

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201607020

引文格式: 黄奥丹, 蓝增全, 吴田. 诺丽叶片的离体再生 [J]. 广西植物, 2017, 37(6):749-756

HUANG AD, LAN ZQ, WU T. Regeneration of leaves of noni [J]. Guihaia, 2017, 37(6):749-756

## 诺丽叶片的离体再生

黄奥丹<sup>1</sup>, 蓝增全<sup>1\*</sup>, 吴田<sup>2</sup>

( 1. 西南林业大学 环境科学与工程学院, 昆明 650224; 2. 西南林业大学 园林学院, 昆明 650224 )

**摘要:** 以诺丽 (*Morinda citrifolia*) 叶片为外植体, 在添加不同激素种类和浓度的 MS 培养基上进行离体培养, 建立两种离体再生模式: 模式 I 为先脱分化愈伤组织, 再分化不定根和不定芽; 模式 II 为直接培养生根后分化不定芽。结果表明: 在模式 I 中, 诱导诺丽叶片产生愈伤组织的最优培养基为 MS + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D; 诱导叶片愈伤组织再分化出不定根和不定芽的最优培养基为 MS + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA 或 MS + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA, 其中 MS + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA 生根时间最早为 10 d 左右, 根系较发达, 而 MS + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA 生根时间在 15 d 左右, 根系发达。在模式 II 中, 诱导叶片直接生根长芽的培养基为 MS + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA。将模式 I 和模式 II 中, 完成诺丽叶片离体再生的苗切下后接种到 MS + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA 培养基中诱导生根, 15 d 左右分化出不定根, 45 d 获得完整植株。该研究结果为后续的遗传转化和基因改良研究奠定了基础。

**关键词:** 诺丽, 植物激素, 愈伤组织, 再生培养

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2017)06-0749-08

## Regeneration of leaves of noni

HUANG Ao-Dan<sup>1</sup>, LAN Zeng-Quan<sup>1\*</sup>, WU Tian<sup>2</sup>

( 1. College of Environmental Science and Engineering, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

2. College of Horticulture and Gardening, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China )

**Abstract:** Using noni (*Morinda citrifolia*) leaves as explant for culture *in vitro* on 3% MS medium with different types and concentrations of plant hormones, two kinds of *in vitro* regeneration modes were built. Mode I: the callus was induced first, and then the adventitious roots and buds were induced; Mode II: the adventitious roots were induced, and then the buds were induced directly. The results showed that the optimal medium of generating callus by noni leaves in Mode I was MS + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D; the optimal medium that induced leaf callus to generate adventitious roots and buds was MS + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA or MS + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA. Thereinto, the solution of MS + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA made the rooting time earlier, about 10 d, and its root system was more developed. Instead, the solution of MS + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA made it 15 d. The optimal medium that induced leaves to generate roots and buds in mode II was MS + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA. Cutting and transplanting the seedlings regenerated *in vitro* from model I and Model II into MS + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA medium to induce rooting. Getting the differentiation of adventitious root about 15 d and complete plant 45 d. This study provides useful references for the breeding and the application of genetic

收稿日期: 2016-08-30 修回日期: 2016-10-21

基金项目: 云南省自然科学基金(2016FB049); 国家林业局推广项目([2015]27号); 中西部高等学校青年骨干教师国内访问学者项目(2016.9-2017.9)[Supported by the Natural Science Foundation of Yunnan Province; the Promotion Program of the State Forestry Administration([2015]27); the Program of Domestic Visiting Scholars of Young Backbone Teachers in Middle and Western Colleges and Universities(2016.9-2017.9)]。

作者简介: 黄奥丹(1992-), 女, 云南昆明人, 硕士研究生, 研究方向为植物生理生态学, (E-mail)540870551@qq.com。

\*通信作者: 蓝增全, 教授, 研究方向为植物生态学, (E-mail)kmlanzenquan@qq.com。

transformation technique in noni.

**Key words:** noni, plant hormones, callus, regeneration of culture

诺丽 (*Morinda citrifolia*) 又称海滨木巴戟、海巴戟天、檄树 (吴田和蓝增全, 2011; 曹艳花, 2014), 为茜草科 (Rubiales) 巴戟天属 (*Morinda*) 植物 (杨小波 2013), 是一种热带常绿多年生阔叶灌木或小乔木。主要生长于温暖潮湿的热带、亚热带地区, 在国外主要分布于南太平洋诸岛, 如大溪地、夏威夷、印度尼西亚等, 在我国主要生长于海南岛、西沙群岛、云南西双版纳及台湾南部等地区 (何明霞和杨清, 2006)。现代医学研究证明, 诺丽果汁中具有免疫调节及抗肿瘤作用的多糖成分 (张学梅, 2000), 果实单用或与其他植物合用可治疗多种疾病, 被医学研究者称为当代神奇的治疗物质 (赖茂良, 2014)、(段文荣等, 2009), 有较高的经济价值。

早在 2000 多年前, 波利尼亚人就用诺丽叶片治疗疾病 (张伟敏等, 2008), 以及为服装染色 (白飞荣等, 2015)。诺丽鲜叶可以直接咀嚼, 或者加水熬汁或浸泡饮用, 也可晒干磨成粉末。在巴西诺丽叶被称为“止痛草”, 其对牙龈炎、牙周病、喉痛、感冒、头疼、骨折、皮肤病等均有一定功效 (杨焱等, 2009)。吴田和蓝增全 (2011) 以带腋芽的茎段为外植体对诺丽进行离体培养, 建立了高效的离体快速繁殖体系; 谢江等 (2012) 和潘晓晴等 (2014) 分别以根和不带腋芽的茎段为外植体, 进行诺丽离体再生培养研究; 而以诺丽叶片为外植体的离体培养研究还未见报道。无菌培养条件下, 诺丽根较细, 诺丽茎段较短, 而诺丽叶片较大, 作为外植体更容易获得。因此, 本研究以诺丽无菌试管苗叶片为外植体, 进行离体再生培养研究, 以期为后续的遗传转化及基因改良研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

实验材料为西南林业大学园林学院组培室的诺丽无菌试管苗, 取健康、无菌诺丽苗的叶片为外植体。试管苗每 90 d 左右继代一次, 继代培养基为 MS + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA。

### 1.2 培养基配制

以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA、NAA 及 2,4-D, 共设计 38 种培养基 (表 1); 再加琼

脂 0.6%、蔗糖 3%, pH 5.8, 分装, 121 °C 灭菌 20 min。

### 1.3 接种与培养

将诺丽无菌苗叶片, 剪去叶尖和叶缘, 剪成 0.5 cm × 0.5 cm 方片, 正面向上放于离体再生培养基上, 确保其与培养基充分接触。每瓶培养基中接种 5 块叶片, 每种培养基接种 10 瓶。接种后, 将材料置于光照强度 1 500 lx (12 h · d<sup>-1</sup>)、温度 (28 ± 2) °C 的条件培养。培养过程中每 5 d 观察 1 次, 统计培养物的形态、颜色和生长情况。以上实验重复 3 次。

### 1.4 离体再生苗生根

将长至 2~4 cm 的诺丽叶片离体再生苗茎尖切下后, 在 MS + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA 培养基上继续诱导生根。观察生根时间和过程, 最终获得完整植株。

### 1.5 数据分析

愈伤组织诱导率 (%) = 产生愈伤组织的外植体数 / 成活的外植体数; 不定根分化率 (%) = 不定根分化的外植体数 / 成活外植体数; 不定芽分化率 (%) = 不定芽分化的外植体数 / 成活外植体数。

数据用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 19.0 统计软件进行计算和方差分析, 在方差分析的基础上, 用 Duncan 法进行多重比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 先诱导脱分化愈伤组织, 再诱导不定根和不定芽

2.1.1 不同激素组合对叶片愈伤组织诱导影响 由方差分析可知, 不同激素组合对叶片愈伤组织的诱导存在一定影响 (表 2)。叶片在 6-BA 和 2,4-D 配合使用的培养基上, 脱分化能力较好, 可在 20 d 左右形成嫩黄色接近透明的疏松的愈伤组织 (图 1: A)。在 6-BA 浓度分别为 2.0、3.0、4.0 mg · L<sup>-1</sup> 同时配合使用 NAA 的培养基上, 在培养 15 d 左右沿叶片主脉出现膨大, 并逐渐形成愈伤组织。当 6-BA 浓度为 2.0 mg · L<sup>-1</sup>, NAA 浓度分别为 0.1、0.2、0.3 mg · L<sup>-1</sup> 时, 叶片能诱导出黄白色颗粒, 质地疏松的愈伤组织 (图 1: B), 但愈伤组织脱分化能力一般。当 6-BA 浓度为 3.0 mg · L<sup>-1</sup>, NAA 浓度为 0.1、0.2、0.3 mg · L<sup>-1</sup> 时, 叶片能诱导出嫩绿色愈伤组织 (图 1: C)。当 NAA 浓度高于 0.3 mg · L<sup>-1</sup> 时, 愈伤组织

表 1 不同激素浓度的培养基  
Table 1 Different combinations of various hormone concentrations

培养基编号 Medium code	激素浓度 Hormone concentration ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )			培养基编号 Medium code	激素浓度 Hormone concentration ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	
	6-BA	NAA	2,4-D		6-BA	NAA
1	0.05	—	1.00	20	1.00	0.40
2	0.10	—	1.00	21	1.50	0.05
3	0.20	—	1.00	22	1.50	0.10
4	0.05	—	2.00	23	1.50	0.15
5	0.10	—	2.00	24	1.50	0.20
6	0.20	—	2.00	25	2.00	0.05
7	0.50	—	—	26	2.00	0.10
8	1.00	—	—	27	2.00	0.15
9	1.50	—	—	28	2.00	0.20
10	2.00	—	—	29	2.00	0.30
11	0.50	0.05	—	30	2.00	0.40
12	0.50	0.10	—	31	3.00	0.10
13	0.50	0.15	—	32	3.00	0.20
14	0.50	0.20	—	33	3.00	0.30
15	1.00	0.05	—	34	3.00	0.40
16	1.00	0.10	—	35	4.00	0.10
17	1.00	0.15	—	36	4.00	0.20
18	1.00	0.20	—	37	4.00	0.30
19	1.00	0.30	—	38	4.00	0.40

为黄褐色(图 1: D)。当 6-BA 浓度高于  $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,愈伤组织为黄褐色且脱分化能力弱诱导率低。将诱导出的愈伤组织转接至原培养基中继续增殖继代培养,每 20 d 更换一次新鲜培养基,除 6-BA 和 2,4-D 配合使用的培养基,愈伤组织可在继代培养基中不断增殖,且愈伤组织质地更加疏松呈泥状,黄色接近透明;其余在 6-BA 和 NAA 配合使用的培养基上继代,愈伤组织增殖能力较弱,并逐渐褐化死亡。在 6-BA 浓度为  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2,4-D 浓度为  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,愈伤组织脱分化能力最好,诱导的愈伤组织质地松散成泥状、黄色接近透明,诱导 20 d、诱导率高达 96.67%,并可不断增殖继代培养。因此,诱导诺丽叶片产生愈伤组织的最优培养基为  $\text{MS} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}$ 。

2.1.2 不同激素组合对诺丽叶片愈伤组织不定根不定芽诱导影响 将诺丽叶片愈伤组织转移至芽或根诱

导培养基中(表 3),发现单独使用 6-BA 无任何不定芽或不定根分化,而配合使用了 NAA 的培养基,在 6-BA 浓度  $1.0 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  之间,不定根分化率随 NAA 浓度的增加而升高;在 6-BA 浓度  $3.0 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  之间,不定根分化率随 NAA 浓度的增加而减低。同时,在 6-BA 浓度  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA 浓度  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 6-BA 浓度  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA 浓度  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时芽分化率最高达 70.67% ( $P > 0.05$  差异不显著)。

通常在分化培养基培养 10~15 d 左右,开始分化不定根(图 2: A),而后长出发达根系(图 2: B); 40 d 左右时分化出不定芽(图 2: C)。综合不定根和不定芽分化两方面因素,诺丽叶片愈伤组织不定根不定芽诱导最佳培养基为  $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$  或  $\text{MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ , 两种培养基之间不定芽分化率差异不显著 ( $P > 0.05$ ),其中  $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

表 2 不同激素组合对叶片愈伤组织诱导影响

Table 2 Effects of different combinations of various hormone concentrations on callus induction

培养基 编号 Medium code	激素浓度 Hormone concentration (mg · L <sup>-1</sup> )			外植 体数 Explant number	愈伤诱导数 Induction number of callus	愈伤诱导率 Induction rate of callus (%)	培养天数 Culture days (d)	愈伤颜色 Color of callus	愈伤质地 Texture of callus	愈伤组织脱 分化能力 Differentiation ability of callus	愈伤组织 增殖能力 Callus proliferation ability
	6-BA	NAA	2,4-D								
1	0.05	—	1.00	50	41.67 ± 0.47	83.33 ± 0.94c	20	嫩黄 Bright yellow	疏松 Loose	+++	+++
2	0.10	—	1.00	50	46.00 ± 0.82	92.00 ± 1.63b	20	嫩黄 Bright yellow	疏松 Loose	++++	++++
3	0.20	—	1.00	50	40.67 ± 0.82	81.33 ± 0.94cd	20	嫩黄 Bright yellow	疏松 Loose	+++	+++
4	0.05	—	2.00	50	47.00 ± 0.82	94.00 ± 1.63b	20	嫩黄、透明 Bright yellow, transparent	泥状疏松 Loose mud	++++	++++
5	0.10	—	2.00	50	48.33 ± 0.47	96.67 ± 0.94a	20	嫩黄、透明 Bright yellow, transparent	泥状疏松 Loose mud	++++	++++
6	0.20	—	2.00	50	40.33 ± 0.47	80.67 ± 0.94d	20	嫩黄 Bright yellow	泥状疏松 Loose mud	+++	++
26	2	0.1	—	50	28.33 ± 0.47	56.67 ± 0.94h	15	黄白 White	颗粒、疏松 Granular, loose	++	+
28	2	0.2	—	50	34.00 ± 0.00	68.00 ± 0.00g	15	黄白 White	颗粒、疏松 Granular, loose	++	+
29	2	0.3	—	50	35.67 ± 0.47	71.33 ± 0.94f	20	黄白 White	颗粒、疏松 Granular, loose	+++	+
30	2	0.4	—	50	22.67 ± 0.47	45.33 ± 0.94i	15	黄褐 Tawny	紧致 Compact	+	+
31	3	0.1	—	50	35.00 ± 0.82	70.00 ± 1.63fg	15	嫩绿 Tender green	紧致 Compact	++	++
32	3	0.2	—	50	35.33 ± 0.47	70.67 ± 0.94f	15	嫩绿 Tender green	紧致 Compact	++	++
33	3	0.3	—	50	37.33 ± 0.47	74.67 ± 0.94e	20	嫩绿 Tender green	紧致 Compact	+++	++
34	3	0.4	—	50	13.00 ± 0.00	26.00 ± 0.00l	25	黄绿 Kelly	紧致 Compact	+	+
35	4	0.1	—	50	12.33 ± 0.47	24.67 ± 0.94l	25	黄褐 Tawny	紧致 Compact	+	+
36	4	0.2	—	50	18.67 ± 0.47	37.33 ± 0.94k	25	黄褐 Tawny	紧致 Compact	+	+
37	4	0.3	—	50	28.00 ± 0.82	55.33 ± 1.89h	25	黄褐 Tawny	紧致 Compact	+	+
38	4	0.4	—	50	21.33 ± 0.47	42.67 ± 0.94j	25	黄褐 Tawny	紧致 Compact	+	+

注：同列不同小写字母之间表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，相同字母之间表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )，下同。+ 愈伤组织增殖和脱分化能力差；++ 愈伤组织增殖和脱分化能力一般；+++ 愈伤组织增殖和脱分化能力好；++++ 愈伤组织增殖和脱分化能力最好。

Note: Different lower cases in a same column mean significant differences ( $P < 0.05$ ), the same lower cases mean no significant differences ( $P > 0.05$ ), the same below. Differentiation ability of callus and callus proliferation ability: + is poor; ++ is general; +++ is good; ++++ is best.

NAA 生根时间为 10 d 左右，根系较发达；而 MS + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA 生根时间在 15 d 左右，根系发达。

## 2.2 直接诱导生根后诱导不定芽

叶片在 6-BA 浓度为 1.0~2.0 mg · L<sup>-1</sup> 的培养基中培养 10~15 d，不定根沿叶片主脉处分化(图 3:

A)，随后长成发达根系(图 3: B)；培养 50 d 左右分化出不定芽(图 3: C)，最终完成离体再生(图 3: D)。其中 6-BA 浓度 1.0 mg · L<sup>-1</sup>、NAA 浓度 0.4 mg · L<sup>-1</sup> 时，芽和根的分化率分别为 66.67% 和 74%。综合不定根和不定芽分化两方面因素，离体叶片再生最佳培养基为 MS + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> NAA。

表 3 不同激素组合对叶片愈伤组织诱导不定根和不定芽影响

Table 3 Effects of different combinations of various hormone concentrations on adventitious root and bud induction by leave callus

培养基 编号 Medium code	激素浓度 Hormone concentration (mg · L <sup>-1</sup> )		不定根开始 分化时间 Initial time of rooting (d)	接种数 Inocu- lation number	不定根 分化数 Rooting number	不定根 分化率 Rooting rate (%)	不定根 生长状况 Growth situation of root	不定芽 分化数 Budding number	不定芽 分化率 Budding rate (%)
	6-BA	NAA							
7	0.50	—	0	50	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00k	—	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00h
8	1.00	—	0	50	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00k	—	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00h
9	1.50	—	0	50	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00k	—	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00h
10	2.00	—	0	50	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00k	—	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00h
16	1	0.1	10	50	27.67 ± 0.94	55.33 ± 1.89d	+++	21.00 ± 0.82	42.00 ± 1.63e
18	1	0.2	10	50	36.67 ± 0.94	73.33 ± 1.89b	++++	28.67 ± 1.25	57.33 ± 2.49c
19	1	0.3	10	50	36.67 ± 0.47	73.33 ± 0.94b	++++	30.67 ± 0.47	61.33 ± 0.94b
20	1	0.4	10	50	44.00 ± 0.82	88.00 ± 1.63a	++++	35.33 ± 1.25	70.67 ± 2.49a
26	2	0.1	15	50	16.00 ± 0.00	32.00 ± 0.00f	++	35.00 ± 0.82	70.00 ± 1.63a
28	2	0.2	15	50	18.00 ± 0.82	36.00 ± 1.63e	++	18.67 ± 0.47	37.33 ± 0.94f
29	2	0.3	15	50	27.00 ± 0.82	54.00 ± 1.63d	+++	30.67 ± 0.94	61.33 ± 1.89b
30	2	0.4	15	50	33.33 ± 1.25	66.67 ± 2.49c	+++	35.33 ± 0.47	70.67 ± 0.94a
31	3	0.1	15	50	27.33 ± 0.47	54.67 ± 0.94d	+++	25.33 ± 0.94	50.67 ± 1.89d
32	3	0.2	15	50	8.67 ± 1.25	17.33 ± 2.49h	+	9.00 ± 0.00	34.00 ± 1.63g
33	3	0.3	15	50	4.67 ± 0.47	9.33 ± 0.94i	+	9.00 ± 0.82	18.00 ± 1.63h
34	3	0.4	15	50	3.33 ± 0.47	6.67 ± 0.94j	+	5.67 ± 0.94	11.33 ± 1.89i
35	4	0.1	24	50	11.00 ± 0.82	22.00 ± 1.63g	+	3.67 ± 0.47	7.33 ± 0.94j
36	4	0.2	0	50	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00k	—	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00h
37	4	0.3	0	50	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00k	—	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00h
38	4	0.4	0	50	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00k	—	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00h

注：+ 不定根长势差；++ 不定根长势一般；+++不定根长势好；++++不定根长势最好。下同。

Note: Using different numbers of plus signs to mark different growth situation of adventitious roots; + is poor; ++ is general; +++ is good; ++++ is best. The same below.

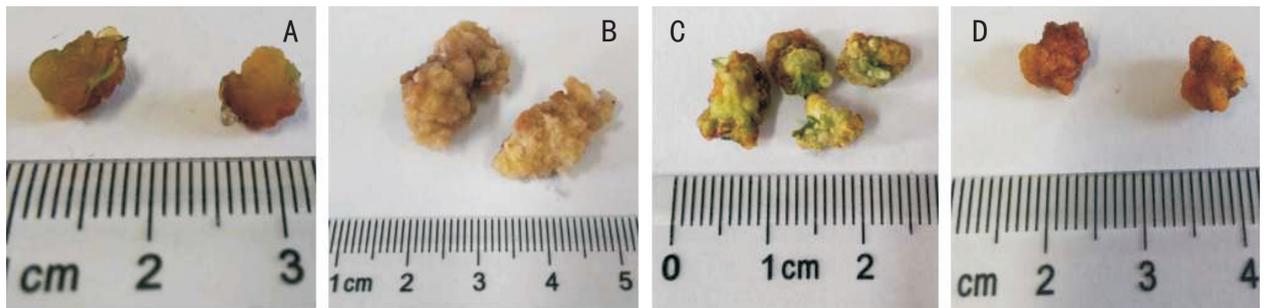


图 1 诺丽叶片诱导出的愈伤组织 A. 黄色泥状愈伤组织；B. 黄白色颗粒愈伤组织；C. 嫩绿色紧致愈伤组织；D. 黄褐色紧致愈伤组织。

Fig. 1 Callus induced from noni leaves A. Yellow mud callus; B. White granular callus; C. Tender green compact callus; D. Tawny compact callus.

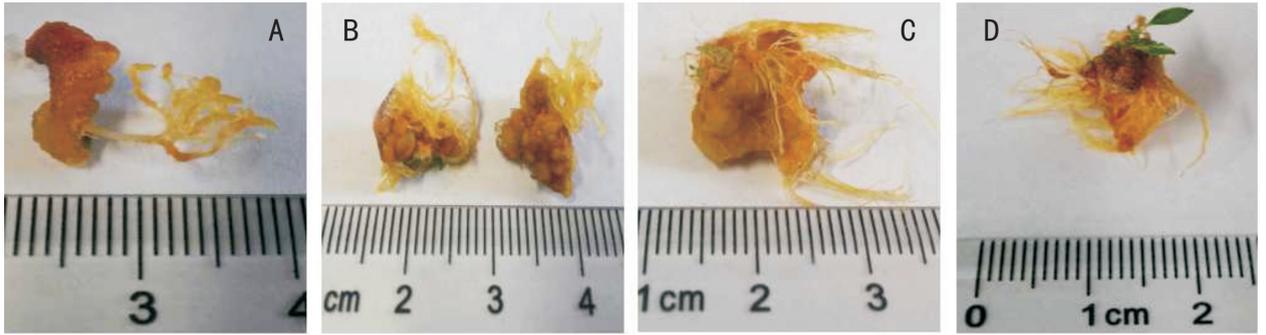


图2 诺丽叶片愈伤组织诱导分化出的不定根和不定芽 A. 通过愈伤组织诱导分化出的根; B. 分化出发达根系; C. 诱导分化出的不定芽; D. 完成离体再生。

Fig. 2 Adventitious root and bud from the callus of noni leaves A. Adventitious root from the callus; B. Grow out developed root; C. Adventitious bud; D. Regeneration *in vitro* complete.

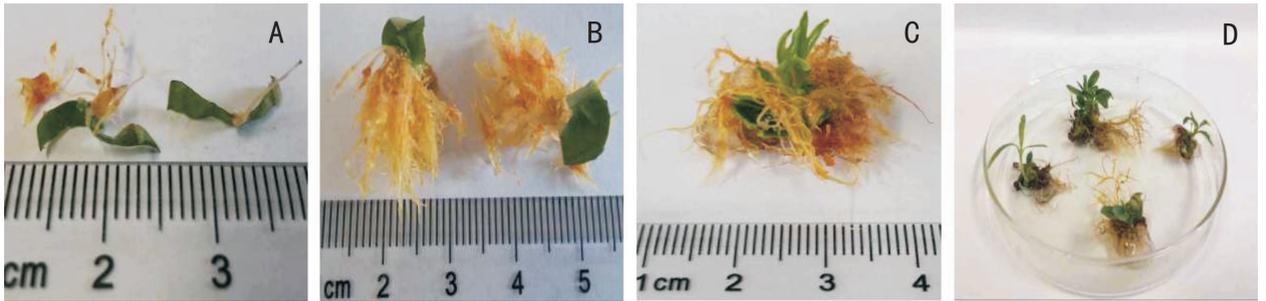


图3 诺丽叶片直接诱导根和芽的分化 A. 沿主脉分化不定根; B. 分化发达根系; C. 分化不定芽; D. 完成离体再生。

Fig. 3 Adventitious root and bud from the noni leaves A. Grow out root along main vein; B. Grow out developed root system; C. Grow bud; D. Regeneration *in vitro* complete.

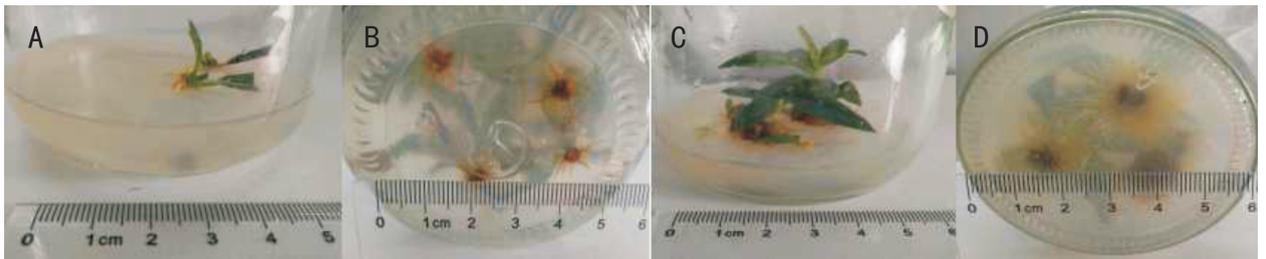


图4 诺丽离体叶片再生苗生根 A. 15 d左右分化出不定根; B. 30 d分化出根系; C. 45 d左右获得完整植株; D. 完整植株分化出发达根系。

Fig. 4 Regeneration plant rooting of noni leaves A. Grow out root about 15 d; B. Grow out root system about 30 d; C. Complete plant growth about 45 d; D. Complete plant differentiation of root system.

### 2.3 离体再生苗生根

将诺丽叶片完成离体再生的苗切下后接种到 MS + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA 培养基上继续诱导生根, 10 d 左右在切口处形成愈伤组织, 15 d 后分化出不定根(图4: A), 30 d 左右分化出根系(图4: B), 45 d 后获得再生苗完整植株(图4: C)并分化出发达根

系(图4: D)。

## 3 讨论与结论

### 3.1 不同种类激素对叶片分化的影响

本研究以诺丽叶片为外植体, 首次建立了诺丽

表 4 不同激素组合对叶片直接诱导不定根和不定芽影响

Table 4 Effects of different combinations of various hormone concentration on adventitious root and bud induction direct

培养基 编号 Medium code	激素浓度 Hormone concentration (mg · L <sup>-1</sup> )		不定根开始 分化时间 Initial time of rooting (d)	接种数 Inoculation number	不定根 分化数 Rooting number	不定根 分化率 Rooting rate (%)	不定根 生长状况 Growth situation of root	不定芽 分化数 Budding number	不定芽 分化率 Budding rate (%)
	6-BA	NAA							
11	0.50	0.05	24	50	31.00 ± 0.82	62.00 ± 1.63ef		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00k
12	0.50	0.10	24	50	27.33 ± 1.25	54.67 ± 2.49h	+++	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00k
13	0.50	0.15	24	50	25.00 ± 0.82	50.00 ± 1.63i	+++	3.33 ± 0.47	6.67 ± 0.94j
14	0.50	0.20	24	50	12.33 ± 0.94	24.67 ± 1.89l	+	10.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00i
15	1.00	0.05	10	50	40.33 ± 0.47	80.67 ± 0.94b	++++	12.00 ± 0.82	24.00 ± 1.63h
16	1.00	0.10	10	50	45.33 ± 0.47	90.67 ± 0.94a	++++	18.33 ± 0.47	36.67 ± 0.94g
17	1.00	0.15	10	50	39.33 ± 0.47	78.67 ± 0.94b	++++	23.67 ± 0.94	47.33 ± 1.89de
18	1.00	0.20	10	50	34.67 ± 0.94	69.33 ± 1.89d	+++	25.00 ± 0.82	50.00 ± 1.63d
19	1.00	0.30	10	50	28.33 ± 0.94	56.67 ± 1.89gh	+++	30.00 ± 0.82	60.00 ± 1.63b
20	1.00	0.40	10	50	37.00 ± 1.41	74.00 ± 2.83c	++++	33.33 ± 0.47	66.67 ± 0.94a
21	1.50	0.05	15	50	22.00 ± 0.82	44.00 ± 1.63j	++	21.33 ± 0.47	42.67 ± 0.94f
22	1.50	0.10	15	50	22.67 ± 1.25	45.33 ± 2.49j	++	17.67 ± 0.47	35.33 ± 0.94g
23	1.50	0.15	15	50	29.33 ± 0.47	58.67 ± 0.94fg	+++	22.67 ± 0.47	45.33 ± 0.94ef
24	1.50	0.20	15	50	34.67 ± 0.94	69.33 ± 1.89d	+++	28.00 ± 0.82	56.00 ± 1.63c
25	2.00	0.05	15	50	18.00 ± 0.82	36.00 ± 1.63k	++	28.00 ± 0.00	56.00 ± 0.00c
26	2.00	0.10	15	50	34.22 ± 0.47	68.67 ± 0.94d	+++	32.67 ± 0.47	65.33 ± 0.94a
27	2.00	0.15	15	50	22.00 ± 0.82	44.00 ± 1.63j	++	27.00 ± 0.82	54.00 ± 1.63c
28	2.00	0.20	15	50	29.33 ± 0.47	58.67 ± 0.94fg	+++	17.33 ± 1.25	34.67 ± 2.49g
29	2.00	0.30	15	50	31.33 ± 0.47	62.67 ± 0.94e	+++	32.33 ± 0.94	64.67 ± 1.89a
30	2.00	0.40	15	50	17.00 ± 0.82	34.00 ± 1.63k	++	32.67 ± 0.94	65.33 ± 1.89a

叶片离体培养体系,并建立两种不同的再生模式。对于叶片离体再生而言,外植体确定后,影响其再生率的最关键因素为激素。再生培养基中必须同时具有细胞分裂素类和生长素类物质(周瑞金和刘孟军,2003),在不同生长素和细胞分裂素的配合使用中,两者的比例十分重要(孙俊,2014)。本研究在 MS 培养基中单独添加 6-BA,叶片不能分化不定根和不定芽,在同时添加 6-BA 和 NAA 两种激素后完成了叶片离体培养,说明诺丽叶片离体培养中这两种激素配合使用效果较好,与大多数木本植物的研究结果一致(Chen & Hsia,2006)。培养基中激素的种类、浓度、配比不同造成生长能力和分化方向不同,可能是因为它们刺激了不同基因控制的酶类,从

而影响内源激素的分布水平,进而在生长和分化上形成差异(黄学林和李筱菊,1986)。

### 3.2 不同种类生长素和浓度对叶片离体再生方式的影响

生长素的种类和浓度影响离体叶片分化不定芽的途径,即是直接由叶片分化不定芽,还是先形成愈伤组织再分化不定芽(丁爱萍和王洪范,1996)。本研究以诺丽叶片为外植体,建立了两种离体再生模式(模式 I 为先诱导愈伤组织后诱导不定根不定芽;模式 II 为不通过愈伤组织直接诱导不定根后诱导不定芽)。诺丽叶片离体培养过程中,无论是哪种再生模式,愈伤组织、不定芽和不定根都是在主脉处形成,分析其原因,可能是双子叶植物叶片主脉含

有维管束,在维管束的木质部和韧皮部之间还存在形成层(李扬汉,1984),形成层细胞可能具有较强的分生和再生能力(柴慈江等,2011),所以促进了愈伤组织、不定根和不定芽的形成。欧阳超等(2014)的研究发现,含主脉的叶块其愈伤组织诱导率明显高于不含主脉叶块;Vieitez(1996)等研究指出,清水钢叶片离体培养中,不定芽的形成主要在叶柄和主脉形成的愈伤组织上分化。本研究中模式Ⅰ和模式Ⅱ的离体培养时间分别为65 d和50 d,两种模式使用的诱导时间差异主要是由于模式Ⅰ诱导愈伤组织的时间在20 d左右,模式Ⅱ利用诺丽叶片直接再生不定芽体系,未经愈伤组织,简化了操作步骤,缩短了不定芽再生时间。

## 参考文献:

- BAI FR, LIU Y, CAO YH, et al, 2015. Isolation and identification of endophytes in wild noni leaves from paracel islands [J]. J Food Sci Technol, 33(1): 32-37. [白飞荣, 刘洋, 曹艳花, 等, 2015. 西沙野生诺丽叶片内生菌的分离与初步鉴定 [J]. 食品科学技术学报, 33(1): 32-37.]
- CAO YH, LIU Y, YAO S, et al, 2014. Communities diversity of endophytic bacteria from fruit of *Morinda citrifolia* (noni) [J]. J Food Sci Technol, 32(2): 39-45. [曹艳花, 刘洋, 姚粟, 等, 2014. 西沙野生诺尼内生细菌群落多样性初步研究 [J]. 食品科学技术学报, 32(2): 39-45.]
- CHAI CJ, SUN SH, WANG Y, et al, 2011. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of *Malus zumi* [J]. J Fruit Sci, 28(1): 124-128. [柴慈江, 孙世海, 王玉, 等, 2011. 珠美海棠叶片离体培养与植株再生 [J]. 果树学报, 28(1): 124-128.]
- CHEN UC, HSIA CN, YEH MS, et al, 2006. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kanoi*—an endangered medicinal plant native to Taiwan [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, (42): 128-133.
- DING AP, WANG HF, 1996. Factors that affect apple *in vitro* leaves adventitious bud differentiation [J]. Chin Fruits, 4: 20-21. [丁爱萍, 王洪范, 1996. 影响苹果离体叶片分化不定芽的因素 [J]. 中国果树, 4: 20-21.]
- DUANG WR, CUI JY, YANG Q, et al, 2009. Biological features of *Morinda citrifolia* and techniques for introduced cultivation [J]. For Inv Plan, 34(1): 125-128. [段文荣, 崔景云, 杨清, 等, 2009. 海巴戟的生物学特性及引种栽培技术 [J]. 林业调查规划, 34(1): 125-128.]
- HE MX, YANG Q, 2006. The cultivation and development prospects of *Morinda citrifolia* Linn [J]. Chin Trop Agric, (4): 28-29. [何明霞, 杨清, 2006. 海巴戟的引种栽培及发展前景 [J]. 中国热带农业, (4): 28-29.]
- HUANG XL, LI XJ, 1986. The formation and control of high plant tissue culture *in vitro* [M]. Beijing: Science Publishing House; 247. [黄学林, 李筱菊, 1986. 高等植物组织培养离体培养的形态建成及调控 [M]. 北京: 科学出版社: 247.]
- LAI ML, 2014. *Morinda citrifolia* Linn (noni) study on genetic diversity of genetic diversity of germplasm resources [D]. Hainan University; 3. [赖茂良, 2014. 海巴戟 (noni) 种质资源的遗传多样性研究 [D]. 海南大学: 3.]
- LI YH, 1984. Botany [M]. 2nd ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House; 146. [李扬汉, 1984. 植物学 [M]. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社: 146.]
- OU YC, MO TH, ZENG LX, 2014. Callus from bagged seedings leaves of *Hevea Brasiliensis* müll. Arg. Clone Reyan 7-33-97. [J]. Chin J Trop Crops, 35(6): 1124-1130. [欧阳超, 莫廷辉, 曾丽星, 2014. 热研7-33-97袋装苗叶片愈伤组织诱导培养研究 [J]. 热带作物学报, 35(6): 1124-1130.]
- PAN XQ, WU T, LAN ZQ, et al, 2014. Regeneration of stem segments of noni (*Morinda citrifolia* Linn.) [J]. J NE For Univ, 42(8): 20-24. [潘晓晴, 吴田, 蓝增全, 等, 2014. 诺丽茎段的离体再生 [J]. 东北林业大学学报, 42(8): 20-24.]
- SUN J, 2014. The high efficient regeneration system of *Pyrus ussuriensis* Maxim leaf *in vitro* culture [J]. Jiangsu Agric Sci, 42(3): 44-46. [孙俊, 2014. 南果梨叶片离体培养的高效再生体系 [J]. 江苏农业科学, 42(3): 44-46.]
- VIEITEZ AM, SANJOSE MC, 1996. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro* [J]. *In vitro Cell Dev Biol*, 32(3): 140-147.
- WU T, LAN ZQ, 2011. Study on culture *in vitro* of noni (*Morinda Citrifolia* Linn) [J]. J Shandong Agric Univ (Nat Sci Ed), 42(2): 179-182. [吴田, 蓝增全, 2011. 诺丽离体培养研究 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 42(2): 179-182.]
- XIE J, WU T, ZANG TT, et al, 2012. Callus induction and plant regeneration of *Morinda citrifolia* Linn [J]. Jiangsu Agric Sci, 40(6): 47-48, 130. [谢江, 吴田, 张婷婷, 等, 2012. 海滨木巴戟愈伤组织诱导及植株再生 [J]. 江苏农业科学, 40(6): 47-48, 130.]
- YANG XB, 2013. Hainan plants [M]. Beijing: Science Publishing House; 340-341. [杨小波, 2013. 海南植物名录 [M]. 北京: 科学出版社: 340-341.]
- YANG Y, LIU CF, LI HQ, et al, 2009. Recent advances in *Morinda citrifolia* research and suggestions on its application [J]. Trop Agric Sci & Technol, 32(4): 23-24. [杨淼, 刘昌芬, 李海泉, 等, 2009. 海巴戟研究进展及开发应用建议 [J]. 热带农业科技, 32(4): 23-24.]
- ZHANG WM, FU WY, FU CX, et al, 2008. Distribution and nutritional evaluation of primary functional components in *Morinda citrifolia* [J]. Food Sci, 29(10): 575-577. [张伟敏, 符文英, 符传贤, 2008. 诺丽果实和叶中主要功能性物质的分布于营养评价 [J]. 食品科学, 29(10): 575-577.]
- ZHANG XM, 2000. Immune regulation of polysaccharide in *Morinda citrifolia* Linn has the effects of an titumor [J]. Drugs & Clinic, 15(5): 207-208. [张学梅, 2000. 海巴戟果汁中具免疫调节作用的多糖具抗肿瘤作用 [J]. 国外医药(植物药分册), 15(5): 207-208.]
- ZHOU RJ, LIU MJ, 2003. Advances in regeneration from leaf explants in fruit tree [J]. Biotechnology, 13(6): 65-66. [周瑞金, 刘孟军, 2003. 果树离体叶片培养再生研究进展 [J]. 生物技术, 13(6): 65-66.]