

野葛高频植株再生体系相关因子的优化

洪森荣, 尹明华, 邵兴华

(江西上饶师范学院 生命科学系, 江西 上饶 334001)

摘要: 对野葛高频植株再生体系相关因子进行优化, 结果表明, 野葛带芽茎段再生体系的最佳消毒方式为70%酒精处理30s后用0.1% HgCl₂处理15min; 最佳培养基为MS + NAA 0.5mg/L + 6-BA 5.0mg/L; 最佳培养条件为: 蔗糖浓度30g/L, pH 6.0, 液体培养, 培养温度25℃, 光照培养。

关键词: 野葛; 高频植株再生体系; 带芽茎段; 组织培养

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-7791(2008)01-0029-04

Optimization of Factors Related to High Frequency Plant Regeneration of *Pueraria lobata*

HONG Sen-rong, YIN Ming-hua, SHAO Xing-hua

(Life Science Department, Shangrao Normal College, Shangrao 334001, Jiangxi China)

Abstract: The effects of several factors on dedifferentiation and redifferentiation of *Pueraria lobata* earthnut were studied. The results showed that the best disinfection way of *Pueraria lobata* stems with a bud was firstly treated with 70% ethyl alcohol for 30 seconds then treated with 0.1% HgCl₂ for 15 minutes, and the optimum regeneration culture medium was MS+NAA 0.5mg/L + 6-BA 5.0mg/L. Liquid culture with sucrose 30g/L, pH 6.0, cultured in light at 25℃ gave a best result for high frequency plant regeneration of *Pueraria lobata*.

Key words: *Pueraria lobata*; high frequency plant regeneration; stem with a bud; tissue culture

野葛 (*Pueraria lobata*) 系豆科葛属药用植物, 其块根为解暑退热、生津解渴的常用生药。对野葛的资源调查、药用成分、药理及临床应用已有较多研究^[1,2]。目前野葛生药主要依赖挖掘野生资源, 难以满足医药工业的需求, 且严重破坏生态环境。近年来野葛生药市场需求日益增加, 野生资源日趋短缺, 因此, 人工栽培是解决野葛野生资源不足的有效途径。组培苗可作为栽培种苗和变异材料的来源, 也可作为植物细胞培养或遗传转化的基础^[3,4]。本文比较了不同因子对离体野葛带芽茎段再生体系的影响, 旨在为野葛再生体系的优化提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试野葛材料取自江西省上饶市横峰县葛源镇。

1.2 方法

将野葛带芽茎段(0.5~1.5cm)用洗洁精浸泡0.5h, 并用自来水冲洗2.5h。于超净工作台上将其分为三等份。将第一份经70%酒精处理30s(处理I), 第二份先用70%酒精处理30s, 再用10% H₂O₂处理15min(处理II), 第三份先用70%酒精处理30s, 再用0.1% HgCl₂处理15min(处理III)。各处理用无菌水冲洗3次后, 将茎段接种至再生培养基。再生培养基以MS为基本培养基, 附加不同浓度的2种生长调节剂(6-BA和NAA, 或KT和NAA)。KT浓度为0、1.0、2.0mg/L, NAA浓度为0、0.5、1.0mg/L, 6-BA

收稿日期: 2007-06-19

基金项目: 江西省自然(青年)科学基金(0630103)、江西上饶师范学院2008-2009年度院级科技项目资助

作者简介: 洪森荣(1974), 男, 江西永新人, 讲师, 硕士, 从事植物生物技术研究。

浓度为0、3.0、5.0mg/L。按照正交表L9(3⁴)设计试验(表1)。所用培养基中蔗糖含量均为30g/L, 冷凝脂含量均为7.5g/L, pH 5.8~6.0。筛选最佳培养基后进行其它单因子实验, 后续实验所用培养基中蔗糖含量为0、5、10、30、50、100g/L, pH为1.0、3.0、6.0、10.0、12.0。培养条件分光培养(光照12h/d)和暗培养, 琼脂含量为0、1、2.5、5、10g/L, 培养温度为5、10、15、25、35、45℃。以上实验均在60d时统计试管苗的新生芽数、株高、鲜重和叶片数。

表1 培养基中NAA与6-BA、KT3水平正交设计(mg/L)

生长调节剂 I(CK)	2	3	4	5	6	7	8	9	10(CK)	11	12	13	14	15	16	17	18	
NAA	0	0	0	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	0	0	0	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0
6-BA	0	3.0	5.0	0	3.0	5.0	0	3.0	5.0	—	—	—	—	—	—	—	—	
KT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	1.0	2.0	0	1.0	2.0	0	1.0	2.0

1.3 统计方法

以上均为单因子实验, 重复3次, 所有数据表示为 Mean±SD。实验数据用 SPSS11.5 软件 One-Way ANOVA 分析后, 进行 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒方法的筛选

由图1可知, 野葛带芽茎段经单一消毒剂消毒后, 污染率较高; H₂O₂ 的灭菌效果不如 HgCl₂。故野葛带芽茎段再生的最佳消毒方式为70%酒精处理30s后, 再用0.1%HgCl₂处理15min。

2.2 植物生长调节剂对野葛带芽茎段再生的影响

由表2和表3可知, 高浓度的6-BA和KT单独使用都有助于野葛带芽茎段的再生, 但与NAA组合的效果更好, 尤其以6-BA与NAA组合的效果最好。值得注意的是, KT单独使用时, 浓度越高效果越好, 而与NAA组合时, 则KT浓度必须适当降低才有助于带芽茎段的再生; 而6-BA无论单独使用或与NAA组合使用, 所需浓度都较高, 这可能与植物内生生长调节剂含量存在差异有关; 综合表2和表3的实验结果可知, 野葛带芽茎段再生的最佳培养基为MS+NAA 0.5mg/L+6-BA 5.0mg/L。

2.3 光照条件对野葛带芽茎段再生的影响

由图2可知, 以MS+NAA 0.5mg/L+6-BA 5.0mg/L为再生培养基, 光培养有利于野葛带芽茎段的再生。

2.4 蔗糖浓度对野葛带芽茎段再生的影响

由图3可知, 以MS+NAA 0.5mg/L+6-BA 5.0mg/L为再生培养基, 野葛带芽茎段再生的最佳蔗糖浓度为30g/L。

表2 NAA和6-BA对野葛带芽茎段再生的影响(60d)

培养基序号	平均株高(cm)	平均鲜重(g)	平均叶片数(片)	繁殖系数
1(CK)	1.93±0.15	1.187±0.034	1.38±0.27	1.23±0.38
2	5.30±0.10**	5.136±0.025**	5.24±0.27**	2.17±0.35*
3	5.20±0.26**	5.657±0.036**	5.90±0.23**	2.50±0.20*
4	4.20±0.26**	2.657±0.026*	2.90±0.33*	1.70±0.30
5	5.26±0.21**	5.791±0.045**	5.27±0.27**	3.73±0.26*
6	6.40±0.26**	6.881±0.039**	6.44±0.22**	4.37±0.36**
7	3.23±0.49**	2.789±0.033*	2.52±0.21*	1.83±0.48
8	4.53±0.15**	4.133±0.043**	4.19±0.35**	3.50±0.30*
9	4.41±0.37**	4.352±0.031**	4.13±0.32**	2.30±0.20*

注: 同列数值后注*、**分别表示与CK差异达显著、极显著水平, 表3同。

表3 NAA和KT对野葛带芽茎段再生的影响(60d)

培养基序号	平均株高(cm)	平均鲜重(g)	平均叶片数(片)	繁殖系数
10(CK)	1.87±0.23	1.267±0.025	1.26±0.39	1.37±0.45
11	3.56±0.21**	4.565±0.036**	4.23±0.48**	2.34±0.33*
12	4.12±0.39**	3.907±0.044**	3.98±0.35**	2.13±0.24*
13	4.20±0.43**	2.657±0.034*	2.90±0.26*	1.70±0.46
14	6.26±0.54**	5.791±0.016**	6.27±0.44**	3.73±0.51**
15	5.21±0.53**	5.643±0.035**	5.21±0.54**	2.22±0.23*
16	3.23±0.48**	2.789±0.054*	2.52±0.33*	1.83±0.27
17	4.78±0.57**	5.287±0.065**	4.69±0.37**	2.69±0.59*
18	3.38±0.41**	2.784±0.063*	3.43±0.42**	2.34±0.46*

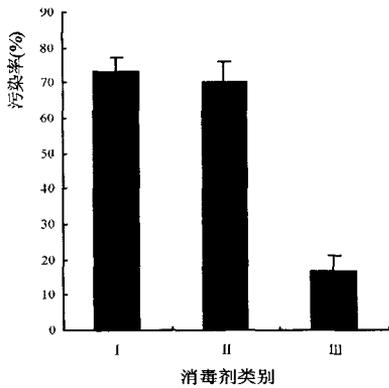


图1 不同消毒剂的污染率比较

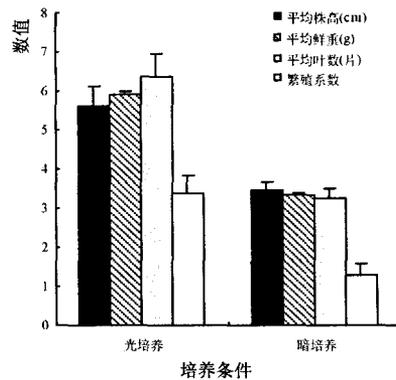


图2 光照对野葛带芽茎段再生的影响

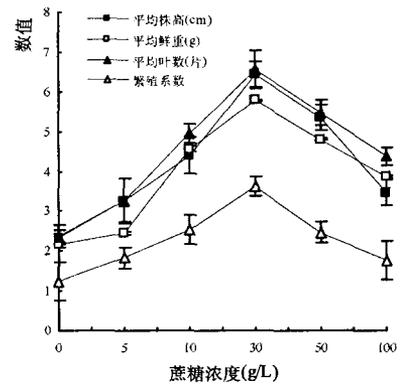


图3 蔗糖浓度对野葛带芽茎段再生的影响

2.5 pH 值对野葛带芽茎段再生的影响

由图 4 可知,以 MS+NAA 0.5mg/L+6-BA 5.0mg/L 为再生培养基,野葛带芽茎段再生的最佳 pH 为 6。

2.6 琼脂浓度对野葛带芽茎段再生的影响

由图 5 可知,以 MS+NAA 0.5mg/L+6-BA 5.0mg/L 为再生培养基,野葛带芽茎段再生的最佳培养方式为液体培养(琼脂浓度为 0g/L),这可能与液体培养有利于茎段切口代谢次生产物的扩散,而不会累积在茎段周围影响带芽茎段的再生有关。

2.7 培养温度对野葛带芽茎段再生的影响

由图 6 可知,以 MS+NAA 0.5mg/L+6-BA 5.0 mg/L 为再生培养基,野葛带芽茎段再生的最佳培养温度为 25℃。

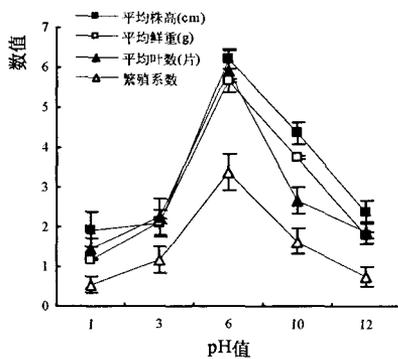


图4 不同pH对野葛带芽茎段再生的影响

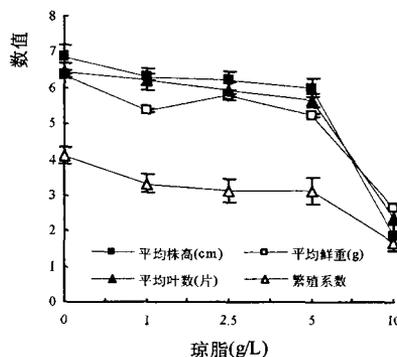


图5 不同琼脂浓度对野葛带芽茎段再生的影响

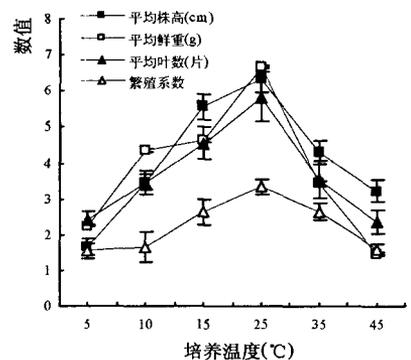


图6 不同培养温度对野葛带芽茎段再生的影响

3 讨论

研究表明,带芽茎段有较强的分生能力,是最理想的外植体^[5]。生长调节剂对带芽茎段的再生起着至关重要的作用^[6]。在植物组织培养中,使用最多的生长调节剂是细胞分裂素类和生长素类^[7]。本实验表明,使用6-BA与NAA配比高的培养基,野葛繁殖系数高;反之,则繁殖系数低。这与任华等^[8]在玫瑰天竺葵上的试验结果一致。

一般而言,暗培养有利于愈伤组织的诱导,而光培养对愈伤组织的分化及器官的形成有利^[9,10],这在本试验野葛带芽茎段的再生过程中也被证实。但师校欣等^[11]和裴东等^[12]发现暗培养后的苹果试管苗

再生能力较强,这可能是由于植物的基因型不同所致。

糖主要为试管芽苗的生长提供碳源和调节渗透势^[13]。本试验发现提高蔗糖浓度对带芽茎段再生有促进作用,但蔗糖浓度过高会抑制试管芽苗的生长,降低繁殖系数。这与Chenevard等^[14]对核桃试管苗再生的报道一致。但管道平等^[15]认为,无糖培养使圆叶海棠离体新梢根系发达,根系活力显著提高。

关于基质pH对培养物影响的机制尚不十分清楚,一般认为基质pH会影响细胞代谢途径,从而间接影响培养物的生长、分化和物质积累。本试验结果表明,适宜的pH(6.0)对带芽茎段再生有促进作用,而过高或过低的pH值均会抑制试管芽苗的生长,降低繁殖系数。这与罗天宽等^[16]在生姜脱毒试管苗的实验结果一致。

本试验表明,培养基中琼脂浓度低有助于带芽茎段增殖,繁殖系数高。随着琼脂浓度的升高,培养基硬化,影响试管苗吸收养分,使其生长减慢,芽增生减少,繁殖系数降低。这与汪建亚^[17]对山地杨的研究相似。

本试验还表明,适宜的温度(25℃)可以使试管苗生长良好,繁殖系数高。当温度低时,容易形成玻璃化苗,温度越低玻璃化苗的比例越高;而温度高时,虽然玻璃化苗减少,但生长受到抑制。

参考文献:

- [1] Hirakura K, *et al.* Phenolic glucosides from the root of *Puerarin lobata*[J]. *Phytochem.*, 1997,46(5): 921-928.
- [2] Park H H, *et al.* Isoflavone glucosides exists as their 6-O-malonyl esters in *Pueraria Lobata* and its cell suspension cultures[J]. *Chem Pharm Bull.*, 1992,40(7): 1 978-1 980.
- [3] Matkowski A. *In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi[J]. *J Plant Physiol.*, 2004,161(3): 343-346.
- [4] Barbara T. *In vitro* propagation of isoflavone-producing *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi [J]. *Plant Science*, 2003,165(5): 1 123-1 128.
- [5] 刘金英,等. 佛手山药组织培养的研究[J]. *植物研究*, 2006,26(3): 323-328.
- [6] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 84-85.
- [7] 王忠. 植物生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [8] 任华,等. 玫瑰天竺葵组培快繁技术的研究[J]. *湖南农业科学*, 2007(1): 32-34.
- [9] 任冬梅,等. 细胞分裂素物质在植物组织培养中的作用机制[J]. *植物生理学通讯*, 1996,32(5): 373-377.
- [10] 谷瑞升,等. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. *植物学通报*, 1999,16(3): 1-4.
- [11] 师校欣,等. 黑暗培养对苹果组培快繁及叶片再生的影响[J]. *河北农业大学学报*, 2004,27(4): 18-21.
- [12] 裴东,等. 红富士苹果试管培养中器官分化及其部分生理指标的研究[J]. *园艺学报*, 1997,24(3): 229-234.
- [13] 蒋泽平,等. 光叶楮组织培养快速繁殖技术的研究[J]. *江苏林业科技*, 2006,33(6): 10-13.
- [14] Chenevard D, *et al.* The effect of sucrose on the development of hybrid walnut plantlets (*Juglans nigra* × *J. regia*), consequences on their survival during their acclimatization[J]. *Ann Sci For.*, 1995,52: 147-156.
- [15] 管道平,等. 圆叶海棠无糖培养生根研究[J]. *果树学报*, 2006,23(6): 899-902.
- [16] 罗天宽,等. 糖及 pH 值对生姜脱毒试管苗继代增殖和生根的影响[J]. *江西农业学报*, 2006,18(6): 81-82.
- [17] 汪建亚,等. 山地杨快速繁殖研究[J]. *湖北林业科技*, 2004(增刊): 1-7.