

藜蒿离体培养再生体系的建立

黄白红^{1,2}, 乔乃妮², 龚逸², 周朴华¹ (1. 湖南农业大学生命科学院, 湖南长沙 410000; 2. 常德职业技术学院, 湖南常德 415000)

摘要 采用植物组织培养技术, 可以诱导藜蒿的幼叶和茎段产生愈伤组织和植株。以藜蒿幼叶、茎段为外植体, 探索建立再生体系的最适条件和方法。研究表明: 用 70% 酒精先消毒 5 s, 再用 0.1% 升汞消毒 8 min, 其消毒效果最好; MS + 6-BA(1 mg/L) + 2,4-D(4 mg/L) 培养基适宜诱导藜蒿茎叶形成愈伤组织, MS + 6-BA(4 mg/L) + NAA(0.4 mg/L) 继代培养基最适诱导叶丛芽分化, 而 1/2 MS + NAA(0.5 mg/L) + IAA(0.5 mg/L) 为丛生菌生根最适培养基。

关键词 藜蒿; 组织培养; 愈伤组织; 外植体

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)22-06832-03

Building-up of Regeneration System *in vitro* Culture of *Artemisia selengensis*

HUANG Bai-hong et al (Department of Biological Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410000)

Abstract The callus and explants could be induced by the young leaves and stems of *Artemisia selengensis* by plant tissue culture technology. The most suitable condition and method of building-up regeneration system with the leaves and stems of *Artemisia selengensis* were studied. The results indicated that the optimal method of sterilization was dipping the explants in 70% alcohol for 5 seconds, and then in 0.1% mercuric chloride for 8 minutes. The optimum medium for the leaves and stems callus induction was MS + 6-BA(1 mg/L) + 2,4-D(4 mg/L). The optimum medium for the bud differentiation was MS + 6-BA(4 mg/L) + NAA(0.4 mg/L). The optimum medium for cluster bacteria rooting was 1/2 MS + NAA(0.5 mg/L) + IAA(0.5 mg/L).

Key words *Artemisia selengensis*; Tissue culture; Callus; Explants

藜蒿(*Artemisia selengensis*)又名芦蒿、水蒿、香艾蒿, 学名蒹蒿, 属菊科菊属多年生宿根性草本植物, 主要以嫩茎为食用器官, 其茎秆清香、鲜美、脆嫩可口。藜蒿含有大量的矿物质元素、蛋白质、碳水化合物、粗纤维、胡萝卜素与维生素等, 具有较高的营养价值。另外, 藜蒿提取物还有一定的药用价值, 具有清凉、平却肝火、治疗高血压、肝炎、抗氧化衰老、抗癌症和驱虫之功效。

目前藜蒿大多采用根茎繁殖。连年种植后, 病毒感染严重, 产量下降, 品质变劣。利用藜蒿茎尖、幼叶进行组织培养, 既可脱去病毒, 提纯种性, 提高产量和品质, 又可加快繁殖系数, 实现工厂化生产。通过组织培养技术, 还可满足藜蒿均衡上市, 实现全年为市场供应可食用藜蒿, 进而为藜蒿食用、药用、保健等深层次的加工提供原料基础。以藜蒿茎、幼叶为外植体, 笔者探索建立了再生体系的最适条件和方法, 为规模化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料 岳阳大棚种植的云南藜蒿幼叶、幼茎、幼嫩花絮。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的制备。基本培养基为 MS, 附加不同种类和浓度配比的植物生长调节剂, 蔗糖 3%, 琼脂 0.7%, pH 值为 5.8~6.0, 121 °C 高压、湿热灭菌 20 min, 灭菌压力为 0.12 MPa, 灭菌后放置 2 d 左右备用。

1.2.2 组织培养方法。

1.2.2.1 培养条件。培养温度为(24±2) °C, 光照强度为 2 500 lx, 光照 12~14 h/d, 保持培养室干燥。

1.2.2.2 外植体的消毒与接种。将藜蒿幼嫩叶片和茎段用自来水冲洗干净, 在超净工作台上直接用 0.1% 升汞消毒, 或用 70% 酒精浸泡 3 s 后, 用无菌蒸馏水冲洗 3 次, 再用 0.1% 升汞消毒, 无菌蒸馏水冲洗 5 次, 然后用无菌滤纸吸去表面

水分, 将叶片切块(1 cm×1 cm)、茎段切段(0.5~1.0 cm)分别接种于愈伤组织诱导培养基上。每种消毒方式接种 20 个外植体, 叶片和茎段各 10 个, 比较不同消毒方式对外植体诱导的影响。

1.2.2.3 愈伤组织的诱导与继代培养。将各外植体分别接种于附加 6-BA、2,4-D 不同浓度配比的 MS 培养基上, 诱导愈伤组织。每样处理 10 瓶, 每瓶接种 4 个外植体。

1.2.2.4 丛芽的分化与增殖。将诱导的愈伤组织转入新鲜的愈伤组织诱导培养基中, 继代培养 25 d 后切割, 接种于附加不同浓度 6-BA 和 2,4-D 的 MS 培养基中, 进行丛芽的分化。分化的丛芽进行切割后, 继续转入新鲜培养基中增殖。每样处理 10 瓶, 每瓶接种 5 块愈伤组织。

1.2.2.5 不定根的诱导。待丛芽长至 2~3 cm 时, 从茎基部切割, 并转入附加不同浓度的 NAA、ISS 的 MA 或 1/2 MS 培养基上, 15 d 后诱导生根。

1.2.3 试管苗的移栽。打开生根试管苗的培养瓶盖, 在人工气候箱中放置 2 d 后, 从培养瓶中取出试管苗, 小心洗去培养基, 移栽到装有沙土的花盆, 培养 10 d 后, 统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂和消毒时间对外植体处理效果的影响 升汞是一种剧毒物质, 经升汞处理后, 即使用无菌水冲洗 5~7 次, 仍然有少量升汞残留在外植体上, 导致外植体死亡。

表 1 表明, 无论是单独用升汞还是升汞、酒精合用, 外植体的染菌率随着消毒时间的延长而呈下降趋势, 但死亡率上升。单独以升汞消毒 2~4 min, 外植体几乎全部污染; 消毒 8 min, 效果稍好, 但仍有很严重的污染。先用 70% 酒精消毒 5 s, 再用 0.1% 升汞消毒 8 min, 效果较好。可见, 以叶片和茎段为外植体时, 以 70% 酒精先消毒 5 s, 再用 0.1% 升汞消毒 8 min 为宜。但以幼嫩花絮为外植体时, 无论采用上述何种消毒方式, 效果均较差。

2.2 不同植物生长调节剂浓度对愈伤组织形成的影响 分别将切割后的叶片和茎段接种在不同浓度配比的 6-BA、2,4-D 培养基上, 诱导愈伤组织。

作者简介 黄白红(1963-), 女, 湖南常德人, 副教授, 从事资源植物学方面的研究。

收稿日期 2007-03-21

表 1 不同消毒试剂和消毒时间对外植体处理效果的影响

序号	酒精消毒时间	升汞消毒时间	外植体污染率	外植体
	s	s	%	情况
1	0	2	100	浅绿色
2	0	4	85	浅绿色
3	0	8	50	浅绿色
4	0	10	40	黄褐色
5	5	2	90	浅绿色
6	5	4	85	浅绿色
7	5	6	75	浅绿色
8	5	8	20	浅绿色
9	5	10	10	黄褐色
10	5	12	5	褐色,死亡

表 2 表明,外植体经过 20 d 培养后,分化出愈伤组织,但愈伤组织的生长情况却大有不同。在 13 组不同植物生长调节剂浓度配比中,1 号培养基对诱导愈伤组织分化有一定的抑制作用,5~10 号培养基对愈伤组织有一定的诱导作用,但愈伤组织分化的质量不同,11~13 号培养基适宜于诱导愈伤组织分化,其中 13 号各激素浓度配比对茎和幼叶的愈伤组织分化都有较好效果。研究表明,MS+6-BA(1 mg/L)+2,4-D(4 mg/L)为适宜培养基,愈伤组织诱导率高,且较易分化丛芽(图 1、2、3)。

表 2 6-BA、2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

代号	6-BA mg/L	2,4-D mg/L	叶片出 茎段出愈		愈伤组织生长情况
			愈率//%	率//%	
1	0	0	0	0	质地疏松,浅黄色,不易分化
2	0	1	10.0	7.5	质地疏松,浅黄色,不易分化
3	0	2	22.5	17.5	质地疏松,浅黄色,不易分化
4	0	4	35.0	25.0	质地疏松,浅黄色,不易分化
5	0.5	1	15.0	10.0	质地疏松,浅黄色,能分化芽
6	0.5	2	62.5	55.0	质地疏松,浅黄色,能分化芽
7	0.5	4	65.0	52.5	质地疏松,浅黄色,能分化芽
8	1.0	1	12.5	7.5	较致密,黄绿色,能分化芽
9	1.0	2	40.0	30.0	较致密,黄绿色,能分化芽
10	1.0	4	65.0	57.5	较致密,黄绿色,能分化芽
11	2.0	1	20.0	12.5	致密,绿色,易分化芽
12	2.0	2	25.0	15.0	致密,绿色,易分化芽
13	2.0	4	25.0	20.0	致密,绿色,易分化芽

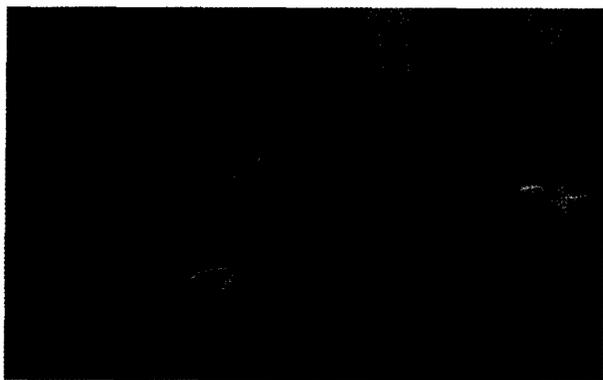


图 1 幼茎离体培养产生的淡黄绿色愈伤组织

2.3 不同植物生长调节剂浓度、种类对芽分化和增殖的影响 继代增殖的愈伤组织经切割后转入不同植物生长调节剂浓度及配比的分化培养基上,使其分化。

表 3 表明,不同植物生长调节剂浓度、配比对芽分化、增殖也有很大的影响。10 号培养基芽分化率、增殖系数均最大,其余均较小;1 号培养基上芽分化率最低,增殖系数仅为

2.0。由此可见,MS+6-BA(1 mg/L)+NAA(0.4 mg/L)为适宜培养基,丛芽分化和增殖系数都为最高(图 4、5)。



图 2 幼叶离体培养产生的多种色泽致密愈伤组织



图 3 继代培养产生的愈伤组织

表 3 6-BA、NAA 对丛芽分化的影响

代号	6-BA mg/L	2,4-D mg/L	分化 块数	分化率 %	分化 丛芽数	增殖 系数
2	1	0.4	14	28	56	4.0
3	1	0.6	12	24	36	3.0
4	1	0.8	11	22	22	2.0
5	2	0.2	33	66	19	8.0
6	2	0.4	35	70	280	8.0
7	2	0.6	32	64	192	6.0
8	2	0.8	30	60	195	6.5
9	4	0.2	37	74	296	8.0
10	4	0.4	39	78	329	8.4
11	4	0.6	36	72	273	7.6
12	4	0.8	36	72	259	7.2



图 4 茎愈伤组织分化的小芽

2.4 不同培养基、植物生长调节剂浓度对藜蒿试管苗生根的影响 丛生苗经切割后转接至添加 NAA、IAA 不同浓度配



图5 叶愈伤组织分化的小芽

比的 MS 或 1/2 MS 培养基上,诱导其生根。培养 15 d 左右,统计其生根情况。

表 4 表明,将愈伤组织分化的幼苗接入不同培养基,大约 15 d 后在 1/2 MS 培养基上生根率最高(图 6,7)。



图6 无根苗在生根培养基上生根培养



图7 完整试管苗及发达的根系

表4 不同植物生长调节剂浓度对藜蒿试管苗生根的影响

培养基类型	NAA	IAA	生根试	生根率
	mg/L	mg/L	管苗数	%
MS	0	0	8	20.0
MS	0	0.5	15	37.5
MS	0	0.8	21	52.5
MS	0	1.0	24	60.0
MS	0.2	0.8	26	65.0
MS	0.3	0.7	28	70.0
MS	0.5	0.5	30	87.5
MS	0.6	0.4	32	80.0
1/2 MS	0.5	0.5	36	90.0
1/2 MS+0.3%活性炭	0.5	0.5	30	75.0

2.5 移栽的藜蒿试管苗成活率 将试管苗培养基瓶盖打开,在人工气候箱中炼苗 2 d 后,洗去培养基,移栽 50 株到装有沙土的花盆内培养 10 d 后,发现成活藜蒿 44 株,成活率为 88%。

3 讨论

研究表明,无论单独用升汞还是合用升汞与酒精,外植体的染菌率随消毒时间的延长呈下降趋势,但死亡率随之上升;采用 70% 酒精先消毒 5 s,再用 0.1% 升汞消毒 8 min,其消毒效果最好,外植体感染率低,可成活。植物生长调节剂可对植物的脱分化、生长、分化起到调节作用。但在一定的浓度范围内,少量植物生长调节剂效果不明显,大量植物生长调节剂抑制其作用,只有在适量的浓度范围和组合比例时效果明显。其中,13 号各激素浓度对比对茎、幼叶的愈伤组织分化都有较好的效果。研究还表明,MS + 1 mg/L 6-BA + 4 mg/L 2,4-D 培养基最适宜诱导藜蒿茎叶形成愈伤组织;MS + 4 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L NAA 为继代培养基时,最适宜诱导叶丛芽分化;而 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L IAA 为丛生苗生根最适培养基。

参考文献

- [1] 汤丽梅,李保同.江西藜蒿的生物学特性与栽培技术[J].中国野生植物资源,1998(4):53-54.
- [2] 赖芳兰,邹桂花.鄱阳湖藜蒿的特性及繁殖方法的研究[J].江西农业大学学报,1998(2):247-251.
- [3] 王新华,刘伟,赵恒国.藜蒿组织培养[J].北方园艺,2002(4):62.
- [4] 涂芝声,余兰平,王永强,等.藜蒿的组织培养和快速繁殖研究[J].中国野生植物资源,2005(2):59-61.
- [5] 杨振国,陈彬,杨艺青.江西藜蒿的开发利用[J].中国野生植物资源,1995(7):61-62.
- [6] 陈新.藜蒿茎叶化学成分研究[D].南昌:江西师范大学,2001:12-13.
- [7] 黄树稳,黄绍华,温辉梁.藜蒿膳食纤维的制备、组成及性能研究[J].中国食品添加剂,1996(4):7-11.

GB/T 7714-2005

专著中析出文献的著录格式

析出文献主要责任者.析出文献题名[文献类型标志].析出文献其他责任者//专著主要责任者.专著题名:其他题名信息.版本项.出版地:出版者,出版年:析出文献的页码[引用日期].获取和访问路径.

示例:

[1] 程根伟.1998 年长江洪水的成因与减灾对策研究[M]//许厚泽,赵其国.长江流域洪涝灾害与科技对策.北京:科学出版社,1999:32-36.

[2] 钟文发.非线性规划在可燃毒物配置中的应用[C]//赵玮.运筹学的理论与应用:中国运筹会第五届大会论文集.西安:西安电子科技大学出版社,1996:468-471.

[3] WEINSTEIN L, SWERTZ M N. Pathogenic properties of invading microorganism[M]//SODEMAN W A, SODEMAN W A. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974:745-772.