

用生长诱导值筛选地灵愈伤组织诱导培养基

肖娅萍, 王孝安, 胡雅琴

(陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 采用正交试验设计, 以地灵根状茎为外植体, 引入综合定量指标—生长诱导值筛选愈伤组织诱导培养基。结果表明: 生长诱导值具有简单、直观、量化、实用的特点。不仅有利于研究人员定量比较观察, 而且有助于经验较少的研究人员在短时间内掌握选择培养基的方法。

关键词: 生长诱导值; 地灵; 组织培养; 最佳方法

中图分类号: Q 945.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274X (2002)05-0569-02

在植物组织培养中, 培养基的种类、成分很多, 这些成分之间具有相互影响和作用, 所以研究时应找出最佳培养基及最适合的条件。多数研究者用单因素试验法进行培养基筛选^[1], 部分研究人员用正交试验设计^[2]。但是, 在确定最佳培养基时, 均用定性指标或经验观察值。本文选取唇形科(Labiatae)水苏属(*Stachys*)植物地灵(*Stachys* sp.)为研究材料, 采用综合定量指标—生长诱导值确定最佳培养基, 不仅有利于定量比较观察, 而且有助于经验不足者在短时间内掌握选择培养基的方法。

地灵原产我国北部, 种植历史悠久。研究发现, 地灵含有丰富的水苏糖, 是一种双歧因子低聚糖, 是低聚糖类中惟一能从植物中大量提取的天然产物, 具有明显而独特的生物活性和优良的理化特性及纯正的口感, 与其他经发酵生产的低聚糖相比, 有明显优势。能调节人体微生态环境, 促进钙吸收, 降低胆固醇, 治疗高血压、高血脂、老年骨质疏松、糖尿病等多种疾病, 具有良好的保健和药用价值, 最适老人、非母乳喂养儿和亚健康者, 市场前景广阔^[3]。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用材料采自河南省洛阳地区, 标本经陕西师范大学生命科学学院植物教研室田先华副教授鉴定。外植体为根状茎。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得 外植体流水冲洗1~2 h后, 剪成茎段, 置于三角瓶中, 70%酒精处理15~20 s, 0.1%升汞进行表面消毒7~15 min, 无菌水冲洗5~6次, 除去消毒液, 在无菌条件下接种于起始培养基上。

1.2.2 培养基及培养条件

1) 起始培养基 采用1/2MS培养基, 不添加任何激素, 附加2%的蔗糖, 0.5%~0.8%的琼脂粉。调节培养基pH5.8~6.2, 于1.1 kg/cm³压力和121℃下灭菌25~35 min。

2) 诱导及增殖培养基 为观察培养基成分对外植体生长发育、愈伤组织形成的影响, 我们采用3因素(培养基、细胞分裂素、生长素)、3水平(以MS培养基为基本培养基, 大量元素略加变化成3个水平; 细胞分裂素和生长素分别采用BA和IAA, 每种生长素取3个浓度)的正交设计, 设置了9组培养基, 用于诱导愈伤组织的发生。培养基附加有3%的蔗糖, 0.5%~0.8%的琼脂粉, pH5.8~6.2。

3) 培养条件 培养室的温度保持25±3℃, 每天光照10~12 h, 照度为2 000~3 000 lx。

2 结果与分析

试验结果见表1。

培养21天后, 3~7号培养基中的外植体均未

收稿日期: 2001-06-24

基金项目: 教育部科研基金重点资助项目(98088)

作者简介: 肖娅萍(1956-), 女, 湖北武汉人, 陕西师范大学副教授, 从事植物学研究。

表 1 地灵根状茎愈伤组织的生长及诱导统计表

Tab 1 The statistic tabulation of growth and inducement of callus carcinogenic rhizome of *Stachys* sp

培养基序号	未褐化外植体/%	诱导率/%	生长势	诱导值
1	19	25	20	21
2	10	24	20	18
3	100	100	100	100
4	100	87	80	89
5	100	89	100	96
6	100	92	60	84
7	100	93	80	91
8	75	92	40	69
9	10	75	20	35

注:表中接种外植体数为 45;未褐化外植体为培养 21 天后,愈伤组织生长势采用等级得分法,长势旺盛记 100,良好记 80,一般记 60,较差记 40,差记 20。

褐化,8 号培养基中外植体有 25% 褐化,而 1, 2, 9 号培养基则较差,80% 以上的外植体褐化。就愈伤组织的诱导而言,3 号培养基中的外植体均诱导出愈伤组织,4~ 8 号培养基诱导率在 90% 左右,9 号为 75%,而 1, 2 号愈伤组织诱导率仅为 25% 左右。从愈伤组织的生长势来看,3, 5 号培养基中的愈伤组织长势旺盛,呈绿色,部分略发白;4, 7 号愈伤组织长势良好,愈伤组织略呈黄绿色;6 号愈伤组织长势一般,愈伤组织略呈黄褐色,且边缘略干燥;8 号培养基中的愈伤组织长势较差,呈黄褐色,表面较干燥,边缘收缩状;1, 2, 9 号愈伤组织生长势最差,呈褐色,表面干燥。

为了用尽可能少的试验组合来筛选最佳培养基,我们引入了生长诱导值的概念,应用该值来选择培养基。生长诱导值为培养一定时间(本文采用 21 天)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。

在本研究中,由表 1 可知:3 号培养基 21 天后所有外植体均未褐化,每个外植体均诱导出愈伤组织,而且愈伤组织生长旺盛,其生长诱导值最大,为 9 组中最好的一组。其次为 5 号培养基,尽管其 21 天后所有外植体均未褐化,愈伤组织生长旺盛,但其愈伤组织诱导率仅为 89%,生长诱导值为 96。2 号培养基在所有组中是最差的,培养 21 天后外植体仅 10% 未褐化,仅有 24% 的外植体诱导出愈伤组

织,且愈伤组织生长势差,其生长诱导值仅为 18。

由此可见,生长诱导值是一个综合性指标,它刻划了地灵组织培养初期愈伤组织诱导与生长阶段的主要特征。其优越性在于该值计算简单、方便,结果直观、实用。应用生长诱导值可快速筛选出最优培养基。100 生长诱导值 0,在应用中,最优培养基应是生长诱导值最大的。

与此同时,我们还进行了利用地灵组培苗的茎、叶作为外植体,采用正交设计法进行愈伤组织诱导,应用生长诱导值选择培养基的验证试验,结果显示:生长诱导值高的愈伤组织诱导率高、生长旺盛,说明可利用生长诱导值快速选择培养基。

3 讨 论

在植物组织培养中,培养基的筛选是一个非常重要的环节。植物的细胞分化与脱分化本身是一个较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^[4,5]。故而常规植物组织培养首要的问题是找出最佳培养基及最适合的培养条件。研究人员通常采用单因素试验法或正交试验设计^[1,2],但在确定最佳培养基时,均采用定性指标或经验观察,这对于初学者来讲是比较难掌握的,通常要花大量的时间来筛选培养基,使其成为影响组培速度的一个限制因素。

在长期的组培实践中,我们发现外植体的生长、褐化、愈伤组织的诱导率及生长势等之间具有明显的相关性,于是引入了生长诱导值的概念。我们所提出的生长诱导值为培养一定时间(本文采用 21 天)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,它是一个综合性指标,刻划了植物组织培养过程初期诱导愈伤组织阶段的主要特征,其大小表示了某种植物组织培养中愈伤组织诱导的状况。该值越大,表明愈伤组织的诱导率及生长势愈好。在本研究中,我们应用生长诱导值方便而快捷地筛选出了地灵根状茎及茎、叶愈伤组织诱导的最佳培养基。在其他植物(如桔梗、苦皮藤、南蛇藤、苹果、葡萄等)的愈伤组织诱导中,也有类似结果。综合多次实验结果考虑,我们认为生长诱导值大于 85 时,该培养基为较合适的培养基;若生长诱导值小于 85、大于 60,此培养基应部分调整;若生长诱导值小于 60,则该培养基应重新设计。(下转第 572 页)

New records of butterflies of Shaanxi province in Changqing national nature reserve

XING Lian-xi¹, YUAN Zhao-hui²

(1. Life science College, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. The Bureau of Changqing National Nature Reserve, Yangxian County, Shaanxi Province 723300, China)

Abstract A fauna of butterfly in Changqing National Nature Reserve was conducted in different seasons from April to August 2001. 17 species and 1 family (Acræidae) were found to be new records of Shaanxi province

Key words: butterflies; Changqing natural reserve; Shaanxi province; new record

(上接第 570 页)

在做了多次重复试验后,我们发现生长诱导值具有计算方法简单、结果直观、量化、实用的特点。它不仅有利于研究人员定量比较观察,而且有助于经验较少的研究人员在短时间内掌握选择培养基的方法。

参考文献:

- [1] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1999.45-50
- [2] 杜勤,王振华,张俊荣.正交设计在何首乌组织培养中的应用[J].中草药,1999,30(7):537-539.
- [3] 郑建仙.功能性食品[M].北京:中国轻工业出版社,1997.136-154
- [4] 孙敬三.浙贝母愈伤组织培养和器官再生[J].植物学报,1977,19:161-162
- [5] BREAT T, CARLE V. Development of an automated plant culture system [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1985, 5(2): 107.

(编辑 徐象平)

Sieving culture medium inducing callus carcinogenic rhizome of *Stachys* sp with growth inducement value

XIAO Ya-ping, WANG Xiao-an, HU Ya-qin

(Life Science College, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract The growth inducement value, which is a comprehensive quantitative index, was led into defining the optimum culture medium. Using orthogonal design, the culture medium inducing callus was sieved with the rhizome of *Stachys* sp. as the explant. The results showed the growth inducement value had the characteristics of simple, object, quantitative and practical. The value was not only advantageous to the research workers quantitatively, but also conducive to the elementary research workers to know the method sieving the culture medium in a short time.

Key words: growth inducement value; *Stachys* sp.; tissue culture; optimum method