

## TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽诱导的效应研究

任鹏斌<sup>1</sup>, 王阿娇<sup>1</sup>, 刘佳晨<sup>1</sup>, 胡选萍<sup>1,2</sup>

(1. 陕西理工学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000)

**摘要:** 为了建立魔芋离体培养高效再生体系, 研究了 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽分化的效应。结果表明: (1) 单独使用 TDZ 和 6-BA 或 6-BA 与 TDZ、6-BA 与 NAA 组合均能诱导魔芋愈伤组织分化形成不定芽, 且 TDZ 与 NAA 组合有利于魔芋不定芽的分化, 当培养基中激素配比为 TDZ  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 不定芽分化率可高达 96.15%; (2) TDZ 或 TDZ 与 NAA 组合对魔芋不定芽数量的增加非常有效, 增殖系数显著高于单独使用 6-BA 或 6-BA 与 NAA 组合, 培养基中 TDZ 为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时增殖系数最高, 可达 15.78。 (3) 相比于激素 6-BA, TDZ 更易于导致不定芽的白化现象, 最高白化率可达 28.37%, 而培养基中 NAA 的适当添加, 可在很大程度上降低魔芋不定芽的白化。TDZ  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与 NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  配比, 不定芽白化率降至 7.56%, 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与 NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  配比不定芽白化率为 0。 (4) TDZ 对魔芋不定芽的伸长生长表现出较强的抑制作用, 而 6-BA 对不定芽的伸长生长则表现出较好的促进作用, 可见在继代培养中使用 6-BA 更有利于魔芋不定芽的伸长生长。

**关键词:** 魔芋; TDZ; 6-BA; 不定芽

中图分类号: S632.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2014)08-0023-05

魔芋 (*Amorphophallus konjac* K. Koch) 是天南星科 (Araceae) 魔芋属 (*Amorphophallus* Blume.) 多年生草本植物, 具有发达的地下块茎, 富含果胶、生物碱、淀粉、17 种氨基酸和多种微

量元素<sup>[1]</sup>。魔芋块茎可作为中药, 其主要功能活性成分是魔芋葡甘聚糖 (konjac glucomannan, KGM), 具有降血糖、降血脂和胆固醇、治疗糖尿病、抗肿瘤和免疫作用<sup>[2-5]</sup>, 在医药方面具有广泛的利用价值和开发价值。由于陕南地区独特的地理位置与气候条件, 魔芋种植历史悠久, 现已成为全国魔芋生产的重要种植地区之一。传统魔芋生产栽培中, 通常主要用球茎着生的根茎进行繁殖, 繁殖系数低, 易感病与腐烂, 严重地阻碍了魔芋大

收稿日期: 2014-04-01

基金项目: 陕西省教育厅自然科学专项计划资助项目 (2013 JK0741)

第一作者简介: 任鹏斌 (1992-), 男, 陕西省铜川市人, 学士, 从事植物学研究。E-mail: 15769162769@163.com。

## Electronic Cloning and Bioinformatics Analysis of *CjTCTP* Gene from *Camellia japonica* L.

DING Yue-lian, ZHAO Hong-jie, KE Huan, CHEN Jie

(Foshan Institute of Forestry Science, Foshan, Guangdong 528222)

**Abstract:** A novel gene of the translationally controlled tumor protein was cloned in silico base on the ESTs database of *Camellia japonica* L. and named *CjTCTP*. Some characterizations of amino acids encoded by *CjTCTP* gene were analyzed by bioinformatics tool, include composition of amino acid sequence, physical and chemical properties, transmembrane domain, hydrophobicity/hydrophilicity, signal peptide, subcellular localization, secondary and tertiary structure of protein plus the functional domain, and phylogentic tree. The results showed that the full-length of *CjTCTP* gene was 706 bp with a complete ORF which encoded 168 amino acids. And the encoded amino acids contained TCTP1 and TCTP2 domains which belonged to TCTP superfamily. Furthermore, the encoded amino acids were possibly a soluble protein contained signal peptide, and it might located in the cytoplasm. The *CjTCTP* amino acid sequence is highly homologous (more than 80%) with TCTPs of other plants, such as *Arabidopsis thaliana*, *Hevea brasiliensis* and *Zea mays* L.

**Key words:** *Camellia japonica* L.; TCTP; electronic cloning; bioinformatics analysis

面积推广种植及相关深加工产业的发展<sup>[6-7]</sup>,而利用组织培养技术是解决魔芋种质退化、满足生产需求的根本途径。该研究以魔芋为试材,分析 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽诱导与增殖的效应,为优化魔芋离体组织培养条件,促进种质筛选与快速繁育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以清江花魔芋为试材,魔芋原球茎由陕西省汉中市农业科学研究所提供,将其室温保存于湿润沙土中约 3 个月,无菌切分球茎块作为试验用外植体。

### 1.2 方法

1.2.1 材料预处理 选择生长健壮、大小一致的魔芋球茎,用自来水冲洗掉表面的杂质,在流水下冲洗 1~2 h。在超净工作台将球茎先用 75% 乙醇漂洗 30 s,再用 0.1% 升汞浸泡 20 min,然后用无菌水漂洗 4~5 次,每次 2~3 min,无菌操作将其切分为 0.5 cm<sup>3</sup> 左右的切块,种至 MS+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 的培养基中诱导愈伤组织,选择质地疏松、生长旺盛的愈伤组织连续继代 2 次,备用。

1.2.2 培养基配制 分别在 MS 培养基中加入不同剂量的 TDZ、6-BA 与 NAA,配制成试验所需的培养基,即:Ⅰ,MS+TDZ 1.0 mg·L<sup>-1</sup>;Ⅱ,MS+TDZ 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>;Ⅲ,

MS+TDZ 2.0 mg·L<sup>-1</sup>;Ⅳ,MS+TDZ 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>;Ⅴ,MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>;Ⅵ,MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>;Ⅶ,MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>;Ⅷ,MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>。各培养基中均按 3.0% 的浓度加入蔗糖,按 0.6% 的浓度加入琼脂粉,按 0.1% 的浓度加入 PVP,调整 pH5.8~6.0,在 121℃、1.3~1.5 个标准大气压下灭菌 20 min。

1.2.3 不定芽的诱导效应 将“1.2.1”得到的愈伤组织(第 2 次继续培养 20 d),选择质地疏松、生长旺盛的淡粉色愈伤组织,在铺有滤纸的培养皿中无菌切分为长宽约 0.3 cm 的切块,接种至Ⅰ~Ⅷ培养基中光照培养。培养光照时间(昼/夜)16 h/8 h、光照强度 1500~2 000 lx,(25±2)℃、相对湿度 50%~60%,培养 30 d,定期观察并统计不定芽的形态与数量变化,并计算相应的二级变量,分析激素 TDZ 与 6-BA 对不定芽分化的效应。

1.2.4 测定项目 数据统计按照公式计算得出。不定芽诱导率(%)=(诱导出不定芽的外植体数/接种外植体总数)×100;增殖系数=诱导出不定芽总数/接种外植体总数;白化率(%)=(白化的不定芽数/不定芽总数)×100。

## 2 结果与分析

### 2.1 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽诱导的效应

试验结果表明,单独使用 TDZ 和 6-BA 或



图 1 魔芋愈伤组织直接分化形成的不定芽

Fig. 1 Adventitious buds differentiated directly from callus of *Amorphophallus*

TDZ、6-BA 与 NAA 组合均能诱导魔芋愈伤组织分化形成不定芽,不定芽可单个发生或成簇发生(见图 1)。单个不定芽直接从愈伤表面形成,多呈“锥状”,少数“开花状”;成簇发生的不定芽直接从愈伤组织表面形成,鳞片在外侧展开,中间有绿色芽点,或者在愈伤组织表面“团块化”形成大量密集的圆球状突起,培养 10~20 d 在突起表面形成不规则状的不定芽,鳞片展开或闭合(见图 2)。相比较而言,单独使用 6-BA 或 6-BA 与

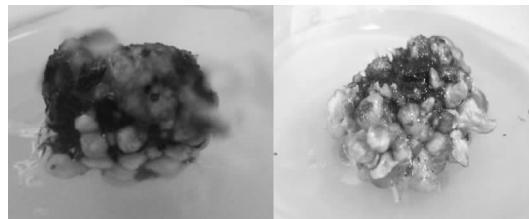


图 2 魔芋愈伤组织“团块化”后分化形成的不定芽  
Fig. 2 Adventitious buds differentiated after block mass of from callus of *Amorphophallus*

NAA 组合,7~10 d 在愈伤组织表面形成少量芽点,初始芽点为白色,培养至 12 d 逐渐转绿,芽点以单个发生居多;而单独使用 TDZ 或 TDZ 与 NAA 组合,不定芽发生时间比 6-BA 组合早 2~3 d,不定芽单个或成簇发生,其中以成簇发生居多。

从不定芽的诱导率分析(见表 1)可知,TDZ 或 TDZ 与 NAA 组合不定芽的诱导率显著优于 6-BA 或 6-BA 与 NAA 组合,TDZ 组合平均不定

芽诱导率为 90.31%,显著高于 6-BA 组合的平均诱导率(82.19%),且其诱导率可高达 96.15%。另外,Ⅱ与Ⅳ处理不定芽的诱导率分别为96.15%与 90.91%,显著大于处理Ⅰ(88.46%)与处理Ⅲ(85.71%),可见 TDZ 与 NAA 组合对不定芽的发生是有利的;但对 6-BA 而言,并未表现出 NAA 对不定芽发生的正向调控作用,添加 NAA 的处理Ⅵ、Ⅶ与未添加 NAA 处理Ⅴ与Ⅷ诱导率基本相当。

表 1 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽诱导效果分析  
Table 1 Analysis on adventitious buds induction with TDZ and 6-BA

处理 Treatments	不定芽诱导率/% Induction rate of adventitious buds	不定芽的发生状况 State of adventitious buds		
		不定芽发生时间/d Time	芽再生方式 Regenerative way	不定芽颜色 Color
I	88.46 b	5~7	单芽或丛芽	白色、淡粉或绿色
Ⅱ	96.15 a	5~7	单芽或丛芽	白色、淡粉或绿色
Ⅲ	85.71 b	5~7	丛芽占优势	多为淡绿色,小芽多白色
Ⅳ	90.91 a	5~7	丛芽占优势	多为淡绿色,少数白色
V	85.19 b	7~10	单芽或丛芽	多为淡绿色,少数粉色
Ⅵ	81.48 b	7~10	单芽或丛芽	大芽淡绿色,小芽粉色
Ⅶ	85.19 b	7~10	单芽或丛芽	多为绿色,少数白色与粉色
Ⅷ	76.92 c	7~10	多为单芽	白色、粉色或淡绿色

注:不同小写了母表示差异显著(P<0.05)。下同。  
Note;Different lowercases mean sigrificant difference at 0.05 leael. The same below.

2.2 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽增殖的效应

由表 2 可知,单独使用 TDZ 或 TDZ 与 NAA 组合,非常有利于不定芽数量的积累,增殖系数处理Ⅰ最高,达 15.78,明显高于处理Ⅱ(9.52 个),远高于处理Ⅴ(3.35 个)和处理Ⅵ(3.96 个);另外从单个外植体最多形成的不定芽总数分析,处理Ⅰ,达最高 73 个,远高于处理Ⅶ(18 个),处理Ⅴ

最低,由此可见 TDZ 对魔芋不定芽的高效诱导具有重要的作用。从表 2 还可看出,处理Ⅱ与处理Ⅳ(添加 NAA0.1 mg·L<sup>-1</sup>)的平均增殖系数9.28,低于处理Ⅰ与处理Ⅲ的平均增殖系数(13.99),可见培养基中添加 NAA 对魔芋不定芽数量的增加并未表现出明显的有利作用,这与不定芽诱导率之间并未表现出良好的一致性。

表 2 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽增殖的实验结果统计  
Table 2 Experimental results of adventitious buds multiplication with TDZ and 6-BA

处理 Treatments	增殖系数 Mutlification coefficient	不定芽增殖状况 Multiplication of adventitious buds		
		不定芽总数/个 Total number of adventitious buds	芽数>8 的外植体数/个 Number of explants(buds>8)	单个外植体最多 发生芽数/个 The most buds of one explant
I	15.78 a	363	16	73
Ⅱ	9.52 b	238	11	36
Ⅲ	12.21 a	293	15	32
Ⅳ	9.03 b	271	14	56
V	3.35 c	77	4	11
Ⅵ	3.96 c	87	5	15
Ⅶ	3.83 c	88	5	18
Ⅷ	2.80 c	56	3	17

### 2.3 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽白化的效应

在不同激素组合诱导魔芋不定芽的试验中,大多数处理存在不定芽白化的现象。魔芋不定芽白化有两种基本情况(见图 3、图 4):第一种为不定芽外被鳞片明显白化或玻璃化,而芽点仍为绿



图 3 鳞片白化的不定芽

Fig. 3 Coleoptile whitening of adventitious buds

色;第二种为鳞片与芽点均白化。由表 3 可知,虽然 TDZ 或 TDZ 与 NAA 组合不定芽的诱导效率高,但不定芽异常化现象比较明显,处理 I 不定芽白化现象最为严重,白化率可高达 28.37%,远高于处理 V,且单独使用 6-BA 或 6-BA 与 NAA 组

合,只发生鳞片白化,芽点白化的现象几乎没有,可见 TDZ 更易于导致不定芽的异常化。



图 4 鳞片与芽点均白化的不定芽

Fig. 4 Whitening of coleoptile and bud points

另外,从不同处理组合中发现,Ⅱ、Ⅳ、Ⅵ、Ⅷ处理(添加 NAA)不定芽的平均白化率为 5.61%,最低为 0,显著低于未添加 NAA 的Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ与Ⅶ处理的不定芽平均白化率(12.83%),可见培养基中 NAA 的添加在很大程度上降低了魔芋不定芽的白化率,对提高不定芽的诱导质量具有重要作用。

表 3 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽白化的试验结果统计

Table 3 Experimental results of adventitious buds whitening with TDZ and 6-BA

处理 Treatments	总白化率/% Total whitening rate	鳞片白化率/% Whitening rate of coleoptile	芽点白化率/% whitening rate of bud points
I	28.37 a	23.97	7.16
II	7.56 c	5.46	2.10
III	14.33 b	12.29	2.39
IV	11.44 b	11.44	0
V	5.19 c	5.19	0
VI	3.45 c	3.45	0
VII	3.41 c	3.41	0
VIII	0 c	0	0

### 2.4 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽生长的影响

试验结果表明,虽然 TDZ 有利于叶片的伸长(见图 5),但对幼芽的伸长生长却表现出一定的抑制作用,所形成的不定芽较小,且部分不定芽

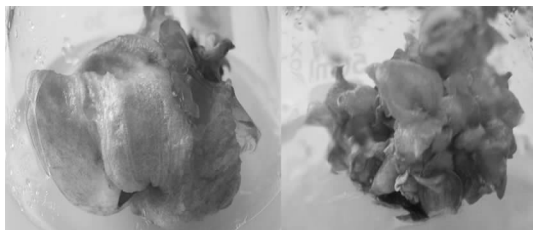


图 5 TDZ 诱导的不定芽的生长

Fig. 5 Bud growth with TDZ



图 6 6-BA 诱导的不定芽的生长

Fig. 6 Bud growth with 6-BA

在继代培养后期逐渐白化死亡。6-BA 对不定芽的伸长则表现出较好的促进作用(见图 6),所形

成的不定芽较大,且生长势旺盛,后期移栽成活率高,可见在继代培养中使用 6-BA 更有利于魔芋不定芽的伸长生长。

### 3 结论与讨论

TDZ 和 6-BA 以及二者与 NAA 组合均能诱导魔芋愈伤组织分化形成不定芽,当培养基中激素配比为 TDZ  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,不定芽分化率相对最高;TDZ 或 TDZ 与 NAA 组合魔芋不定芽增殖系数显著高于单独使用 6-BA 或 6-BA 与 NAA 组合,说明 TDZ 及 TDZ 与 NAA 组合对于魔芋不定芽的分化增殖非常有效。

TDZ 比 6-BA 易导致不定芽的白化,但适当添加 NAA 可降低魔芋不定芽的白化率,可见 NAA 可以与 TDZ 及 6-BA 平衡拮抗抑制不定芽的白化与畸形化,对提高魔芋不定芽质量具有重要作用。与 TDZ 相比,6-BA 对不定芽的伸长表现出较好的促进作用,可见在继代培养中使用 6-BA 更有利于魔芋不定芽的伸长生长,这对于试

管苗后期壮苗、生根、炼苗与移栽具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 刘佩瑛.魔芋学[M].中国.北京:农业出版社,2004:1-30.
- [2] 何亚娟,李久香.魔芋对艾氏腹水瘤(EAC)抑制作用的研究[J].肿瘤防治研究,2000(27):197-198.
- [3] Sood N,Baker W L,Coleman C I. Effect of glucomannan on plasma lipid and glucose concentrations, body weight, and blood pressure: systematic review and meta-analysis[J]. Am J Clin N,2008,88:1167-1175.
- [4] Vuksan V,Sievenpiper J L,Zheng X. et al. Konjac-mannan and American Ginseng: Emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus[J]. J. Am. Coll. Nutr., 2001, 20(5S):370S-380S.
- [5] Tamura M,Tsushida T,Shinohara K. Konjac glucomannan consumption may enhance equol production in mice[J]. Food Sci. Technol. Res., 2005(11):376-379.
- [6] 徐伟,王婷婷,刘列平,等.陕西岚皋县魔芋软腐病原菌的分离与鉴定[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2011(11):97-102.
- [7] 杨英,何峰,金文闻,等.魔芋种植业发展存在的问题与对策[J].湖北农业科学,2008(9):1095-1098.

## Effect of TDZ and 6-BA on Adventitious Bud Differentiation of *Amorphophallus*

REN Peng-bin<sup>1</sup>, WANG A-jiao<sup>1</sup>, LIU Jia-chen<sup>1</sup>, HU Xuan-ping<sup>1,2</sup>

(1. Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000 2. Shaanxi Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong, Shaanxi 723000)

**Abstract:** In order to establish high-efficiency *in vitro* culture regeneration system, the effect of TDZ and 6-BA on adventitious bud differentiation of *Amorphophallus* was studied. The results showed that (1) Using TDZ or 6-BA singly and their combination with NAA could induce the differentiation of adventitious buds and the combination of TDZ and NAA was better, the differentiation rate had reached 96.15% when hormone concentration was TDZ  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . (2) Multiplication coefficient of TDZ or the combination with NAA attained 15.78 which was higher than 6-BA and combination with NAA, there was  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ, which demonstrated that TDZ had great effect on multiplication of adventitious buds. (3) Compared to 6-BA, TDZ was apt to bring whitening, and the highest whitening rate was 28.37%, however, NAA could largely decrease whitening. Whitening rate of NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  with TDZ  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  with 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  fell to 7.56% and 0 respectively. (4) Differing from 6-BA, TDZ showed stronger suppression to growth of adventitious bud, so 6-BA was relatively appropriate in secondary culture of adventitious buds.

**Key words:** *Amorphophallus*; TDZ; 6-BA; adventitious buds