

## 6-BA、NAA和2,4-D不同配比对荠菜愈伤组织诱导、生长及植株再生的影响

李文静<sup>1</sup>, 李学强<sup>1,\*</sup>, 贾毛毛<sup>2</sup>, 唐洪梅<sup>1</sup>, 宋乾江<sup>1</sup>, 连少英<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河南科技大学林学院, 河南洛阳471003; <sup>2</sup>华中农业大学园艺林学学院, 武汉430070

**摘要:** 以野生荠菜 [*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic] 无菌苗为试材, 选取下胚轴、子叶、真叶和叶柄作为外植体, 研究了不同外植体的出愈情况, 不同植物生长调节剂及配比对愈伤组织诱导、继代及植株再生的影响。结果表明: (1) 下胚轴作为外植体出愈情况最好, 继代后生长快; (2) 下胚轴愈伤组织的最适植株再生培养基为 MS+2~3 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2~0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA; (3) 愈伤组织培养阶段的 2,4-D 浓度对其植株再生能力有影响。

**关键词:** 荠菜; 愈伤组织; 植株再生; 2,4-D

## Effects of 6-BA, NAA and 2,4-D on Callus Induction, Growth and Plantlet Regeneration of Shepherd's Purse [*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic]

LI Wen-Jing<sup>1</sup>, LI Xue-Qiang<sup>1,\*</sup>, JIA Mao-Mao<sup>2</sup>, TANG Hong-Mei<sup>1</sup>, SONG Qian-Jiang<sup>1</sup>, LIAN Shao-Ying<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Forestry College of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; <sup>2</sup>College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** The test material is the germ-free plants of shepherd's purse [*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic]. Using the hypocotyls, the cotyledons, the leaves and the petioles as explants, the appearance of different explants on callus induction and the effects of the different medium on callus induction, callus subculture and plant regeneration were investigated. The results showed that: (1) the hypocotyl was the best explant for callus induction and subculture; (2) the favorable medium of plant regeneration for the hypocotyls was MS+2~3 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2~0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA; (3) the concentration of 2,4-D that was used in callus growing had obvious effect on the callus redifferentiation.

**Key words:** shepherd's purse [*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic]; callus; plantlet regeneration; 2,4-D

荠菜 [*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic] 为十字花科 (Cruciferae) 一年生草本植物, 别名野荠、护生草、鸡心菜等。其叶绿鲜嫩、气味清香、味道鲜美、营养丰富, 又有一定药用功效, 富含 Vc 及 Ca、P、Fe 等人体必需的矿物质元素。全株可入药, 具清热利尿、止血、凉血、明目降压、消炎解毒等功效而颇受城乡人民所喜爱。目前, 荠菜的繁殖主要是依靠种子, 但种子繁殖有很大的局限性: 首先, 种子繁殖会使一些品种的某些优良性状难以保持; 其次, 种子发芽率低, 即使在最适宜的条件下, 其萌发率也只有 23.33% (亚吉东等 2009); 第三, 利用种子繁殖长成成株的时间长, 而利用组培苗进行生产则可克服上述缺点。关于荠菜组培的研究, 目前国内只见到王丽艳等 (2007) 和贾毛毛等 (2010) 的研究报道, 他们均以种子培养的无菌苗为外植体, 经过丛生芽诱

导、继代以及生根, 培育出完整植株并成功移栽, 初步建立了荠菜的无菌快繁体系; 国外有 Bonfils 等 (1992) 及 Sigareva 和 Earle (1999) 对荠菜的胚培养进行了一些研究; 有关荠菜愈伤组织诱导、再生植株的研究却少有人涉及, 迄今国内外仅见到 Zilkah 和 Gressel (1977) 的报道。本试验是以野生荠菜无菌苗为试材, 选取下胚轴、子叶、真叶和叶柄作为外植体, 研究了不同植物生长调节剂及其配比对其愈伤组织诱导、继代及植株再生的影响, 为荠菜植株再生体系及遗传转化体系的建立提供理论依据。

收稿 2011-12-08 修定 2012-01-12

资助 河南科技大学大学生研究训练计划项目 (SRTP2009113)。

\* 通讯作者 (E-mail: gnaiqexil@163.com; Tel: 0379-64282669)。

## 材料与方法

### 1 材料

荠菜[*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic]无菌苗。

### 2 方法

#### 2.1 外植体的处理

无菌条件下,从苗龄为10 d的无菌苗上,取下胚轴和子叶,下胚轴剪到约0.8 cm长,单个子叶作为一个外植体。从苗龄为25 d的无菌苗上,取叶柄和真叶,单个叶柄作为一个外植体,叶片修剪成约0.5 cm<sup>2</sup>。将外植体分别接种在诱导培养基上,每种外植体接种3瓶,每瓶接4个,重复2次。要求子叶和叶片的背面接触培养基表面。

接种完毕,将三角瓶置于以下环境条件中:温度(光照) 25 °C、(黑暗) 18 °C,光照时间14 h·d<sup>-1</sup>,光照强度20~30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,相对湿度80%。之后观察试验结果。

#### 2.2 6-BA与2,4-D组合处理方法

在MS培养基中添加2、4、6 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA和0.5、1.0、2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D组合成9种配方,即BD系列I,分别用B2D0.5、B2D1.0、B2D2.0、B4D0.5、B4D1.0、B4D2.0、B6D0.5、B6D1.0、B6D2.0共9个代号表示;添加0.5、1.0、2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA和1、2、3 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D组合成9种配方,即BD系列II,分别用B0.5D1、B0.5D2、B0.5D3、B1.0D1、B1.0D2、B1.0D3、B2.0D1、B2.0D2、B2.0D3共9个代号表示,代号中字母B表示6-BA, D表示2,4-D,字母后数字表示该植物生长调节剂的浓度。将下胚轴和子叶分别接种在BD系列I的培养基上,叶柄和真叶分别接种在BD系列II的培养基上。接种25 d后进行外植体出愈率,愈伤组织颜色和质地的统计,40 d后记录生长势并用相同的培养基进行继代,观察继代愈伤组织的生长势。

#### 2.3 6-BA与NAA组合处理方法

在MS培养基中分别添加2、3、4 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA和0.2、0.4、0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA组合成9种配方,即BN系列,分别用B2N0.2、B2N0.4、B2N0.6、B3N0.2、B3N0.4、B3N0.6、B4N0.2、B4N0.4、B4N0.6共9个代号表示,代号中字母B表示6-BA, N表示NAA,字母后数字表示该植物生长调节剂的浓度。选用在B2D0.5上诱导并经2次继代的下胚

轴愈伤组织作为材料,接种在上述9种培养基中,30 d后统计分化率。每个处理接3瓶,每瓶3块愈伤组织,重复2次。

#### 2.4 愈伤组织培养阶段2,4-D浓度及植株再生处理方法

选用在B4D0.5、B4D1.0、B4D2.0上诱导并经2次继代的下胚轴愈伤组织,分别接种在BN系列的培养基上。30 d后统计再分化率。每种材料接27瓶,每个处理3瓶,共81瓶,每瓶3块愈伤组织。

## 实验结果

### 1 6-BA与2,4-D的不同组合对愈伤组织诱导及生长的影响

下胚轴和子叶在BD系列I的9种培养基上均能诱导出愈伤组织,愈伤组织的颜色稍有差别,质地无明显差异(表1)。接种后第5天在B2D0.5、B2D1.0、B2D2.0中下胚轴两端先出现可见愈伤组织,接种后第7天在B2D0.5中子叶基部切口处出现可见愈伤组织,到第9天几乎每种培养基中的外植体均出现可见愈伤组织。总之,B2D0.5、B2D1.0、B2D2.0中的外植体出愈率高,愈伤组织米黄色、质地疏松粗糙、质量好,这说明下胚轴和子叶愈伤组织诱导时对6-BA比较敏感,其最适浓度为2 mg·L<sup>-1</sup>。

叶柄和真叶在BD系列II的9种培养基上均能诱导出愈伤组织,愈伤组织的颜色稍有差别,质地却有明显差异(表2)。接种后第9天,在叶柄两端和真叶切口处有可见愈伤组织出现。颜色上,叶柄的愈伤组织较真叶的有光泽,多为浅黄色或黄绿色;质地上,愈伤组织小颗粒在B0.5D1、B1.0D1、B2.0D1中均疏松粗糙,而在B0.5D3、B1.0D3、B2.0D3中均较离散。B0.5D1、B1.0D1、B2.0D1上的愈伤组织浅黄绿色或浅黄色、质地疏松粗糙、质量好,这说明真叶和叶柄愈伤组织诱导时对2,4-D比较敏感,其最适浓度为1 mg·L<sup>-1</sup>。

下胚轴和子叶愈伤组织诱导时,下胚轴比子叶出愈早,且愈伤组织生长快,长势好。真叶和叶柄愈伤组织诱导时,二者可见愈伤组织出现的时期相同,但均晚于子叶,而且生长较慢。综合比较4种外植体的愈伤组织在所设培养基上生长状况(图1),可以认为下胚轴为愈伤组织诱导的最适外植体。

表1 下胚轴、子叶愈伤组织生长情况

Table 1 Growth state of callus from hypocotyl and cotyledon

调节剂组合	下胚轴					子叶				
	出愈率/%	愈伤组 织颜色	愈伤组 织质地	愈伤组织长势		出愈率/%	愈伤组 织颜色	愈伤组 织质地	愈伤组织长势	
				诱导	继代				诱导	继代
B2D0.5	100.00	米黄	疏松粗糙	++	++	100.00	米黄	疏松粗糙	+	+
B2D1.0	100.00	米黄	疏松粗糙	+++	++	100.00	米黄	疏松粗糙	++	++
B2D2.0	92.00	米黄	疏松粗糙	++	+	100.00	米黄	疏松粗糙	++	+++
B4D0.5	62.50	嫩黄	疏松粗糙	+	+++	62.50	淡黄	疏松粗糙	++	+
B4D1.0	58.33	淡黄	疏松粗糙	+	+++	75.00	淡黄	疏松粗糙	+	+
B4D2.0	37.50	淡黄	疏松粗糙	+	++	75.00	淡黄	疏松粗糙	+	+
B6D0.5	33.33	淡黄	疏松粗糙	-	+	16.67	浅黄	疏松粗糙	+	-
B6D1.0	33.33	淡黄	疏松粗糙	-	+	25.00	浅黄	疏松粗糙	-	-
B6D2.0	58.33	淡黄	疏松粗糙	+	+	58.33	浅黄	疏松粗糙	+	+

表中为接种25 d的统计数据; +++表示长势非常好, ++表示长势很好, +表示长势一般, -表示长势差。

表2 真叶、叶柄愈伤组织生长情况

Table 2 Growth state of callus from leaf and petiole

调节剂组合	真叶					叶柄				
	出愈率/%	愈伤组 织颜色	愈伤组 织质地	愈伤组织长势		出愈率/%	愈伤组 织颜色	愈伤组 织质地	愈伤组织长势	
				诱导	继代				诱导	继代
B0.5D1	100	淡黄	疏松粗糙	+	+	100	淡黄	疏松粗糙	++	++
B0.5D2	100	浅黄	较疏松	+	+	100	浅黄褐	较疏松	+	+
B0.5D3	100	淡黄	离散松软	+	+	100	淡黄	离散松软	+	+
B1.0D1	100	浅黄绿	疏松粗糙	++	++	100	浅黄绿	疏松粗糙	++	+
B1.0D2	92	浅黄	较疏松	+	-	100	浅黄绿	较疏松	-	-
B1.0D3	100	浅黄绿	离散松软	+	+	75	浅黄绿	离散松软	-	++
B2.0D1	75	浅黄	疏松粗糙	-	+++	92	浅黄绿	疏松粗糙	++	++
B2.0D2	75	浅黄绿	较疏松	++	++	100	浅黄绿	较疏松	+	++
B2.0D3	75	浅黄	离散松软	+	+	83	浅黄绿	离散松软	-	-

表中为接种25 d的统计数据; +++表示长势非常好, ++表示长势很好, +表示长势一般, -表示长势差。

## 2 6-BA与NAA的不同组合对下胚轴愈伤组织植株再生的影响

在B2D0.5上诱导并经2次继代的下胚轴愈伤组织在BN系列的9种培养基上均能诱导出再生芽, 在一些培养基中还出现了根(图2)。B2N0.2、B2N0.6、B3N0.2、B3N0.6中再分化愈伤组织块数较多, 出芽数也比较多(表3)。接种后2周, B2N0.2中出现一个带有2片小叶的芽, B3N0.2、B3N0.6上已分化大量小芽点; B3N0.4中最先有根的分化。接种后5周时, B2N0.2、B3N0.2、B3N0.6上芽较大, 在B3N0.2中一株已抽出花茎, B4N0.2、B4N0.4、B4N0.6培养基上再生芽很多, 但长势很弱, 畸形较严重; B2N0.4培养基上芽较少, 而是有

大量的根; 培养基B2N0.6上芽较正常。由以上结果可知, 6-BA浓度在2~3 mg·L<sup>-1</sup>时对植株再生的效果最好, 而NAA浓度在2~6 mg·L<sup>-1</sup>时对植株再生的影响差异不大。

## 3 愈伤组织培养阶段2,4-D浓度对植株再生的影响

随着愈伤组织培养阶段2,4-D浓度的增加, 愈伤组织的再分化率降低(图3和表4)。接种2周后, B4D0.5的愈伤组织在B2N0.2、B2N0.6上已有少量再生芽, B2N0.4、B4N0.2、B4N0.4、B4N0.6上有较多小芽点分布; B4D1.0的愈伤组织在B2N0.2、B2N0.4、B2N0.6上有少量幼根分化, 其余几种培养基上的愈伤组织蓬松, 仅边缘发绿; B4D2.0的愈伤组织仍为淡黄色, 只是有大量生长。接种5周后,

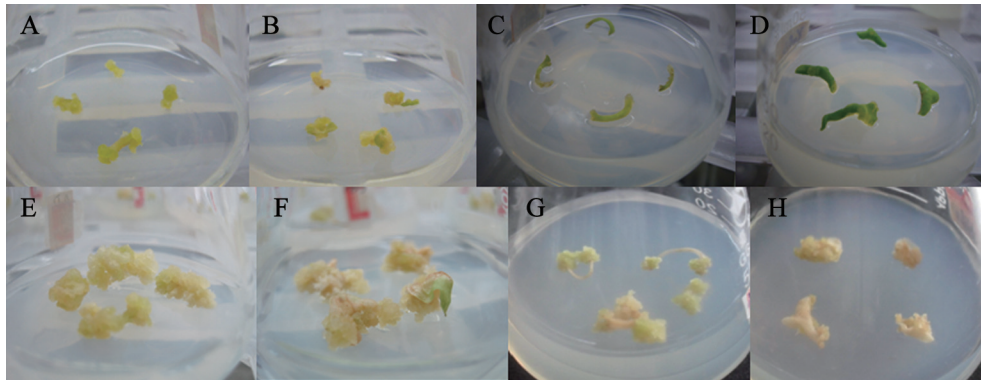


图1 四种外植体的愈伤组织诱导

Fig.1 Callus induction from four kinds of explants

A、B分别为接种15 d后的下胚轴和子叶愈伤组织; C、D分别为接种10 d后的叶柄和真叶愈伤组织; E、F、G、H分别是接种5周的下胚轴、子叶、叶柄、真叶愈伤组织。

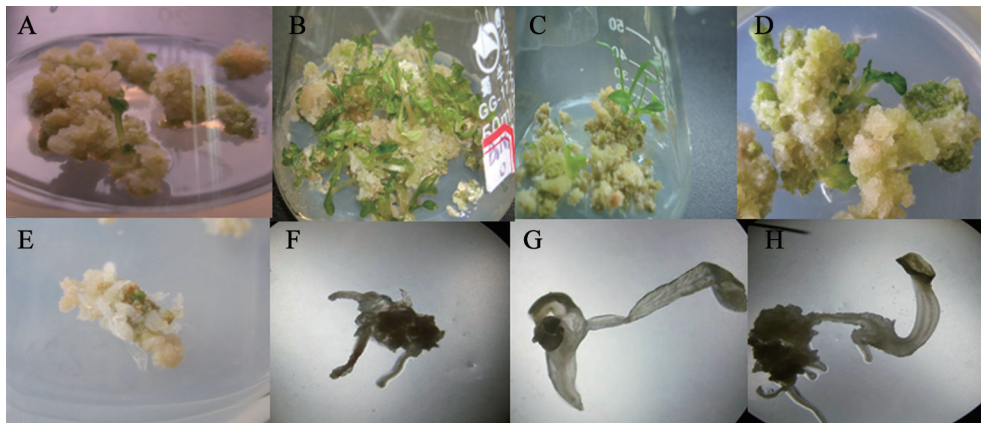


图2 下胚轴愈伤组织的植株再生

Fig.2 Plantlet regeneration of callus form hypocotyls

A是接种2周后的再生芽; B、C: 接种5周后的再生芽, 其中B为玻璃化的芽, C为正常芽; D、E分别是分化的芽和幼根; F、G、H分别是解剖镜下看到的再生根、芽、完整植株。

表3 不同培养基对植株再生的影响

Table 3 Effect of different mediums on plantlet regeneration

调节剂组合	接种组织数/块	再分化数/块	出芽数/个	单块出芽数/个
B2N0.2	9	7	24	2.67
B2N0.4	9	2	1	0.11
B2N0.6	9	7	16	1.78
B3N0.2	9	8	30	3.33
B3N0.4	9	5	20	2.22
B3N0.6	9	7	18	2.00
B4N0.2	9	6	15	1.67
B4N0.4	9	2	3	0.33
B4N0.6	9	5	16	1.78

表中为接种30 d的统计数据。

B4D0.5的愈伤组织几乎在所有培养基上都有再生芽, 在B2N0.4、B2N0.6、B3N0.2、B3N0.4、B4N0.4内还有根的生成; B4D1.0的愈伤组织几乎在所有培养基上都有根的生成, 仅在B2N0.6上有再生芽; B4D2.0的愈伤组织仅在B3N0.6、B4N0.4上有器官分化, 其中B3N0.6上有2个芽、B4N0.4上有几条短根。总之, B4D0.5的愈伤组织再生芽很多, B4D1.0的愈伤组织分化的根很多、再生芽很少, B4D2.0的愈伤组织再生的根和芽都很少。说明在愈伤组织生长阶段培养基中添加较高浓度的2,4-D不利于愈伤组织的植株再生。

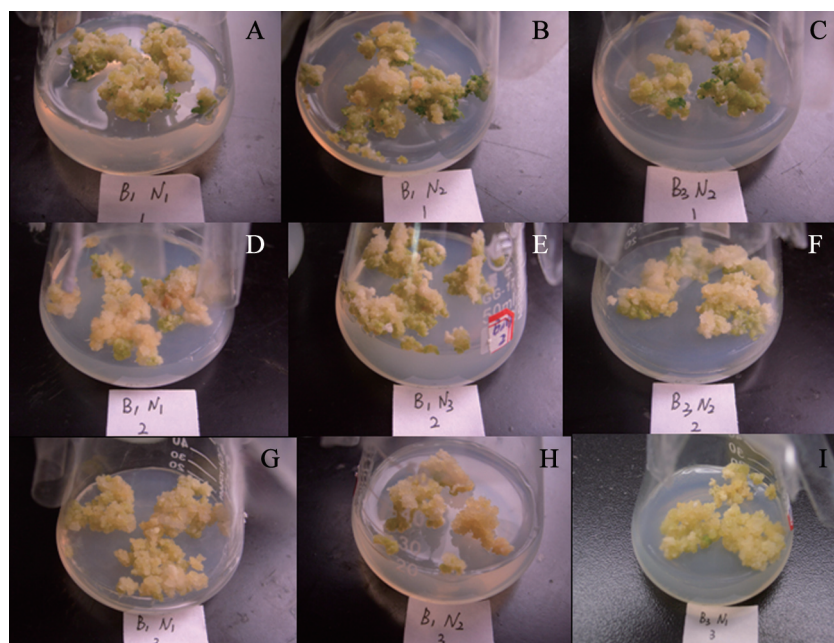


图3 不同2,4-D浓度下生长的愈伤组织的再分化情况

Fig.3 The condition of regeneration of develop form medium with different concentration of 2,4-D

A、B、C是B4D0.5的愈伤组织; D、E、F是B4D1.0的愈伤组织; G、H、I是B4D2.0的愈伤组织。均为接种后2周情况。

表4 培养基中添加不同浓度2,4-D长成的愈伤组织的再分化率

Table 4 The rate of regeneration of callus develop from medium with different concentration of 2,4-D

调节剂组合	愈伤组织再分化率/%		
	B4D0.5	B4D1.0	B4D2.0
B2N0.2	77.78	22.22	0
B2N0.4	66.67	33.33	0
B2N0.6	22.22	55.56	0
B3N0.2	44.44	0	0
B3N0.4	0	0	0
B3N0.6	66.67	66.67	0
B4N0.2	55.56	22.22	22.22
B4N0.4	33.33	0	0
B4N0.6	55.56	11.11	0

表中为接种30 d的统计数据。再分化率为分化出芽或根的愈伤组织块比率。

## 讨 论

从本试验结果可以看出,不同的外植体在不同培养基上的愈伤组织诱导表现有很大差异,下胚轴接种后第5天就出现可见愈伤组织,而真叶和叶柄接种后第9天愈伤组织才出现,而且愈伤组织的质地、生长速度也有差异。产生这种差异的原

因可能与外植体、培养基都有关系。王媛媛等(2010)以南方紫花苜蓿为试材,得到下胚轴作为外植体诱导愈伤组织的效果较好;张徐俞等(2011)在研究天台铁线莲愈伤组织诱导时得出嫩茎为最佳外植体,这些研究表明不同的植物材料其诱导愈伤组织的最适外植体的不同,本试验虽然未将4种外植体接种在完全一致的培养基上进行比较,但从4种外植体在不同培养基上的综合表现仍可看出下胚轴表现最好,可以认为下胚轴是诱导外植体最好的愈伤组织。当然,培养基的不同所导致的差异也是不可忽视的,关于芥菜不同外植体愈伤组织诱导的最适培养基还需进一步研究。

本试验中,对生长在含有不同2,4-D浓度培养基中的下胚轴愈伤组织进行植株再生时发现,在2,4-D浓度较高培养基上生长的愈伤组织,植株再生能力有所降低。刘福平和陈移亮(2008)在研究细胞分裂素对蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导的影响时发现,外植体在只含2,4-D培养基上诱导的愈伤组织没有胚性,王媛媛等(2010)以南方紫花苜蓿为试材研究时,发现2,4-D浓度过高时,愈伤组织呈水浸状,乳白或灰色,无再分化能力。以上研究都说明在愈伤组织培养阶段2,4-D浓度对愈伤组织的植株

再生能力有着较大的影响, 此阶段较高的2,4-D浓度会抑制其植株再生能力。

### 参考文献

- 贾毛毛, 李学强, 李文静(2010). 荠菜快繁体系初步研究. 北方园艺, (24): 157~159
- 刘福平, 陈移亮(2008). 细胞分裂素对蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导的影响. 热带作物学报, 29 (1): 42~46
- 王丽艳, 荆瑞勇, 郭培磊(2007). 荠菜无菌快速繁殖技术的研究. 黑龙江八一农垦大学学报, 19 (3): 13~16
- 王媛媛, 柳小妮, 柏东山(2010). 三个南方紫花苜蓿品种的耐盐性及其再生体系的建立. 甘肃农业大学学报, 45 (2): 127~133
- 亚吉东, 李树珍, 申仕康, 申意, 王跃华, 蒋连计(2009). 荠菜(*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic)种子萌发特性. 种子, 28 (1): 37~39
- 张徐俞, 蒋明, 陈彤, 李温平, 倪雪莉(2011). 天台铁线莲愈伤组织诱导研究. 江苏农业科学, 39 (3): 65~66
- Bonfils AC, Gleddie SC, Webb JA, Keller WA (1992). Somatic embryogenesis from cell suspension and protoplast cultures of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic. In Vitro Cell Dev Biol, 28: 137~142
- Sigareva MA, Earle ED (1999). Regeneration of plants from protoplasts of *Capsella bursa-pastoris* and somatic hybridization with rapid cycling *Brassica oleracea*. Plant Cell Rep, 18: 412~417
- Zilkah S, Gressel J (1977). Cell cultures vs. whole plants for measuring phytotoxicity. I. The establishment and growth of callus and suspension cultures; definition of factors affecting toxicity on cells. Plant Cell Physiol, 18: 641~655