

白亮独活的组织培养和植株再生研究

谭兴¹, 杨军^{1,2*}, 陈德灿¹, 龚真才¹ (1. 西华师范大学生命科学学院, 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 建立了白亮独活组织培养和小植株再生的体系。以叶片为外植体, 在含不同生长调节物质的 MS 培养基中培养, 结果表明, 在 MS 培养基上附加 2,4-D 2.0 mg/L 和 6-BA 0.5 mg/L 对愈伤组织的诱导率可达 100%; 而愈伤组织继代最合适的培养基培养为附加 2,4-D 2.0 mg/L 和 6-BA 0.2 mg/L 的 MS 培养基; 苗的诱导以附加 6-BA 2.0 mg/L 的 MS 培养基效果最好; 生根在附加 NAA 0.2 mg/L 和 IAA 0.5 mg/L 的 1/2 MS 培养基中最好。

关键词 白亮独活; 叶片; 组织培养; 植株再生

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)20-5182-02

Research on the Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Heracleum candicans*

TAN Xing et al (School of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637002)

Abstract A system of tissue culture and plantlet regeneration of *Heracleum candicans* was established. The different combinations of plant growth regulators were added into MS medium to investigate their effects on tissue culture of leaf as explants and 100% callus was induced on MS media with 2.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L 6-BA. And the most suitable subculture medium was MS with 2,4-D 2.0 mg/L and 6-BA 0.2 mg/L. Shoots were proliferated on MS media supplemented with 6-BA 2.0 mg/L and the rooting medium was 1/2 MS media added with NAA 0.2 mg/L and IAA 0.5 mg/L.

Key words *Heracleum candicans*; Leaf; Tissue culture; Plantlet regeneration

白亮独活, 又名藏当归、白羌活, 为伞形科芹亚科独活属多年生草本^[1]。

白亮独活的根中含有佛手柑内酯, 欧前胡素, 8-香叶氧基补骨脂素, 当归素及硬脂酸(β -谷甾醇)等成分^[2-3]。其干燥根为常用中草药, 用于治疗风寒感冒头痛, 肢节风湿痛^[4-5]。因其含有的化学成分有较强的皮肤光敏作用, 也常用于治疗白癣及银屑病等皮肤病^[6]。

白亮独活分布区域较狭窄, 野生资源十分有限, 加之环境的破坏及人为掠夺式的采挖, 使其处于濒临灭绝的境地。为此, 笔者以白亮独活的叶片为外植体进行愈伤组织诱导通过继代增殖诱导, 获得组培苗, 旨在为其野生资源保护、规模化培养及细胞培养作一探讨; 为其细胞培养获取有效的生物活性物质, 以及通过遗传转化对白亮独活的性状品质进行改良奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 白亮独活的幼叶, 采自卧龙自然保护区。

1.2 方法

1.2.1 消毒。将幼叶用自来水洗净, 流水冲 3~5 min, 滤纸吸干, 然后用浓度为 70% 的酒精浸泡 30~60 s, 无菌水冲洗 2~3 次, 再用 HgCl₂ 浸泡 10 min, 无菌水冲洗 4~5 次。

1.2.2 培养条件。培养温度为 25℃±2℃, 光照周期为 12 h, 光照强度为 2 000~2 500 Lx。

1.2.3 愈伤组织诱导试验。将消毒过的叶片切成 0.5 cm 左右的小段, 接于 MS 诱导培养基上。诱导培养基中含有不同浓度的 2,4-D 和 6-BA, 测试对愈伤组织诱导的影响。培养基均附加蔗糖 3%, 琼脂 0.5%。

1.2.4 继代增殖试验。在愈伤组织诱导培养 3 周左右, 选取最佳的愈伤组织进行继代培养。MS 继代培养基中, 添加不同浓度的 2,4-D+6-BA 或 2,4-D+Kt, 测试不同激素及水平

组合对愈伤组织继代的影响。每 2~3 周更换 1 次培养基, 继代增殖 4 次。

1.2.5 分化培养试验。将继代培养基中略有分化愈伤组织以及未见分化的愈伤组织转接至分化培养基上, 其成分为 MS+2.0 mg/L 6-BA。

1.2.6 生根培养试验。待分化的苗长出茎后, 将苗分别接入含 NAA、NAA 和 IAA 不同浓度组合的 MS 或 1/2 MS 培养基上, 测试对苗生根的影响。

1.2.7 抗玻璃化处理试验。将培养基中琼脂含量由 0.5% 提高到 0.8%, 与此同时, 在苗转入生根培养基之后, 于 12:00 将培养瓶置于太阳光照下 1~2 h, 连续 3 d。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导试验结果 培养 7 d, 外植体膨大, 卷曲, 愈伤组织开始萌动, 出现如针尖大小的菜花状愈伤组织。培养 30 天后, 在所有培养基上, 都有愈伤组织发生, 但附有 2.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L 6-BA 的培养基上愈伤组织发生率最高, 为 100% (表 1); 愈伤组织呈透明的乳白色, 所发生的愈伤组织体积也最大 (图 1)。

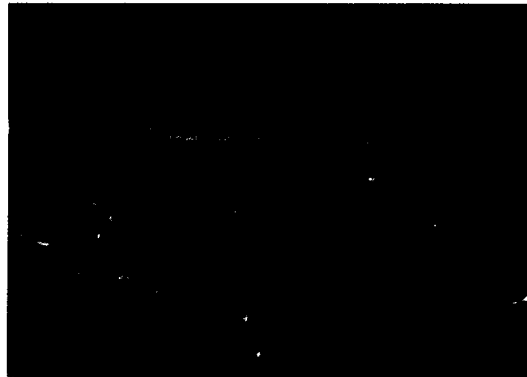


图 1 最佳状态的愈伤组织

2.2 愈伤组织的继代试验结果 附加 2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 的培养基上愈伤组织继代过程中增殖快、状态好, 继代 4 次以后, 愈伤组织开始直接分化, 出现绿色质硬的芽点 (图 2), 然后分化出单片叶, 叶片玻璃化; 附加 2,4-D

基金项目 四川省重点学科建设项目 (SZD0420) 资助。

作者简介 谭兴 (1972-), 男, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 资源植物遗传学。* 通讯作者。

收稿日期 2006-06-15

表 1 不同激素对愈伤组织形成的影响

2,4-D mg/L	6-BA mg/L	外植数	发生愈伤组 织外植体数	诱导率 %	愈伤组织的体积状态
2.0	0.5	20	20	100	体积大、透明、乳白色
2.0	1.0	20	17	85	体积较大、乳白色
1.0	0.5	20	18	90	体积较大、透明、乳白色

2.0 mg/L+ 6-BA 0.2 mg/L 的培养基上愈伤组织继代过程增殖较快、状态好,继代次数延长至 6 次也无分化;附加 2,4-D 2.0 mg/L+Kt 0.5 mg/L 和 2,4-D 4.0 mg/L+ Kt 1.0 mg/L 的培养基上愈伤组织继代过程中增殖迅速,每 2 周就需转接继代,但愈伤组织易褐化,呈水渍状,时间延长会分化出根来(图 3)。



图 2 绿色芽点



图 3 褐色的愈伤组织及分化出的根

2.3 分化培养试验结果 将继代培养基上状态好的愈伤组织转入分化培养基后,14 d 左右分化出大量的绿色芽点,继续培养 3 周左右,可得到叶片簇生的小苗,叶片上着生白色的绒毛(图 4);一部分苗的叶片绒毛在继续培养时消失,叶片透明、质硬、易碎,呈典型的玻璃化症状(图 5)。



图 4 叶片簇生的苗丛

2.4 生根培养试验结果 小苗转入生根培养基后,经过抗玻璃化处理,叶片玻璃化情况明显得以改善,叶片叶柄转



图 5 玻璃化的苗

绿,叶缘呈明显锯齿状。将小苗转入附加 NAA 1.0 mg/L 的培养基中,培养 3 周后仍不生根;1/2 MS+ NAA 0.5 mg/L 中的小苗着生有少量的根;1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IAA 0.5 mg/L 中小苗根的发生较为明显(图 6)。



图 6 生根的小苗

3 结论与讨论

从该试验结果来看,愈伤组织继代增殖的情况及分化能力明显受到 3 个因素的影响:①初始诱导培养基。愈伤组织在含 2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 的培养基上增殖快,多次继代也容易分化;而在附加有 2,4-D 1.0 mg/L+ 6-BA 0.5 mg/L 和附加有 2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基上诱导出的愈伤组织其增殖速度不如前者。②愈伤组织自身所处的培养基中的生长调节物质。愈伤组织在含有 2,4-D 4.0 mg/L+Kt 0.5 mg/L 和含有 2,4-D 4.0 mg/L+Kt 1.0 mg/L 的培养基上继代过程中,增殖虽快,但呈水渍状,易褐化,表现为典型的 2,4-D 浓度过高的症状,这与张俊莲等在研究当归愈伤组织所观察到的现象一样^[9]。在这 2 种培养基上生长的一部分愈伤组织分化出根,而将根转接至分化培养基进行芽诱导时,根先愈伤化,继而褐化死亡,可能是该愈伤组织残留的生长调节物质的影响,减轻这种症状的有效方法是降低 2,4-D 的浓度。③继代次数。随着继代次数的增加,胚性愈伤组织会转为非胚性愈伤组织,转入分化培养基中分化水平降低,表明部分愈伤组织已经丧失了分化能力。综合考虑,试验中培养基 MS+ 2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 为诱导白亮独活愈伤组织的最适培养基。继代增殖培养基以 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 为好;生根培养基以 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+ IAA 0.5 mg/L 为宜。

组织培养过程中,常有 3 大难题,即菌类污染,玻璃化

(下转第 5222 页)



图3 BC3代品系(1)植株



图4 BC3代品系(2)植株

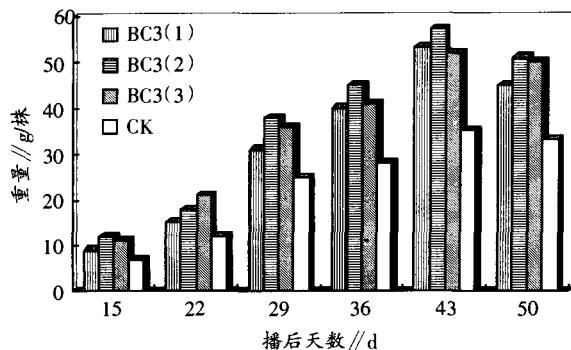


图5 回交 BC3 代群体植株不同时期的产量对比

表1 杂交及回交后代性状观察

	株型	分蘖
F1 代	较分散、植株平均高达 63 cm	分蘖生长能力强、侧芽生长快且多
BC1 代	较紧凑、植株平均高达 51 cm	分蘖生长能力强、侧芽生长快且多
BC3 代	较紧凑、植株平均高达 46 cm、外形趋于菜心	分蘖生长能力强、侧芽生长快且多

2.3 回交 BC3 代品系的超亲优势分析(表 2) 从表 2 可以看出,回交 BC3 代群体植株各项品质性状指标均表现出超亲优势。其中还原糖、总糖的超亲优势最为显著,分别达到了 40.39% 和 39.51%;蛋白质、维生素 C 的含量也有不同程度的超亲优势,分别为 16.67% 和 21.82%,因此,回交后代具有较好的品质。

(上接第 5183 页)

以及褐变现象。其中,玻璃化的症状是试管苗植株矮小肿胀、半透明玻璃状,叶片呈浅绿色或黄绿色,叶片增厚而狭长,有时基部较宽,叶片皱缩或纵向卷曲,脆弱易破碎;叶表面缺少角质层和腊质或腊质发育不全;茎短、粗、扁平、节间很短或几乎没有节间。抗玻璃化的对策有:①降低激素水平;②减少培养基的含水量;③纯化培养物;④避免高温^[6-8]。该实验中分化出来的苗、叶呈玻璃化。采取阳光照射、增加琼脂含量以降低含水量、缩短继代时间等方法基本上使组培苗正常化。

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[M].第 55 卷,第 3

表 2 回交 BC3 代群体植株营养成分超亲优势

营养成分	超亲优势/%
总糖	39.51
还原糖	40.39
蛋白质	16.67
维生素 C	21.82

3 结论与讨论

不断提高蔬菜周年供应水平,一直是蔬菜生产追求的目标,从现代社会的要求及今后的发展来看,蔬菜供应的水平不仅体现在数量、品种的多样性和商品质量等方面,还体现在蔬菜各种营养的供给量上。因此,学者们的研究也要顺应这一方向,选育出各种营养素含量高的品种。在该试验中,回交后代在产量和品质性状各方面都表现出了明显的杂种优势。从生长性状来看,与亲本相比,杂种后代具有明显的营养生长优势,植株外形趋于菜心,生长速度快,产量高,收获期长,依靠侧芽生长可持续收获,收获期长达 2 个月,且菜色浓绿,净菜率高,有较好的商品性,这在生产上是非常有利的,是一般菜心所不能比的。F1 代群体植株具有很好的营养生长优势,植株平均高达 63 cm,有较高产量,可探讨在饲料等方面的利用价值。

BC3 代群体植株的营养成份也相对较高,特别是还原糖和总糖的含量,蛋白质、维生素 C 的含量也比亲本有较大幅度的提高。综合考虑各项指标,回交 BC3 代已初步具有了杂种优势,在生产、营养和商品价值各方面都具有一定的潜力,具备了选育的价值。杂种后代的优势和差异性为选育工作提供了重要的依据,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 梁红,曾慕衡.植物遗传与育种[M].广东:高等教育出版社,2002.
- [2] 梁红.芸苔属植物的种间杂交研究进展[J].仲恺农业技术学院学报,1996(9):88-93.
- [3] 梁红,覃广泉,何丽贞.菜心与甘蓝杂种 F1 代杂种优势研究(初报)[J].中国蔬菜,1994(1):1-3.
- [4] 王国槐,官春云.十字花科芸苔属种间杂种营养优势的利用研究[J].作物学报,2003(1):54-58.
- [5] 张云贵,覃广泉.生物化学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [6] 张云贵.生物化学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [7] 傅廷栋,杨光圣.油菜杂种优势利用研究的历史、现状与展望[M].北京:中国科学技术出版社,1999:742-748.
- [8] 分册.北京:科学出版社,1992:207.
- [2] 林中文,高岚,陈一平,等.白亮独活的香豆素成分[J].云南植物研究,1993,15(3):313-314.
- [3] 孙汉董,林中文,钮芳娣.伞形科中药的研究Ⅶ——白亮独活的化学成分(1)[J].云南植物研究,1984,6(1):99-102.
- [4] 江苏省植物研究所.新华本草纲要:第 1 册[M].上海:上海科技出版社,1988:361.
- [6] 张俊莲,米受恩,栾文举.当归愈伤组织产生的影响因素分析[J].甘肃农业科技,1995(11):8-10.
- [7] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].第 2 版.北京:科学出版社,2002:355-358.
- [8] 蔡祖国,徐小彪,周会萍.植物组织培养中的玻璃化现象及其预防[J].生物技术通讯,2005,16(3):353-355.
- [9] 秦静远,王军利,王富容.植物组织培养中的玻璃化现象[J].杨凌职业技术学院学报,2004,3(2):51-53.

本刊提示 来稿请用国家统一的法定计量单位的名称和符号,不要使用国家已废除了的单位。如面积用 hm^2 (公顷)、 m^2 (平方米),不用亩、尺²等;质量用 t(吨)、kg(千克)、mg(毫克),不再用担等;表示浓度的 ppm 一律改用 mg/kg 、 mg/L 或 $\mu\text{L/L}$ 。