

酸浆的组织培养与植株再生

陈明波¹, 赵丽英², 尚富德^{1*}

(1. 河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475004; 2. 南阳师范学院 生物科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

摘要: 以酸浆的叶片、叶柄、茎段、子叶、胚轴、胚根为外植体进行离体培养, 结果表明: 叶柄为酸浆不定芽分化的最佳外植体类型; IAA 为诱导叶柄不定芽分化较适合的生长素类型; 不定芽分化的最佳培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA; 丛生芽增殖的最佳培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L IAA, 增殖系数达 5.0; 最优的生根培养基为 1/2 MS, 生根率达 91.7%.

关键词: 酸浆; 离体培养; 植株再生; 最佳外植体; 最佳培养基

中图分类号: Q943.1

文献标志码: A

文章编号: 1003-4978(2008)06-0613-05

Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Physalis alkekengi* L.

CHEN Ming-bo¹, ZHAO Li-ying², SHANG Fu-de^{1*}

(1. College of Life Science, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China;

2. School of Life Science & Technology, Nanyang Normal College, Henan Nanyang 473061, China)

Abstract: The leaves, petiole, stems, cotyledon, embryonic axis and radicle of *Physalis alkekengi* as explants were cultured *in vitro*. The results were as follows. For inducing adventitious buds, petiole was the optimal explant; IAA was the best growth hormone; and MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA was the most appropriate hormone mixture; MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L IAA was the most appropriate media for differentiation and multiplication of adventitious shoots; the optimum rooting medium was 1/2 MS, and its efficiency was 91.7%.

Key words: *Physalis alkekengi* L.; *in vitro* culture; plantlet regeneration; optimal explants; the best medium

酸浆(*Physalis alkekengi* L.)为茄科酸浆属多年生草本, 分布于欧亚大陆, 在我国产于甘肃、陕西、河南、湖北、四川、贵州、云南等地^[1]. 它是目前发现的少有的集观赏、食用、药用于一身的宝贵的野生植物资源^[2]. 在热带和亚热带地区, 酸浆作为一种常用药物被广泛用于治疗疟疾、哮喘、肝炎、皮炎、风湿等疾病; 其药用成分酸浆苦素具有免疫调节、抗肿瘤、抗菌、强心等生物活性^[3-6]. 被称为“红灯笼”的带宿萼果实具有极高的观赏价值, 且既可以生食, 也可加工成果汁、罐头、果酒等产品. 近年来, 酸浆已由野生状态走向人工种植, 其中东北一些地区已有大面积人工栽培. 酸浆一般采用种子繁殖, 但种子发芽率低, 且实生后代个体间药用有效成分和果实品质差异显著, 不利于新选育出的优良品种的推广. 目前, 关于酸浆的研究报道主要集中在其有效化学成分分析及药理研究方面^[7,8], 对其离体再生体系的研究目前还未见报道. 本文以酸浆的叶片、叶柄、茎段、子叶、胚轴、胚根为外植体, 对酸浆的离体培养条件进行了初步研究, 以期对酸浆的快速繁殖和优良野生资源的保护提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

采自河南省南阳市内乡县宝天曼国家级自然保护区的野生酸浆植株与种子.

收稿日期: 2007-12-29

基金项目: 河南省高校创新人才培养工程基金资助.

作者简介: 陈明波(1981-), 男, 河南平顶山人, 硕士研究生, 主要从事植物资源生态学研究.

* 通讯联系人, E-mail: fudeshang@henu.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 外植体的选取

选取酸浆的叶片、叶柄、茎段、子叶、胚轴、胚根为外植体。叶片取幼嫩叶片, 大小为 1.5 cm, 带叶柄; 茎段取健壮者为佳, 可留 1~2 片幼嫩小叶, 长 2 cm 左右; 子叶、胚轴、胚根在种子萌发 7 d 子叶已展开时取。

1.2.2 外植体消毒及切割

外植体选取后先在自来水下冲洗 20~30 min, 再用蒸馏水冲洗 2~3 遍, 然后用体积分数 70% 乙醇处理 30 s, 无菌水冲洗 2~3 遍, 随即转入 0.1% 升汞溶液。叶片、叶柄、茎段灭菌 5 min, 子叶、胚轴、胚根灭菌 3 min, 无菌水冲洗 5~6 遍, 无菌滤纸吸干水分备用。灭菌后, 叶片去除叶柄, 切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块; 叶柄切成 0.3~0.5 cm 的小段; 茎段去除叶片, 切成 0.3~0.5 cm 的小段; 子叶切成 0.2 cm×0.2 cm 的小块; 胚轴和胚根切成 0.3~0.5 cm 的小段。将切好的外植体接种于含有诱导培养基的三角瓶中。

1.2.3 培养基

幼芽的诱导以 MS 为基本培养基^[9,10], 添加不同种类 (IAA、NAA、2,4-D) 及浓度 (0.05、0.1、0.5、1.0 mg/L) 的生长素及 6-BA (2.0、3.0 mg/L); 幼芽的增殖以 MS 为基本培养基, 添加 6-BA (0.5、2.0、3.0 mg/L) 和 IAA (0、0.05、0.1 mg/L); 生根培养基分别以 MS、1/2 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 IAA 和 2,4-D (0、0.05、0.5 mg/L)。以上每个处理接种 40 个左右外植体, 重复 3 次。培养基中蔗糖浓度为 3% (1/2 MS 培养基减半), 琼脂浓度为 0.7%, pH 5.8, 于 121 °C 灭菌 20 min, IAA 过滤灭菌。

1.2.4 培养条件及试管苗移栽

培养室温度 (25±1) °C, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 12 h。当酸浆生根培养 25 d, 小苗高 4~5 cm, 叶色浓绿, 根长 2~3 cm 且发达粗壮时进行移栽。先将培养瓶盖打开, 注入少量清水淹没培养基表面, 在自然条件下炼苗 3~5 d, 洗净培养基移植于装有花卉营养土与蛭石 (体积比为 1:1) 的塑料盆中, 保持高湿环境, 观察小苗生长情况并统计试管苗成活率。

1.3 数据处理

不定芽分化率 = 分化不定芽外植体数 / 接种外植体数 × 100%, 增殖倍数 = 增殖芽数 / 接种外植体数, 生根率 = 生根幼芽数 / 接种幼芽数 × 100%。所有实验数据采用 SPSS 11.5 进行方差分析, Duncan 检测方法, 百分数在统计分析前均进行反正弦数据转化, 用 origin7.0 进行数据作图。

2 结果与分析

2.1 酸浆不同外植体的分化表现

表 1 结果表明: 叶片、叶柄、茎段、子叶、胚轴、胚根在 3 个不同处理的诱芽培养基中培养 20 d 后, 其芽的分化能力存在较大差异。在 D1 中, 各种类型外植体的分化率都较低, 这可能是由于单一植物生长物质不利于诱导分化。D2 培养基中, 叶柄、茎段和胚轴的不定芽诱导率较高, 分别为 52.5%、18.9% 和 16.1%。D3 中, 叶片、叶柄、茎段、胚轴都能诱导出不定芽, 但不定芽诱导率都未超过 30%。在 3 个处理中子叶切口处在接种后 10 d 左右开始膨大, 有少量愈伤组织形成, 随着培养时间的延长, 部分外植体开始褐化, 都未形成不定芽。在继代培养中发现, 子叶诱导出不定芽的时间至少在两个月以上且诱导率较低, 平均在 5% 以下。因此, 本研究初步认为子叶不适合作为酸浆组织培养的外植体。胚根由于过于细嫩, 升汞灭菌后在培养基中全部失水死亡。综合考虑以上各种因素, 叶柄为酸浆组织培养最佳外植体类型。

表 1 酸浆不同外植体在诱芽培养基上的分化率

Tab. 1 The differentiation rate of *P. alkekengi* explants in the media of induced shoots

培养基 编号	生长物质浓度 /(mg·L ⁻¹)		不同外植体的分化率/%					
	6-BA	IAA	叶片	叶柄	茎段	子叶	胚轴	胚根
D1	2.0	0	0 b	7.5 a	8.3 a	0 b	6.7 a	0 b
D2	2.0	0.05	10.5 c	52.5 a	18.9 b	0 d	16.1 b	0 d
D3	2.0	1.00	12.2 c	21.1 b	27.0 a	0 d	10.3 c	0 d

注: 表中不同小写字母表示同一处理内不同外植体分化率差异达显著水平 ($P < 0.05$), 以下类同。

2.2 不同种类生长素对酸浆叶柄不定芽分化的影响

以叶柄为外植体,当培养基中 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,同浓度而不同种类生长素处理的分化率为 IAA>NAA>2,4-D(图 1)。不同浓度生长素的处理中,IAA 和 NAA 浓度变化对分化率的影响表现出相同的效应,即随着 IAA、NAA 浓度的提高,分化率都呈现先升后降的趋势。二者浓度为 0.5 mg/L 时,分化率都达最高值,分别为 62.5%和 38.4%,但 NAA 诱导的不定芽白化率较高(图版 I A);当二者浓度大于 0.5 mg/L 时分化率都开始下降。2,4-D 处理分化出芽率最低,培养过程中在外植体切口处诱导出少量愈伤组织,同时有少量不定芽形成,但 4 个浓度梯度诱导率都在 20%以下。综合看来,IAA 是酸浆叶柄诱导不定芽分化较适宜的生长素类型,但用量过多时有抑制作用。

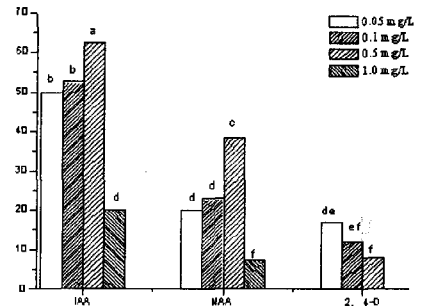


图 1 不同种类及浓度的生长素对酸浆叶柄不定芽分化率的影响

Fig. 1 Effects of different types and concentrations of auxins on differentiation rate of *P. alkekengi* petiole adventitious shoots

2.3 不同植物生长物质对比对酸浆叶柄不定芽分化率的影响

6-BA 与 IAA 的比例及其总量对酸浆叶柄不定芽分化率影响较大。由表 2 可知,不定芽分化率随二者比例的下降呈先升后降趋势,但二者总量不宜过高,否则抑制分化。由处理 N2 与 N6、N3 与 N7、N4 与 N8 的结果对比可知,在 IAA 浓度一定的条件下,较高浓度的 6-BA 不利于不定芽诱导率的提高。因此,二者总量比其比例对不定芽分化率影响更大。综合看来,以 N3 处理的分化率最高,达 62.5%(图版 I B)。因此,MS+2.0 mg/L 6-BA+ 0.50 mg/L IAA 是酸浆叶柄诱导不定芽分化的最佳培养基。

表 2 不同植物生长物质对比对酸浆叶柄不定芽分化率的影响

Tab. 2 Effects of different ratio of plant growth substances on differentiation rate of *P. alkekengi* petiole adventitious shoots

培养基 编号	植物生长物质浓度/(mg·L ⁻¹)		外植体数	诱芽外植体数	分化率/%
	6-BA	IAA			
N1	2.0	0	40	3	7.5 e
N2	2.0	0.05	40	21	52.5 b
N3	2.0	0.50	40	25	62.5 a
N4	2.0	1.00	35	7	20.0 d
N5	3.0	0	35	12	34.3 c
N6	3.0	0.05	39	15	38.5 c
N7	3.0	0.50	41	10	24.4 d
N8	3.0	1.00	40	4	10.0 e

2.4 酸浆叶柄不定芽的增殖培养

当幼芽长到 1.5~2.0 cm 时,从外植体上切下幼芽,接种于增殖培养基,3 周后统计出芽情况,结果见表 3。可以看出:在只加 6-BA 的培养基 H1、H2、H5 中,随着 6-BA 浓度的增加,芽的增殖倍数逐渐上升,但高浓度的 6-BA 对芽的增殖有抑制作用。在 6-BA 存在的情况下,加入低浓度的 IAA 有利于芽的增殖,但此增殖倍数的提高会被高浓度的 6-BA 所抑制。综合看来,在 H3 培养基上,幼芽增殖倍数最高达 5.0(图版 I C)。因此,酸浆最佳丛芽增殖培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L IAA。

表 3 不同培养基对酸浆叶柄丛生芽增殖的影响

Tab. 3 Effect of different media on multiplication of *P. alkekengi* petiole adventitious shoots

培养基 编号	植物生长物质浓度/(mg·L ⁻¹)		外植体数	增殖芽数	增殖倍数
	6-BA	IAA			
H1	0.5	0	40	56	1.4 d
H2	2.0	0	40	128	3.2 c
H3	2.0	0.05	40	200	5.0 a
H4	2.0	0.10	40	163	4.1 b
H5	3.0	0	40	105	2.6 c
H6	3.0	0.05	40	122	3.1 c
H7	3.0	0.10	40	115	2.9 c

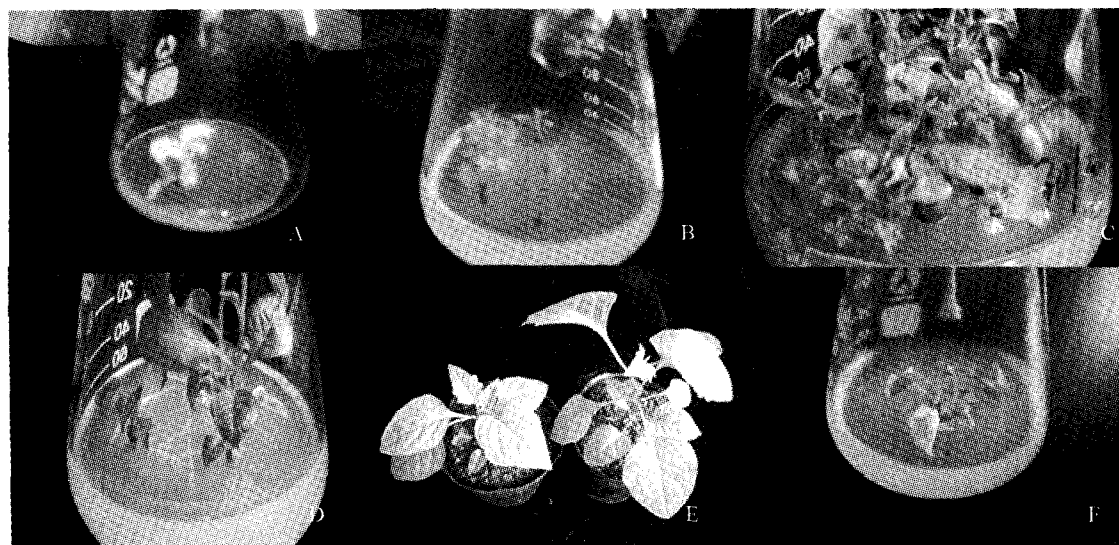
2.5 酸浆幼芽生根培养基的筛选与试管苗的移栽

当增殖的幼芽高度达到 1.5~2 cm 且带有 3~5 片小叶时,从基部切下幼芽接种于生根培养基, 3 周后统计生根情况. 由表 4 可知, 幼芽在不添加植物生长物质的 1/2 MS 培养基上生根率最高, 达 91.7% (图版 I D), 且根长最长, 平均在 2.0 cm 以上. 与不添加植物生长物质的 MS 培养基相比, IAA 和 2,4-D 都有利于试管苗生根, 其中以 IAA 的促进作用较明显, 但高浓度的 IAA 和 2,4-D 都抑制根的生成. 当生根培养 25 d, 小苗高 4~5 cm, 叶色浓绿, 根长 2~3 cm 且发达粗壮时, 进行移栽, 移栽成活率可达 90% 以上 (图版 I E).

表 4 不同培养基对酸浆幼芽生根的影响

Tab. 4 Effect of different media on inducing roots of *P. alkekengi* buds

培养基编号	基本培养基	IAA/ (mg · L ⁻¹)	2,4-D/ (mg · L ⁻¹)	接种幼芽数	生根幼芽数	生根率/%	平均根长/cm
R1	1/2 MS	0	0	36	33	91.7 a	2.0
R2	MS	0	0	36	12	33.3 d	1.0
R3	MS	0.05	0	36	22	61.1 b	1.0
R4	MS	0.50	0	36	18	50.0 bc	1.0
R5	MS	0	0.05	36	15	41.7 cd	0.5
R6	MS	0	0.50	36	6	16.7 e	0.2



A—NAA 诱导出的酸浆白化苗; B—酸浆叶柄在培养基 (MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA) 中诱导出的不定芽; C—酸浆增殖培养基 (MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L IAA) 中生长 3 周后形成的丛生芽; D—酸浆幼芽在 1/2 MS 生根培养基上生长 3 周后的幼苗; E—最佳生根培养基上生长 25 d 后移栽的酸浆幼苗; F—NAA 诱导的酸浆白化苗转移到 IAA 培养基中后变绿.

3 讨论

植物的不同器官, 由于其细胞结构和生理状态不同, 分化能力存在显著的差异. 一般来说, 与由成熟的及高度分化的细胞组成的器官相比, 分化程度较轻的细胞组成的器官具有较高的再生能力. 本研究结果表明, 在叶片、叶柄、茎段、子叶、胚轴、胚根 6 种外植体类型中, 由高度分化的细胞组成的叶柄具有较高的再分化率, 是酸浆不定芽发生的最佳外植体类型, 而非子叶、胚轴或胚根等通常情况下具有较强分生能力的器官. 这主要是由于子叶在培养中褐化较为严重, 而胚根细嫩, 对消毒剂敏感, 接种后失水严重, 因此降低了二者的分化率. 组织培养中的器官发生包括外植体直接分化形成器官的直接发生方式和外植体先脱分化形成愈伤组织再分化成器官的间接发生方式^[1], 器官间接发生方式需经愈伤组织阶段且培养周期较长, 试管苗变异率较高. 本实验中, 酸浆叶柄不定芽直接发生于外植体上, 未经愈伤组织阶段, 克服了由愈伤组织分化不定芽周期长且变异率高的缺陷.

在研究不同生长素对酸浆不定芽诱导的实验中, NAA 诱导的不定芽有白化苗出现. 白化苗是植物组织培养中常见的一种异常苗, 这种异常苗很难移栽成活, 是植物组织培养特别是花粉培养中很难克服的一个问

题. 引起植物产生白化苗的原因及影响因素很多,光照、温度以及培养基选择不当均可能诱发白化苗. 在组培苗白化机理的研究中,陈纯贤、孙敬三等指出核基因是控制花药培养力(包括绿苗率)的关键因素,质体DNA的缺失(可能也有线粒体的参与)是出现白化苗的直接原因,而在离体培养中高频发生的体细胞无性系变异很可能也是白化苗大量出现的原因之一^[12]. 在本实验中,NAA诱导出的不定芽白化率较高,但把白化苗在添加同浓度IAA的培养基中继代培养后,白化苗逐渐转绿(图版IF). NAA诱导产生的白化苗是否发生了核基因的变化及质体DNA的缺失,以及在含有IAA的培养基中继代培养后白化苗转绿过程中核基因及质体DNA是否发生了回复性变化还有待进一步深入研究.

本研究的结果表明,低盐的培养基有利于生根培养,这与一般植物生根培养时需要低盐浓度培养基的结论一致^[13,14].

参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志:第67卷[M]. 北京:科学出版社,1980.
- [2] 孙可群. 花卉及观赏树木栽培手册[M]. 北京:中国林业出版社,1988.
- [3] Chiang HC, Jaw SM, Chen PM. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells *in vitro* [J]. *Anticancer Res*, 1992 (12):1155-1164.
- [4] Chiang HC, Jaw SM, Chen CF, et al. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. [J]. *Anti-cancer Res*, 1992 (12):837-844.
- [5] Soares MB, Bellintani MC, Riberiro IM, et al. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2003, 459(1):107-112.
- [6] Eloi S Garcia, Daniele P Castro, Ivone M Ribeiro, et al. *Trypanosoma rangeli*: Effects of physalin B on the immune reactions of the infected larvae of *Rhodnius prolixus* [J]. *Experimental Parasitology*, 2006(112):37-43.
- [7] 赵倩, 邱莉, 卜光明, 等. 酸浆宿萼的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(3):151-155.
- [8] Soares MBP, Brustolim D, Santos LA, et al. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection [J]. *International Immunopharmacology*, 2006(6):408-414.
- [9] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 第2版. 北京:中国农业大学出版社, 2002.
- [10] 宋晓宏, 李景富. 毛酸浆的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3):488.
- [11] 肖尊安. 植物细胞全能性[J]. 生物学通报, 2006, 41(6):1-3.
- [12] 陈纯贤, 孙敬三. 花粉白化苗高频发生的遗传基础[J]. 植物学通报, 1997, 14(4):13-17.
- [13] 张金文, 范兴中, 王莹, 等. 辣椒离体培养及再生体系的研究[J]. 西北植物学报, 2006, 29(9):1893-1899.
- [14] 梁冰, 杨爱馥, 樊锐锋, 等. 矮牵牛组织培养技术研究[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(4):478-483.

责任编辑:康燕丽