

旋覆花组织培养及无性系建立的研究

边永梅 李 森 刘孟颖 李铁松 姜长阳*

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

【摘要】以生长旺盛的野生旋覆花根茎为外植体, 以附加不同浓度的 BA、IAA、NAA、2, 4-D、GA 的 MS、1/2 MS 或 1/3 MS 为培养基, 进行了旋覆花根茎愈伤组织诱导培养、愈伤组织分化培养、试管苗生根培养和试管苗移栽与扦插的研究。结果表明: MS + 2, 4-D $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是诱导根茎愈伤组织的理想培养基。MS + Ag (N03) $20.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是根茎颗粒状愈伤组织和不定芽分化培养的理想培养基; 1/3MS + NAA $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是试管苗生根培养和生根增殖培养的理想培养基; 炉灰渣是试管苗移栽、扦插的理想基质; 移植后旋覆花试管苗生长非常旺盛。

【关键词】旋覆花; 组织培养; 愈伤组织; 无性系

中图分类号: S603

文献标识码: A

旋覆花 (*Inula japonica*) 属于菊科旋覆花属多年生草本植物^[1,2], 其根茎、茎、叶和花可入药, 具有祛风除湿、解毒疗疮、止渴平喘、降逆止呕、散节行水等功效, 能治四肢麻木、畏寒肢冷、手足不温、痰饮咳喘、水肿鼓胀和刀伤等疾病^[2~4]; 又因旋覆花具有植株美观、花期较长、花色艳丽、几乎不遭病害等特点, 近年来辽宁南部地区城乡进行观赏栽培。因药用与观赏栽培都需要挖取根茎, 导致旋覆花的野生资源迅速减少。为了保护野生资源, 并满足人们药用和观赏栽培的需要, 我们对旋覆花进行了组织培养和无性系建立的研究。

1 材料与方法

1.1 材料及灭菌

试验材料为大连石门山生长非常旺盛的旋覆花根茎。将采集回的根茎除掉毛根后, 放到 250 mL 的磨口广口瓶中, 用自来水振荡洗涤 20 min 左右, 再用蒸馏水振荡洗涤 4 次, 接着用 0.05% 安利洗涤剂振荡洗涤 15 min, 再用蒸馏水漂洗至泡沫消失时转移到超净工作台上; 加 75% 酒精灭菌约 20 s 后, 迅速用无菌水洗涤 2 次, 再加 0.05% HgCl₂ 溶液振荡灭菌 1 min, 加入等体积无菌水, 使 HgCl₂ 灭菌液的浓度变为 0.025%, 继续振荡灭菌 15 min, 接着用无菌水振荡洗涤 5 次。即获

得无菌材料。

1.2 培养条件

以 MS、1/2 MS 或 1/3 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 BA、IAA、IBA、NAA、2, 4-D 和 GA。以 MS 为基本培养基加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 1/2 MS 为基本培养基加蔗糖 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 1/3 MS 为基本培养基加蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养基胨力强度 $180 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ^[5], pH 值 5.8 ~ 6.0。培养温度 25 ℃, 光照强度 2500 Lx, 光照时间 12 h/d。

1.3 试验方法

1.3.1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

在超净工作台上, 用解剖刀将无菌根茎切成长 0.1 ~ 0.2 cm 的片状后, 分别接种到附加浓度为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IAA 和 2, 4-D 的 MS 和 1/2 MS 培养基上。每处理接种外植体 50 片。在无光照条件下进行愈伤组织的诱导培养。50 d 时统计诱导愈伤组织的数量, 计算愈伤组织的诱导率, 观察愈伤组织的生长状况。

1.3.2 不同激素对愈伤组织分化培养的影响

将由根茎诱导培养的黄色的颗粒状愈伤组织, 分散为较均匀的颗粒后, 接种到以 1/2 MS + Ag (N03) $20.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、MS + Ag (N03) $20.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为基本培养基, 附加不同激素浓度 BA、NAA、IBA 的分化培养基中, 在光照条件下进行愈伤组织的分化培养。每种培养基均接种 100 个愈伤组织颗粒, 重复 4 次。

1.3.3 不同浓度激素对生根培养的影响

将继代培养生长较为旺盛的分化不定芽,从基部切下,接种到附加不同浓度 IAA 和 NAA 的 1/3MS 培养基上,进行生根培养。每种培养基接种 100 个不定芽。

1.3.4 不同移栽和扦插基质对试管苗生长的影响

把 1/3 MS + NAA 0.6 mg/L 培养基上继代培养的生根试管苗,分别移栽到以河沙、炉灰渣、肥沃园土、1/2 河沙 + 1/2 肥沃园土和 1/2 炉灰渣 + 1/2 肥沃园土 5 种移栽基质中。将试管苗剪成长 1.5 cm 左右、具有 1~2 个生长点的茎段,下部剪口在 100 mg·L⁻¹ 的 IAA 溶液中处理 5 min 后,扦插到与移栽相同 5 种基质上。移栽和扦插试验每组处理 100 个试管苗。移栽和扦插的前 14 d,要保持温度 25℃ 左右、湿度 90% 以上、没有直射光的环境条件,随后按正常管理。30 d 统计计算成活率,并观察试管苗长势。试验重复 4 次。

2 结果分析

2.1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

观察发现,培养 10 d 左右时,1/2 MS + 2, 4

- D1.2 mg·L⁻¹ 和 MS + 2, 4 - D1.2 mg·L⁻¹ 两种培养基上接种的材料开始生长愈伤组织。培养 50 d 时,接种在加 IAA 培养基上的材料不仅不能诱导生长出愈伤组织,并且都出现了褐化现象;而接种在含 2, 4 - D 培养基上的材料都能诱导出愈伤组织,尤其是在 MS + 2, 4 - D 1.2 mg·L⁻¹ 这一培养基上,愈伤组织的诱导率达到了 100% (见表 1)。经过 4 次重复试验,结果基本保持不变。观察还发现,接种于 MS + 2, 4 - D 1.2 mg·L⁻¹ L 培养基上诱导的愈伤组织初期为淡黄色球状,随着愈伤组织的不断生长,愈伤组织逐渐生长为黄色的颗粒状。这样的颗粒状愈伤组织为具有分化能力的愈伤组织^[6,7]。把这种黄色的颗粒状愈伤组织接种到相同的培养基上,进行愈伤组织的继代培养,结果表明,40d 可继代培养 1 代,连续培养 8 代,培养的颗粒状愈伤组织长势保持不变,平均每代的增殖率为 32.5 倍。这表明 MS + 2, 4 - D 1.2 mg·L⁻¹ 是诱导旋覆花根茎愈伤组织的理想培养基。

表 1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

培养基种类	愈伤组织生长情况	愈伤组织率 (%)
1/2 MS + IAA 0.6 mg·L ⁻¹	不生长, 逐渐褐化	0
1/2 MS + 2, 4 - D 0.6 mg·L ⁻¹	生长一般	42
1/2 MS + IAA 1.2 mg·L ⁻¹	不生长, 逐渐褐化	0
1/2 MS + 2, 4 - D1.2mg·L ⁻¹	生长较好	88
MS + IAA 0.6 mg·L ⁻¹	不生长, 逐渐褐化	0
MS + 2, 4 - D 0.6mg·L ⁻¹	生长较好	76
MS + IAA 1.2 mg·L ⁻¹	不生长, 逐渐褐化	0
MS + 2, 4 - D 1.2 mg·L ⁻¹	生长好	100

2.2 不同激素对愈伤组织分化培养的影响

观察表明,培养到 30 d 左右时在含不同浓度 BA、NAA 的培养基上培养的颗粒状愈伤组织开始分化。培养到 60 d 统计证明 (见表 2), 在含不同

浓度 BA、IBA 的培养基上培养的颗粒状愈伤组织不分化,而在含不同浓度 BA、NAA 的培养基上培养的颗粒状愈伤组织基本都能分化出不定芽,其中在含 BA 0.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养

基上的愈伤组织颗粒，不仅分化率达到了 95%，并且分化芽长势较好。观察还表明，在含 BA 0.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基上的愈伤组织颗粒，培养到 25d 时有的颗粒就可分化出可见不定芽，随后伴随着愈伤组织颗粒的分化，先期分化的不定芽在不断生长的同时，基部又能分化出 2-7 个不定芽，形成丛生分化不定芽。把分化的不定芽从基部剪下，接种到相同的培养基上，进

行不定芽的分化增殖培养，40 d 可培养 1 代高 1.4cm 左右、生长较旺盛的丛生不定芽，每代每个不定芽平均能繁殖出 5.6 个不定芽。经过 4 次重复、11 次继代培养，其培养周期、分化系数、不定芽的长势保持不变。这说明 MS + Ag (NO₃)₂0.4 mg·L⁻¹ + BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 这一培养基为旋覆花根茎颗粒状愈伤组织和不定芽分化培养的理想培养基。

表 2 不同浓度激素对愈伤组织分化的影响

激素 / mg·L ⁻¹			1/2MS + Ag (NO ₃) ₂ 0.4mg·L ⁻¹			MS + Ag (NO ₃) ₂ 0.4 mg·L ⁻¹		
BA	IBA	NAA	分化数	分化率/%	长势	分化数	分化率/%	长势
0	0	0	0	0		0	0	
0.2	0	0	0	0		0	0	
0.2	0	0.1	19	19	++	74	74	++
0.2	0	0.2	24	24	++	69	69	+
0.2	0	0.5	6	6	+	28	28	+
0.2	0	1.0	3	3	+	0	0	
0.2	0.1	0	0	0		0	0	
0.2	0.2	0	0	0		0	0	
0.2	0.5	0	0	0		0	0	
0.2	1.0	0	0	0		0	0	
0.5	0	0	0	0		0	0	
0.5	0	0.1	68	68	++	95	95	++
0.5	0	0.2	37	37	++	62	62	++
0.5	0	0.5	22	22	+	50	50	++
0.5	0	1.0	8	8	+	2	2	+
0.5	0.1	0	0	0		0	0	
0.5	0.2	0	0	0		0	0	
0.5	0.5	0	0	0		0	0	
0.5	1.0	0	0	0		0	0	

注：++ 为长势较好；+ 为长势一般。

2.3 不同浓度激素对生根培养的影响

观察表明，接种 10d 左右，部分培养基上培养的材料能形成可见的根原基，25d 时观察统计。

由表 3 可见，在附加不同浓度 NAA 或 IAA 的 1/3MS 生根培养基上，均可诱导生根。但是，在附加不同浓度 IAA 的生根培养基上随着培养基中

IAA 含量的增加, 生根率逐渐降低、生根数不断减少。而在附加不同浓度 NAA 的生根培养基上, 诱导生根率较高、生根数较多, 并且所诱导根都是由不定芽茎基部发出。尤其是在 NAA 浓度为 0.6 的生根培养基上, 不仅生根率达到了 98%, 平均生根数为 7.7 条/株, 并且生根苗生长旺盛。把生根试管苗剪成长 1.5cm、至少具有 1 个生长点的茎段, 接种到相同的培养基上进行生根继代

培养, 培养 20 d 左右, 97% 的生根试管苗可以生长为高 5cm 左右、具有长 0.3cm 左右的根茎旺盛生根试管苗; 每一代的繁殖系数为 3.3。连续进行了 10 代生根继代培养, 生根苗的长势、繁殖系数基本保持不变。由此可见, $1/3MS + NAA0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是旋覆花试管苗生根培养和生根增殖培养的理想培养基。

表 3 不同浓度激素对不定芽生根的影响

激素		生根数 (株)	生根率 %	平均生根数/株
NAA	IAA			
0	0	0	0	0
0.2	0	28	28	3.6
0.4	0	59	59	6.2
0.6	0	98	98	7.7
0.8	0	67	67	3.7
1.0	0	41	41	3.5
0	0.2	58	58	6.6
0	0.4	45	45	4.4
0	0.6	36	36	3.7
0	0.8	19	19	4.3
0	1.0	10	10	2.6

2.4 不同移栽和扦插基质对试管苗生长的影响

试验结果表明, 以炉灰渣为移栽和扦插基质, 成活率高 (分别为 94% 和 86%), 且成活苗生长非常旺盛; 移栽苗与扦插苗长势一致, 根系均非常发达。这表明炉灰渣是旋覆花试管苗移栽和扦插的理想基质。

把移栽和扦插成活的旋覆花试管苗一部分移植到花坛进行绿化栽培, 另一部分移植到采集材料的山脚下。不论是移栽成活还是扦插成活的旋覆花试管苗, 移植后不仅生长得非常旺盛, 6~10 月开花, 而且根系相当于野生植株 2 倍左右, 初冬枯萎时间延迟 10 d 左右, 翌年春天萌发早 4 d 左右。

3 讨论

虽然目前已多有菊科植物组织培养及无性系建立的报道^[8~15], 但迄今未见旋覆花属植物组织培养与无性系建立的报道。为此, 我们以旋覆花根茎为材料, 成功地进行了组织培养及无性系建立的研究, 这不仅证明旋覆花的非分生器官根茎细胞具有全能性, 而且也为旋覆花的工厂化育苗提供了可能。

移植后的旋覆花试管苗, 不仅具有 6~10 月正常开花、根系相当于野生植株 2 倍左右、初冬枯萎时间延迟 10d 左右、翌年春天萌发早 4 d 左

右等特点,而且生长得非常旺盛,这说明通过根茎培养的旋覆花试管苗可以取代野生根茎用于生产,满足人们药用和观赏栽培的需要。

旋覆花根茎继代培养的愈伤组织 40 d 的分化数为 5.6 个。按照这个速率计算,旋覆花愈伤组织分化培养年增殖数为 5.6⁹。用生根继代培养进行增殖,20d 增殖系数为 3.3,按照这个增殖率进行计算,年增殖倍数为 3.3¹⁸。这说明,不论采用上述哪种方法进行快速繁殖,一年都能繁殖出数百万株试管苗,达到快速繁殖、工厂化育苗的目的,满足生产上对旋覆花种苗的需要。在上述所研究的几种快速繁殖方法中,生根继代培养快速繁殖的方法具有试管苗生长旺盛,没有无效苗的特点。因此,在生产上应采用生根试管苗继代培养的方法进行快速繁殖为宜。

移栽和扦插的旋覆花试管苗移植到花坛和山脚下后之所以生长旺盛,主要是与试管苗的根系非常发达有关。而试管苗非常发达的根系除了与自身的遗传因素有关外,还与在培养过程中使用了细胞分裂素和生长素有关。细胞分裂素的后效作用会使移栽和扦插的试管苗的根系细胞产生了很强的分生作用,促使扦插和移栽试管苗形成了更为发达的根系,从而能够吸收更多的营养和水分,促进其旺盛生长。

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(第七十五卷)

- [M].北京:科学出版社,1993:263-264
- [2]李书心主编.辽宁植物志(下册)[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1991:469-471
- [3]冉先德主编.中华药海[M].哈尔滨:上海辞书出版社,1993:1791-1792
- [4]田代华主编.实用中药辞典[M].北京:人民卫生出版社,1993:1848-1851
- [5]姜长阳.培养基琼脂用量计算的商榷[J].植物生理学通讯,1992,28(2):155
- [6]安利佳,姜长阳.植物组织培养导论[M].大连:辽宁师范大学出版社,1996:68-72
- [7]胡尚连,王丹.植物生物技术[M].西安:西安交通大学出版社,2004:35-40
- [8]肖玉兰,张立力.非洲菊无糖组织培养技术的应用研究[J].园艺学报,1998,25(4):408-410
- [9]官晓青,蔡智贤,岳庆熙.非洲菊胚珠之培养及育种上之应用[J].台湾花卉园艺,2000,(15):36-38
- [10]郑秀芳,李名扬.非洲菊花托培养和植株再生[J].西南农业大学学报,1998,25(4):408-410
- [11]向太和.菊花组织培养植株再生及其后代的变异[J].杭州师范学院学报,2006,5(1):42-45
- [12]周瑞玲,吴雨龙.菊花的组织培养及移栽技术初探[J].江苏林业科技,2001,28(2):23-24
- [13]林青萍,陈雄艇.菊花离体叶片快繁体系的建立[J].热带农业科学,2006,26(3):25-28
- [14]童朝阳.菊花组织培养和快速繁殖[J].芜湖职业技术学院学报,2001,3(1):28-29
- [15]司怀军,戴朝曦,于品华,王蒂,王清.菊花幼嫩花瓣愈伤组织的诱导和植株再生[J].甘肃农业大学学报,1998,33(2):175-177.174

The study of Tissue Culture and Establishment of asexual system of *Inula japonica*

BIAN Yong-Mei, Li Sen, LIU Meng-Ying, LI Tie-song, JIANG Chang-Yang*

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: The rhizomes explants from *Inula japonica* were cultured on the MS, 1/2MS or 1/3MS medium supplemented with BA, IAA, NAA, 2, 4-D, GA of different concentrations to study the callus induction, bud differentiation, rooting, and transplantation of seedlings. The results showed that the medium MS + 2, 4-D 1. 2 mg · L⁻¹ was the best for inducing callus, medium MS + Ag (N03) 20. 4 mg · L⁻¹ + BA 0. 5 mg · L⁻¹ + NAA 0. 1 mg · L⁻¹ was the most suitable for bud differentiation, medium 1/3MS + NAA 0. 6 mg · L⁻¹ was the optimum for rooting. The ideal transplantation matrix for tube plantlets was the furnace ashes. The transplanted plantlets in the field grew vigorously.

Keywords: *Inula japonica*; Tissue culture; Callus; Clone