

野生黄花白芨的组织快繁及分子鉴定

陶刚^{1,2}, 朱英^{1,3}, 刘作易^{1,4}, 毛堂芬³

(1. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵阳 550006; 2. 贵州省植物保护研究所, 贵阳 550006;
3. 贵州省生物技术研究, 贵阳 550006; 4. 贵州省农业科学院, 贵阳 550006)

摘要:对野生黄花白芨的种子进行组织快繁, 获得了苗质健康的组培苗; 同时从遗传本质上分析验证了它的分类地位和种类鉴定。

关键词: 黄花白芨; 组织培养; 系统发育分析

中图分类号: S 567.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-4705(2008)08-002-04

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Bletilla Ochracea*, which Identified by Phylogenetic Analysis

TAO Gang^{1,2}, ZHU Ying^{1,3}, LIU Zuo-yi^{1,4}, MAO Tang-fen³

(1. The Key Laboratory for Agri. Biotechnology of Guizhou, Guiyang 550006, China;
2. Guizhou Institute of Plant Protection, Guiyang 550006, China;
3. Guizhou. Institute of Biotechnology, Guiyang 550006, China;
4. Guizhou Academy of Agri. Sci, Guiyang 550006, China)

Abstract: We studied on the tissue culture and rapid propagation of *Bletilla ochracea* in the wild primarily, and succeeded in obtaining the healthy tissue culture seedlings. We also built up the phylogenetic tree of this sort of plant to confirm the taxonomic level by the sequences of rDNA, ie. ITS 1, ITS 2, and 5.8 S rDNA.

Key words: *Bletilla ochracea*; tissue culture; phylogenetic analysis

白芨属 (*Bletilla*) 又称白及属, 为兰科多年生草本植物。世界上现有白芨属植物 6 种, 分布于缅甸北部, 经我国至日本。国有 4 种, 分别为白芨 (*Bletilla striata*)、华北白芨 (*B. sinensis*)、小白芨 (*B. formosana*) 和黄花白芨 (*B. ochracea*)^[1]。在我国, 该属植物主要分布于冀、京、陕、甘、滇、苏、皖、浙、赣、闽、鄂、湘、川和黔等省^[2]。贵州境内白芨种类主要有 3 种即白芨 (*B. striata*)、黄花白芨 (*B. ochracea*) 和小白芨 (*B. formosana*)。白芨属的几个种均可作为中药材, 以干燥块茎药用, 具有收敛止血、清热利湿、消肿生肌之功效, 临床上广泛用于治疗咳血、吐血、外伤出血、疮疡肿毒、肺结核咳血、溃疡病出血等病症^[3], 具有很大的商品开发潜力。同时又可作为观赏花卉, 特别是黄花白芨 (*B. ochracea*), 其色鲜黄, 具有较高的观赏价值。

兰科植物的种子细小, 大多数都需要相关的共生菌共同作用才能萌发生长^[4], 所以在野生条件下成苗

率低, 白芨植物也是如此。近年来, 由于白芨植物的药用价值和观赏价值引起人们的关注, 野生白芨植物遭到过度采挖, 导致野生资源已经越来越少, 人工栽培分株繁殖的周期长, 繁殖率低, 不能满足市场需求和有效保护生态环境。组织培养在短期内可以大批量扩繁, 获得品质优良的群体。白芨植物中通过组织培养方法进行扩繁的研究并不多, 主要集中在白芨 (*B. striata*) 这一种类^[6-8], 而黄花白芨 (*B. ochracea*) 的组织培养研究^[9]是采用人工栽培和人工授粉的种子为实验材料。目前, 还没有利用野生条件下的黄花白芨自然授粉的种子进行组织培养研究的报道, 而且, 有的报道出现了一些该类植物的分类和命名错误和混乱^[8,10]。

因此, 本文选择野生条件下的黄花白芨自然授粉的种子作为实验材料进行组织快繁, 并利用该种植物的 rDNA ITS 区序列为依据, 从遗传本质上分析验证它的分类地位和种类鉴定。结果表明, 白芨组培繁殖速度快、成活率较高, 可以在短期内获得大量的无病毒种苗满足市场需求, 也能通过放养有利于白芨野生资源的保护, 为挽救保护野生植物资源提供一条有效的途径。同时, 本研究结果为进一步研究用于该类植物的组织快繁的基本培养基、植物激素的种类和配比以及

收稿日期: 2008-03-27

基金项目: 贵州省农业科学院重点专项 [院 2 × (2006) 018 号]; 贵州省基金 [黔科合 J 字 (2008) 2095 号]。

作者简介: 陶刚, 男, 在读博士研究生, 助理研究员, 研究方向: 真菌分子系统; E-mail: ttg729@sina.com。

通讯作者: 刘作易, 男, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: liuzuoyi@yahoo.com.cn。

不同原球茎的切割方式等对组织培养技术的优化和完善奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

白芨种子(材料编号:DYXB),采自贵州都匀境内原生地野生的自然授粉成熟未裂开的蒴果,用灭菌的脱脂棉轻轻包裹,装入灭菌的纸袋带回实验室于4℃保存备用,该种白芨花期开黄色花;用于提取DNA的材料来自组织快繁出的无菌小苗叶片。

1.2 方法

1.2.1 生芽增殖培养基:采用MS培养基为基本培养基,加入激素萘乙酸(NAA,0.5 mg/L)和碳源(白糖,3%)作为继代培养基和生根培养基。

1.2.2 材料消毒:将采集的成熟未裂开的蒴果先用75%的酒精表面消毒30 s,再用0.1%的升汞(HgCl₂)消毒10 min,无菌水冲洗5~6次,用无菌滤纸吸干表面水分,备用。

1.2.3 接种和培养:在无菌操作条件下,用消过毒的手术刀切开处理好的蒴果顶部,直接将种子抖落在培养基上,稍加摇动,使种子散布均匀,立即盖上瓶盖,放在培养室进行培养。培养温度为25~28℃,光照12 h/d,黑暗12 h/d,光照强度2 000~2 500 lx。

1.2.4 植物材料基因组DNA的提取:采用CTAB法提取:取1~2 g新鲜组培苗放在预冷且灭菌的研钵中,加入适量的液氮并研磨成灰白色粉末状,移至2.0 ml离心管中,加600 μl预热的CTAB裂解液,(CTAB 2%, Tris-HCl 100 mM, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, β-巯基乙醇 1%, PVP 1%, pH 8.0),充分混匀,65℃保温1 h,其间轻摇混匀几次;加等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),轻摇5 min,12 000 r/min离心10 min。取上清至另一离心管中,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),抽提10 min,12 000 r/min离心10 min,取上清至另一管中。再根据情况重复本次操作,直至在两相分层处无杂物,一般重复抽提1次即可。向抽提后的液相中加入0.1倍体积的KAc(5 M)混匀,再加入0.8~1倍体积的异丙醇混匀,于-20℃静置30 min以上;吸出DNA至1.5 ml离心管中,用70%乙醇洗涤2次,吹干后将其溶于适量的TE中,于-20℃保存备用。

1.2.5 植物材料ITS序列的PCR扩增及序列测定

采用通用引物ITS 1-ITS 4^[11]扩增ITS:反应体系为50 μl,其中:DNA模板约25 ng, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP 200 μmol/L, ITS 5、ITS 4 0.25 μmol/L, Taq DNA聚合酶 1.5 U, 10×PCR Buffer 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl, 0.01% gelatin。扩增反应程序:

95℃预变性3 min后进入循环,94℃ 60 s,54℃ 40 s,72℃ 60 s,进行35个循环,72℃ 10 min,进入8℃,反应结束,于4℃或-20℃保存备用。上述反应在BIO-RAD公司的PCR扩增仪中进行。

采用北京TIANGEN生物公司的纯化试剂盒进行琼脂凝胶的回收和PCR产物纯化,把纯化产物与T载体(pMD 18-T Vector, Takara)连接,并按照常规实验操作步骤转化到大肠杆菌DH 5α中,利用蓝白斑法筛选出阳性克隆,摇菌并送北京诺塞基因生物公司测序。

1.2.6 ITS序列分析及系统发育树的构建:本研究得到植物材料的ITS序列以及来自GenBank与这些种类相近似的ITS序列(表1)一起用于分子系统发育分析。通过Clustal-X 1.81^[12]软件包进行相似序列的比对,再运用BioEdit version 5.0.6 (Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695)对比对的结果进行手工校正,把上述处理的序列数据通过PAUP* 4.0 beta 10^[13]进行分子系统发育分析,构建系统发育树。

本研究通过N-J法(Neighbour-joining Analysis)建立系统发育树(N-J tree),通过1 000步重复获得的自展检验(Bootstrap)数值标记在分支上。

表1 用于系统发育分析的白芨属植物及相近属植物的rDNA ITS区序列

种名	登录号	种名	登录号
<i>Bletilla formosana</i>	EU 100761	<i>Coelogyne veitchii</i>	AF 302759
<i>Bletilla striata</i>	AF 461466	<i>Coelogyne rhabdlobulbon</i>	AF 281127
<i>Bletilla striata</i>	AF 273334	<i>Pleione bulbocodioides</i>	EU 100770
<i>Bletilla striata</i>	EU 100762	<i>Pleione grandiflora</i>	AF 461476
<i>Coelogyne multiflora</i>	AF 302758	<i>Pleione x confusa</i>	AF 461479
<i>Coelogyne dayana</i>	AF 281126	<i>Pleione formosana</i>	EU 100756

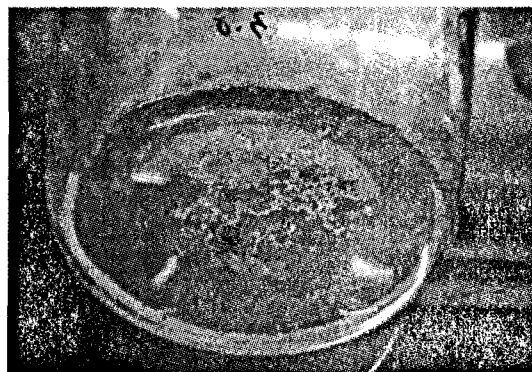


图1 播种后15天

2 结果与分析

2.1 由种子萌发和分化形成的无菌组培苗

取成熟种子播于组培基本培养基上进行培养,15天后种胚开始膨大,逐渐萌发形成绿色原球茎(图1),约60 d后,有80%的原球茎顶部出现幼叶。从原球茎

顶端产生叶原基突起,逐渐发育成幼叶(图2),最后形成完整植株;另一部分原球茎则继续长大、分化,它既可用于继代增殖和生根培养,又可以保存种质。

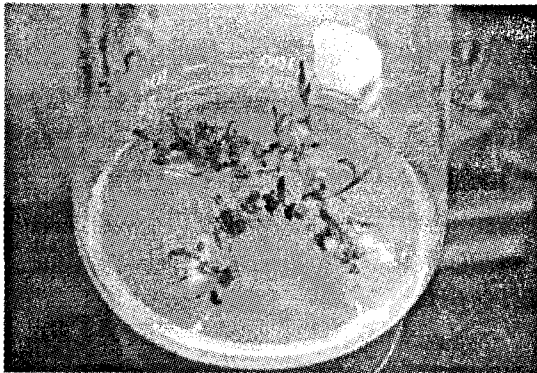


图2 播种后60天

2.2 无菌组培苗的生根培养

将原球茎或无根幼苗转接到生根培养基(基本培养基加入NAA和碳源)中,30 d左右即可长出3~6根幼根,在生根的同时,幼苗会不断地发育增高,叶片会增多且绿色会加深,最后能形成健壮的完整植株(图3)。生根的小组织苗可以进行炼苗和移栽到培养室外,并可逐步驯化进行野外栽培。



图3 组培苗在培养基中的生根培育

2.3 植物组培材料的ITS序列测定及系统发育树的构建

本实验测得的组培苗DYXB的ITS序列包括ITS1、ITS2和5.8S rDNA区段,大小为738 bp。上述序列与GenBank中已经发表的白芨属植物或与它们亲缘关系相近属(兰科植物)的序列一起,建立了一棵N-J树(图4)。

从构建的系统发育树可以看出,这棵树的拓扑结构中有3个分支,第1个分支为白芨属(*Bletilla*)的植物,选用的实验材料也被聚在这一类群中,第2个分支

为兰科植物中与白芨属有较近亲缘关系的一个属(*Coelogyne*),第3个分支则是兰科植物中与白芨属亲缘关系较远的一个属(*Pleione*)。它们分支的支持强度都很高(分别为93%、100%和96%),说明该树反映的这些种类的亲缘关系的拓扑结构是可靠的。从这棵树反映的兰科植物的进化关系层次上还可以看出,本文研究的组培苗材料应该属于白芨属中的不同于另外两种白芨(*B. striata*)和小白芨(*B. formosana*)的第3个种类。结合采样时初步的形态记录(具有鲜明兰科植物特征的黄色花);以及贵州省的白芨种类分布调查统计,可以确定我们获得的组培苗就是黄花白芨(*B. ochracea*)。

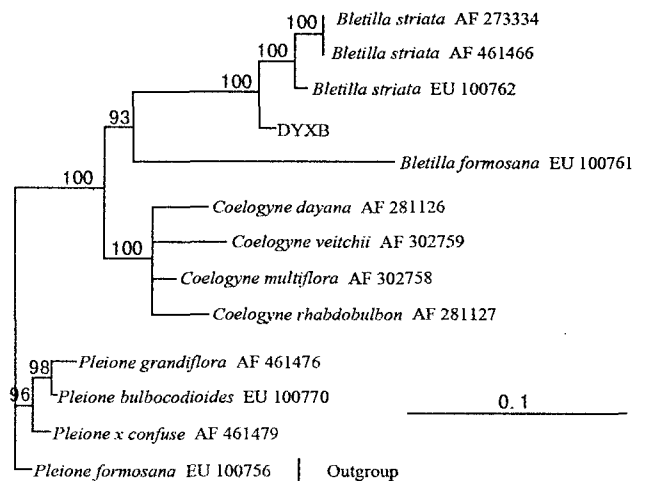


图4 根据ITS1-5.8S-ITS2序列构建的N-J树,显示组培白芨DYXB与相近种参考序列的系统发育关系。分支显示等于或大于75%的Bootstrap值。

3 讨论

组织快繁研究可获得健康的无菌组培苗,体现出较分株繁殖栽培具有更高效率和效果,为解决白芨野生资源的保护提供一条有效的途径。但本研究没有对培养基的组成、植物激素种类和配比、以及原球茎的转接方式等因素对组织快繁的效率和效果影响进行深入研究,这些因素的优化将会更加完善组织快繁的技术体系,这也是下一步深入研究的重点。

本研究的实验材料采自贵州的原产地,从形态特征上可以鉴别为兰科植物白芨属的种类,但无法确定它的具体种类,经作者调查,在贵州省这种白芨种类是白芨属中常见的一种,也是当地常用的中药材。但是,这些材料的分类地位和种类鉴定仍不清楚,也缺少可靠的分子鉴定的证据,也造成一些研究报道的错误命名和混乱,因而本研究结果只能为相关的研究提供一些借鉴。

(下转第29页)

期群体颖花数/抽穗期叶面积之比值、总实粒数/抽穗期群体叶面积之比值及产量/抽穗期叶面积之比值将与点播密度分别呈二次曲线递升。

3 从源库关系看高产栽培

水稻产量的高低主要决定于源、库、流三者的强弱及其协调程度^[10-13]。一般说来,叶片光合强度的增加,或者库对同化产物需求的增加,都能导致同化物从源到库转运速率的提高,即源、库的增加都会在一定程度上改善流的状况。但源或库单方面的过度增加不一定有利于流的畅通,即流的状况在很大程度上还受源库协调程度的影响。协调的源、库可以减小同化物运输过程中的阻力,提高同化物运输速度;反之,若源/库比过大,则会降低维管束通畅程度,增加同化物运输的阻力,减小同化物的运输速度。另一方面,流的畅通状况也会影响源和库的活性。若水稻同化物运输受阻,同化物大量积聚在叶片中,则会大大降低叶片的同化能力。“源库比”是衡量源库关系是否协调的一种量化表示方法,其中,“粒叶比”是最常用的指标。

结果表明:不同施氮量及氮肥运筹和点播密度极显著影响灌浆期群体叶面积、抽穗期群体颖花量、总实粒数及产量和粒叶比。因此适宜的施氮量、合理的氮肥运筹及点播密度必将调控抽穗期群体 LAI 在适宜范围内并延缓灌浆群体叶面积的衰减而保证灌浆期群体较大的光合叶面积、显著提高颖花量形成较高的粒/叶而增加库对光合物质需求,促进同化物质从源到库转动速率的提高,而形成“库大”、“源足”、“流畅”的高

产群体而实现高产。

参考文献:

- [1]江西婺源水稻旱种获得成功. 来源:中国农业信息网加入日期:2004-11-29.
- [2]水稻旱种技术. 来源:<http://www.myyxagri.gov.cn>.
- [3]水稻的旱种技术. 来源 <http://foodmate.net>.
- [4]叶永印,张时龙. 不同生育期施氮对水稻群体物质生产及分配的影响[J]. 山地农业生物学报,2001(6):1-6.
- [5]杨建昌,朱庆森,曹显祖,等. 水稻群体冠层结构与光合特性对产量形成作用的研究[J]. 中国农业科学,1992,25(4):7-14.
- [6]易杰忠,尹建义,刘芹,等. 氮肥运筹对不同覆盖物水稻旱管栽培产量形成的影响[J]. 贵州农业科学,2000,28(5):14-17.
- [7]王加成,赵新华,高得友,等. 覆膜旱管对水稻群体特征的影响[J]. 作物研究,2001(2):16-17.
- [8]曹显祖,朱庆森. 水稻品种的库源特征及其类型化分的研究[J]. 作物学报,1987,13(4):265-272.
- [9]松岛省三(虎诚译). 稻作理论和技术[M]. 北京:北京出版社,1973.
- [10]杨建昌,王志琴,朱庆森. 水稻产量源库关系的研究[M]. 江苏农业学报,1993,14(3):47-53.
- [11]张俊国. 不同粳稻品种源库关系的研究 II 不同栽培条件品种源库关系的变化[J]. 吉林农业科学,1991(2):8-14.
- [12]王丰,张国平,白朴. 水稻库源关系评价体系的研究进展与展望[J]. 中国水稻科学,2005,19(6):556-560.

(上接第24页)

参考文献:

- [1]中国植物志编委会. 中国植物志[M](第十八卷). 北京:科学出版社,1999:50.
- [2]冉懋雄. 现代中药栽培养殖与加工手册[M]. 北京:中国中医药出版社,1999.
- [3]国家药典委员会编. 中华人民共和国药典[M](第1部). 北京:化学工业出版社,2000:76-77.
- [4]Arditti J. Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot. Rev. 1967,3:1-4.
- [5]熊丽,吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与人规模生产[M]. 北京:化学工业出版社,2003:1-14.
- [6]彭丽丽,刘祥东,刘华,等. 白芨的组培快繁(简报)[J]. 中国野生植物资源,2004,23(5):65.
- [7]曾宋君,黄向力,陈之林,等. 白芨的无菌播种和组织培养研究[J]. 中药材,2004,27(9):625-627.
- [8]余朝秀,李枝林,王玉英. 野生白芨组培快繁技术研究[J].

西南农业大学学报:自然科学版,2005,27(5):601-604.

- [9]朱玉球,王雪根. 黄花白芨组培快繁技术[J]. 浙江林学院学报,1999,16(2):164-169.
- [10]田英翠,袁雄强. 白芨组织培养快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2006,4:75-77.
- [11]White T J, Bruns T D, Lee S B, Taylor J W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J (eds). PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Acad. Press. San Diego, C A. pp. 315-322.
- [12]Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The Clustal windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24:4 876-4 882.
- [13]Swofford D L. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.