

正交试验优化余甘子愈伤组织诱导培养基研究

黄 勇, 张 铁, 沈尚东
(文山学院, 云南 文山 663099)

摘要: 以余甘子无菌幼苗作为材料, 通过正交试验研究影响余甘子愈伤组织诱导的因素, 以完善余甘子组织培养体系。结果表明: 以茎或叶作为外植体, 在 MS+1.0 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L 6-BA 培养基中, 愈伤组织诱导率达 87.9% 以上, 愈伤组织生长良好。

关键词: 余甘子; 愈伤组织; 组织培养; 离体快繁; 正交试验

中图分类号: Q813.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2018)03-0049-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2018.03.014

Study on Optimizing the Inducing Medium for Calli of *Phyllanthus emblica* through Orthogonal Test

HUANG Yong, ZHANG Tie, SHEN Shangdong
(Whenshan University, Whenshan Yunnan 663099, China)

Abstract: Using asepsis seedling of *Phyllanthus emblica* as material, the factors that affect the callus induced were studied, in order to improve the system of tissue culture for *Phyllanthus emblica* through orthogonal experiment. The results show that when using stems or leaves as explants, inducement rate of calli was above 87.9% and calli grew well in the medium of MS+1.0 mg/L 2,4-D +0.5 mg/L 6-BA.

Key words: *Phyllanthus emblica*; Callus; Tissue culture; Propagation in vitro; Orthogonal test

余甘子 (*Phyllanthus emblica* L.) 系大戟科 (Euphorbiaceae) 叶下珠属 (*Phyllanthus*) 乔木。分布于印度、斯里兰卡、中南半岛、印度尼西亚、马来西亚、菲律宾等, 南美也有栽培。我国产于江西、福建、台湾、广东、海南、广西、四川、贵州、云南等南方省 (区)。余甘子用途广泛。其根系发达, 可保持水土, 可作产区荒山荒地酸性土造林的先锋树种。树姿优美, 可作庭园风景树, 亦可作为果树栽培。果实富含丰富的丙种维生素, 供食用, 可生津止渴, 润肺化痰, 治咳嗽、喉痛, 解河豚鱼中毒等。初食味酸涩, 良久乃甘, 故名“余甘子”。树根和叶可供药用, 能解热清毒, 治皮炎、湿疹、风湿痛等。叶晒干供枕芯用料。种子含油量 16%, 供制肥皂。树皮、叶、幼果可提制栲胶。木材棕红褐色, 坚硬, 结构细致, 有弹性, 耐水湿, 供农具和家具用材, 又为优良的薪炭柴^[1]。

余甘子良种苗木多采用嫁接的方法进行无性

繁殖, 扦插繁殖不理想^[2]。组织培养是植物快速繁殖的最佳途径, 但国内外对余甘子组织培养的相关报道很少。Sehgal-CB 等^[3-4]用胚乳诱导出胚状体, 形成三倍体小苗, 但小苗移植死亡率较高。Parul 等^[5]用下胚轴诱导出不定芽, 但不定芽生根非常困难。Rahman MM 等^[6]用茎尖和节间诱导丛生芽, 但丛生芽生根率很低。张守英等^[7-8]成功诱导嫩芽、嫩枝形成丛生芽, 但生根率和移栽存活率都不高。胡海涛等^[9-10]用下胚轴诱导出不定芽, 生根率也不高。植物组织培养环节中, 愈伤组织诱导至关重要, 既可进一步诱导器官分化形成组培苗, 又可直接从愈伤组织中提取次生代谢产物。我们通过混合正交设计, 以期筛选出余甘子愈伤组织诱导培养基配方, 完善余甘子组织培养方案。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生余甘子种子, 购自文山市综合市场。

收稿日期: 2017-11-13

作者简介: 黄 勇(1981—), 男, 四川泸州人, 讲师, 硕士, 主要从事植物资源开发研究工作。E-mail: huangyong-1159@163.com

1.2 研究方法

1.2.1 种子无菌萌发 将余甘子种子冲洗干净, 置 75%酒精中漂洗 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 1 g/kg HgCl₂ 灭菌 10 min, 无菌水冲洗 5 次。接种于 1/2 MS+ 蔗糖 25 g/L+ 琼脂 6 g/L, pH 为 5.8 的培养基上, 培养在温度为 25 ℃、光照强度为 2 000 lx、光周期为 12 h 条件下。

1.2.2 愈伤组织诱导 种子萌发后, 分别取无菌幼苗的根、茎、叶接种到愈伤组织诱导培养基。愈伤组织诱导培养以 MS 为基本培养基, 添加蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L, pH 为 5.8。植物生长调节剂采用混合正交设计(表1)。

表 1 余甘子愈伤组织诱导混合正交设计

处理	6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	外植体
1	0	0	根
2	0	0.50	茎
3	0	1.00	叶
4	0	2.00	根
5	0	4.00	茎
6	0.25	0	叶
7	0.25	0.50	根
8	0.25	1.00	茎
9	0.25	2.00	叶
10	0.25	4.00	根
11	0.50	0	茎
12	0.50	0.50	叶
13	0.50	1.00	根
14	0.50	2.00	茎
15	0.50	4.00	叶
16	1.00	0	根
17	1.00	0.50	茎
18	1.00	1.00	叶
19	1.00	2.00	根
20	1.00	4.00	茎
21	2.00	0	叶
22	2.00	0.50	根
23	2.00	1.00	茎
24	2.00	2.00	叶
25	2.00	4.00	根

如表 1 所示, 共 25 个处理, 每处理接种 12 瓶, 每瓶接种 3~4 个外植体。置温度为 25 ℃、光照强度为 2 000 lx、光周期为 12 h 培养室中培养。观察外植体生长情况。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织生长情况

不同外植体在不同培养基中的生长情况有所

差异, 有的未形成愈伤组织。形成愈伤组织的情况如表 2 所示。

表 2 余甘子愈伤组织生长情况

外植体	产生位置	产生速度	颜色
根	多在一端	慢	灰白色
茎	一端或两端	较快	淡黄色
叶	多在切口处	快	黄绿色

从愈伤组织产生速度和颜色来看, 茎和叶是诱导余甘子形成愈伤组织较好的外植体(图 1), 而根的效果不佳。

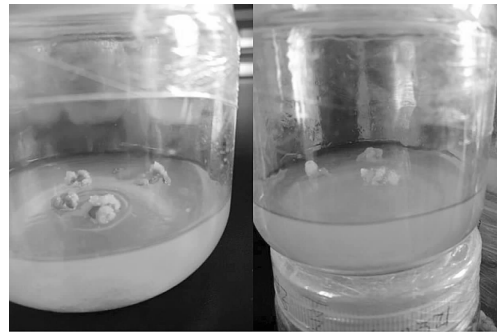


图 1 余甘子叶(左)和茎(右)愈伤组织生长情况

2.2 愈伤组织诱导率极差分析

各处理愈伤组织诱导率有较大差异, 结果如表 3 所示。

从表 3 极差的 R 大小可以看出, $2, 4-D >$ 外植体 $>$ 6-BA, 说明对诱导余甘子形成愈伤组织影响最大的因素是 2, 4-D, 其次是外植体, 然后是 6-BA。

从表 3 均值 K 的大小可以看出, 对于 6-BA 来说, 均值 K 从大到小依次为 K_3, K_4, K_1, K_2, K_5 , 说明随着 6-BA 质量浓度的增加, 余甘子愈伤组织诱导率总体表现为先升高后降低的趋势, 最佳质量浓度为 0.50 mg/L; 对于 2, 4-D 来说, 不添加 2, 4-D 未能诱导出愈伤组织, 均值 K 从大到小依次为 K_3, K_4, K_5, K_2, K_1 , 表明随着 2, 4-D 质量浓度的增加, 余甘子愈伤组织诱导率表现为先升高后降低的趋势, 最佳质量浓度为 1.00 mg/L; 对于外植体来说, 均值 K 从大到小依次为 K_2, K_3, K_1 , 即茎的愈伤组织诱导率最高、叶次之、根最低, 说明应选用茎或叶作为诱导余甘子愈伤组织的外植体。

2.3 愈伤组织诱导率方差分析

运用 SPSS 软件对影响余甘子愈伤组织诱导率的因素进行显著性检验, 结果见表 4。

表 3 余甘子愈伤组织诱导极差分析

处理	6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	外植体	诱导率 /%
1	0	0	根	0
2	0	0.50	茎	30.2
3	0	1.00	叶	38.7
4	0	2.00	根	10.5
5	0	4.00	茎	47.3
6	0.25	0	叶	0
7	0.25	0.50	根	13.2
8	0.25	1.00	茎	52.9
9	0.25	2.00	叶	37.1
10	0.25	4.00	根	13.3
11	0.50	0	茎	0
12	0.50	0.50	叶	75.0
13	0.50	1.00	根	27.5
14	0.50	2.00	茎	87.9
15	0.50	4.00	叶	49.3
16	1.00	0	根	0
17	1.00	0.50	茎	39.5
18	1.00	1.00	叶	48.5
19	1.00	2.00	根	10.6
20	1.00	4.00	茎	57.9
21	2.00	0	叶	0
22	2.00	0.50	根	7.5
23	2.00	1.00	茎	51.8
24	2.00	2.00	叶	41.2
25	2.00	4.00	根	5.6
均值 K_1	25.3	0	9.8	
均值 K_2	23.3	33.1	45.9	
均值 K_3	47.9	43.9	36.2	
均值 K_4	31.3	37.5		
均值 K_5	21.2	34.7		
极差 R	26.7	43.9	36.1	

表 4 余甘子愈伤组织诱导率显著性检验^①

源	III 型平方和	df	均方	F	Sig.
校正模型	37 041.541 ^a	10	3 704.154	25.292	.000
截距	69 730.430	1	69 730.430	476.112	.000
6-BA	4 124.496	4	1 031.124	7.040	.000**
2, 4-D	15 112.682	4	3 778.171	25.797	.000**
外植体	12 335.597	2	6 167.798	42.113	.000**
误差	9 373.320	64	146.458		
总计	113 089.400	75			
校正的总计	46 414.861	74			

①因变量为诱导率，**表示 0.01 水平差异显著，*表示 0.05 水平差异显著。

从表 4 可以看出，6-BA、2, 4-D、外植体三者的 Sig 值均为 0，小于 0.01，表明 6-BA、2, 4-D、外植体对余甘子愈伤组织诱导率均具有极显著的影响。

3 小结与讨论

以余甘子无菌幼苗作为试验材料，通过正交试验研究余甘子愈伤组织诱导影响因素。结果表明，以茎或叶作为外植体，在 MS+1.0 mg/L 2, 4-D +0.5 mg/L 6-BA 培养基中，愈伤组织诱导率达 87.9% 以上，愈伤组织生长良好。

愈伤组织诱导是植物组织培养过程中的关键环节，诱导率的高低受很多因素的影响。一是外植体的选择。从本试验结果看，茎和叶是较好的外植体。二是激素的质量浓度和组合。一般而言，适宜质量浓度的生长素是决定因素，而适宜质量浓度的细胞分裂素有一定的促进作用。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第四十四卷(第一分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 87.
- [2] 崔永忠, 陈玉德, 郑德蓉. 余甘子繁殖试验初报[J]. 林业科学研究, 1997, 10(1): 93-95.
- [3] SEHGAL C B, SUNILIA K. Morphogenesis and plant regeneration from cultured endosperm of *Emblica officinalis* Gaertn [J]. Plant Cell Reports. 1985.4(5): 263-266.
- [4] SEHGAL C B, SUNILIA K, SYED A N, et al. In vitro regeneration of triploid plantlets from the endosperm of *Emblica officinalis* Gaertn [J]. Advances in Agricultural Research in India, 1994(2): 1-19.
- [5] PARUL G, VIDYA P, KANT U. In vitro shoot differentiation in *Emblica officinalis* Gaertn [J]. Journal of Phytological Research, 1997, 7(2): 171-172.
- [6] RAHMAN M M, ROY P K, ROY S K. Clonal Propagation of *Emblica officinalis* through in vitro culture [J]. Plant Tissue Culture, 1999, 9(1): 32-35.
- [7] 张守英, 姚小华, 任华东, 等. 余甘子离体快速繁殖技术的初步研究[J]. 林业科学研究, 2002, 15(1): 116-119.
- [8] 张守英, 姚小华, 任华东, 等. 余甘子丛生芽诱导和快速繁殖研究[J]. 经济林研究, 2002, 20(1): 11-13.
- [9] 胡海涛, 刘永立, 姚小华. 余甘子下胚轴离体培养中的器官形成与植株再生[J]. 果树学报, 2006, 23(4): 623-626.
- [10] 胡海涛. 余甘子高效再生体系的建立及遗传转化条件的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.

(本文责编: 陈 珩)