

外植体类型和培养基中激素浓度对香茶菜愈伤组织诱导的影响

刘芳¹, 陶兴魁², 张爱民³, 滕井通³, 丁盼盼³, 薛建平^{3,①}

(1. 宿州职业技术学院, 安徽 宿州 234101; 2. 宿州学院生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000;

3. 淮北师范大学生命科学院, 安徽 淮北 235000)

Effects of explant type and hormone concentration in medium on callus induction of *Isodon amethystoides* LIU Fang¹, TAO Xingkui², ZHANG Aimin³, TENG Jingtong³, DING Panpan³, XUE Jianping^{3,①} (1. Suzhou Vocational and Technical College, Suzhou 234101, China; 2. School of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China; 3. College of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2017, 26(1): 113-115

Abstract: Effects of explant type (leaf and stem segment) and hormone concentration (0.1, 0.2 and 0.3 mg · L⁻¹ 6-BA; 1.0, 1.5 and 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D) in medium on callus induction of *Isodon amethystoides* (Benth.) H. Hara were studied by using single-factor and L₉(3²) orthogonal experiments. The results show that compared with callus induction from leaves, calli can be induced from stem segments within a short time, which are loose and large in quantity. The results of orthogonal experiment show that the callus induction rate of stem segments of *I. amethystoides* varies from 72% to 93% in different media, in which, mass concentration of 2,4-D has a significant ($P < 0.05$) effect on callus induction rate, while that of 6-BA has no significant effect. According to the results, MS medium (containing 30 g · L⁻¹ sucrose and 7 g · L⁻¹ agar, pH 5.8) with 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA and 1.5 mg · L⁻¹ 2,4-D is considered as an optimum medium for callus induction from stem segments of *I. amethystoides*.

关键词: 香茶菜; 外植体类型; 激素浓度; 正交实验

Key words: *Isodon amethystoides* (Benth.) H. Hara; explant type; hormone concentration; orthogonal experiment

中图分类号: Q813.1⁺2; Q945 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2017)01-0113-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2017.01.17

香茶菜 [*Isodon amethystoides* (Benth.) H. Hara] 为唇形科 (Lamiaceae) 香茶菜属 [*Isodon* (Schrader ex Benth.) Spach] 植物^[1], 又名“王枣子”^[2], 广泛分布于江苏、安徽、浙江、河南、湖北和广西等省(自治区), 为安徽宿州著名的传统药食两用植物, 以茎叶入药, 其主要活性成分为萜类化合物, 具有一定的抑菌、杀菌和抗肿瘤作用, 且无副作用^[3-6]。自 20 世纪 80 年代以来, 人们逐渐意识到香茶菜的经济价值并推广应用, 但大规模的无序挖掘导致其野生资源数量急剧下降, 目前仅在偏僻山区有零星分布。

为满足香茶菜的市场需求, 保护香茶菜的野生资源, 应扩大香茶菜的人工栽培规模并提升其产量和质量。为此, 作者研究了外植体类型和培养基中不同激素浓度对香茶菜愈伤组织诱导的影响, 以期筛选出适宜于香茶菜愈伤组织诱导的培养条件, 为该种类的组织培养以及人工繁殖技术的研究奠定基础, 并为利用植物细胞培养技术对其有效成分进行工业化生产提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

供试香茶菜种子于 2014 年 10 月采自宿州市夹沟。定株采种后挑选饱满的种子, 用 1 mg · L⁻¹ GA₃ 浸泡 12 h, 然后将种子用流水冲洗 2~3 h; 用体积分数 75% 乙醇消毒 5~10 s, 无菌水冲洗 2~3 次; 然后用质量体积分数 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 5 min, 无菌水冲洗 2~3 次; 最后吸干种子表面水分接入 MS 培养基中, 置于温度 (25±1) °C、光照度 2 000~3 000 lx、光照时间 10 h · d⁻¹ 条件下进行培养, 培养约 15 d 得到供试的无菌苗。

1.2 方法

1.2.1 外植体类型的比较实验 在超净工作台上将供试香茶菜无菌苗的茎和叶分别剪成 0.5~0.8 cm 小段, 参照同属植物总序香茶菜 [*Isodon racemosa* (Hemsl.) Hara] 的组织培养条

收稿日期: 2016-12-09

基金项目: 安徽省高校省级优秀青年人才基金重点项目(2013SQRL151ZD); 淮北市人才培育计划(20140315); 宿州学院特色种植业苗种生产工程技术研究中心开放课题(2014XKF19); 安徽省高校自然科学研究项目(KJ2014B21)

作者简介: 刘芳(1982—), 女, 安徽濉溪人, 博士, 副教授, 主要从事生物技术及园林植物应用方面的研究。

①通信作者 E-mail: xuejp@163.com

件^[7],将无菌苗叶片和茎段分别接入添加了 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D的MS培养基(含 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂,pH 5.8)中,叶片和茎段分别接种4瓶,每瓶接入4~6个外植体;置于温度 $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 、光照度 $2\ 000 \sim 3\ 000 \text{ lx}$ 、光照时间 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 条件下培养。观察培养过程中外植体的变化并拍照记录,筛选出愈伤组织诱导效果较优的外植体类型。

1.2.2 培养基中激素浓度的正交实验设计 采用 $L_9(3^2)$ 正交实验设计2因素(6-BA和2,4-D质量浓度)3水平正交实验,其中,6-BA质量浓度设置为 0.1 、 0.2 和 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,2,4-D质量浓度设置为 1.0 、 1.5 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,将不同质量浓度6-BA和2,4-D分别添加至上述MS培养基中,共9组培养基。

根据上述外植体筛选的结果,选择香茶菜无菌苗茎段作为外植体,在超净工作台上分别将供试无菌苗茎段接种至上述9组培养基中,每组培养基接种4瓶,每瓶接入4~6个无菌苗茎段;置于温度 $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 、光照度 $2\ 000 \sim 3\ 000 \text{ lx}$ 、光照时间 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 条件下培养,定期观察并记录外植体的愈伤组织

诱导状况,共培养30 d。根据愈伤组织的统计结果计算愈伤组织诱导率。

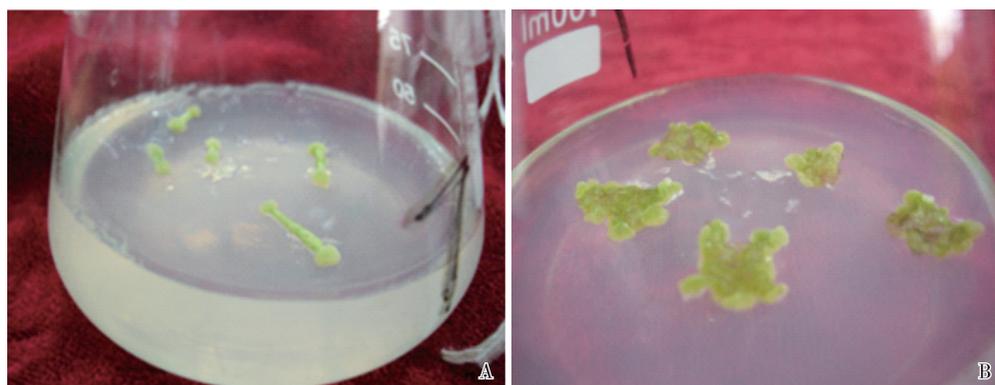
1.3 数据计算和分析

按照公式“愈伤组织诱导率=(诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数) $\times 100\%$ ”计算各组培养基中愈伤组织的诱导率,采用SPSS 17.0统计分析软件进行极差分析和方差分析。

2 结果和分析

2.1 外植体类型对香茶菜愈伤组织诱导的影响

香茶菜叶片和茎段愈伤组织的诱导状况见图1。观察结果表明,培养约9 d,部分茎段的两端切口处开始膨大,并诱导出淡黄色愈伤组织(图1-A);培养约16 d,个别叶片边缘微卷,伤口处有少量愈伤出现(图1-B),叶片表面出现淡黄色的透明颗粒。从诱导所需时间和愈伤组织生长状况看,茎段的愈伤组织诱导效果优于叶片。



A: 培养9 d茎段愈伤组织的诱导状况 Status of callus induction from stem segments cultured for 9 d; B: 培养16 d叶片愈伤组织的诱导状况 Status of callus induction from leaves cultured for 16 d.

图1 香茶菜茎段和叶片愈伤组织诱导状况的比较

Fig. 1 Comparison on status of callus induction from stem segments and leaves of *Isodon amethystoides* (Benth.) H. Hara

2.2 激素浓度对香茶菜愈伤组织诱导的影响

不同激素浓度对香茶菜茎段愈伤组织诱导影响的正交实验结果见表1。

由表1可见:在添加不同质量浓度6-BA和2,4-D的9组培养基中,香茶菜茎段均能诱导出愈伤组织。其中,在6号培养基(添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D)中愈伤组织诱导率最低,为72%;在8号培养基(添加 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D)中愈伤组织诱导率最高,为93%;在5号培养基(添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D)中愈伤组织诱导率次之,为92%。从茎段形态看,培养约10 d部分茎段的两端切口处开始膨大并呈不对称的哑铃型,淡黄色;培养20 d后茎段两端均不同程度膨大;培养30 d

后绝大部分茎段均已长出愈伤组织。

极差分析结果表明:因子B(2,4-D质量浓度)的极差较大,因子A(6-BA质量浓度)的极差较小,表明2,4-D质量浓度对香茶菜茎段愈伤组织诱导的影响效应相对较大,而6-BA质量浓度对茎段愈伤组织诱导的影响效应相对较小。方差分析结果表明:因子B(2,4-D质量浓度)对茎段的愈伤组织诱导有显著作用($P < 0.05$),而因子A(6-BA质量浓度)对茎段的愈伤组织诱导无显著作用($P = 0.567$),与极差分析结果一致。

由极差分析结果可知:适合香茶菜茎段愈伤组织诱导的最优激素组合为 A_1B_2 ,即 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D。

表1 培养基中激素浓度对香茶菜茎段愈伤组织诱导影响的正交实验结果¹⁾

Table 1 Orthogonal experiment result for effect of hormone concentration in culture medium on callus induction from stem segments of *Isodon amethystoides* (Benth.) H. Hara¹⁾

培养基序号 No. of medium	因子和水平 Factor and level		愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus
	A	B	
1	0.1	1.0	84
2	0.1	1.5	87
3	0.1	2.0	83
4	0.2	1.0	80
5	0.2	1.5	92
6	0.2	2.0	72
7	0.3	1.0	83
8	0.3	1.5	93
9	0.3	2.0	78
K_1	84.7	82.3	
K_2	81.3	90.7	
K_3	84.7	77.7	
R	3.4	13.0	

¹⁾ A: 6-BA 质量浓度 Mass concentration of 6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); B: 2,4-D质量浓度 Mass concentration of 2,4-D ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). K_1, K_2, K_3 : 分别表示各因子同一水平的实验结果的平均值 Representing the average of the experiment results of each factor in the same level. R: 极差 Range.

3 结 论

观察结果表明:与叶片相比,以茎段作为外植体,获得的愈伤组织量大且疏松,因此,对于香茶菜的组织培养,茎段是较为合适的外植体。由正交实验结果可见:培养基中2,4-D质量浓度对香茶菜茎段愈伤组织的诱导影响效应相对较大,可见在香茶菜茎段组织培养过程中2,4-D质量浓度对其愈伤

组织诱导起关键作用,这与张献龙等^[8]的研究结果一致。根据上述实验结果,获得香茶菜茎段愈伤组织诱导培养的最佳培养基为添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D的MS培养基(含 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂,pH 5.8)。

本研究初步筛选出香茶菜茎段愈伤组织诱导的最适培养基,但其他植物生长调节剂对其愈伤组织诱导的影响及不同形态愈伤组织的诱导条件还有待进一步研究;另外,还需对不定芽诱导和增殖培养条件、试管苗生根培养条件进行筛选,完善香茶菜组织培养技术,以期对香茶菜的规模化种植提供优良种苗。此外,以本实验获得的愈伤组织为材料,摸索愈伤组织悬浮培养条件,可为香茶菜药用活性成分的工厂化生产提供技术支持。

参考文献:

- [1] RAVEN P H, WU Z Y. Flora of China: Vol. 17 [M]. Beijing: Science Press, 1994: 273-274.
- [2] 安徽省宿县地方志编纂委员会. 宿县县志[M]. 黄山: 黄山书社出版, 1988: 76.
- [3] 李广义, 王玉兰, 徐宗沛, 等. 王枣子化学成分的研究[J]. 药学学报, 1981, 16(9): 9-13.
- [4] 王先荣, 王兆全, 石鹏程, 等. 王枣子的新二萜: 王枣子甲素[J]. 安徽医学, 1982(2): 50-53.
- [5] 崔佳, 施务务, 宿玉, 等. 王枣子三萜成分的研究[J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(3): 57-59.
- [6] 张修华. 草药王枣子抗菌作用的临床应用[J]. 煤矿医学, 1982, 4(5): 13-15.
- [7] 丁兰, 吕军旺, 汪汉卿. 总序香茶菜的组织培养与快繁研究[J]. 中草药, 2005, 36(1): 115-117.
- [8] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 65.

(责任编辑: 郭严冬)

《植物资源与环境学报》启事

为了扩大科技期刊的信息交流、充分实现信息资源共享,《植物资源与环境学报》已先后加入“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据——数字化期刊群”和“中文科技期刊数据库”等网络文献资源数据库,凡在本刊发表的论文将编入数据库供上网交流、查阅及检索,作者的著作权使用费与本刊稿酬一次性给付,不再另付。如作者不同意将文章收编入数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《植物资源与环境学报》仅接受网上投稿,投稿网址为 <http://www.cnbg.net/Tg/Contribute/Login.aspx> (拟于2017年4月启用新投稿系统,网址为 <http://zwzy.cnbg.net>)。投稿咨询电话: 025-84347014; E-mail: zwzybjb@163.com; QQ: 2219161478。

《植物资源与环境学报》编辑部

2017-02