

# 虎耳草的组织培养和离体再生

赵宏波, 房伟氏, 陈发棣

(南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

**摘要:**以第一张展开的叶片为外植体进行了虎耳草组织培养研究。结果表明,最佳的培养体系为:以培养基 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 诱导愈伤组织;形成的愈伤组织转接到 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 上诱导分化,分化率达到 65%;分化的不定芽转接到 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 上诱导增殖,增殖倍数达到 6.35;形成的植株转移到不含激素的 1/2MS 培养基上诱导生根,同时还有壮苗效果。

**关键词:**虎耳草;组织培养;离体再生;叶片

**中图分类号:**S682.036 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-1302(2006)05-0070-02

虎耳草 (*Saxifraga stolonifera*) 是虎耳草科多年生常绿宿根植物<sup>[1]</sup>,不仅可用于盆栽观赏、点缀盆景和园林地被,还具有较好的药用价值。虎耳草的叶茎密被茸毛,叶形似老虎耳朵,叶表面有白色斑点,背面多为紫红色;具匍匐茎,顶端可形成小植株;初夏从叶丛间抽出花葶,开 5 瓣白色小花,优雅动人。具有清热解毒、祛湿消肿、凉血止血的功效<sup>[2]</sup>,可用于治疗中耳炎、外伤出血、牙痛、湿疹、吐血、前列腺增生等多种疾病<sup>[3-5]</sup>。本研究拟建立虎耳草组织培养和离体快繁体系,为产业化育苗生产提供技术支持,同时为提取和生产虎耳草中的药用活性成分奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试材料为虎耳草第一张刚展开的嫩叶及其叶柄。愈伤组织诱导培养基:①MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA;②1/2MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA;③MS'(大量元素为 MS 培养基的一半,微量、铁盐、有机物质与 MS 同) + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA。分化培养基:④MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA;⑤MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA;⑥MS + 0.01 mg/L TDZ +

0.1 mg/L NAA;⑦MS + 0.02 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA。增殖继代培养基:⑧MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA;⑨MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA;⑩MS + 0.2 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA。生根培养基:⑪1/2MS。培养基均加 3% 蔗糖和 0.6% 琼脂, pH 值 5.8。

### 1.2 方 法

选取健康嫩叶,放入洗洁精水中漂洗 8 ~ 10 min,用自来水冲净,滤纸吸干,再用 70% 乙醇浸泡 30 s,0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 8 min,无菌水冲洗 4 次。切成(2~3) mm × (2~3) mm 大小,接种于愈伤组织诱导培养基中。30 d 后将形成的愈伤组织转接到分化培养基中,再过 30 d 后将分化的不定芽切下,接到增殖继代培养基上。将长至一定大小(全展叶直径 1 cm 以上)的不定芽切下,转接到生根培养基中。以上各阶段培养条件均为(25 ± 2) °C, 1 500 ~ 2 000 lx, 12 h/d。30 d 后进行驯化移栽,将装有已生根的试管苗的培养瓶拿出培养室,在室温自然条件下锻炼 3 d,然后打开瓶盖,再锻炼 3 d,最后用镊子将试管苗取出,在自来水下将培养基冲净,栽到经高温灭菌过的基质[W(珍珠岩):W(泥炭) = 3:1]中,用塑料薄膜罩住保湿,温度 23 ~ 25 °C,光照 3 000 lx。1 个月后移栽。

### 1.3 数 据 分 析

采用最小显著极差法(LSR)进行数据分析。

## 2 结 果 与 分 析

### 2.1 愈伤组织的诱导

接种于①、②、③培养基中的叶片在 10 d 后开始膨大,形成愈伤组织,30 d 后膨大的叶片周边形

收稿日期:2006-03-03

基金资助:江苏省农业三项工程项目[编号:S01(48)]。

作者简介:赵宏波(1979—),男,浙江武义人,博士生,从事观赏植物种质资源和遗传育种等研究。Tel:(025)84395231;E-mail:zhaohbzhou@yahoo.com。通讯作者:陈发棣,教授,博导。E-mail:chenfd@njau.edu.cn。

成了一定的愈伤组织,3种培养基出愈率差异不显著(表1)。培养基①上形成的愈伤组织呈黄绿色,表面湿润;培养基②和③上形成的愈伤组织呈米黄色,半透明,较疏松。培养基①诱导的愈伤组织后期分化能力较强。

表1 不同培养基上愈伤组织诱导情况

培养基	接种数(个)	愈伤组织数(个)	出愈率(%)
①	39	33	84.6a
②	54	42	77.8a
③	50	40	80.0a

芽形成之后需及时转接,若转接太迟易发生玻璃化,且形成的不定芽过多,导致个体太小,继代之后生长缓慢。

表2 不定芽的诱导情况

培养基	分化率(%)	褐化率(%)	分化情况
①	20.0B	2.5B	愈伤组织周边形成1~3个不定芽
④	65.0A	0	愈伤组织周边形成2~5个不定芽
⑤	5.00B	50.0A	极少数分化,大部分愈伤组织褐化
⑥	8.30B	64.0A	少数分化,绝大部分愈伤组织褐化

形成的不定芽及时转接到增殖继代培养基①、⑦和⑧上,结果见表3。在培养基①上40d后不定芽增殖倍数达到10.6,但形成的不定芽过多且小,部分发生玻璃化;而在培养基⑦上每株不定芽增殖倍数适中,40d后达6.35,形成的个体较粗壮,适合生根移栽;在培养基⑧上虽然增殖倍数和长势均较好,但芽丛形成了根,不适合移栽,也给转接继代带来不便。

表3 不定芽的增殖情况

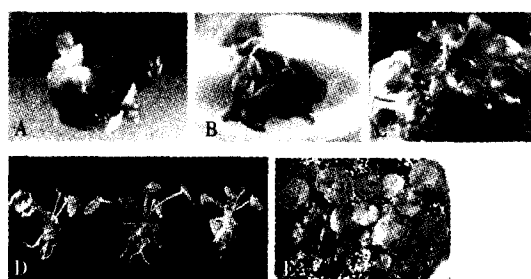
培养基	接种数(个)	不定芽数(个)	增殖倍数	生长情况
①	60	634	10.6A	不定芽过多且大小,有部分玻璃化
⑦	60	381	6.35B	不定芽大小适中,长势好
⑧	60	256	4.27B	长势较好,但芽丛形成了一定量的根

## 2.2 不定芽的诱导和增殖

30~40d后将愈伤组织及时转接到分化培养基①、④、⑤和⑥上,15d后便陆续分化出不定芽,但在培养基①上分化率只有20%,而在培养基④上分化率达到65%;在添加了TDZ的培养基⑤和⑥上,分化率较低,且愈伤组织褐化严重(表2)。不定

## 2.3 根的诱导和移栽

从丛生芽上切下长至一定大小的不定芽,转接到培养基⑨上诱导生根。30d后,不定芽生长健壮,基部形成一定量白色的根,根上形成了大量根毛,生根率达到95%以上,说明培养基⑨兼有生根和壮苗的作用。生根植株经驯化后,移栽成活率达95%以上,1个月后移栽,后期长势旺盛(图1)。



A.愈伤组织分化;B.第1次继代;C.丛生芽;D.生根植株;E.移栽3周后的植株。

图1 虎耳草组织培养过程

愈伤组织,发现只有叶片能诱导出长势良好且具有较好分化能力的愈伤组织,以培养基MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA最为适宜。在不同培养基上诱导出的愈伤组织状态不同,可作不同用途使用。在培养基MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA上诱导出的黄绿色愈伤组织作为诱导分化的材料,而培养基1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA和MS'(大量元素为MS培养基的一半,微量、铁盐、有机物质与MS同)+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA上诱导出的愈伤组织呈米黄色,半透明,较疏松,可作为悬浮培养的材料,用以提取药用成分。黄绿色的愈伤组织转接到分化培养基MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA上,分化率达到65%。形成的不定芽需及时转接继代,否则极易玻璃化。不定芽转接到MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA上诱导增殖,增殖倍数达到6.35,植株生长旺盛。将增殖的芽丛切成单株,转移到不含激素的1/2MS培养基上诱导生根,结果表明1/2MS兼有生根和壮苗效果。生根植株驯化移栽成活率高且长势好。

## 3 结论

以虎耳草不同部位(叶片、叶柄)为外植体诱导

(下转第72页)

# 同源四倍体抗热萝卜同工酶研究

徐伟钰, 张蜀宁, 万双粉, 侯喜林

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 园艺学院, 江苏南京 210095)

**摘要:** 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对二倍体和四倍体萝卜进行了营养生长和生殖生长期超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和酯酶(EST)同工酶研究。结果表明, 与二倍体相比, 无论是营养生长期还是生殖生长期, 四倍体 EST 同工酶多 1~2 条特异条带且颜色较深; POD 同工酶酶谱带的条数相同, 但四倍体的酶谱带显色深, 差异显著; 营养生长期四倍体中 SOD 同工酶酶谱带和二倍体相同; 生殖生长期四倍体 SOD 酶谱带的活性加强。

**关键词:** 萝卜; 同工酶; 二倍体; 四倍体

**中图分类号:** S631.103.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2006)05-0072-03

植物多倍体具有抗逆性、优质性和巨大性<sup>[1]</sup>, 备受人们重视。多倍体与二倍体差异的根本原因是 DNA 分子水平表达不同。有关果树多倍体与二倍体同工酶电泳谱带特征的比较研究<sup>[2-7]</sup>表明, 多倍体植株同工酶同一位点基因剂量加倍, 该位点的酶量相应增加, 并且多倍体酶谱中出现特异条带。蔬菜多倍体中仅在不结球白菜<sup>[8]</sup>和萝卜上有报道, 但在萝卜<sup>[9]</sup>上只对同源多倍体萝卜过氧化物酶同工酶进行了研究, 关于二倍体和四倍体萝卜不同生育时期、不同组织器官的同工酶的变化规律还未见报道。本研究利用本实验室培育的抗热四倍体白萝卜叶片和花蕾为试材, 比较分析不同生育时期叶片和花蕾中 EST、SOD 和 POD 同工酶酶谱带的表达特性, 为多倍体育种后代的遗传分析和倍性筛选提供辅助方法。

收稿日期: 2006-01-09

基金项目: 江苏省重大科技攻关项目(编号: 2002304)。

作者简介: 徐伟钰(1980—), 女, 河南南阳人, 硕士生, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。Tel: (025) 84395332; E-mail: xuweiyu\_0000@sina.com。通讯作者: 张蜀宁。E-mail: snzhang@njau.edu.cn。

(上接第 71 页)

## 参考文献:

- [1] 潘锦堂. 中国植物志: 第三十四卷, 第二分册[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [2] 罗厚蔚, 吴葆金, 陈节庵. 虎耳草有效成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 1988, 19(1): 1.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为二倍体抗热白萝卜( $2n = 2x = 18$ ) 03R-2 和四倍体抗热白萝卜( $2n = 4x = 36$ ) 03R-1 (本实验室利用秋水仙素诱导 03R-2 获得), 试验于 2004 年 11 月~2005 年 4 月在南京农业大学国家重点实验室和园艺站进行。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料准备 田间试验设计采用随机区组, 3 次重复。2004 年 9 月播种, 株行距 30 cm × 35 cm, 每小区 40 株。9~12 月营养生长, 同年 12 月收获贮藏, 次年 2 月定植进行生殖生长。

1.2.2 电泳 (1) 凝胶制备: 分离胶浓度 7.5% (pH 值 8.9), 浓缩胶浓度 4% (pH 值 6.7), 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 值 8.3)。(2) 样品制备: 营养生长期, 取全展幼叶 1 g, 加入 2~3 倍体积的缓冲液(PBS 0.1 mol/L, pH 值 6.8, 0.2% β-巯基乙醇, 10% 蔗糖), 冰浴研磨匀浆后在 12 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液保存于 -20 °C 冰箱中待用。生殖生长期, 取抽薹部位的全展叶及花蕾(长度 0.3~0.4 cm) 各 1 g, 其他同营养生长期酶液

- [3] 钮绪燕, 吴文君, 刘虎奇, 等. 虎耳草科植物杀菌活性的初步研究[J]. 西北农业大学学报, 1996, 5(2): 61-65.
- [4] 张秋海, 丁家欣, 张玲. 不同产地与采收季节虎耳草中原儿茶酸的含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(4): 30-31.
- [5] 张立石, 丁家欣, 张秋海, 等. 虎耳草提取物对大鼠成纤维细胞的抑制作用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(12): 920-922.