

# 苦豆子的组织培养及植株再生的研究

曹有龙, 李晓莺, 罗青, 贝盏临

(宁夏农林科学院 枸杞工程技术研究中心, 银川 750002)

**摘要:** 用4种诱导培养基 P1(MS+2,4-D 0.5 mg/L)、P2(MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L)、P3(MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L)、P4(MS+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L), 3种分化培养基(MS+6-BA 1 mg/L; MS+6-BA 0.5 mg/L; MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L)和4种生根培养基(MS; MS+IBA 1 mg/L; MS+IBA 1 mg/L+IAA 0.5 mg/L; 1/2 MS+IAA 0.2 mg/L)对苦豆子愈伤组织进行诱导和植株再生, 研究影响苦豆子组织培养的因素, 结果表明愈伤组织的诱导频率主要依靠激素的种类和浓度, 培养基中加入0.2~2 mg/L的2,4-D有利于苦豆子愈伤组织生长, 但使褐化发生时间提前; 培养基中加入活性炭对苦豆子愈伤组织褐化有明显的抑制作用; 加入IAA对苦豆子根的分化是必需的。

**关键词:** 苦豆子; 组织培养; 植株再生

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)01-0102-04

## Tissue culture and plant regeneration of *Sophora alopecuroides*

CAO You-Long, LI Xiao-Ying, LUO Qing, BEI Zhan-Lin

(Engineering and Technology Research Center of Wolfberry, Ningxia Academy  
of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China)

**Abstract:** In order to study the factors that influence the tissue culture of *Sophora alopecuroides*, four callus-inducing media, i. e. P1(MS+2,4-D 0.5 mg/L), P2(MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L), P3(MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L), P4(MS+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L), three different media(MS+6-BA 1 mg/L; MS+6-BA 0.5 mg/L; MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L), and four root-inducing media(MS; MS+IBA 1 mg/L; MS+IBA 1 mg/L+IAA 0.5 mg/L; 1/2 MS+IAA 0.2 mg/L) were applied. The results showed that the induction frequency of calluses highly depended on the varieties and concentration of hormone in media. 2,4-D in media, with concentration ranging from 0.2-2 mg/L, was favorable to the growth of calluses of *S. alopecuroides*, accompanying earlier browning occurrence. It was found that adding active charcoal into medium could efficiently inhibit the callus browning. In addition, IAA seemed an essential ingredient in medium to the root differentiation of *S. alopecuroides*.

**Key words:** *Sophora alopecuroides*; tissue culture; plant regeneration

苦豆子(*Sophora alopecuroides*)为豆科槐属植物, 别名苦甘草、苦豆根、西豆根、苦参草(江苏新医学院, 1977), 为多年生半灌木或小灌木, 其根系发达, 耐干旱、盐碱、严寒, 抗风沙, 在荒漠和沙性土壤上具有极强的防风抗蚀能力, 是我国西北荒漠化地

区广泛分布的一种防风固沙和改良盐碱地的重要野生植物(张守润等, 2008)。其植株和种子富含多种生物碱、黄酮类物质、有机酸、氨基酸、蛋白质和多糖类等, 具有抗癌、免疫等新的药理活性(钟仁山, 1983)。苦豆子植物多与甘草(*Striga asiatica*)等其

收稿日期: 2008-08-04 修回日期: 2009-02-27

基金项目: 宁夏回族自治区科技攻关项目(2001-015-04)[Supported by Key Technology Research and Development Program of Ningxia(2001-015-04)]

作者简介: 曹有龙(1963-), 男, 宁夏银川人, 博士, 研究员, 主要从事植物生物技术研究工作, (E-mail)youlongchk@163.com.

它植物伴生,近年来因滥挖甘草引起的草牧场沙漠化,加上超载过牧和扩耕使草原植被受到破坏,苦豆子资源蓄积量及分布面积呈下降趋势。有效保护、合理利用苦豆子资源已成为目前生态环境建设和可持续发展不可忽视的问题。多年来,植物组织培养研究极少涉及沙漠植物(张国荣等,2001;黄学林等,1995),对苦豆子的组织培养,仅利用茎段诱导出愈伤组织(饶品昌等,1992),无菌苗下胚轴和茎段进行组织培养获得再生植株(李晓莺,2004)。本研究利用苦豆子无菌苗子叶为外植体,诱导形成愈伤组织,然后分化得到完整植株,为其大规模生产提供重要技术支持,同时也为保护其种质资源提供重要手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于2002年8月实地采集宁夏盐池县荒漠半荒漠地带生长的野生苦豆子。

### 1.2 培养条件

所选用的基本培养基为MS,按不同处理方案添加不同类型和浓度的萘乙酸(NAA)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、激动素

(KT)、水解乳蛋白(LH)、水解酪蛋白CH、聚乙烯吡咯酮(PVP)、抗坏血酸(Ascorbic acid)活性炭(Activated carbon)柠檬酸(Citric acid)、半胱氨酸(Cysteine),高压(121℃)灭菌20 min。接种后在培养室内培养,温度25℃左右,每天日光灯(19.53~23.40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )照射12 h。

### 1.3 方法

1.3.1 愈伤组织的诱导 挑选成熟、饱满、无虫蛀的苦豆子种子,用自来水清洗干净。在室温下将处理好的种子浸泡12 h,在超净工作台上,用0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡20 min,无菌水冲洗3次,然后接种到培养基MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.1 mg/L上进行培养。培养20 d后,将子叶切成0.5 cm大小的片段,分别接种到P1(MS+2,4-D 0.5 mg/L)、P2(MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L)、P3(MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L)、P4(MS+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L)培养基上进行培养。

1.3.2 愈伤组织的继代 将诱导出的愈伤组织转接到P1培养基上,继代培养20 d左右,然后再转接到分化培养基上进行分化培养。

1.3.3 愈伤组织的分化 待分化出的芽长到1~2 cm时,将其转入生根培养基中进行生根培养。

表1 苦豆子在不同培养基上的诱导情况

Table 1 The induction state of calli from *S. alopecuroides* cotyledon tissue on different media

| 培养基<br>Medium | 培养及组分 (mg/L)<br>Components of<br>medium | 启动时间<br>Time of<br>initiation(d) | 接种块数<br>No. of explants<br>inoculated (piece) | 出愈块数<br>No. of explants with<br>callus(piece) | 诱导率<br>Induced<br>rate(%) |
|---------------|---|----------------------------------|---|---|---------------------------|
| P1            | MS+2,4-D 0.5                            | 3                                | 95  | 95  | 100                       |
| P2            | MS+6-BA 0.1+NAA 0.5                     | 10                               | 95  | 75  | 78.9                      |
| P3            | MS+6-BA 0.5+NAA 0.5                     | 14                               | 95  | 70  | 77.8                      |
| P4            | MS+NAA 1.0+KT 0.5                       | 14                               | 95  | 51  | 56.7                      |

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导与生长

无菌苗子叶切块接至诱导培养基上,3 d后开始膨大,一周左右在切面上开始形成愈伤组织,愈伤组织的发生与生长速度随培养基中的激素种类和浓度不同而异(表1)。在P1培养基中,加入0.5 mg/L的植物激素2,4-D诱导愈伤组织,诱导率为100%,说明添加2,4-D有利于苦豆子愈伤组织的发生;P2和P4培养基诱导的愈伤组织呈白色水泽状,失去分化能力;P3培养基诱导的愈伤组织白色致密,不易分散,经过30 d的培养,有的可直接分化出

芽,但频率很低。

培养基中添加2,4-D,愈伤组织诱导频率高且生长迅速。本实验在继代培养中添加了不同浓度的2,4-D,结果表明:2,4-D的存在对愈伤组织发生非常有利,其含量(0.5~2 mg/L)越高,愈伤组织生长越快,但褐化时间提前。当0.5 mg/L 2,4-D与0.1 mg/L 6-BA和0.5 mg/L KT配合使用时,愈伤组织的生长速度很慢,并逐渐变得十分坚硬,颜色也由白色转为淡绿色(表2)。培养基中添加500 mg/L CH或LH对愈伤组织生长均具有良好的促进作用,但CH的促进作用更为明显。苦豆子愈伤组织一般每次转接生长2周后,常有褐化现象,生长速度也减慢。

为了克服褐化现象,在培养基中分别添加了活

表 2 2,4-D 对苦豆子愈伤组织的作用  
Table 2 Effect of 2,4-D on *S. alopecuroides* calli

| 编号<br>No. | 激素浓度 (mg/L)<br>Concentration of hormone | 愈伤组织生长情况<br>Growth status of calli | 褐化时间 (d)<br>Time of browning | 愈伤组织特点<br>Characteristics of calli |
|-----------|---|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| 1         | 2,4-D2                                  | ++++                               | 10                           | 白色水质,生长快                           |
| 2         | 2,4-D1                                  | +++                                | 12                           | 白色水质,生长快                           |
| 3         | 2,4-D0.5                                | ++                                 | 25                           | 白色松散,生长较快                          |
|           | 2,4-D0.5+CH                             | +++                                | 28                           | 白色松散,生长较快                          |
| 4         | 2,4-D0.5+KT0.5                          | ++                                 | —                            | 白色紧密,由白转绿                          |
| 5         | NAA0.5+6-BA0.1                          | +++                                | —                            | 白色颗粒                               |

注:“+”代表愈伤组织生长状况,越多表明生长状况越好。 Note:“+”symbolizes growth status of calli, the more the better.

性炭和某些还原剂,如抗坏血酸、聚乙烯吡咯酮(PVP)、柠檬酸、半胱氨酸等物质,结果表明活性炭对于愈伤组织褐化有明显抑制作用,这可能是由于它对酚类物质的吸收。诱导培养基中添加活性炭后,愈伤组织生长速度虽略有下降,但逐渐变成紧密颗粒状。单独使用抗坏血酸无明显效果,但与柠檬酸配合使用则有一定作用,这可能是由于柠檬酸阻止了抗坏血酸氧化。半胱氨酸与 PVP 对愈伤组织褐化也有一定抑制作用(表 3)。以上这些还原剂由于阻止了愈伤组织中酚类物质的氧化,因而能在不同程度上起到抑制褐化的作用(李浚明,1992; Nguyen & Yukio, 2003; Anderson, 1975; 田志宏等,2004)。

表 3 不同附加物质对苦豆子愈伤组织褐化的抑制作用  
Table 3 Inhibition of different supplementary substances to the browning of *S. alopecuroides* calli

| 抑制物<br>Inhibitor                     | 浓度 (%)<br>Concentration | 抑制效果<br>Effect |
|--------------------------------------|-------------------------|----------------|
| 对照(Control)                          | —                       | —              |
| 聚乙烯吡咯酮(PVP)                          | 0.5                     | +              |
| 抗坏血酸(Ascorbic acid)                  | 0.1                     | —              |
| 活性炭(Activated carbon)                | 0.1                     | +++            |
| 柠檬酸(Citric acid)+抗坏血酸(Ascorbic acid) | 0.1+0.1                 | ++             |
| 半胱氨酸(Cysteine)                       | 0.1                     | ++             |

## 2.2 芽的分化

将苦豆子愈伤组织转入 3%蔗糖、0.6%琼脂、500 mg/LCH、pH5.8~6.0、含不同浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 分化培养基,两周后开始形成芽点,芽点迅速长大,可进一步发展成芽丛。所作不同植物激素配比试验结果表明,苦豆子愈伤组织芽的分化要求一定浓度 6-BA;在所试两种浓度(0.5 mg/L 和 1.0 mg/L)中,分化芽的频率均在 75%以上,但若 6-BA 与 NAA(0.2 mg/L)配合使用,芽分化频率则明显下降(表 4)。材料在分化培养基上培养 3 周后,

需将分化得到的芽转移,否则会重新脱分化形成愈伤组织,并很快褐化死亡。

表 4 不同植物激素对苦豆子愈伤组织再生频率的影响  
Table 4 Influence of different hormones on regeneration of *S. alopecuroides* calli

| 激素种类和浓度<br>Concentration of hormone | 再生频率<br>Regeneration rate (%) | 每块愈伤组织平均芽点发生数<br>Average number of shoots per callus |
|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| 6-BA 1 mg/L                         | 100                           | 25   |
| 6-BA 0.5 mg/L                       | 95                            | 11   |
| 6-BA 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L            | 83                            | 5  |

表 5 不同培养基组成对苦豆子根形成的影响  
Table 5 Effect of different media on root formation of *S. alopecuroides* shoot

| 培养基<br>Medium              | 接种苗数<br>No. of shoots planted | 根发生数<br>No. of roots formation | 频率<br>Rate (%) |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------|
| MS                         | 50                            | 0                              | 0              |
| MS+1 mg/L IBA              | 50                            | 0                              | 0              |
| MS+1 mg/L IBA+0.5 mg/L IAA | 50                            | 18                             | 36             |
| IAA 1/2 MS+0.2 mg/L IAA    | 50                            | 32                             | 64             |

将分化得到的芽连同少量愈伤组织转移到同样培养基上,几天后即发展成丛生芽,但大多数芽伸长很慢。如果在培养基中添加 0.2 mg/L Zeatin,芽的伸长可明显加快,10 d 内株高可在 5 cm 以上,表明 Zeatin 对苦豆子苗的伸长有明显促进作用(毕静华,2005)。

## 2.3 根的形成

苦豆子愈伤组织在含有 6-BA 的 MS 培养基上诱导成后,根的分化非常困难。在原培养基上没有观察到根的形成。为了诱导根的发生,进行了几种组合培养基筛选试验,在不含激素的 MS 培养基上也没有得到根的分化,然而在 IAA 的 MS 培养基上得到了少量具有根的完整植株。表 5 列出了不同生长素对诱导根的作用,表明 0.2 mg/L IAA 具有较好的效果,

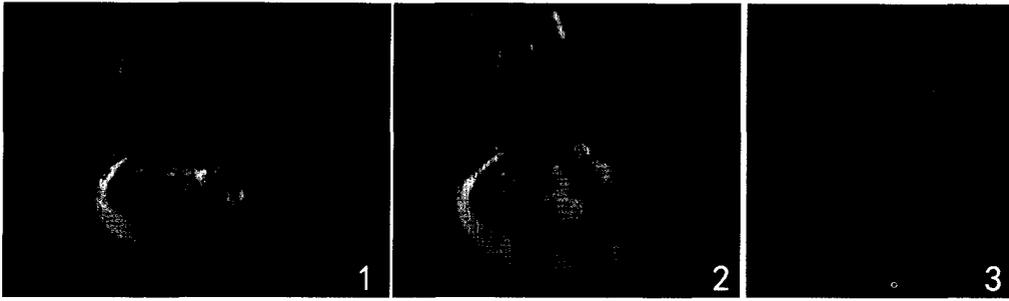


图 1 A. 从子叶外植体诱导出的愈伤组织; B. 继代培养的愈伤组织; C. 组培苗。

Fig. 1 A. Calli induced from cotyledon of *S. alopecuroides*; B. Calli subcultured; C. Tissue culture seedlings.

但诱导根的频率仍有待进一步提高(陈光登等 2007)。

苦豆子一般在条件极为恶劣的沙漠地域生长,对水分十分敏感,水分过多将抑制细胞生长、直至死亡,湿度已成为能否对苦豆子进行组织培养的关键因子之一。本实验研究结果表明,在合适激素浓度和培养条件下,苦豆子这种沙漠生长的豆科植物离体培养也可有效地再生完整植株;在培养基中添加阻止褐变抑制物,可以阻止其愈伤组织褐化,维持其持续生长,并诱导再生;苦豆子进行人工培育成功获得再生植株,这对苦豆子及其它沙漠植物的人工种植、生物工程操作及其遗传资源开发具有重要参考意义。

#### 参考文献:

- 江苏新医学院. 1977. 中药大辞典[M]. 上海:上海科技出版社:1 293-1 295
- 李晓莺,曹有龙,贝盛临. 2004. 苦豆子组织培养初步研究[J]. 甘肃农业科技,12:12-14
- 李俊明. 1992. 植物组织培养教程[M]. 北京:北京农业大学出版社:347
- 钟仁山. 1983. 苦豆子的研究及其应用[M]. 银川:宁夏人民出版社:10-20
- 张国荣,赵辉. 2001. 甘草麻黄开发应用技术[M]. 银川:宁夏人民出版社:34
- 黄学林,李筱菊. 1995. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京:科学出版社:127
- 饶品昌,刘贤旺. 1992. 苦豆子组织培养及有效成分分析[J]. 江西中医学院学报,4(2):33,39
- Anderson WC. 1975. Propagation of rhododendrons by tissue culture. Development of culture medium for multiplication of shoots [J]. *Proc Intl Plant Prop Soc*,25:129-135
- Bi JH(毕静华),Liu YL(刘永立),Syed Asghar. 2005. *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Actinidia latifolia*(阔叶猕猴桃叶片离体器官发生和植株再生)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报),22(4):405-408
- Chen GD(陈光登),Li YX(黎云祥),Han SJ(韩素菊). 2007. Studies on tissue culture and rapid propagation techniques of *Glechoma longituba*(活血丹组织培养与快速繁殖技术研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(2):265-271
- Nguyen TPT, Yukio O. 2003. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,73:285-289
- Tian ZH(田志宏),Li XL(李小丽),Yan H(严寒),et al. 2004. Effect of different growth regulators on callus induction from explants in Creeping Dichondra(不同生长调节剂对马蹄金愈伤组织诱导的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物),24(3):253-258
- Zhang SR(张守润),Ji Y(纪瑛),Lin HM(蔺海明). 2008. Effects of nitrogen nutrition on dynamics of biological character and biomass accumulation of *Sophora alopecuroides*(施氮对苦豆子生物性状和生物量积累动态的响应)[J]. *Prat Sci*(草业科学),25(3):37-42