

文章编号:1673-5072(2008)04-0421-05

苦豆子愈伤组织的诱导与继代培养的去褐化研究

王立强¹, 杨军^{1,2}, 王光碧¹, 邓锴¹

(1. 西华师范大学生命科学院, 四川南充 637002; 2. 西华师范大学珍稀动植物研究所, 四川南充 637002)

摘要: 利用苦豆子的子叶进行愈伤组织的诱导与继代, 筛选出诱导愈伤组织及继代时的最佳培养基. 实验发现各种培养基均能诱导出愈伤组织, 0.5-1.0mg/L的2,4-D和0.5-2.0mg/L的细胞分裂素6-BA或与Zt共同添加, 诱导的愈伤组织状态较好, 且当NAA(浓度为0.5mg/L)存在时可改善愈伤组织的状态; 浓度为2.0mg/L的Kt和1.0mg/L以下的2,4-D、NAA分别或同时使用时同样可得状态较好的愈伤组织. 低浓度的2,4-D、6-BA混合使用或添加1.0mg/L以下的NAA是愈伤组织继代时较好的激素组合, 同时观察到0.5mg/L 2,4-D和0.5mg/L Kt以及0.5mg/L 2,4-D、0.2mg/L NAA和0.2mg/L TDZ两种组合也能较好的继代愈伤组织. 愈伤组织的去褐化除调节激素的浓度与配比外, 还采取了其他的去褐化措施, 发现添加0.1%活性炭的条件下快速继代(2d继代一次)以及调整基本培养基是较好的去褐化措施.

关键词: 苦豆子; 组织培养; 激素; 愈伤组织

中图分类号: Q944.6 **文献标识码:** B

苦豆子(*Sophora alopecuroides* Linn.)是豆科槐属植物, 别名苦豆根、苦甘草、西豆根、苦豆草、欧苦参等, 分布于我国西北省区及中亚细亚一带. 苦豆子含有二十多种生物碱, 其他还含有多种黄酮类、有机酸、氨基酸、蛋白质和多糖类成分. 根、根茎、全草及种子入药, 味苦性寒, 有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀虫、抗癌、增强免疫等作用^[2].

槐属植物的组织培养国际上仅有关于濒危种 *S. toromiro*^[3,4] 和国槐(*S. japonica*)^[5] 快速繁殖的报道. 在国内, 王喆之^[6-8]、陈维伦^[9] 报道建立了槐树的离体再生体系. 前者^[10] 还利用槐树的花药培养获得了单倍体植株. 饶品昌^[11]、李晓莺^[12] 等先后进行了苦豆子的快速繁殖. 近年来, 王关林研究了蝶形花亚科8种槐树的组织培养及再生能力与基因型效应的关系^[13]. 然而却没有关于苦豆子离体再生体系建立的报道. 本文进行了苦豆子愈伤组织的诱导和继代培养的去褐化研究, 为苦豆子离体再生体系的建立打下了基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

苦豆子种子采自新疆玛纳斯县.

1.2 方 法

苦豆子种子用98%浓硫酸软化50 min^[14], 75%酒精灭菌十分钟, 无菌水冲洗5次, 然后接种在MS空白培养基上; 6-8 d后取无菌苗子叶, 切去边缘部分, 然后将其一分为二, 接种于愈伤组织诱导培养基中, 并在光周期为16 h/d、光强度为1000 lux、温度为(25±2)℃的培养室中进行培养. 培养基均为MS基本培养基(个别说明除外), 并在121℃条件下灭菌15 min. 21 d后将获得的愈伤组织继代于继代培养基中; 14 d后将褐化较轻的愈伤组织继代于防褐化培养基中, 筛选去褐化措施. 实验重复3次, 每个处理接种至少接种30块外植体. 数据分析时, 对数据进行了反正弦平方根转换处理, 利用DPS7.05进行单因素方差分析, 并在95%的置信区间里采用LSD法进行多重比较, 表中数据为平均值±标准差.

收稿日期:2008-08-25

基金项目:四川省青年科技基金项目(05ZQ026-017);四川省重点学科建设项目(SZD0420)

作者简介:王立强(1983-),男,山东省平度人,西华师范大学生命科学院硕士研究生,主要从事植物组织培养以及生理学方面的研究.

通讯作者:杨军(1973-),男,重庆忠县人,西华师范大学生命科学院副研究员,主要从事细胞生物学和遗传学研究.

2 实验结果

2.1 不同激素浓度及配比对苦豆子子叶愈伤组织诱导的影响

各种激素浓度及配比均能诱导出愈伤组织,并且诱导率与对照组有显著差异,仅 Kt 的诱导能力稍差;各种处理下的褐化率均无显著差异,且褐化现象严重,褐化问题是苦豆子离体再生体系建立时的一大障碍.各种激素浓度及配比下获得的愈伤组织的状态差异较大,在高浓度或高活性的分裂素存在时愈伤组织大多为绿色、生长致密,在高浓度生长素存在时愈伤组织松散且大都褐化甚至变黑死亡,根据鲜嫩率和死亡率以及观察的结果筛选出部分较好的激素浓度及配比对愈伤组织进行继代.子叶诱导愈伤组织的结果见表 1.

表 1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

Tab. 1 Effect of different medium for callus induction

植物激素 (mg/L)	出愈率 (%)	褐变率 (%)	鲜嫩率 (%)	死亡率 (%)	愈伤组织状态
Control	40.0 ± 7.1d	30.0 ± 1.4a	47.5 ± 1.8abc	20.0 ± 0.0abc	褐色 鲜绿色 仅边缘愈伤化
2,4-D1.0	100.0 ± 0.0a	70.3 ± 5.1a	45.9 ± 2.7abc	13.3 ± 1.9bcd	褐色 黑色 致密
NAA1.0	93.3 ± 9.4ab	71.7 ± 2.6a	41.7 ± 1.7abc	30.0 ± 1.4ab	绿色 黑色 致密 出愈较易 有死亡
BA1.0	100.0 ± 0.0a	50.8 ± 1.3a	37.9 ± 1.1abc	19.2 ± 1.5abc	生根并有死亡现象
Zt1.0	97.9 ± 3.0ab	50.8 ± 1.3a	59.2 ± 1.2abc	4.2 ± 0.6cd	绿色 致密 出愈难
Kt1.0	77.0 ± 1.0c	62.0 ± 2.5a	82.0 ± 2.5ab	6.0 ± 0.8cd	浅绿色致密 出愈慢
TDZ1.0	96.9 ± 4.4ab	67.8 ± 3.1a	33.8 ± 5.3abc	37.8 ± 0.3a	绿色 黑色 致密 出愈易死亡严重
2,4-D0.5 + BA0.5	100.0 ± 0.0a	50.3 ± 3.3a	69.1 ± 1.3abc	0.0 ± 0.0d	黄绿色 组织致密表面沙状
2,4-D0.5 + BA1.0	91.7 ± 11.8b	37.9 ± 2.9a	58.3 ± 5.9abc	0.0 ± 0.0d	黑绿色 非常致密且褐化变黑
2,4-D0.5 + Zt0.5	100.0 ± 0.0a	61.1 ± 1.3a	38.9 ± 1.3abc	4.4 ± 0.6cd	绿色 褐色 较致密 生长两极分化
2,4-D0.5 + Kt0.5	100.0 ± 0.0a	31.3 ± 4.4a	54.4 ± 5.0abc	0.0 ± 0.0d	绿色 较致密 出愈难
2,4-D0.5 + TDZ0.5	100.0 ± 0.0a	20.8 ± 2.2a	35.0 ± 3.5abc	0.0 ± 0.0d	深绿色 致密 褐化 生长极不均匀
NAA0.5 + BA1.0	100.0 ± 0.0a	46.1 ± 8.6a	56.7 ± 1.9abc	0.0 ± 0.0d	绿色 较致密 水样状
NAA0.5 + Zt1.0	100.0 ± 0.0a	42.5 ± 2.5a	34.2 ± 1.3abc	5.0 ± 0.7cd	浅绿至绿色 较致密 出愈难
NAA0.5 + Kt1.0	100.0 ± 0.0ab	65.4 ± 6.5a	25.2 ± 7.4bc	6.5 ± 0.9cd	绿色 较致密 出愈难 生根
NAA0.5 + TDZ1.0	95.0 ± 7.1a	58.3 ± 2.5a	54.6 ± 2.2abc	0.0 ± 0.0d	深绿色 致密 出愈难 轻微褐化
2,4-D1.0 + BA0.5	100.0 ± 0.0ab	37.0 ± 1.4a	61.5 ± 1.2abc	10.0 ± 0.9bcd	黄绿色 褐色 致密沙状状态好
2,4-D1.0 + Zt0.5	98.5 ± 2.1a	29.2 ± 4.1a	70.8 ± 4.1abc	0.0 ± 0.0d	绿色 松散 生长较好仅底部褐化
2,4-D1.0 + Kt0.5	100.0 ± 0.0a	42.9 ± 5.1a	63.3 ± 4.2abc	6.3 ± 0.8cd	黄绿至浅绿色 致密沙状 生长快
2,4-D1.0 + TDZ0.5	100.0 ± 0.0ab	65.2 ± 4.9a	28.3 ± 4.0c	0.0 ± 0.0d	褐色 致密 出愈困难
NAA1.0 + BA0.5	94.0 ± 8.5a	48.0 ± 1.7a	50.7 ± 2.4abc	5.7 ± 0.3bcd	黄绿色 褐色 致密沙状 生长缓慢
NAA1.0 + Zt0.5	100.0 ± 0.0a	61.3 ± 3.0a	38.7 ± 3.0abc	0.0 ± 0.0d	绿色 松散 生长较好仅底部褐化
NAA1.0 + Kt0.5	100.0 ± 0.0a	42.3 ± 5.1a	63.3 ± 4.2abc	6.3 ± 0.8cd	黄绿至浅绿致密沙状 褐化不严重
NAA1.0 + TDZ0.5	100.0 ± 0.0a	23.9 ± 3.4a	87.0 ± 1.8a	0.0 ± 0.0d	绿色 致密 出愈困难
NAA1.0 + TDZ1.0	100.0 ± 0.0a	39.7 ± 2.8a	50.6 ± 2.7abc	0.0 ± 0.0d	绿色 致密 出愈困难
2,4-D0.5 + NAA0.5 + BA0.5	100.0 ± 0.0a	33.0 ± 3.5a	68.6 ± 3.3abc	0.0 ± 0.0d	黄绿至浅绿 致密沙状 生长快
2,4-D0.5 + NAA0.5 + BA1.0	100.0 ± 0.0a	39.2 ± 5.9a	30.8 ± 3.7bc	20.0 ± 0.3abcd	绿色 致密 出愈慢

续表 1

植物激素 (mg/L)	出愈率 (%)	褐变率 (%)	鲜嫩率 (%)	死亡率 (%)	愈伤组织状态
2.4 - D0.5 + NAA0.5 + Zt0.5	100.0 ± 0.0a	56.3 ± 3.7a	50.9 ± 4.1abc	0.0 ± 0.0d	绿色 较致密 出愈难 基部褐化
2.4 - D0.5 + NAA0.5 + Kt0.5	100.0 ± 0.0a	39.1 ± 5.5a	58.7 ± 5.8abc	0.0 ± 0.0d	绿色 致密 出愈慢
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + TDZ0.2	100.0 ± 0.0a	42.4 ± 1.1a	72.6 ± 1.0abc	0.0 ± 0.0d	黑绿色 较致密 沙样状且褐化
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + BA2.0	100.0 ± 0.0a	40.0 ± 0.0a	55.0 ± 7.1abc	0.0 ± 0.0d	黑绿色 致密 表面干燥 出愈难
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + Zt2.0	100.0 ± 0.0ab	42.6 ± 3.2a	63.9 ± 2.3abc	0.0 ± 0.0d	绿色 致密 基部褐化变黑
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + Kt2.0	100.0 ± 0.0a	23.0 ± 4.3a	72.6 ± 1.1abc	0.0 ± 0.0d	鲜绿色 致密 出愈难
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + TDZ0.5	97.5 ± 3.5a	36.4 ± 1.6a	46.1 ± 8.6abc	0.0 ± 0.0d	绿色 致密 出愈慢

注:表中数据为平均数 ± 标准误,在 95% 的置信区间里采用 LSD 法进行多重比较,不同字母表示具有显著差异。

2.2 继代激素浓度及对比对愈伤组织生长的影响

各种激素浓度及对比对预防愈伤组织继代时的褐化效果并不理想,且褐化问题依然严重,乃至成为愈伤组织继代培养的最大障碍。生长素浓度较高条件下愈伤组织较疏松,褐化严重,难以继代;分裂素浓度较高时愈伤组织较致密,尽管表面褐化,但可以继代不至于死亡,且在个别激素条件下产生了绿色斑点,有望进一步分化出芽,与李晓莺^[12]的结果相似。愈伤组织的鲜嫩率和死亡率受褐化和激素的双重影响。鲜嫩率与生长素浓度正相关和褐化率负相关,死亡率则相反,其生长情况见表 2。

表 2 愈伤组织继代于不同培养基上时的生长情况

Tab.2 Growth station of callus sub-cultured on various mediums

植物激素 (mg/L)	褐化率 (%)	鲜嫩率 (%)	死亡率 (%)	愈伤组织状态
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + BA0.5	74.1 ± 1.6ab	13.7 ± 7.6bc	33.3 ± 0.0abc	褐色 浅绿色 松散 生长慢
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + BA1.0	62.0 ± 3.1ab	56.0 ± 3.4ab	6.0 ± 8.5c	黄绿色 松散 生长快状态好 仅略微褐化
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + BA0.75	79.2 ± 1.1ab	25.2 ± 4.8abc	0.0 ± 0.0c	黄绿色 褐色 较紧密 个别褐化严重死亡
2,4 - D0.3 + NAA0.3 + Zt1.2	91.7 ± 1.2 a	29.8 ± 1.9abc	10.0 ± 1.5c	黄绿色 绿色 褐色 较紧密 轻微褐化
2,4 - D0.3 + NAA0.3 + Z0.3	79.2 ± 2.9ab	29.2 ± 4.1abc	0.0 ± 0.0abc	褐色 松散不生长 与琼脂接触处呈炭疽状
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + Kt0.5	87.0 ± 1.8ab	13.0 ± 1.8bc	40.0 ± 1.9abc	褐色 较紧密 基本不生长
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + Kt2.0	91.3 ± 1.2a	33.0 ± 9.8abc	20.9 ± 1.2abc	黄绿色 褐色 黑色 松散
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + TDZ0.2	71.3 ± 1.6ab	67.4 ± 4.6a	4.4 ± 6.2c	黄绿色 仅轻微褐化 紧密 生长速度一般
2,4 - D0.5 + NAA0.5 + TDZ0.1	40.4 ± 2.9b	57.4 ± 3.2ab	17.4 ± 2.5bc	黄绿色 生长慢 褐化不严重 生长慢
2,4 - D1.0 + BA0.5	77.9 ± 2.4ab	30.9 ± 1.3abc	28.9 ± 2.7abc	浅绿色 褐色 松散水样状 状态不好
2,4 - D0.5 + BA0.75	80.4 ± 2.7ab	53.1 ± 2.6ab	10.9 ± 1.5bc	绿色 褐色 较松散 虽全部褐化但不严重
2,4 - D0.5 + Zt0.75	61.3 ± 3.0ab	45.2 ± 2.1abc	13.0 ± 1.8bc	黄绿色 褐色 松散 生长较快状态较好
2,4 - D0.5 + Kt1.0	73.9 ± 3.7ab	23.9 ± 3.4bc	19.2 ± 3.6abc	褐色 较紧密 褐化严重
2,4 - D1.0 + Kt0.5	55.0 ± 4.0ab	44.1 ± 0.1abc	8.7 ± 1.2c	浅绿色 褐色 松散 轻微褐化 生长慢
2,4 - D0.5 + TDZ0.1	51.5 ± 2.6ab	55.4 ± 7.7ab	2.2 ± 3.1c	黄绿色 松散 状态好仅个别基部褐化
NAA1.0 + BA0.5	97.9 ± 3.0 a	8.3 ± 1.2bc	40.5 ± 5.1abc	褐色 呈死亡状
NAA0.5 + BA1.0	84.8 ± 2.1ab	8.7 ± 1.2bc	40.1 ± 4.4abc	褐色 黑色 松散
NAA1.0 + Kt0.5	79.3 ± 4.7ab	19.4 ± 2.2bc	34.4 ± 3.6abc	褐色 呈死亡状
NAA0.5 + Kt0.75	91.7 ± 1.2a	12.5 ± 1.8bc	62.5 ± 5.3a	黑色 紧密 死亡严重
NAA0.5 + TDZ0.1	97.8 ± 3.1a	2.2 ± 3.1c	66.0 ± 5.0ab	褐色 黑色 紧密 死亡严重
NAA1.0 + TDZ0.2	82.0 ± 2.5ab	3.1 ± 2.4abc	41.7 ± 4.2abc	绿色 褐色 松散 死亡严重

注:表中数据为平均数 ± 标准误,在 95% 的置信区间里采用 LSD 法进行多重比较,不同字母表示具有显著差异。

2.3 愈伤组织的去褐化处理

在外植体诱导愈伤组织时,当浓度为0.5-2.0mg/L的Kt和1.0mg/L以下的2,4-D、NAA分别或同时使用时可得到褐化较轻的愈伤组织(图1. A-D);当浓度为0.5-1.0mg/L的2,4-D分别和浓度为0.5-2.0mg/L的细胞分裂素6-BA、Zt共同添加时,同样可得褐化较轻的愈伤组织(图1. E-G),且当低浓度的NAA存在时可改善愈伤组织的状态(图1. H-I).在继代时,0.5-1.0mg/L的2,4-D与0.5mg/L的6-BA搭配或者添加1.0mg/L以下的NAA是较好的激素组合(图1. J-K),同时观察到2,4-D0.5mg/L+Kt0.5mg/L也能较好的继代愈伤组织(图1. L).愈伤组织的防褐化处理除调节激素浓度与配比外,笔者还进行了其它的一些防褐化处理.如降低培养基pH值至5.0、降低培养温度至20℃、添加100mg/L的Vc或半胱氨酸、添加0.1%的活性炭、乙烯生成抑制剂(AgNO₃5mg/L或CoCl₂2.5mg/L)以及快速继代(每两天继代一次)和暗培养等.结果发现只在添加0.1%活性炭的条件下快速继代(图1. M-O)和更换安利佳^[1]等的A培养基时取得一定的效果(图1. P,以上部分数据未给出).

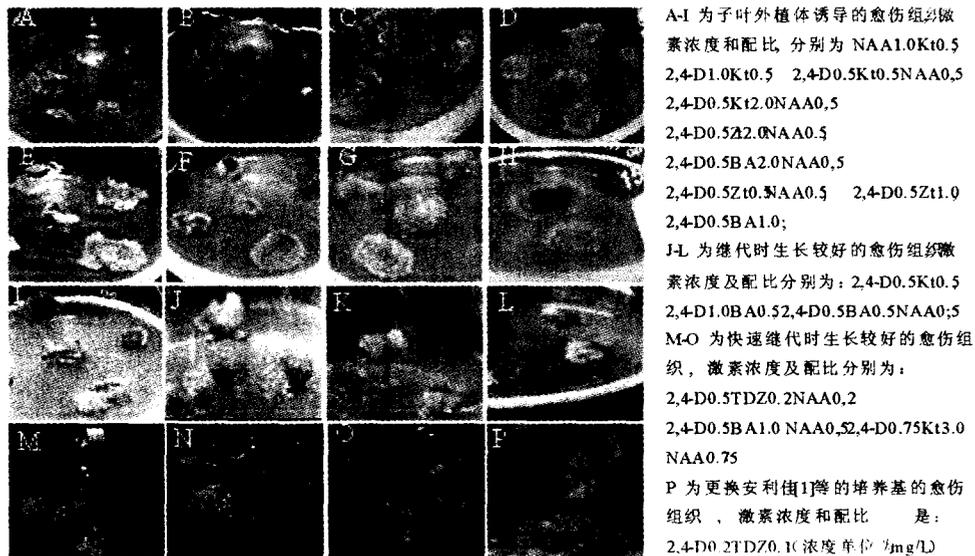


图1 愈伤组织在不同培养基上的生长状态

Fig 1 Growth station of callus reduced on different mediums

3 分析与讨论

在本文的研究中,生长素和细胞分裂素单独或配合使用均能获得愈伤组织.生长素浓度较高或单独使用时,诱导的愈伤组织疏松、易褐化且不易继代.2,4-D单独使用时表现出毒害作用,致使外植体褐化死亡,而与分裂素配合使用时,随分裂素浓度的提高生长素的毒害作用减轻直至消失,表现出激素间的协同效应;NAA单独使用或与低浓度低活性的分裂素配合可促使外植体生根,产生的根易愈伤化、褐化,这与王喆之的结果相似^[15].分裂素单独使用时诱导愈伤组织的周期较长,出愈缓慢,高浓度时表现出毒害作用,与低浓度的生长素配合诱导的愈伤组织致密、表面干燥、褐化较轻.在较高分裂素条件下,细胞分裂旺盛,导致组织致密,细胞活性与抗逆性较强,也可能细胞与培养基接触少,细胞死亡破裂较少,从而减轻褐化.所以建议在诱导愈伤组织时应选择分裂素比例较高的激素组合.在继代时,高生长素浓度下诱导的愈伤组织,由于组织松散极易褐化,继代后难以存活;高分裂素浓度条件下诱导的愈伤组织结构致密,继代时不易褐化死亡.继代时,继代激素浓度较高愈伤组织同样疏松易褐化,且有时呈烂泥状.笔者建议在愈伤组织继代时同样应选择分裂素浓度较高的激素组合.

苦豆子在愈伤组织诱导和继代培养中均出现褐化问题,在继代培养中尤为严重,这与银杏的组织培养相似^[16].有报道称:在黑暗条件下初代培养,生长调节剂的存在是影响褐变的主要原因,此时去除生长调节剂可减轻褐变^[17];6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)或KT(激动素)不仅能促进酚类化合物的合成^[18],而且还能刺激多酚氧化酶的活性^[19];而生长素类如2,4-D和IAA可延缓多酚化合物的合成,减轻褐变发生^[18].

在苦豆子的组织培养中,观测到即使在黑暗条件下诱导愈伤组织同样褐化,黑暗条件下诱导愈伤组织并不能抑制褐化,相似于参考文献^[16]的结果;6-BA 或 KT 较高浓度时诱导的愈伤组织结构致密褐化较轻,对褐化起到一定的抑制作用,这与参考文献的报道结果相反^[18,19],这可能是高细胞分裂素时细胞分裂旺盛、细胞体积较小、组织致密,致使细胞间的协同作用增强、抗逆性增强,同时较高的密度和较小的体积使细胞与空气以及培养基接触面积减少的缘故.笔者还观察到愈伤组织与培养基接触的部位常常褐化严重.且在生长素浓度高时褐化更为突出,这与牡丹和野牛草的组织培养结果类似^[20,21].笔者推测与较大的细胞体积以及较小的细胞密度有关,致使细胞间的协同作用及细胞的抗逆性降低,细胞易于衰老死亡,进而引起褐化反应.还有人推测外植体内源乙烯水平也会影响酚类化合物含量,从而影响褐化^[22],并且钱永强等^[23]在试验中发现当愈伤组织开始褐化时乙烯的合成代谢旺盛.笔者在实验中添加了 AgNO₃、CoCl₂^[24],企图通过抑制乙烯的生成量来控制褐化,但并未得到预想的结果.在传统的防褐化措施中,只有在添加 0.1% 活性炭的条件下快速继代和更换安利佳^[1]等的 A 培养基时取得一定的效果.苦豆子褐化问题采用常规的方法难以克服,所以寻找新的克服褐化的方法以及多种措施共同使用将成为苦豆子组织培养的研究方向.

参考文献:

- [1] 安利佳,李凤霞.豆科植物组织培养的研究[J].植物学报,1992,34(10):743-752.
- [2] 杨家新,喻志芳.苦豆子的研究进展[J].天津药学,1998,10(1):43-45.
- [3] LILIANA I, MIGUEL J, CARLOS R, et al. In vitro culture of *Sophora toromiro* (Papilionaceae), an endangered species[J]. Plant Cell Tiss Org, 1994 37: 201-204.
- [4] JORDAN M, LARRAIN M, TAPIA A, et al. In vitro regeneration of *Sophora toromiro* from seedling explants[J]. Plant Cell Tiss Org, 2001, 66: 89-95.
- [5] ZHAO D L, GUO G Q, WANG X Y, et al. In vitro micropropagation of a medicinal plant species *sophora flavescens*[J]. Biol. Plantarum, 2003, 47(1): 117-120.
- [6] 王喆之,李克勤.槐树子叶组织培养中的形态发生研究[J].实验生物学报,1993,26(1):39-44.
- [7] 王喆之,李克勤,郝联芳,等.槐树的组织培养及植株再生[J].植物生理学通讯,1992,2:131.
- [8] 王喆之,李克勤,刘全宏,等.槐树器官、胚胎发生及细胞学观察[J].植物学通报,1992,S1:41.
- [9] 陈维伦.国槐子叶和下胚轴外植体上芽的形成[J].生命世界,1982,(1):19.
- [10] 王喆之,李克勤,刘全宏,等.槐树花药培养并获得单倍体植株[J].科学通报,1993,38(3):266-269.
- [11] 饶品昌,饶品昌.苦豆子组织培养及有效成分分析[J].江西中医学院学报,1992,4(2):33-39.
- [12] 李晓莺,曹有龙,贝盛临,等.苦豆子组织培养初步研究[J].甘肃农业科技,2004,(12):12-14.
- [13] 王关林,刘秀梅,方宏筠,等.蝶形花亚科 8 种槐树的组织培养及再生能力的基因型效应[J].园艺学报,2005,32(5):844-848.
- [14] 刘建明,占布拉.苦豆子特性的初步探讨[J].内蒙古草业,1996,(3):51-54.
- [15] 王喆之,胡正海. IAA、IBA、NAA 和 2,4-D 对槐树试管苗生根的影响[J].陕西师范大学学报(自然科学版),1997,25(2):57-59.
- [16] 张明文,陈力耕.银杏组织培养中控制褐化的研究[J].中国南方果树,2003,32(3):51-52.
- [17] 崔堂兵,郭勇,张长远.植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J].广东农业科学,2001,(3):16-18.
- [18] PICRIK R. In vitro culture of higher plant[M]. Mattinus: Nijff publisher, 1987. 183-230.
- [19] ZAID A. In vitro browning of tissues and media with special emphasis to data palm cultures——A review[J]. Acta Hort, 1987, 212: 561-566.
- [20] REID S. Ethylene in plant growth, development, and senescence. Davis PJ (ed) Plant hormones, 2nd edn[M]. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. 1995: 486-508.
- [21] 张俊琦,罗晓芳.牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究[J].沈阳农业大学学报,2006,37(5):720-724.
- [22] 裘文达,曹改义.植物组织培养实用技术[M].北京:高等教育出版社,1989.96-98.
- [23] 钱永强,孙振元,李云,等.野牛草成熟胚植株再生及其影响因素研究[J].草业科学,2005,22(2):101-107.
- [24] ABELES F B. Biosynthesis and mechanisms of action of ethylene[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1972, 23: 259-292.

- [6] 杨迎春, 鲍正荣. 高师化学中的绿色化学教育[J]. 四川师范学院学报(自然科学版)2003. 24(2).
- [7] 蔡铎昌, 鲍正荣, 邹荣贤, 等. 化学微型实验及教学研究[M]. 西南师范大学出版社. 1997.
- [8] 孙杰, 鲍正荣, 黄会林. 利用手持技术探究影响硫酸铅溶解度的因素[J]. 中小学实验与装备. 2005. 6.

Investigation and Discussion About the Teaching of Chemical Experiment

BAO Zheng-rong, JIANG Xiao-hui, WANG Dan, LI Xiao-yan, LEI Jiu-jun

(1. College of Chemistry & Chemical Engineering, China West Normal University Nanchong, 637002 China;
2. Xihe Middle School Chengdu, 61000 China)

Abstract: We have already carried on questionnaire investigation to the junior, and analyzed the census data. To the problem of chemical experiment teaching at present, we have put forward the reform measure about teaching and teaching material of the course. We also have proposed deep excavation and expansion of education function of chemical experiment with scientific methodology for the center, making the subject in the level of integration platform, strengthening basic chemical experiment content, widely opening laboratory and comprehensive development experimental curriculum resources, strengthen the green, microinformation experiment and the modernization for the imagination and suggestion about the exploration the function of chemical experiment.

Key words: chemical; experiment; investigate; improve

(上接第 425 页)

Callus Induction and Antibrowning in Subculture of *Sophora alopecuroides* L.

WANG Li-qiang¹, YANG Jun^{1,2}, WANG Guang-bi, DENG E¹

(1. College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002, China;
2. Institute of Rare and Precious Animals and Plants, China West Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: The best medium was selected when the callus of *Sophora alopecuroides* L. was inducted and subcultured. All the mediums used in the experiments could induce callus formation. The best callus could be induced by 2,4-D (0.5 ~ 1.0mg/L) when the cytokinin 6-BA or Zt (0.5 ~ 2.0mg/L) was present respectively, and the state of the callus could be improved with the existence of NAA (0.5mg/L); 2,4-D or NAA with less than 1.0mg/L could induce best callus corporately with 2.0mg/L Kt too. 2,4-D, 6-BA under low concentration with or without NAA ($\leq 1.0\text{mg/L}$) was suitable for subculture; the combination of 0.5mg/L 2,4-D and 0.5mg/L Kt or 0.5mg/L 2,4-D, 0.2mg/L NAA and 0.2mg/L TDZ could also get the same effectiveness. Many measures were carried out to prevent browning besides the concentrations and categories of hormones. The best proposal was frequent subculture (subcultured per 2 days) with 0.1% active carbon or adjusting the base medium.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; tissue culture; hormone; callus