



牛蒡组织培养和高频植株再生的研究

何雯婷¹, 侯岁稳^{1,2*}, 王崇英¹

(1 兰州大学 生命科学学院, 兰州 730000; 2 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000)

摘要:通过对牛蒡(*Arctium lappa* L.)不同外植体、不同激素配比的比较研究,建立了牛蒡离体培养高效植株再生体系。牛蒡子叶与下胚轴切段在含 2.0 mg/L 2,4-D 和 0.5~2.0 mg/L BA 的 MS 培养基中愈伤组织诱导率可以达到 87%~100%;在 1.0~3.0 mg/L NAA 和 0.5~2.0 mg/L BA 的 MS 培养基上通过愈伤组织间接分化或外植体直接分化形成不定芽,其中愈伤组织分化率可达 100%;下胚轴的分化率明显高于子叶,在 1.0 mg/L NAA 和 1.0 mg/L BA 的 MS 培养基上下胚轴直接分化率达 77.3%。组织学观察发现牛蒡再生有器官发生和体细胞胚发生两种途径。将生长状态良好的不定芽转至含 1.0 mg/L IBA 和 1.0 mg/L NAA 的 1/2 MS 培养基上生根,移栽,成活率达到 93.3%。从诱导愈伤组织到组培苗在珍珠岩中过渡成活,大约需要 13 周。组培苗次年开花并结实,生长形态特征正常。

关键词:牛蒡;愈伤组织;组织培养;器官发生;胚状体发生途径

中图分类号:Q813.1⁺2; Q949.783.5

文献标识码:A

Tissue Culture and High-efficiency Plant Regeneration of *Arctium lappa*

HE Wen-ting¹, HOU Sui-wen^{1,2*}, WANG Chong-ying¹

(1 School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Different *Arctium lappa* L. explants and the compounding proportions of different hormones were comparatively studied in tissue culture and thereafter a high-efficiency plant-regeneration system by *in vitro* *A. lappa* culture. On MS mediums containing 2.0 mg/L 2,4-D and 0.5~2.0 mg/L BA, cotyledon and hypocotyl pieces could be induced to produce callus at 87%~100%; On MS medium containing 1.0~3.0 mg/L NAA and 0.5~2.0 mg/L BA, the calluses could indirectly differentiate or the explants could directly differentiate to form adventitious buds and the differentiation rate of the calli could reached as high as 100%; The hypocotyls differentiated at a higher rate than the cotyledons and their direct differentiation rate amounted to 77.3% on MS medium containing 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA. *A. lappa* was histochemically found capable of regenerating by two approaches, organogenesis and embryogenesis. Well-growing adventitious buds were inoculated on 1/2 MS medium containing 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA for their rooting and thereafter transplanted, and their survival rate reached 93.3%. It approximately took 13 weeks to complete the transition from callus induction to *in vitro* plantlet transplantation to perlite matrix. The *in vitro* plantlets flowered in the following year and presented a normal morphology in their growth.

收稿日期: 2005-08-11; 修改稿收到日期: 2005-12-14

基金项目: 兰州大学交叉学科青年创新研究基金项目(Lzu-200312); 甘肃省自然科学基金项目(ZS011-A-25-009-Z); 中国科学院近代物理研究所所长基金项目(ZY-050605)

作者简介: 何雯婷(1981—), 女(汉族), 硕士研究生, 主要从事细胞生物学研究。

* 通讯联系人。Correspondence to: HOU Sui-wen. E-mail: housw@lzu.edu.cn

Key words: *Arctium lappa* L.; callus; tissue culture; embryoid-genesis approach

牛蒡(*Arctium lappa* L.)别名牛菜,白肌人参等,是菊科牛蒡属二年生草本植物,高70~150 cm,花紫红色,原产亚洲,主要分布于中国和日本的大部分地区^[1]。其嫩叶、茎、花和肉质根均可食用,营养价值很高,富含蛋白质、氨基酸、多种维生素和微量元素^[2]。因此,在日本牛蒡是一种广为流行的蔬菜^[3]。牛蒡叶中含有的绿原酸可用作食品抗氧化剂,根中富含的菊糖和膳食纤维均可用来开发保健食品^[4]。近年来科研人员经过努力,已经开发出了有关牛蒡的种子、根、茎、叶的清汁饮料、罐头、茶片和低糖口含片等一系列产品,其制品在国内外市场上具有良好的开发利用前景^[5]。牛蒡还是我国民间传统的药用植物,种子具有疏风散热,宣肺透疹,解毒利咽,滑肠通便之功效^[6]。自1929年日本人田·川越等^[7]从牛蒡种子获得牛蒡苷以来,关于牛蒡化学活性物质的研究取得了重要进展,从其种子、茎叶和根中分别获得30余种不同类型的天然化合物,譬如牛蒡酚、牛蒡子酸等^[7],并且发现了它们许多重要的药理和生理活性。目前研究表明,牛蒡具有抗肿瘤、抗癌、抗菌、清除自由基、抗衰老和降血糖等作用^[8~11];另外发现,牛蒡子甙元可强烈地抑制白血病HL-60细胞株以及HIV-1病毒P17和P24的表达^[12,13],因此推断它对白血病和艾滋病的治疗可能也有一定的作用。随着牛蒡的营养价值和药用价值得到认可,其研究越来越受到人们的关注。目前有关牛蒡的研究主要集中在药理方面,而其组织培养和高效再生体系的详细研究在国内外还鲜有报道^[14]。

1 材料和方法

1.1 植物材料

实验所用牛蒡种子购于兰州市中草药公司。将种子用70%乙醇浸泡30 s,用0.1%升汞溶液灭菌10 min,无菌蒸馏水清洗5次,然后接种于附加3%蔗糖、0.8%琼脂粉的MS培养基上^[15]。所有培养条件为:光照强度 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照16 h/d,温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

1.2 愈伤组织的诱导

取生长7 d的牛蒡无菌苗,将其子叶和下胚轴切成5~10 mm的小段,接种在含有不同激素组合的MS培养基上,进行愈伤组织诱导。2周后观察各种外植体的愈伤组织诱导频率,并选择诱导频率最高的培养基作为愈伤组织继代培养基,每3周继代

培养一次。

1.3 芽的分化与增殖

将生长状态良好的愈伤组织转至含不同浓度NAA和BA的MS分化培养基上诱导分化,30 d后统计分化率。

1.4 根的诱导和移栽

切取生长健壮的幼苗转至含不同浓度IBA、IAA和NAA的1/2 MS培养基上诱导生根,3周后统计生根率。对以上所有统计数据进行分析。取根系发达的再生苗栽至珍珠岩铺成的苗床,过渡2周后新根长出,转至混合土中(营养土:蛭石=1:1),在温室里继续培养。植株长到高约15 cm时移栽到植物园大田中。

1.5 组织学观察

取诱导培养5~30 d的外植体,用FAA液(甲醛:冰乙酸:无水乙醇=5:5:90, v:v:v)固定,按照郑国锡等^[16]的方法,逐级酒精脱水,石蜡包埋,切片厚度10 μm ,苏木精染色,镜检。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织的诱导

种植在MS无激素培养基上的牛蒡种子萌发10 d,发芽率达到90%,生长1周后长度达1.5~2 cm。不同外植体在不同的激素组合(表1)培养基上,均能产生愈伤组织。在含有2.0 mg/L 2,4-D和0.5~2.0 mg/L BA的培养基上,子叶和下胚轴的诱导率达到了87%~100%(表1)。在2,4-D和BA组合的培养基上得到了大量的愈伤组织,都呈黄褐色且松软,继代一次后出现褐化,这很有可能是其分泌的大量酚类物质所致,但是褐化并没有影响到分化(图版I, b);而NAA和BA组合的培养基上,除了得到大量的愈伤组织外,外植体还直接分化出芽,其愈伤组织致密且呈颗粒状(图版I, a)。BA可以促进愈伤组织的产生,当单独使用2,4-D或NAA时,其诱导率均未超过50%,加入0.5 mg/L的BA后,诱导率提高了2~3倍。但当BA浓度较高时(4.0 mg/L),子叶和下胚轴的愈伤组织诱导率仅为23.5%和28.6%,严重抑制了愈伤组织的产生(表1)。在BA浓度较低时,2,4-D浓度的变化并没有明显影响到愈伤组织的诱导率;但当2,4-D为4.0 mg/L时,愈伤组织极易褐化。而愈伤组织的诱导对NAA浓度的变化比较敏感,当NAA浓度由2.0

mg/L 上升为 4.0 mg/L 时,子叶和下胚轴的愈伤组织诱导率均下降了 14%左右(表 1)。对于两种不同的外植体,其产生的愈伤组织质地基本没有差异,诱导率也相差无几。

表 1 不同外植体与激素对牛蒡愈伤组织诱导的影响

植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg/L)			接种外植体数 No. of inoculated explants		愈伤组织诱导率(Mean±SD) Callus induction rate (%)	
2,4-D	BA	NAA	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
2.0	0	0	39	27	43.6±0.1 a	47.5±0.3 a
2.0	0.5	0	54	13	87.0±0.6 b	100±0.0 c
2.0	1.0	0	24	15	100±0.0 c	100±0.0 c
2.0	1.5	0	20	14	100±0.0 c	100±0.0 c
2.0	2.0	0	21	13	100±0.0 c	100±0.0 c
4.0	0.5	0	42	6	80.9±0.6 b	100±0.0 c
4.0	4.0	0	34	28	23.5±1.6 d	28.6±1.1 d
0	0	2.0	26	19	16.1±3.3 d	45.2±2.8 a
0	0	4.0	34	16	2.9±1.9 e	31.3±2.6 a
0	0.5	2.0	27	14	81.5±1.5 b	100±0.0 c

注:显著性水平为 0.05。Note:The significance probability is 0.05.

2.2 愈伤组织的分化和苗的形成

将得到的愈伤组织切成 5 mm² 左右的小块接种于分化培养基上。诱导过程中发现在含有 NAA 的培养基上有分化现象,因此将培养基设计为不同浓度 NAA 和 BA 的组合。30 d 后,100%的愈伤组织分化。由图 1 看出,NAA 1.0 mg/L 时,随着 BA 浓度的增高,平均每块愈伤组织的诱导芽数减少;对于芽的伸长生长而言,1.0 mg/L BA 显著地提高芽的长度。而由图 2 可以看到,随着 NAA 浓度的升高,芽的平均高度逐渐下降;同时 2.0 mg/L 的 NAA 更适合于芽的诱导,平均每块愈伤组织分化出芽的个数达到 5 个。

另外,由于在愈伤组织诱导实验中出现了外植体直接分化,所以对就如何通过直接分化途径建立

牛蒡的再生体系做了详细研究。将由无菌苗得来的子叶和下胚轴切成小块和小段,接种于表 2 的培养基上。结果可以看出,牛蒡的下胚轴能直接高频诱导芽的分化,而子叶的直接分化率均未超过 50%(表 2)。在 NAA 浓度一定(1.0 mg/L)而改变 BA 的浓度时,两种外植体的反应发生了明显的变化;BA 为 1.0 mg/L 时,分化率有显著的提高,特别是下胚轴的分化率提高了近 50%(表 2)。NAA 浓度对分化的影响与 BA 相似,也是适中的浓度(2.0 mg/L)更有利于芽的分化。

将诱导出的芽置于 NAA 1.0 mg/L+BA 1.0 mg/L+GA₃ 3.0 mg/L 的 MS 培养基上增殖、增壮,2 周后,每个芽的增殖系数达到 5~6 倍;同时,芽也得以增壮,平均芽高达到 3~4 cm。

表 2 不同激素对牛蒡子叶和下胚轴直接分化的作用

植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg/L)		接种外植体数 No. of inoculated explants		分化率(Mean±SD) Shoot differentiation rate (%)	
NAA	BA	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
1.0	0.5	43	26	20.9±2.4 A	29.6±0.4 A
1.0	1.0	23	22	30.4±1.9 B	77.3±1.8 C
1.0	2.0	34	27	23.3±2.1 A	30.5±0.6 AB
2.0	0.5	33	21	39.4±0.2 B	66.7±2.5 C
3.0	0.5	35	24	22.9±0.5 A	54.2±2.2 C

注:显著性水平为 0.01。下表同。
Note:The significance probability is 0.01. It is the same as below.

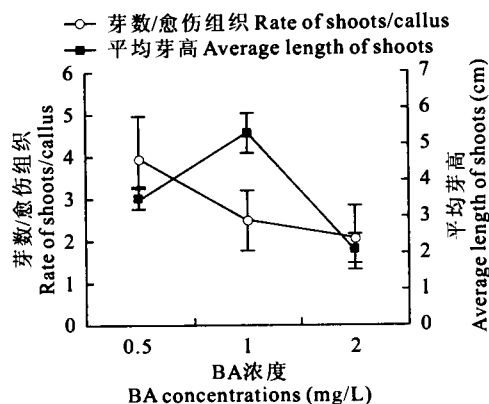


图1 NAA 浓度为 1 mg/L 时 BA 浓度对芽分化的影响

Fig. 1 Shoot differentiations of *A. lappa* at different BA concentrations with NAA set at 1.0 mg/L

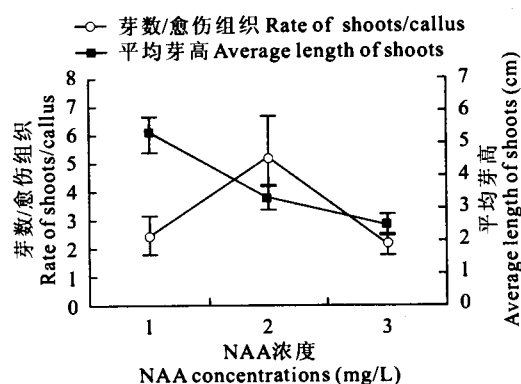


图2 BA 为 1 mg/L 时 NAA 浓度变化对牛蒡芽分化的影响

Fig. 2 Shoot differentiation of *A. lappa* at different NAA concentrations with BA fixed at 1.0 mg/L

表3 牛蒡增殖芽的生根

Table 3 Adventitious shoot rooting of *A. lappa* with different by combined growth regulators

植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg/L)			接种芽数 No. of inoculated shoots	生根芽数 No. of rooted shoots	生根率 (Mean±SD) Frequency of rooting (%)	根生长情况 Growing characters of roots
IAA	NAA	IBA				
0.5	1.0	0	20	7	35.0±0.7 A	短,较细,稀疏,主侧根不明显
1.0	1.0	0	16	3	16.7±1.6 B	稀疏,有毛状根,主侧根不明显
0	1.0	0.5	23	12	52.2±1.3 A	细长且繁密,主侧根发达
0	1.0	1.0	17	15	85.7±0.4 C	繁密,有毛状根,主侧根发达

2.3 根的分化和苗的移栽

将增殖后生长状态良好的芽接种到生根培养基中进行培养,激素组合、生根率及生长状况见表3。可以看出 IBA 比 IAA 更适合于诱导牛蒡生根,这与其它一些菊科植物譬如黄花蒿、甜叶菊等诱导生根的情况相同^[17,18]。当 NAA 1.0 mg/L, IBA 1.0 mg/L 时最易生根,且生长状况较好(图版 1, c)。

用 5 cm 厚的珍珠岩制作苗床,将生根苗洗净培养基后移入,在光强为 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、每天光照 14 h、温度为 22 °C 培养室内培养,湿度保持在 85% 以上,2 周即可成活,成活率 100%,根系发达,平均根长达 8~9 cm。从诱导愈伤组织到组培苗在珍珠岩中过渡成活,整个过程大约需要 13 周。将苗移入营养土中(砾石:土=1:1),在培养室培养 3 周左右(图版 1, d),移栽至植物园大田中,在自然条件下生长,3 个月后成活率为 93.3%。牛蒡的田间管理较为容易,每月浇水 1 次,不用施肥,过冬时用土覆盖保温,第二年春季新芽破土而出,5 月开花,植株高达 1.5 m,基部叶片长达 40 cm,形态正常,生长状况良好,无病虫害(图版 1, e, f),比自然植株分枝

多且健壮。6、7 月份结籽,生长状态完全正常。

2.4 组织学观察

组织切片观察发现,牛蒡的再生可以通过器官发生或胚状体发生两种途径。器官发生途径是先在体外切口处诱导产生愈伤组织,7 d 后从愈伤组织内部开始分化形成分生细胞,这些分生细胞不断进行分裂,20 d 后形成一个芽前体,即突起状的分生组织(图版 1, g),继而形成芽原基,30 d 后形成不定芽;胚状体发生途径起源于单细胞,先在外植体的表面诱导产生胚性细胞,这些胚性细胞不断分裂,形成的顶部细胞大于基部细胞,有类似于胚柄状的结构出现,形成了早期的球形胚(图版 1, h);经过继续发育,最终形成子叶胚(图版 1, i)。

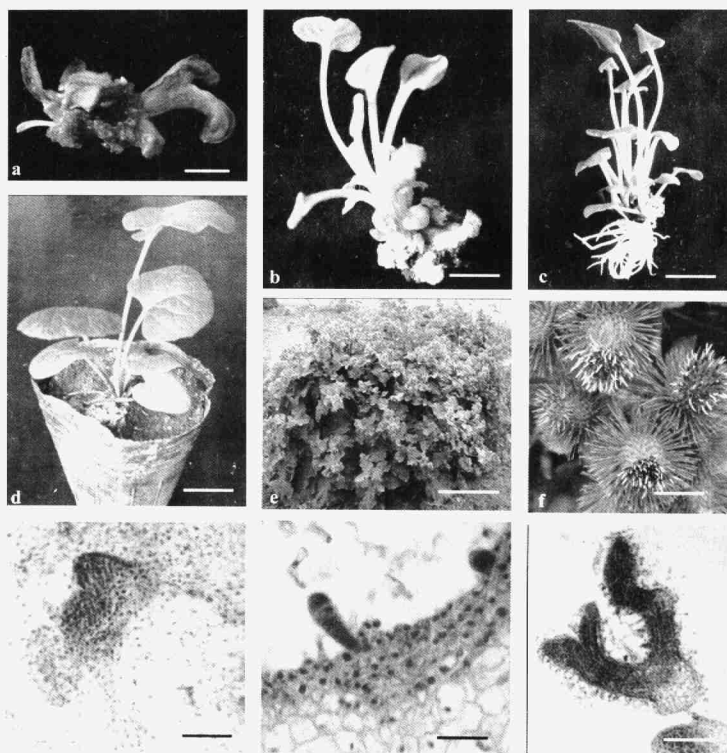
牛蒡适应性强、易栽培、产量大,在我国具有丰富的资源。由于其耐盐性较好,已在山东和江苏两省大面积种植^[4],据估计,仅山东一省,2004 年产量就达 100 万 t。从本实验栽培情况来看,牛蒡亦适应西北的干旱与半干旱环境。目前,牛蒡作为一种新特蔬菜,大量出口到日本、韩国及欧美一些国家。但国际市场对出口牛蒡的品质规格要求较高,造成大量等

外根、叶等的废弃,致使资源浪费。如果能利用牛蒡生产出优质的高附加值产品,将会使其具有更好的开发利用前景。本实验建立的完整再生体系,为牛蒡

的种质改良、生理活性和药理作用的研究、以及进一步开发利用奠定了很好的实验基础。

参考文献:

- [1] 黄璧才. 常用中草药识别与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 150—151.
- [2] CHEN G L(陈贵林), REN L Y(任良玉), SONG L Y(宋立彦). The technique of cultivating *Arctium lappa* L. [J]. *China Vegetables* (中国蔬菜), 1994, 3: 42—43 (in Chinese).
- [3] HORITA H, YASUOKA S. Black streak of edible burdock caused by *itersonilia perplexans* in Japan[J]. *J. General Plant Pathology*, 2002, 68: 277—283.
- [4] HAO L H(郝林华), CHEN K SH(陈靠山), LI G Y(李光友). Study and application of salt resistant plant great burdock[J]. *Marine Sciences* (海洋科学), 2004, 28(5): 69—72 (in Chinese).
- [5] ZHANG Y(张煜). The exploitation of burdock[J]. *China Fruit Research* (中国果品研究), 1993, 3: 32 (in Chinese).
- [6] 吴征镒. 新华本草纲要[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 373.
- [7] JIANG SH M(蒋淑敏). Recent advances in study of components and pharmacological roles of *Arctium lappa* L. [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research* (时珍国医国药), 2001, 12(10): 941—942 (in Chinese).
- [8] TAKASAKI M, KONOSHIMA T, KOMATSU K, TOKUDA H. Antitumor-promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa*[J]. *Cancer Lett.*, 2000, 158: 53—59.
- [9] HIROSE M, YAMAGUCHI T, LIN C. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats[J]. *Cancer Lett.*, 2000, 155: 79—88.
- [10] YAN L X(阎凌霄), LI Y M(李亚明). The effects of fructus arctii extracts on immunological competence and blood sugar of mice[J]. *Northwest Pharmaceutical J.* (西北药学杂志), 1993, 8(2): 76 (in Chinese).
- [11] KATO T, HIROSE M, TAKAHASHI S. Effect of the lignan, arctiin, on 17-beta ethinyl estradiol promotion of preneoplastic liver cell foci development in rats[J]. *Anticancer Res.*, 1998, 18: 515—517.
- [12] HIRANO T, GOTOH M, OKA K. Natural flavonoid and lignan are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells[J]. *Life Sci.*, 1994, 55: 1061—1069.
- [13] ZSCHRODER H C, MERZ H, STEFFEN R. Different inhibitory activity of natural lignan[J]. *Natur. Forsch.*, 1990, 11~12 (45): 1215—1221.
- [14] LIANG Y L(梁玉玲), ZHU B CH(朱宝成), LI Q Y(李庆余). Tissue culture of *Arctium lappa* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 1993, 24(7): 383 (in Chinese).
- [15] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. *Physiol. Plant*, 1962, 15: 473—497.
- [16] 郑国锴, 谷祝平. 生物显微技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 39—85.
- [17] LUO G F(罗桂芬), HU H(胡虹), DUAN J Y(段金玉). Tissue culture of *Artemisia annua* [J]. *Plant Physiol. Commun.* (植物生理学通讯), 1995, 31(3): 207 (in Chinese).
- [18] SHEN X L(沈秀丽). Tissue culture of *Sterea rebaudianum* [J]. *Plant Physiol. Commun.* (植物生理学通讯), 1995, 31(1): 42—43 (in Chinese).



图版 1 牛蒡的再生发育过程

a. 在 NAA 1.0 mg/L+BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基上, 4 周后从子叶直接分化成芽且诱导出颗粒状愈伤组织(标尺=2.5 mm); b. 褐化的愈伤组织在 NAA 1.0 mg/L+BA 0.5 mg/L 的 MS 培养基上, 30 d 后分化出芽(标尺=0.5 cm); c. 再生芽在 NAA 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L 的 1/2 MS 培养基上 3 周后生根(标尺=1 cm); d. 移栽至营养土中 3 周后的苗(标尺=2.5 cm); e. 再生牛蒡苗在大田中生长一年后的情况(标尺=0.4 m); f. 牛蒡再生苗次年开花(标尺=1.2 cm); g. 培养 20 d 的下胚轴愈伤组织内部诱导产生分生组织的切片(标尺=300 μ m); h. 从牛蒡子叶外植体表面直接诱导出的球形胚(培养 3 周)(标尺=300 μ m); i. 发育中的子叶胚(标尺=250 μ m)。

Plate 1 Plant regeneration and development of *Arctium lappa*

a. The granular calli and shoots of *Arctium lappa* induced direct from cotyledon after 4 weeks in MS with 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA (bar=2.5 mm); b. Multiple shoots induced from brown calli in MS with 1.0 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA after 30 d (bar=0.5 cm); c. Elongated shoots with root formation in 1/2 MS added 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L IBA after 3 weeks (bar=1 cm); d. Plantlets established in soil 3 weeks after transferring (bar=2.5 cm); e. Regenerated *Arctium lappa* growing in the field after one year (bar=0.4 m); f. Regenerated *Arctium lappa* flowering in the second year (bar=1.2 cm); g. A meristem embedded in callus induced from hypocotyl after 20 d (bar=300 μ m); h. Globular embryoids induced direct from cotyledon after culturing 3 weeks (bar=300 μ m); i. Well developed somatic embryo at cotyledonary stage (bar=250 μ m)