

不同浓度三种激素对小蓟茎段愈伤组织诱导影响

何易航<sup>1,2</sup>, 黄三印<sup>1</sup>, 邓凯元<sup>1</sup>, 方烨红<sup>1</sup>, 潘玉欣<sup>1</sup>

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063009; 2. 唐山市第十二高级中学, 河北 唐山 063009)

**摘要:**为了进一步开发和利用小蓟,以小蓟茎段为外植体,采用单因素及正交试验方法,探讨 2,4-D、6-BA 以及 NAA 三种激素对小蓟愈伤组织诱导的影响。结果表明:单因素试验 2,4-D 最佳浓度范围为 0.6~1.0 mg·L<sup>-1</sup>;6-BA 最佳浓度范围为 0.6~1.0 mg·L<sup>-1</sup>;NAA 最佳浓度范围为 2.4~2.6 mg·L<sup>-1</sup>。正交试验结果显示,在 MS+2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 2.4 mg·L<sup>-1</sup> 培养基中,小蓟茎段愈伤组织诱导效果最好。3 种激素不同程度上促进小蓟愈伤组织的形成及生长。

**关键词:**小蓟;茎段;愈伤组织;诱导

中图分类号:Q94-331;S567.23<sup>+</sup>9 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2015)09-0026-06 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.09.0026

小蓟(*Cirsium setosum*)为菊科蓟属多年生草本植物<sup>[1]</sup>,具有药用及食用价值<sup>[2]</sup>。近年来,人类保健意识逐渐增强,对小蓟有效成分提取和利用等需求也越来越大。野生小蓟种子小,壳厚,萌发时间长,生长在春夏季节,在一定程度上限制了对其资源的开发利用。组织培养技术不受季节限制,对小蓟进行组织培养在生产上有重要的研究意义。目前对小蓟组织培养技术的研究还较少,本研究旨在为后续小蓟的开发利用提供技术支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为河北联合大学校园内野生小蓟种子繁育的无菌苗茎段。

1.2 方法

1.2.1 外植体处理 取小蓟无菌苗茎段,剪成约 2~3 mm 长度大小,接种于含有不同激素浓度的培养基中。

1.2.2 培养基处理 MS 基本培养基+处理激素+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+5 g·L<sup>-1</sup>琼脂,pH6.0,设计 3 种激素配比试验,以未添加任何激素的培养基为对照组。

1.2.3 单因素试验 在培养基中,分别添加不同浓度 2,4-D、6-BA 以及 NAA,不同激素浓度设置详见表 1。

1.2.4 正交试验 采用 3 因素 3 水平正交试验设计,由单因素试验确定 3 种激素的 3 个水平分别是 2,4-D 0.6、0.8、1.0 mg·L<sup>-1</sup>;6-BA 0.6、0.8、1.0 mg·L<sup>-1</sup>;NAA 2.4、2.5、2.6 mg·L<sup>-1</sup>。

表 1 小蓟茎段愈伤组织诱导中激素浓度设计

Table 1 Different hormone concentration for *Cirsium setosum* stem callus induction

激素 Hormone	浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) Concentration											
2,4-D	0	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.4	1.5	2.0
6-BA	0	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.4	1.5	1.7
NAA	0	1.5	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	3.0

1.2.5 培养条件 每瓶接种外植体数量为 5 个,每种激素浓度接种 5 瓶,在光强 6 000 lx,光周期 12 h·d<sup>-1</sup>,温度 25℃ 条件下,在培养箱中诱导愈伤组织生长。培养第 21 天,称量愈伤组织重量,计

算重量诱导系数(愈伤组织重量/外植体接种重量)、诱导率,并观察愈伤组织生长状态(包括颜色、质地),确定适宜的激素浓度范围。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 对小蓟茎段愈伤组织诱导的影响  
2,4-D 对小蓟茎段愈伤组织诱导率较高,最早 6 d 即可诱导出愈伤组织,早于对照 4~5 d。2,4-D 浓度在 0.8~1.4 mg·L<sup>-1</sup> 条件下,均能诱导出松软、呈白绿色或黄绿色的愈伤组织,细胞透明度均较低;2,4-D 浓度低于 0.8 mg·L<sup>-1</sup>、高于

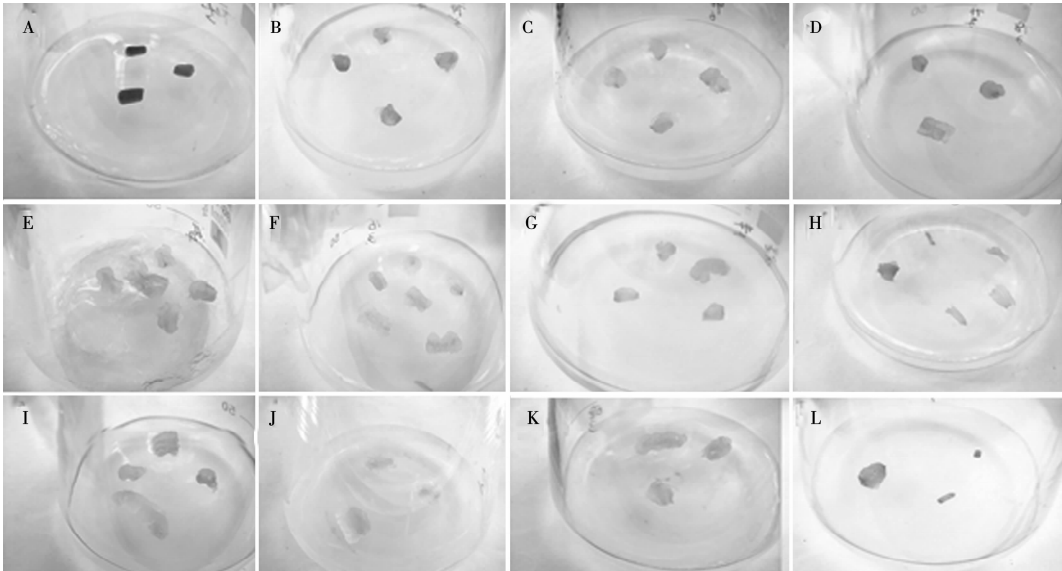
收稿日期:2015-04-22  
基金项目:河北省大学生创新创业训练计划资助项目(2014 10081069);华北理工大学校级创新创业训练计划资助项目(X2014059)  
第一作者简介:何易航(2001-),男,河北省唐山市人。  
通讯作者:潘玉欣(1979-),女,博士,副教授,硕士生导师,从事植物学研究。E-mail:panyu-xin@163.com。

1.4 mg•L<sup>-1</sup>时,愈伤组织质量明显下降,褐化甚至发黑(见表 2、图 1)。在 0.8 mg•L<sup>-1</sup> 条件下,21 d 愈伤组织重量诱导系数最高,达 19.07。确定 2,4-D 浓度 0.6、0.8、1.0 mg•L<sup>-1</sup> 用于茎段愈伤组织诱导正交试验。

表 2 不同浓度 2,4-D 对小蓟茎段形成愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different concentrations of 2,4-D on callus induction of <i>Cirsium setosum</i> stem					
2,4-D 浓度/(mg•L <sup>-1</sup> ) 2,4-D Concentration	诱导率/% Callus inductivity	重量诱导系数 Weight coefficient of induction	愈伤组织颜色 Callus color	生长状态 Growing status	出现愈伤组织天类/d Days until callus appearance
0	90	5.61	绿色	+	10
0.5	100	5.33	白绿色发黑	+	6
0.6	100	8.21	白绿色发黑	+	6
0.7	100	7.18	白绿色发褐	++	6
0.8	100	19.07	白绿色	++++	6
0.9	100	17.90	白绿色	++++	6
1.0	100	17.06	白绿色	+++	6
1.1	100	17.03	白绿色发褐	++	6
1.2	100	17.22	白绿色	+++++	5
1.4	100	15.92	白绿色	+++	6
1.5	100	9.28	白绿色发褐	+++	6
2.0	35	4.05	暗绿色发黑	+	7

愈伤组织生长状态+++++>++++>+++>++>+>“-”。下同。  
The growth state of the callus +++++>++++>+++>++>+>“-”. The same below.



A~L: 2,4-D浓度分别为0、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.5、2.0 mg • L<sup>-1</sup>  
A~L: Concentrations of 2,4-D respectively are 0、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.5、2.0 mg • L<sup>-1</sup>

图 1 不同浓度 2,4-D 诱导下小蓟茎段愈伤组织

Fig.1 Callus induction of *Cirsium setosum* stem at different 2,4-D concentrations

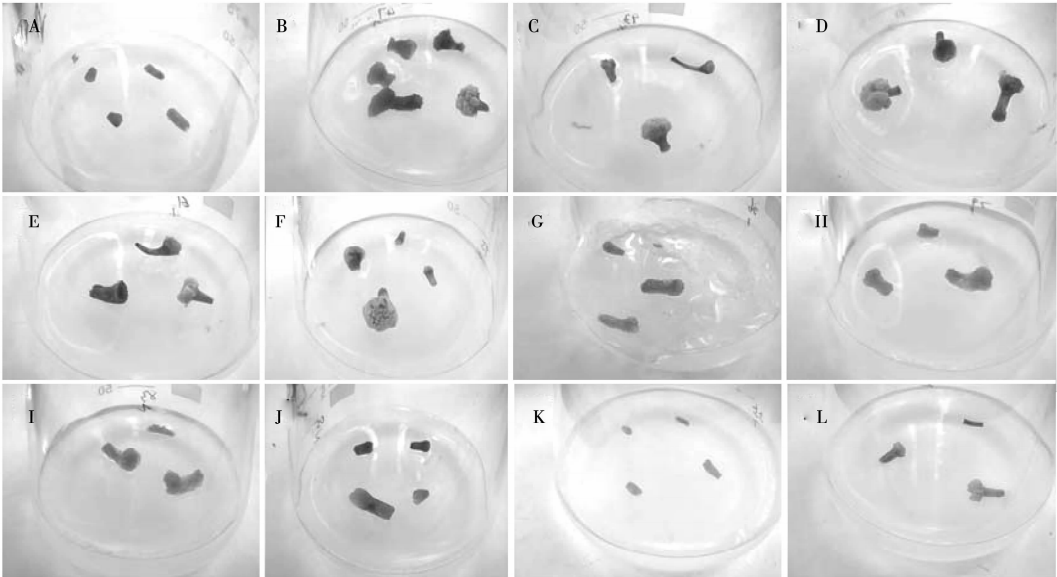
2.2 6-BA 对小蓟茎段愈伤组织诱导的影响

6-BA 对愈伤组织诱导效果较差,愈伤组织出现时间早于对照 0~3 d。愈伤组织严重褐化,生长缓慢,随 6-BA 浓度增高,愈伤组织诱导率逐渐降低,出现时间逐渐延长(见表 3、图 2)。6-BA 在 0.5~1.2 mg•L<sup>-1</sup> 条件下,愈伤组织诱导效果相对

较好。6-BA 浓度低于 0.6 mg·L<sup>-1</sup>、高于 1.5 mg·L<sup>-1</sup>时,愈伤组织质量明显下降。在 0.7~1.0 mg·L<sup>-1</sup>条件下,愈伤组织重量诱导系数高,愈伤组织呈致密深绿色,细胞透明度极低,在 6-BA 0.8 mg·L<sup>-1</sup>条件下,21 d 愈伤组织重量诱导系数最高,达 24.60。确定 6-BA 浓度 0.6、0.8、1.0 mg·L<sup>-1</sup>用于茎段愈伤组织诱导正交试验。

表 3 不同浓度 6-BA 对小蓟茎段形成愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of different 6-BA concentrations on callus induction of <i>Cirsium setosum</i> stem					
6-BA 浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) 6-BA concentration	诱导率/% Callus inductivity	重量诱导系数 Weight coefficient of induction	愈伤组织颜色 Callus color	生长状态 Growing status	出现愈伤组织天数/d Days untills callus appearance
0	90	5.59	绿色	+	10
0.5	82	9.82	深绿色	++	7
0.6	100	14.15	深绿色发黑	++	7
0.7	72	12.31	深绿色发黑	++	7
0.8	100	24.60	翠绿点状发红	+++	7
0.9	100	15.50	翠绿点状暗红	++	7
1.0	100	16.75	翠绿点状发红	+++	7
1.1	100	14.60	翠绿点状暗红	++	7
1.2	100	13.17	绿色发红	++	8
1.5	75	7.16	绿色发褐	+	9
1.7	60	7.75	绿色发褐	+	10
2.0	80	8.28	绿色发黑	-	10



A~L: 6-BA浓度分别为 0、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.7、2.0 mg·L<sup>-1</sup>  
A~L: Concentrations of 6-BA respectively are 0、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.7、2.0 mg·L<sup>-1</sup>

图 2 不同浓度 6-BA 诱导下小蓟茎段愈伤组织

Fig. 2 Callus induction of *Cirsium setosum* stem at different 6-BA concentrations

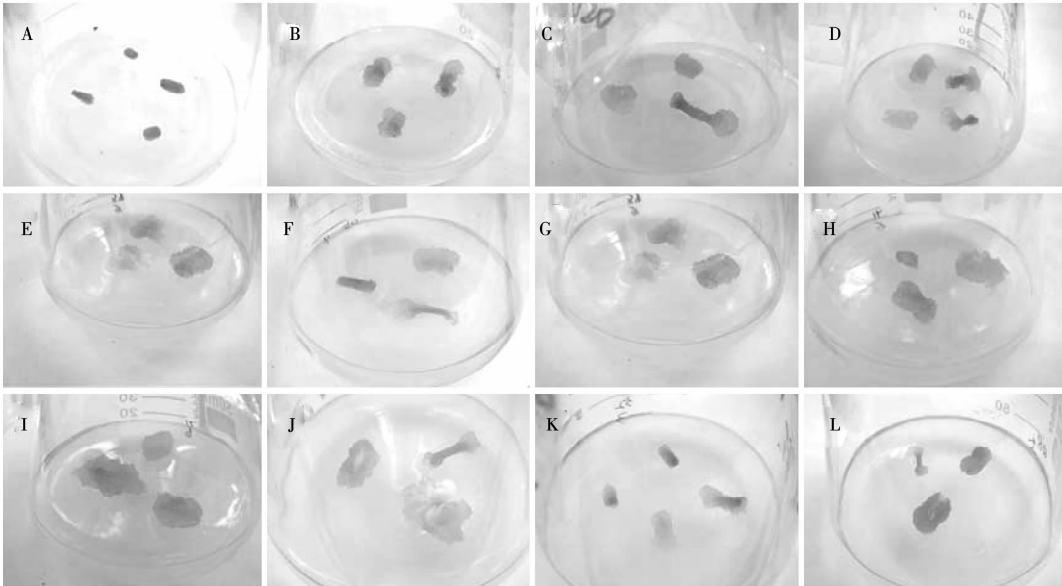
2.3 NAA 对小蓟茎段愈伤组织诱导的影响

三种激素中,NAA 对愈伤组织诱导率最好。愈伤组织出现时间早于对照 4~5 d,愈伤组织呈白绿色,NAA 在 1.5~3.0 mg·L<sup>-1</sup> 条件下,均能诱导得到愈伤组织,在 NAA 浓度低于 2.0 mg·L<sup>-1</sup>、高于 2.7 mg·L<sup>-1</sup>时,愈伤组织质量下

降,且可见明显颜色发暗,浓度 2.0~2.6 mg·L<sup>-1</sup>条件下,愈伤组织呈松软白绿色,细胞透明度较高(见表 4、图 3)。NAA 浓度为 2.7 mg·L<sup>-1</sup>时,诱导系数最高,但愈伤组织质量较低,确定 NAA 浓度为 2.4、2.5、2.6 mg·L<sup>-1</sup>用于茎段愈伤组织诱导正交试验。

表 4 不同浓度 NAA 对小蓟茎形成愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of different NAA concentrations on callus induction of <i>Cirsium setosum</i> stem					
NAA 浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) NAA concentration	诱导率/% Callus inductivity	重量诱导系数 Weight coefficient of induction	愈伤组织颜色 Callus color	生长状态 Growing status	出现愈伤组织天娄/d Days untils callus appearance
0	90	5.60	绿色	+	10
1.5	100	8.24	白绿色发暗	++++	5
2.0	100	9.25	白绿色	++++	5
2.1	100	9.98	白绿色	++++	5
2.2	100	10.08	白绿色	++++	5
2.3	100	9.91	白绿色	++++	5
2.4	100	11.09	白绿色	++++	5
2.5	100	11.12	白绿色	++++	5
2.6	100	10.33	白绿色	++++	5
2.7	100	12.52	白绿色发暗	++++	6
2.8	100	9.62	白绿色发褐	+++	5
3.0	95	10.25	白绿色发黑	++	5



A~L: NAA浓度分别为 0、1.5、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、3.0 mg · LL  
A~L: Concentrations of NAA respectively are 0、1.5、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、3.0 mg · LL

图 3 不同浓度 NAA 诱导下小蓟茎段愈伤组织

Fig. 3 Callus induction of *Cirsium setosum* stem at different NAA concentrations

2.4 正交试验三种激素对小蓟茎愈伤组织诱导影响

2,4-D、6-BA、NAA 浓度的 9 种 MS 培养基均对小蓟茎愈伤组织有较高诱导率,均达 100%,

且质量较好,愈伤组织呈白绿色,细胞透明度一般(见表 5、图 4)。不同浓度重量诱导系数的极差分析显示,3 种激素对小蓟茎愈伤组织诱导的影响主次顺序为 NAA>2,4-D>6-BA。9 种处理愈

伤组织生长状态均较好,2,4-D、6-BA 均以 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 的平均诱导系数为最高,NAA 以 2.4 mg·L<sup>-1</sup> 的平均诱导系数为最高(见表 5)。经验证试验可知,MS+2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup> +6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup> +NAA 2.4 mg·L<sup>-1</sup> 为最佳组合。试验证实,在该培养基中能获得最好效果,呈白绿色,质地松软(见图 5),愈伤组织重量诱导系数为 83.44,为所有激素处理最高。

表 5 小蓟茎诱导愈伤组织的 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 试验结果  
Table 5 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) test results of callus induction of *Cirsium setosum* stem

处理 Treatments	激素浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) Hormone concentration			重量诱导系数 Weight coefficient of induction	诱导率/% Callus inductivity	愈伤组织颜色 Callus color	生长状态 Growing status
	2,4-D	6-BA	NAA				
1	0.6	0.8	2.4	74.02	100	白绿色	+++++
2	0.6	0.9	2.5	50.93	100	白绿色	+++++
3	0.6	1.0	2.6	45.27	100	白绿色	++++
4	0.8	0.8	2.5	38.28	100	白绿色	+++
5	0.8	0.9	2.6	53.57	100	白绿色	+++++
6	0.8	1.0	2.4	59.13	100	白绿色	+++++
7	1.0	0.8	2.6	54.63	100	白绿色	++++
8	1.0	0.9	2.4	60.75	100	白绿色	++++
9	1.0	1.0	2.5	61.40	100	白绿色	+++++
T1	55.740	54.643	63.633				
T2	50.327	55.083	50.203				
T3	58.927	55.267	51.157				
R	8.600	0.623	13.430				

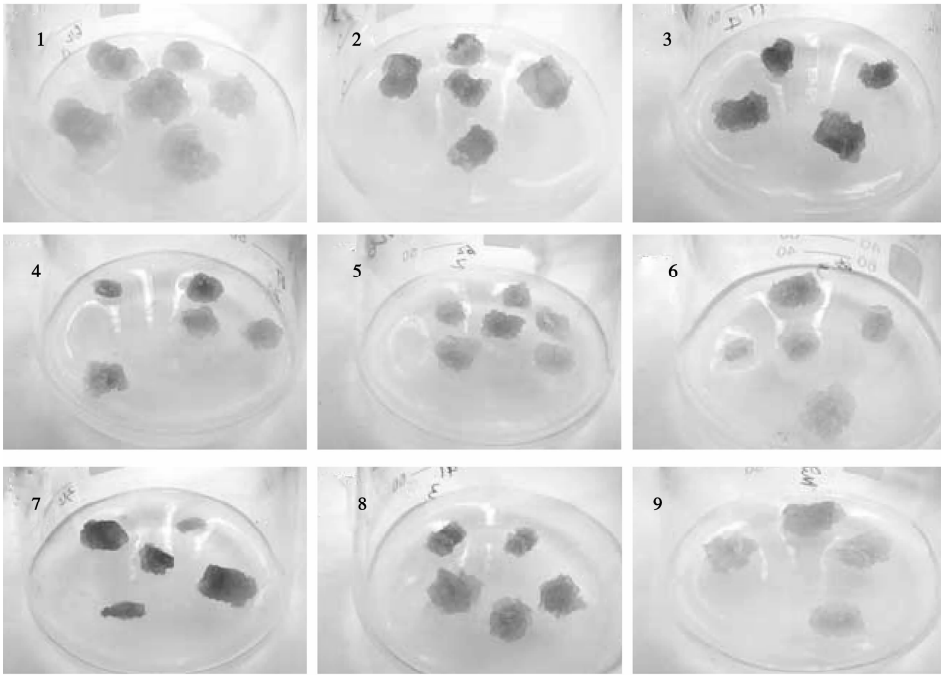


图 4 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计诱导下小蓟茎段愈伤组织  
Fig. 4 Stem callus induction under L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal design

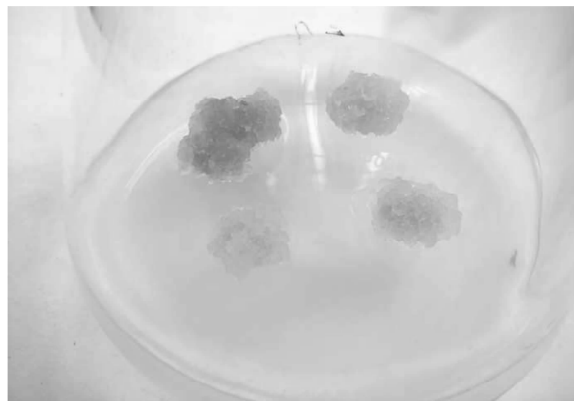


图5 小蓟茎段于 MS+2,4-D  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基愈伤组织生长  
Fig. 5 Stem callus induction under the condition of MS+ 2,4-D  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

### 3 结论与讨论

培养基中激素种类、浓度以及配比均影响植物愈伤组织的生长。本试验以小蓟茎段为外植体,探究 2,4-D、6-BA、NAA 三种激素对小蓟愈伤组织诱导的影响。在不添加任何激素的 MS 培养基上,愈伤组织诱导效果均相对较低,愈伤出现时间较晚。3 种激素不同程度上促进了小蓟愈伤组织的形成。

6-BA 具有促进细胞分裂、组织分化等特点<sup>[3]</sup>,试验显示添加 6-BA,小蓟愈伤诱导效果较差,褐化严重。这与张海兰、解继红等研究类似<sup>[4-5]</sup>。添加 2,4-D 与 NAA,愈伤组织诱导效果均较好,2,4-D 较 NAA 更适合小蓟愈伤组织诱导,与萝卜愈伤组织诱导因素相似<sup>[6]</sup>。三种激素组合显著提高小蓟愈伤组织效果,尤以 2,4-D  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组合明显。

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志(第一分册)[M]. 北京:科学出版社,1991:569.
- [2] 孟永海. 小蓟的化学成分研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2007.
- [3] Moncalean P, Rodriguez A, Fernandez B. In vitro response of *Actinidia deliciosa* explants to different BA incubation periods[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 67(3):257-266.
- [4] 解继红,云锦凤,杨斌,等. 2,4-D 和 BAP 对蒙古冰草幼胚愈伤组织诱导及生长的影响[J]. 中国草地,2006,28(2):44-47.
- [5] 张海兰,林晓佳,赵博光. 激素对黑松愈伤组织褐变和增殖的作用[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2002,33(4):413-417.
- [6] 胡伟,陈豫,伍洋. 不同激素浓度配比对萝卜愈伤组织形成的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):60-62.

## Effect of Different Concentrations of Three Kinds of Hormone on Callus Induction of *Cirsium setosum* Stem

HE Yi-hang<sup>1,2</sup>, HUANG San-yin<sup>1</sup>, DENG Kai-yuan<sup>1</sup>, FANG Ye-hong<sup>1</sup>, PAN Yu-xin<sup>1</sup>

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063009; 2. Tangshan No. 12 High School, Tangshan, Hebei 063009)

**Abstract:** In order to further develop and use *Cirsium setosum*, the effect of 2,4-D, 6-BA and NAA for *Cirsium setosum* callus induction were discussed by single factor and orthogonal test. The results showed that under single factor, 2,4-D optimal concentration range from 0.8 to  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 6-BA range from 0.8 to  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and NAA range from 2.4 to  $2.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Orthogonal test results showed that the MS + 2,4-D  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  medium induced best callus. The three kinds of hormones all could promote *Cirsium setosum* stem callus formation and growth.

**Keywords:** *Cirsium setosum*; stem; callus; induction

### 致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网络出版总库》及 CNKI 等系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部