

罗布麻外植体的筛选及愈伤组织诱导

刘晓晨^{1,2}, 曹君迈², 陈彦云³, 李国旗³

(1. 南开大学 滨海学院, 天津 300270; 2. 北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021; 3. 宁夏大学 生命科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:以罗布麻带芽茎段、茎段、幼根为外植体, 探讨不同培养基、不同激素配比对罗布麻愈伤组织形成的影响。结果表明: 适宜的罗布麻外植体为带芽茎段; 适宜的培养基为 MS 培养基; 适宜愈伤组织诱导的激素配比为 6-BA0.6 mg·L⁻¹+NAA0.5 mg·L⁻¹, 其愈伤组织诱导率达到 100%。

关键词:罗布麻; 培养基; 外植体; 愈伤组织

中图分类号:S563.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2012)09-0024-03

罗布麻(*Apocynum venetum* L.)属夹竹桃科罗布麻属, 为多年直立宿根草本植物, 成活期可达 30 a 以上。我国开发利用的罗布麻有白麻和红麻两种, 是一种有多种经济用途的野生资源型植物。其药理作用: 主治“平肝安神、清热利水, 用于肝阳眩晕, 心悸失眠, 浮肿尿少, 高血压, 神经衰弱, 肾炎浮肿”, 为《中华人民共和国药典》(2005)年版收录^[1]。罗布麻药用成分主要是西麻甙、黄酮类、酸类和三萜类物质, 可治疗冠心病、急性肾炎等^[2]; 此外罗布麻对头痛、咳嗽、感冒等症均有治疗作用^[3]。而 Kazuaki Kamata 等^[4]对罗布麻叶的组分进行了研究, Yuhua Cao 等^[5], 利用毛细管电泳技术对罗布麻活性成分进行了研究。我国对罗布麻在栽培方面的研究工作始于 20 世纪 50 年代, 但在生物技术方面的研究却起步较晚, 目前有关报道的文章也较少^[6-9], 主要集中在罗布麻茎段和子叶的研究, 而对幼芽和幼根未见文献报道, 从而进行相关研究, 以期建立愈伤组织培养体系, 为今后建立悬浮细胞系和生产次生代谢产物的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以采自新疆库尔勒地区的野生罗布麻种子在

无菌条件下培育的健壮罗布麻幼苗为材料。罗布麻种子采用水选法清选, 选出沉于水底的饱满种子, 将筛选的罗布麻种子用 0.1% HgCl₂ 消毒 1 min, 用无菌水冲洗 5~6 次, 在无菌条件下, 接种在不加任何其它成分的 MS 培养基上, 放入温度 24℃ 光照 12 h·d⁻¹, 光强在 1 000 lx 左右的条件中培养 15 d 左右, 待幼苗长到 2~3 对真叶后, 可作为供试材料。

将供试材料切成带芽茎段、茎段、幼根约 0.5 cm 长作为外植体, 接种在各种起始诱导培养基上。

1.2 培养基的制备与培养条件

以 MS、B₅、KC 为 3 种基本培养基, 分别加入琼脂 6.5 g·L⁻¹, 蔗糖 27 g·L⁻¹ 并配以 6-BA、KT、NAA、2,4-D 四种激素, 共 9 个处理(见表 1), 且将 pH 调至 6.0。培养温度 22~24℃, 光照 6 h·d⁻¹, 光强 1 000 lx。

表 1 激素配比方案
Table 1 The hormone ratio scheme

处理 Treatment	激素种类 Kinds of hormone			
	6-BA/ mg·L ⁻¹	KT/ mg·L ⁻¹	NAA/ mg·L ⁻¹	2,4-D/ mg·L ⁻¹
1	0.6	0.5	—	—
2	0.6	—	0.5	—
3	0.6	—	—	0.5
4	1.2	0.5	—	—
5	1.2	—	0.5	—
6	1.2	—	—	0.5
7	1.8	0.5	—	—
8	1.8	—	0.5	—
9	1.8	—	—	0.5

1.3 方法

将根、茎、叶 3 种外植体分别接入 MS、KC、

收稿日期: 2012-05-02
基金项目: “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2011BAC0703)
第一作者简介: 刘晓晨(1988-), 女, 宁夏回族自治区银川市人, 在读学士, 从事生态环境影响评价研究。E-mail: weisq630504@163.com。
通讯作者: 曹君迈(1964-), 女, 宁夏回族自治区银川市人, 学士, 教授, 从事植物资源的利用及开发工作。E-mail: junmai-ca@163.com。

B₅ 培养基,每种培养基均为 9 个处理,每处理接 16 瓶,每瓶 3 个外植体,剔除污染后,均以 12 瓶计算,即同种外植体每处理共接 36 个外植体,每种培养基类型共接种 324 个外植体。并统计茎芽外植体在 MS 培养基上生长了 20 d 的愈伤组织的生长发育情况。

愈伤组织诱导率/%=(愈伤组织形成的外植体数/接种的外植体数)×100;

褐化率/%=(褐化的外植体数/接种的外植体数)×100;

愈伤组织生长势:采用等级得分法统计,长势旺盛的记为 100,良好的记为 80,一般的记为 60,较差的记为 40,差的记为 20^[10];

生长诱导值:培养一定时间后未褐化外植体的百分数、愈伤组织诱导率及愈伤组织生长势的平均值^[10]。

2 结果与分析

2.1 罗布麻愈伤组织最适培养基及外植体的筛选

由表 2 的愈伤组织诱导率经方差分析看出,不同的培养基对罗布麻愈伤组织的诱导有极显著的差异,MS 培养基极显著优于其它两种培养基,即:MS 培养基中平均诱导率达到 64.2%,为最高;其次 B₅ 培养基,诱导率为 32.1%;最差是 KC 培养基,诱导率仅有 24.7%,所以 MS 培养基比较适合诱导罗布麻的愈伤组织培养。

从表 2 亦可看出,在 3 种培养基上,以茎芽作外植体时,愈伤组织诱导率平均最高,达到 56.8%,茎段和幼根的愈伤组织诱导率平均为 30.9%和 33.3%,二者与茎芽的诱导率差异达到显著水平;无论茎芽还是茎段和幼根,均以在 MS 培养基上的愈伤组织诱导率最高,平均达 64.2%,

表 2 不同培养基类型对不同外植体愈伤组织诱导率的影响
Talbe 2 Effects of different meida on induction rate of different explants

培养基 类型 Medium type	茎段 Stem			茎芽 Stems with a bud			幼根 Root			3 种外植体诱导率 均值/% Average introduction rate of three kinds of explans
	接种数 Inoculum source	愈伤块数 Callus number	诱导率/% Induction rate	接种数 Inoculum source	愈伤块数 Callus number	诱导率/% Induction rate	接种数 Inoculum source	愈伤块数 Callus number	诱导率/% Induction rate	
MS	324	192	59.3	324	252	77.8	324	180	55.6	64.2* *
B ₅	324	84	25.9	324	144	44.4	324	84	25.9	32.1
KC	324	24	7.4	324	156	48.1	324	60	18.5	24.7
总和或 平均值 Total or average	97.2	300	30.9	972	552	56.8*	972	324	33.3	

注:* 为显著水平;* * 为极显著水平。

Note: * and * * mean significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively.

极显著高于在 B₅ 和 KC 培养基上;茎芽在 MS 培养基上愈伤组织诱导率为 77.8%,在 B₅ 和 KC 培养基上,愈伤组织诱导率分别为 44.4%和 48.1%。由此说明:在进行罗布麻离体培养时,选取以罗布麻茎芽为外植体的材料和 MS 培养基较为理想。

2.2 不同激素组合对罗布麻愈伤组织诱导的影响

为了直观地比较不同激素处理对罗布麻茎芽形成愈伤组织的诱导效果以及愈伤组织生长状

况,引用生长诱导值的概念,结果表明,在不同的处理中,处理 2 诱导值最高达到 100%,说明愈伤组织生长状况优秀;其次为处理 1 和处理 5,诱导值均达 93.3%,说明愈伤组织生长状况优良;处理 3、4 诱导值低于 80,愈伤组织生长状况良好;处理 6、7、8、9,诱导值均在 60 以下,生长稍差。因此表明:处理 2 是理想的愈伤组织诱导培养基,即愈伤组织诱导值为 100%、褐化率为 0、愈伤组织生长直径为 1.2~3.4 cm。

表 3 不同激素组合对罗布麻茎芽愈伤组织诱导值的影响
Table 3 Effects of different hormone combinations on induce value of callus

处理 Treatment	直径/cm Diameter	诱导率/% Introduction rate	未褐化率/% Unbrowning rate	生长势 Growth potential	诱导值/% Induce value
1	0.6~1.4	100	100	80	93.3
2	1.2~3.4	100	100	100	100
3	0.8~1.4	66.7	100	60	75.6
4	0.4~0.8	66.7	100	60	75.6
5	1.0~2.4	100	100	80	93.3
6	0.2~0.6	66.7	37	40	47.9
7	0.8~1.4	66.7	37	40	47.9
8	0.6~1.6	66.7	37	60	54.6
9	0.4~0.6	66.7	37	20	41.2

3 结论与讨论

该研究主要对茎段、茎芽、幼根 3 种外植体和 MS、B₅、KC 培养基,诱导愈伤组织的效果进行了比较,试验结果表明以茎芽作外植体,是较为理想的试验材料,MS 是较为适宜的基本培养基。

用茎芽作外植体,并配以 MS + 6-BA 0.6 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹ 的培养基,愈伤组织块的生长直径达 1.2~3.4 cm,褐化率为 0,愈伤组织诱导率高达 100%,生长状况好,是一种理想的愈伤组织诱导培养基。

在植物组织培养中,培养基的筛选是一个非常重要的环节,植物组织细胞分化与脱分化本身是一个较为复杂的生理生化过程,培养基的组分及植物生长调节物质的种类及浓度以及它们之间的相互作用,直接影响愈伤组织的诱导率。在罗布麻离体培养快繁技术研究中,以顶芽为外植体时,愈伤组织诱导率最高达到 82.7%^[9],而在处理 2 中却高达 100%,其主要原因是由于外植体年龄的不同而形成的差异。在愈伤组织诱导中,激素配比效果 6-BA + NAA > 6-BA + KT > 6-BA + 2,4-D,与郝玉蓉、陈彦云利用 MS 培养基的研究结果基本一致^[8-9]。愈伤组织诱导中,激素配比,以生长素与细胞分裂素浓度较低,基本接近时,效果要优于高浓度,6-BA 0.6 mg·L⁻¹, NAA 0.5 mg·L⁻¹ 为宜。

在愈伤组织培养过程中还发现,光照超过 2 000 lx 时,愈伤组织易褐化,还易形成红色素,所以在低光照条件下或无光照条件下,有利于愈伤组织的生长,但对其有效成分要求的适宜培养条件还

有待于研究。该试验中引用了生长诱导值的概念,来描述外植体的生长、褐化、愈伤组织的诱导率及生长势等之间的关系,将这些指标综合成一个指标,来判断培养配方优劣,该值越大,表示愈伤组织的诱导率及生长势越好,处理 2 愈伤组织诱导值为 100%、褐化率为 0、愈伤组织生长直径为 1.2~3.4 cm,是诱导愈伤组织的最佳培养基。

参考文献:

- [1] 王宁,陈斌.柴达木盆地资源植物——罗布麻的开发利用[J].青海科技,2005(6):15-17.
- [2] 李国旗,陈彦云,孟军.极具开发潜力的生态经济型植物——罗布麻[C]//谢应忠,孙权.宁夏生态环境恢复重建的理论与实践.宁夏:宁夏人民出版社,2004:199-201.
- [3] 赵秀芳,赵彦杰.罗布麻的开发利用价值栽培技术[J].中国水土保持,2005(10):42,45.
- [4] Kazuaki Kamata, Shujiro Seo, Jun-ichiro Nakajima. Constituents from Leaves of *Apocynum venetum* L. [J]. J. Nat. Med., 2008, 62: 160-163.
- [5] Cao Yuhua, Zhang Xin, Fang Yuzhi, et al. Determination of active ingredients of *apocynum venetum* by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. Microchimica Acta, 2001, 137: 57-62.
- [6] 魏凌基,王咏星,徐海霞,等.罗布麻茎段的组织培养[J].植物生理学通讯,2000,36(5):434.
- [7] 马森,陆嘉惠,周玲玲,等.资源植物罗布麻的茎段组织培养与植株再生[J].中草药,2001,32(9):841.
- [8] 郝玉蓉,李明世.罗布麻子叶和下胚轴再生植株的培养[J].西北植物学报,2002,22(7):82-84.
- [9] 陈彦云,曹君迈,李国旗,等.罗布麻离体培养及快繁技术优化的研究[J].生物技术,2006,16(1):72-75.
- [10] 肖娅萍,王孝安,胡雅琴.用生长诱导值筛选地灵愈伤组织诱导培养基[J].西北大学学报,2002,32(5):569-570,572.

播期和肥料对大豆新品种合农 63 生长发育和产量构成因素的影响

申晓慧¹, 姜 成², 刘婧琦¹, 赵桂范¹, 冯 鹏¹, 郭 泰¹, 张敬涛¹

(1. 黑龙江省农业科学院 佳木斯分院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学 生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:以大豆新品种合农 63 为试材,研究了不同播期和不同施肥量处理对叶面积、干物质积累及产量构成因素的影响。结果表明:相同施肥量处理下,早播和晚播对大豆的生长都不及正常播期,早播由于地温低,前期营养生长受抑制,晚播生育日数比正常播期缩短,二者均影响干物质的积累;在不同施肥量处理下,早播和晚播与正常播期的株高差距不大,平均来看,早播略高于晚播和正常播期,但单株荚数、粒数、百粒重和产量均低于正常播期;在佳木斯地区 5 月 8 日前后播种最为适宜,平均产量比早播高 14.3%,比晚播高 16.7%。

关键词:大豆;播期;肥料;产量构成因素

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)09-0027-03

大豆对光温反应非常敏感^[1],不同光温条件对大豆的生长发育、干物质积累及产量形成都会产生不同的影响。大豆的产量除受遗传因素影响外,还受环境因素和栽培措施的影响,在栽培措施中肥料对大豆的影响较大。该试验在中等肥力条件下,研究了播期和肥料对大豆新品种合农 63 的产量和产量构成因素的影响,以期大豆新品种的生产示范与推广提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为合农 63,来自黑龙江省农业科学院佳木斯分院。尿素(总氮 $\geq 46.4\%$)大庆石化生产,粒状重过磷酸钙($P_2O_5 \geq 43\%$)云南三环化工有限公司生产,氯化钾($K_2O \geq 60\%$)四川成都乌拉尔钾肥有限公司生产。

1.2 试验地概况

试验于 2011 年在黑龙江省农业科学院佳木斯分院试验田中进行,试验地前茬作物为大豆,试验地养分含量见表 1。

1.3 方法

试验共设 3 个播期,第 1 次播期为 4 月 30 日播种(A_1),第 2 次播期为 5 月 8 日播种(A_2 ,正常播期),第 3 次播期为 5 月 16 日播种(A_3),每个播

收稿日期:2012-05-15

基金项目:黑龙江省农业科技创新工程种子创新基金资助项目(2010-03-02)

第一作者简介:申晓慧(1980-),女,吉林省扶余县人,硕士,助理研究员,从事作物工程研究。E-mail: xiaohuishen@126.com。

通讯作者:张敬涛(1964-),男,黑龙江省佳木斯市人,研究员,从事大豆高产栽培研究。E-mail: zhangjt2008@163.com。

Explants Selection and Callus Induction of *Apocynum venetum* L.

LIU Xiao-chen^{1,2}, CAO Jun-mai², CHEN Yan-yun³, LI Guo-qi³

(1. Binhai College of Nankai University, Tianjin 300270; 2. Biological Science and Engineering College of Beifang University of Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021; 3. Life Science and Engineering College of Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: The effect of different mediums and different hormone combinations on callus formation of *Apocynum venetum* L. was investigated using stems with a bud, stem and root of *Apocynum venetum* L. as explants. The results showed that the suitable explant was stem with a bud, the suitable medium for callus induction was: MS+6-BA 0.6 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹, in which the callus induction rate reached 100%.

Key words: *Apocynum venetum* L.; medium; explant; callus