Ke-qin (College of Plant Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(1): 118-120

Abstract: Taking cotyledon and hypocotyl of *Abelmoschus sagittifolius* (Kurz.) Merr. as explants, the optimal hormone combinations for induction and proliferation cultures of their calli were selected. The results show that the growth status of callus is better with an induction rate of 100.0% on MS medium (containing $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar and $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sugar, pH 6.0) with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT, so this hormone combination is suitable for callus induction. And cotyledon is better than hypocotyl as explant for callus induction of the species. The effect of callus proliferation is the best with an average increment of 9.74 g per culture bottle on MS medium with $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, so this hormone combination is optimal for callus proliferation culture of *A. sagittifolius* cotyledon.

关键词: 箭叶秋葵; 愈伤组织; 诱导; 增殖; 激素组合

Key words: *Abelmoschus sagittifolius* (Kurz.) Merr.; callus; induction; proliferation; hormone combination

中图分类号: Q943.1; S567.23⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)01-0118-03

箭叶秋葵 [*Abelmoschus sagittifolius* (Kurz.) Merr.] 又名红花马宁、铜皮、五指山参、小红芙蓉、岩酸, 系锦葵科 (Malvaceae) 秋葵属 (*Abelmoschus* Medic.) 多年生亚灌木状草本; 其根既可食用又可入药, 具有滋养强壮之功效, 可用于治疗神经衰弱、头晕、腰腿痛、胃痛及腹泻等^[1]。

目前, 利用愈伤组织悬浮培养生产药用植物次生代谢物的研究较多, 如: 通过人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey.)、西洋参 (*P. quinquefolium* L.)、银杏 (*Ginkgo biloba* L.)、环草石斛 (*Dendrobium loddigesii* Rolfe)、喜树 (*Camptotheca acuminata* Decne.)、高山红景天 (*Rhodiola sachalinensis* Boriss.) 和虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) 等的愈伤组织分别提取皂苷、黄酮、总生物碱、喜树碱、红景天甙、白藜芦醇等活性成分^[2-8]。然而, 目前国内关于秋葵属植物愈伤组织培养的研究较少, 仅见黄秋葵即黄蜀葵 [*Abelmoschus manihot* (L.) Medic.] 再生体系的研究报道^[9-10]。

作者对箭叶秋葵子叶和下胚轴愈伤组织诱导及增殖培养过程中的激素组合进行了筛选, 以其为该种愈伤组织快速培养体系的建立奠定前期实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

箭叶秋葵种子于2008年10月采自安徽省芜湖市南陵县绿岭镇农田, 置于干燥器中保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 种子前处理及萌发 于2009年6月进行种子萌发。种子用自来水冲洗干净后, 用洗衣粉水刷洗片刻, 再用自来水冲洗8~10 min, 在超净工作台上用体积分数75%乙醇消毒1 min, 再用质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HgCl₂溶液消毒13 min, 无菌水洗4~5次; 将种子接种到仅含质量浓度 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基中, 置于(25±2) °C的黑暗条件下进行种子萌发培养, 待子叶露出后接种。

1.2.2 愈伤组织诱导培养基中激素组合的筛选 设6个激素组合: $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 及 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT。将子叶沿主脉剪开, 下胚轴剪成2段, 分别接种到含有不同激素组合的愈伤组织诱导培养基 (MS基本培养基, 添加 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 6.0) 上。子叶片和下胚轴段分瓶接种, 子叶片正接 (上表皮朝上)、下胚轴横接 (水平放置), 每瓶接种4个子叶片或2个下胚轴段, 每处理各接种6瓶, 各处理均接种24个子叶片和12个下胚轴段。在温度(25±2) °C、光照度2000 lx、光照时间12 h·d⁻¹的条件下培养, 25 d后统计愈伤组织诱导率并描述其生长状况。

1.2.3 愈伤组织增殖培养基中激素组合的筛选 共设置8个激素组合: $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 及 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。采用筛选出的最佳愈伤组织诱导培养基并以子叶为外植体诱导出大量愈伤组织,将愈伤组织分成 8 份,分别接种到含有不同激素组合的愈伤组织增殖培养基(MS 基本培养基,添加 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖,pH 6.0)上。每瓶接种 4 块愈伤组织,每处理 6 瓶。在温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、光照度 2000 lx 、光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的条件下培养,15 d 后统计愈伤组织生长量。

1.3 愈伤组织平均生长量的计算

为了准确计算增殖过程中愈伤组织的平均生长量,在增殖培养瓶中先放入大小适合的无菌滤纸 1 片,称量,记为 G_a ; 接种愈伤组织后,称量,记为 G_b ; G_b 与 G_a 的差值为接种质量(G_c)。培养结束后,将滤纸上的愈伤组织取出称量,记为 G_d ; G_d 与 G_c 的差值即为愈伤组织的生长量。根据每处理各瓶愈伤

组织的生长量总和及瓶数计算愈伤组织的平均生长量。

2 结果和分析

2.1 不同激素组合对箭叶秋葵愈伤组织诱导的影响

分别用箭叶秋葵的子叶和下胚轴为外植体进行愈伤组织诱导,诱导培养基中不同激素组合对愈伤组织诱导率和生长的影响见表 1。由表 1 可见:接种 25 d 后,在 6 种含不同激素组合的诱导培养基中箭叶秋葵子叶和下胚轴的愈伤组织诱导率几乎都超过 90%,且诱导率随 2,4-D 质量浓度的提高而增加,但在不同培养基上愈伤组织的颜色及生长状况差别较大。诱导自子叶的愈伤组织多呈淡黄色,且黑色物质较少,生长状况明显优于诱导自下胚轴的愈伤组织;后者多显乳白色,且黑色物质较多,不适宜用于下一步的研究。综合比较结果表明:含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 的诱导培养基适宜于箭叶秋葵子叶愈伤组织的诱导,诱导率可达 100.0%,且愈伤组织生长状况良好。

表 1 不同激素组合对箭叶秋葵子叶和下胚轴愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different hormone combinations on callus induction from cotyledon and hypocotyl of *Abelmoschus sagittifolius* (Kurz.) Merr.

激素质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration of hormone		由子叶诱导的愈伤组织 Callus induced from cotyledon		由下胚轴诱导的愈伤组织 Callus induced from hypocotyl	
2,4-D	KT	诱导率/% Induction rate	生长状况 ¹⁾ Growth status ¹⁾	诱导率/% Induction rate	生长状况 ¹⁾ Growth status ¹⁾
0.5	0.0	91.7	+	83.3	+
1.0	0.0	100.0	+	91.7	--
2.0	0.0	100.0	--	100.0	--
0.5	0.1	95.8	+	91.7	+
1.0	0.1	100.0	++	100.0	--
2.0	0.1	100.0	-	100.0	--

¹⁾ ++: 愈伤组织呈淡黄色或乳白色,生长旺盛 Callus grows well with color of light yellow or milky white; +: 愈伤组织呈淡黄色或乳白色,少量愈伤组织变黑 Callus with color of light yellow or milky white, and little callus blackening; -: 大量愈伤组织变黑 Much callus blackening; --: 全部愈伤组织变黑 All callus blackening.

2.2 不同激素组合对箭叶秋葵愈伤组织增殖的影响

在含不同激素组合的增殖培养基上箭叶秋葵愈伤组织的平均生长量见表 2。由表 2 可以看出:在增殖培养基中添加不同种类及质量浓度的激素组合,箭叶秋葵愈伤组织的平均生长量有明显差异;在含 6-BA 与 NAA 的培养基中愈伤组织的每瓶平均生长量都超过 7 g,而在含 KT 与 NAA 的培养基中愈伤组织的每瓶平均生长量都低于 5.5 g。培养 15 d 后,在含有 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的增殖培养基中愈伤组织的每瓶平均生长量最大,达到 9.74 g。

3 结 论

在组织培养过程中,大多数植物的愈伤组织诱导过程都需要添加外源激素 2,4-D,添加的质量浓度范围为 $0.001 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,但由于遗传背景及代谢途径不同,有些植物(如薄荷

表 2 不同激素组合对箭叶秋葵愈伤组织增殖的影响

Table 2 Effect of different hormone combinations on callus proliferation of *Abelmoschus sagittifolius* (Kurz.) Merr.

激素质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration of hormone			生长量/ g^1 Increment ¹⁾
6-BA	KT	NAA	
1	0	0.5	7.90
2	0	0.5	7.17
0	1	0.5	3.09
0	2	0.5	3.85
1	0	1.0	7.51
2	0	1.0	9.74
0	1	1.0	5.50
0	2	1.0	2.80

¹⁾ 每瓶愈伤组织的平均生长量 Average increment of callus per culture bottle.

(*Mentha haplocalyx* Briq.) 的愈伤组织诱导过程中并不需要添加 2,4-D^[11]。本研究结果表明:在仅添加 2,4-D 的培养基中,箭叶秋葵愈伤组织的诱导率及生长状况较差,而其愈伤组织诱导的最佳激素组合是 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT,与多数植物愈伤组织诱导条件相似。另外,不同外植体的诱导效果也有明显差异,以子叶为外植体进行愈伤组织诱导,效果较好。

研究结果表明:箭叶秋葵愈伤组织在含 6-BA 和 NAA 的增殖培养基中的平均生长量明显高于含 KT 和 NAA 的培养基。在添加 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的增殖培养基中每瓶愈伤组织的平均生长量最大,故可将其作为箭叶秋葵子叶愈伤组织增殖培养的最佳培养基。

参考文献:

- [1] 胡能兵,张子学,隋益虎,等. 外源生长素对箭叶秋葵种子萌发及幼苗抗氧化酶系统的影响[J]. 激光生物学报, 2009, 18(3): 315-319.
- [2] 南桂仙,许明子,李美善,等. 不同培养条件对高山红景天愈伤组织红景天甙含量的影响[J]. 延边大学农学学报, 2006, 28(1): 1-3.

- [3] 周福泉. 激素对西洋参愈伤组织人参皂甙形成的影响[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(11): 656-658.
- [4] 张 磊,杨世海. 外源 NO 对人参愈伤组织次生代谢产物的影响[J]. 人参研究, 2010, 22(1): 5-9.
- [5] 卢文芸,张宇斌,罗迎春,等. 环草石斛愈伤组织和拟原球茎中生物碱和多糖含量的研究[J]. 种子, 2010, 29(3): 33-35.
- [6] 张冬艳,赵心清,于 放,等. 喜树愈伤组织诱导及喜树碱的产生[J]. 东北师大学报:自然科学版, 2002, 34(1): 45-48.
- [7] 王丹丹,李兴林,崔兴华,等. 虎杖愈伤组织的诱导及白藜芦醇含量的变化[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(2): 9-12.
- [8] 杜丽霞,崔 鹏,曾月川,等. 蔗糖及天然有机物对银杏愈伤组织合成黄酮的影响[J]. 武汉生物工程学院学报, 2010, 6(1): 12-15.
- [9] 吴丹丹. 黄秋葵组织培养及胚性细胞悬浮体系的建立[D]. 福州:福建农林大学园艺学院, 2008.
- [10] 朱华云,谈献和,李 建,等. 黄蜀葵组织培养的初步研究[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(4): 27-28.
- [11] 于 吁,李维林,梁呈元,等. 两个薄荷品种叶片愈伤组织的诱导及增殖[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(2): 84-88.

(责任编辑:佟金凤)

《植物资源与环境学报》2011 年审稿专家名单

《植物资源与环境学报》2011 年审稿专家名单如下(按姓氏的汉语拼音排序):

常 江 陈炳华 陈崇顺 陈金林 陈树元 陈双林 陈学林 崔大方 邓懋彬 丁炳扬 董仕勇 董云发 方升佐
高聪芬 高捍东 高志红 葛学军 郭海林 郝日明 何开跃 胡春梅 胡 虹 胡耀辉 黄苏珍 江海东 蒋文伟
李会军 李火根 李建宏 李泰辉 李维林 李先琨 李 亚 梁呈元 林金国 刘红霞 刘金福 刘启新 龙春林
陆 巍 马金双 纳 智 濮社班 乔玉山 权俊萍 宋小玲 苏家乐 孙 视 童再康 王发国 王金信 王康才
王年鹤 王效科 吴彩娥 吴承祯 吴慧平 吴 俊 吴文珊 肖伟烈 谢寅峰 邢福武 徐 进 徐增莱 许晓明
薛超彬 杨德奎 杨志玲 姚 淦 殷云龙 余东升 虞木奎 俞元春 张保龙 张冬梅 张涵庆 张乐华 张水明
章 镇 赵政阳 郑青松 郑玉红 宗良纲

本刊对各位审稿专家的支持表示诚挚的感谢!