

功率超声对地灵叶片愈伤组织 诱导和芽生长的影响

曾 弦, 肖娅萍*, 胡雅琴, 张媛华

(陕西师范大学生命科学学院, 陕西西安 710062)

摘 要: 用频率分别为 27 KHz 和 40 KHz 的功率超声对地灵组培苗进行不同时间的处理, 继代培养后进行观察。结果显示: 经超声处理的叶片形成愈伤组织时间比对照组提前, 但在愈伤组织生长后期增殖与对照组没有差异; 超声处理后的腋芽生长状况比对照组好, 表现为腋芽高度增加, 直径加粗, 说明超声在一定程度上可以促进植物的生长。

关键词: 功率超声; 地灵; 愈伤组织

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)02-0130-04

Effect of power ultrasound on induction of *Stachys sieboldii* leaf callus and growth of axillary bud

ZENG Xian, XIAO Ya-ping*, HU Ya-qin, ZHANG Yuan-hua

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

Abstract: Using the power ultrasound 27 KHz and 40 KHz respectively to treat with *Stachys sieboldii* in different treatment time then the treated materials were sub cultured. We observed that the leaves callus formation time of ultrasound treatment groups was shortened comparing with the control ones. However, there was no apparent difference during the later growing period. The axillary buds of ultrasound treatment groups grow better than the control ones, such as increased height and thickened stem. It shows that power ultrasound, to some degree, could stimulate the growth of plant.

Key words: power ultrasound; *Stachys sieboldii*; callus

超声波是指频率高于 20 KHz 且不引起听觉的弹性波。功率超声是利用超声波振动产生的能量来改变物质的组织结构、状态和功能。功率超声处理技术还可以引发或强化机械、物理、化学、生物等过程, 提高这些过程的质量和效率, 达到其他处理技术难以达到的效果。目前, 功率超声处理技术已广泛应用于工业、农业、医药卫生等领域(郭孝武, 2000; 孙丹红等, 2002; 邱荷香, 2002)。对于功率超声生物

效应的研究始于二十世纪初, 目前探索超声处理技术向生物工程领域渗透的研究已引起了广大科技工作者的浓厚兴趣(李重九等, 1999; 董云洲, 1999)。

地灵(*Stachys sieboldii* Miq.), 又名甘露子、螺丝菜、宝塔菜等, 是唇形科水苏属多年生草本植物(胡雅琴等, 2003); 原产于华北及西北地区, 现各地有栽培; 生湿地, 海拔分布可高达 3 200 m; 块茎可供食用, 全草治肺炎。有关地灵的组织培养工作已

收稿日期: 2003-07-10 修订日期: 2003-10-15

基金项目: 教育部“利用生物技术保护与开发秦巴山区珍稀濒危药用植物资源研究”项目

作者简介: 曾弦(1980-), 女, 湖南常德人, 硕士生, 植物生物技术专业。* 为通讯作者 E-mail: yapingxiao@yahoo.com.cn

经开展(肖娅萍等, 2002, 2003)。

本文以地灵组培苗为研究对象, 经不同频率、不同时间的超声处理, 研究超声处理对地灵生长的影响, 以期为地灵的进一步开发利用提供依据, 同时为功率超声的研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

超声波发生器为陕西师范大学应用声学研究所研制, 频率分别为 27 KHz 和 40 KHz。实验装置的主体为超声波发生器, 由电源、电压变压器、电压放大器、发射电路计时器以及换能器组成。材料处理池为不锈钢及铝合金薄板制成的矩形容器。超声强度 1.5 w/cm^2 。

1.2 材料

植物材料采自河南, 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, 为唇形科水苏属植物地灵 (*S. sieboldii* Miq.)。本实验所选材料为继代培养的地灵组培苗。

1.3 方法

1.3.1 丛生芽的获得 采回幼嫩的地灵植株, 流水冲洗 0.5~2 h 后, 截取茎段, 置于三角瓶中, 用 70% 酒精处理 15~20 s, 0.1% 的 HgCl_2 表面消毒 10~15 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 无菌条件下接种于起始培养基 1/2 MS, 外植体培养至无菌状态, 转接于 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L。培养基附加蔗糖 4%, 琼脂 0.6%~0.8%, pH5.8, 培养温度为 $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, 光照度 2 000 lx, 光照 12~14 h/d。

培养 10 d 后, 腋芽发出, 切下腋芽继代培养, 基部发出丛生芽。

1.3.2 超声处理 待生长健壮的丛生芽长至 4~6 节(生长 20 d 左右)时, 在超净工作台上剪取每苗上方高度一致(高大约 1.5 cm)的带叶片的茎段放入无菌三角瓶中(瓶中已装有 100 mL 无菌水)。每瓶 10 段, 标号 0~16。1~8 号用频率为 27 KHz 的超声波依次处理 0.5、1、1.5、2、2.5、3、6、10 min, 9~16 号用频率为 40 KHz 的超声波依次处理 0.5、1、1.5、2、2.5、3、6、10 min。0 号为对照组。处理介质均为水。

超声处理后迅速将处理过的叶片, 切成 0.5 cm^2 大小, 接入 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基, 观察叶片经过超声处理后愈伤组织形成

状况。同时将经过超声处理后地灵茎段接入 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基, 观察腋芽发生及生长情况。

2 结果与分析

2.1 超声对植株外形的影响

地灵植株经不同频率、不同时间的超声处理, 外观呈现不同程度的损伤。超声处理 1 min, 叶片即呈现轻度损伤, 表面出现少量深绿色斑点; 超声处理 3 min, 深绿色斑点增加; 超声处理 6 min, 大部分叶片呈现严重损伤, 有的叶片甚至只剩下网状叶脉, 说明叶肉大部分已被破坏, 可见超声可破坏植物的叶肉组织。作为超声处理介质的无菌水, 随着超声处理时间的延长, 颜色逐渐由自然色转变为浅绿色, 最后呈现深绿色, 这是受超声破坏散到水中的叶肉细胞中叶绿素的颜色, 这从侧面说明超声处理时间越长, 地灵叶片受到的损伤越大。

2.2 超声对叶片愈伤组织形成的影响

我们观察到: 经频率 27 KHz 和 40 KHz 的超声处理后, 叶片愈伤组织的形成情况类似。因此我们以用 27 KHz 处理后叶片愈伤组织形成为例来探讨超声对地灵叶片愈伤组织形成的影响。

接种 4 d, 经超声处理的叶片全部卷曲, 而对照组仅正面向下的叶片发生卷曲。

接种 6 d, 大部分经超声处理的叶片叶柄切口处出现白色突起; 未切到叶柄的叶子则在叶片切口处出现类似结构。部分超声损伤严重的叶片呈枯死状。对照组只有少数叶片发生卷曲。

接种 8 d, 经超声处理的叶片中脉处出现淡绿色的愈伤组织, 少数叶片在中脉切口处出现淡绿色的愈伤组织。对照组叶片仅出现卷曲, 没有突起或愈伤组织出现。

接种 10 d, 对照组的叶片出现突起, 少数叶片从叶柄到叶中脉、支脉都有淡绿色或淡黄色的愈伤组织形成。而经超声处理的叶片, 愈伤组织的数量虽有增多, 但不明显。

接种 14 d, 对照组叶片的支脉愈伤组织呈凸瘤状, 叶缘的凹缺处及叶尖都有愈伤组织出现, 而经超声处理的叶片则没有类似现象。

综上所述: 经超声处理, 地灵叶片愈伤组织出现和形成的时间比对照组短(图版 I: 5, 6); 但愈伤组织形成后, 对照组愈伤组织增殖较明显, 且叶缘处也

可形成愈伤组织。

不同处理后叶片颜色、愈伤组织出现时间、颜色、大小及紧密程度见表 1。

2.3 超声对腋芽发生及生长状况的影响

经超声处理,植株的生长情况比对照组好。形态上表现为:腋芽增高,直径加粗(图版 I:1~4)。

培养 21 d,超声处理后腋芽高度均在 2~3 cm,对照组腋芽高度几乎都在 1 cm 左右。

培养 21 d,用游标卡尺测量腋芽直径,结果见表 2。

经超声处理,腋芽的直径均有不同程度的增加。用 SPSS 10.0 作 LSD 极差分析,结果见表 3。

表 1 不同处理方法下地灵叶形成的愈伤组织的情况

Table 1 The situation of *Stachys sieboldii* leaves callus in different treatments

项目 Items	对照组 Control group	40 KHz 处理 Treat with 40 KHz	27 KHz 处理 Treat with 27 KHz
叶片颜色 Color of leaf	浅绿至深绿	不均一至均一	不均一至均一
愈伤组织出现时间 Time of formation of callus	10 d	6 d	6 d
愈伤组织颜色 Color of callus	白至淡绿/淡黄	白至深绿	白至深绿
愈伤组织颗粒大小 The granule size of callus	大	较小	较小
愈伤组织紧密程度 Degree of the tightness of callus	较疏松	紧密	紧密

表 2 不同处理腋芽直径 (mm)

Table 2 The diameter of axillary bud in different treatments (mm)

项目 Items	对照 Control	0.5 min	1 min	1.5 min	2 min	2.5 min	3 min	6 min	10 min
40 KHz 处理 Treat with 40 KHz	1.185	1.752	1.676	1.776	1.412	1.587	2.969	2.059	1.432
27 KHz 处理 Treat with 27 KHz	1.185	1.447	1.543	1.546	1.51	1.767	2.094	1.672	2.333

表 3 40 KHz 处理与 27 KHz 处理 LSD 极差分析腋芽直径的结果

Table 3 The outcome of the diameter of axillary bud of LSD on 40 KHz and 27 KHz

时间 Time (min)	40 KHz 处理 Treat with 40 KHz									27 KHz 处理 Treat with 27 KHz								
	对照 Control	0.5 min	1 min	1.5 min	2 min	2.5 min	3 min	6 min	10 min	对照 Control	0.5 min	1 min	1.5 min	2 min	2.5 min	3 min	6 min	10 min
0	—	*	*	*	—	*	*	*	—	—	—	*	*	*	*	*	*	*
0.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	*	*
1	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	—	—	*	*	*
1.5	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	*	*
2	—	—	—	—	—	—	*	*	—	—	—	—	—	—	—	*	*	*
2.5	—	—	—	—	—	—	*	*	—	—	—	—	—	—	—	*	—	*
3	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	—	—	*	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	—	—	—	*

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

LSD 分析可见,对于超声 40 KHz 处理的腋芽直径,2 min 处理和 10 min 处理与对照组差异不显著,而 0.5 min 处理除了与对照组差异显著外,和其它处理差异都不显著,说明 40 KHz 的超声处理对地灵腋芽生长影响存在时间区域值,0.5~1.5 min 的处理和 2.5~6 min 的处理都促进了腋芽的生长,而且短时间的超声处理促进效果差异不显著,而长时间的超声处理之间促进效果差异显著;而对于超声 27 KHz 处理的腋芽直径,对照组和 0.5 min 的

处理差异不显著,但和其他处理组差异显著,说明 27 KHz 的超声处理对地灵生长影响有一个时间阈值,在这个阈值以上的时间超声处理皆能促进地灵腋芽的生长,而且不同时间的超声处理促进作用亦不同。

3 讨论

超声处理可以对地灵植株造成损伤,是因为超

声具有空化作用,空化作用产生的高压很可能对细胞造成了一个损伤的过程(Giordano 等,1976;Doulah,1978)。这种损伤体现在很多方面,例如细胞壁局部破裂,细胞质膜通透性的改变,细胞膜的破损等。在本实验中叶肉细胞的损伤就是其中之一。

对超声处理后的叶片进行愈伤组织的诱导,发现出现愈伤组织的时间比对照组稍微提前一些,但在愈伤组织的生长后期,愈伤组织的增殖没有明显变化,说明超声处理在一定程度上可以激活细胞的脱分化能力,这种作用到底是通过破坏细胞壁或者增加膜透性从而加速细胞吸收培养基中的激素及营养物质还是通过改变细胞内某些酶的活性表现出来的还有待进一步研究。

一定时间的超声处理,可以促进腋芽的生长,它的这种作用有可能是通过改变地灵输导组织的输导能力表现出来的(Nardini 等,2001)。超声的空化作用很有可能损伤了导管,但这种损伤是可逆的。在停止超声处理后的一段时间内,受损伤的细胞不但能够修复损伤而且经过适宜的超声处理很有可能激活了腋芽生长的某条特定的代谢途径或者某个关键性的酶,从而促进了腋芽的生长(Bohm 等,2002)。

超声还具有热效应,可能一定程度上激活了一些受温度调控的酶的表达(冯若等,1994),改变了细胞的新陈代谢,从而促进了地灵腋芽的生长。

超声具有复杂的生物学效应,从我们的实验结果看,一定时间范围和一定功率的超声处理可以促进植物的生长,使形成愈伤组织的时间提前,因此我们可以通过超声来处理某些采用愈伤组织来获得次生代谢物的植物,以期减少实验周期。至于超声如何作用,超声处理对次生代谢物的积累有没有影响则有待于进一步的实验研究。

参考文献:

Bohm H, Anthony P, Garratt LC, et al. 2002. Ultrasound-induced physiological changes in cultured cells of *Petunia hybrida*[J]. *Artificial Cells Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology*, 30(2): 127-136.

Dong YZ(董云洲). 1999. The Biological Effect and Direct Gene Transfer to Tobacco Pollen by Sonication(超声波对烟草花粉的生物学效应及其诱导外源基因向烟草花粉的转移)[J]. *Journal of Basic Science and Engineering*(应用基础与工程科学学报), 7(4): 393-398.

Doulah MS. 1978. Application of the statistical theory of reliability to yeast cell disintegration in ultrasonic cavitation

[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 20(8): 1 287-1 290.

Feng R(冯 若), Zhao YY(赵逸云), Li HM(李化茂), et al. 1994. The Advance of Application of Ultrasound to Biotechnology(超声在生物技术中应用的研究进展)[J]. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 21(6): 500-503.

Giordano R, Leuzzi U, Wanderlingh F. 1976. Effects of ultrasound on uni cellular algae[J]. *Journal of the Acoustical Society of America*, 60(1): 275-278.

Guo XW(郭孝武). 2000. Application of ultrasonic technology to Growing and Cultivating medicinal Plants(超声技术在药用植物种植栽培中的应用)[J]. *World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine*(世界科学技术—中药现代化), 2(2): 24-26.

Hu YQ(胡雅琴), Xiao YP(肖娅萍). 2003. Tissue Culture and Rapid Propagation of *Stachys sieboldii*(地灵的组织培养及快速繁殖)[J]. *Plant physiology communications*(植物生理学通讯), 39(3): 225.

Li CJ(李重九), Hou YX(侯玉霞), Cai ZN(蔡祝南), et al. 1999. A Study on TMV Infection of Tobacco Cells by Ultrasonic Treatment(用超声波法使烟草花叶病毒侵染烟草细胞的研究)[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*(植物病理学报), 29(1): 86-90.

Nardini Andrea, Tyree Melvin T, Salleo Sebastiano. 2001. Xylem cavitation in the leaf of *Prunus laurocerusus* and its impact on leaf hydraulics[J]. *Plant Physiology* (Rockville), 125(4): 1 700-1 709.

Qiu HX(邱荷香). 2002. Research on the Application Ultrasound in Solving Water-bloom(超声技术抑制藻类生长的研究)[J]. *Journal of Anqing Teachers College*(安庆师范学院学报), 8(1): 69-73.

Sun DH(孙丹红), Zhou RJ(周如军), Shi B(石 碧), et al. 2002. Effects of ultrasound on vegetable tanning(功率超声波对栲胶池鞣法的影响)[J]. *China Leather*(中国皮革), 31(9): 33-35.

Xiao YP(肖娅萍), Wang XA(王孝安), Hu YQ(胡雅琴). 2002. Sieving culture medium inducing callus carcinogenic rhizome of *Stachys* sp. with growth inducement value(用生长诱导值筛选地灵愈伤组织诱导培养基)[J]. *Journal of Northwest University*(西北大学学报), 32(5): 569-572.

Xiao YP(肖娅萍), Hu YQ(胡雅琴), Wang ZZ(王喆之). 2003. Effect of Kanamycin on induction and growth of *Stachys sieboldii* callus(卡那霉素对地灵愈伤组织诱导和生长的影响)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 23(2): 318-322.