

马齿苋植物的无性系及其植株再生体系

黄群策, 贾宏汝, 王红艳

(河南郑州大学离子束生物工程重点实验室, 450052)

摘 要: 试验研究了影响马齿苋组织培养的 3 大因素(外植体种类、激素种类和浓度、光照条件)所导致的生物学效应。研究结果表明, 在马齿苋愈伤组织的诱导过程中, 以幼嫩茎段为外植体比以幼嫩叶片为外植体可以获得更好的诱导效果, 由前者所诱导的愈伤组织表现出更快的生长速度。当以马齿苋叶片为材料, 以 C_1 培养基或 C_5 培养基进行培养时, 其愈伤组织的诱导率均可以达到 100%。光照条件对于愈伤组织的生长速度有一定的影响, 在光照条件下培养, 愈伤组织生长速度比较快, 其颜色为淡绿色; 在黑暗培养条件下培养, 愈伤组织生长速度缓慢, 其颜色为淡黄色。根据两种激素(6-BA 和 NAA)的不同含量, 配制 9 种分化培养基($D_1 \sim D_9$)。试验结果表明, 愈伤组织在 D_7 分化培养基($MS+6-BA 4.0mg/L+NAA 0.2mg/L$)上的分化效果最好, 其幼芽的分化率达到 87.5%。含有不同激素的培养基对于诱导马齿苋再生芽产生不定根有明显的影 响。在培养基中加入 IBA, 则对诱导马齿苋生根有明显的促进作用。根据这些初步的研究结果, 建立了一套简便易行的高效的马齿苋无性系诱导体系和植株再生体系。

关键词: 马齿苋植物; 无性系; 再生体系

中图分类号: S647.03.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)02-0142-04

自 20 世纪 90 年代以来, 全球许多有识之士不断地强烈倡导人们进一步提高环境意识, 提出全球可持续发展的战略思路并促使其进入实质性的实施阶段。全球可持续发展战略的主要特征是兴起绿色产业和绿色生产, 发展绿色产品和绿色技术, 建立绿色产业的贸易壁垒和绿色银行, 实施绿色标志制度和绿色管理制度, 盛行绿色营销市场和绿色包装设计, 倡导绿色消费和绿色审计, 启动绿色会计制度和绿色国民经济核算体系, 由此在全球范围内掀起了绿色经济的浪潮, 给国际社会中的各个领域带来了又一次变革, 利用现代生物技术进一步挖掘野生植物的潜在价值将有助于人类从根本上解决蔬菜食用安全问题^[1,2]。马齿苋是集食用性、药用性和饲用性为一体的新型经济植物, 其开发前景非常广阔。马齿苋科(*Portulacaceae*)是属于种子植物门(*Spermatophyta*)、被子植物亚门(*Angiospermae*)、双子叶植物纲(*Dicotyledoneae*)、石竹目(*Caryophyllales*)中的一个科, 其中大约包括 20 个属 580 物种, 它们广泛分布于全球各地,

但主要产于南美热带和亚洲。我国现有 2 个属 7 个物种, 在全国各地均有分布^[3]。目前对马齿苋科植物的研究还需要进一步深入, 其潜在的开发利用价值还有待于进一步挖掘和探索。从我国目前在这方面的研究现状来看, 首先值得注意的是, 人们对马齿苋植物的潜在价值尚未充分认识, 其重视程度还有待于进一步加强。马齿苋植物的种类繁多, 资源丰富, 并具有很高的利用价值和广阔的开发前景^[4]。

利用现代生物技术对野生植物进行有效的遗传改良将有助于挖掘其潜在的利用价值。随着植物生物技术的不断创新和完善, 植物细胞工程技术在植物遗传改良中的重要作用越来越明显。利用植物细胞工程技术获得植物离体培养的组织、细胞或原生质体, 这对于在细胞水平开展植物遗传改良和创造出优良基因型具有特殊意义。本项研究以马齿苋叶片为试验材料, 试图通过细胞工程技术建立马齿苋无性系及其植株再生体系, 旨在为进一步在离体水平上对马齿苋进行遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

在开展试验之前, 以野生马齿苋植株为基础经过 4 个世代的自交、筛选和纯化之后, 获得了遗传性相对稳定的后代株系。试验的材料采自生长良好的马

第一作者简介: 黄群策, 男, 1958 年生, 教授, 博士生导师, 河南省特聘教授, 研究方向为生殖发育生物学。

基金项目: 国家“863”项目, 项目编号: SZ-01-01-03。

收稿日期: 2006-10-20

齿苋顶端幼嫩叶片。

以 MS 为基本培养基(其蔗糖浓度和琼脂浓度分别为 3.0% 和 0.7%), 在其中分别加入不同种类和不同浓度的激素。培养基分装后在 121℃ 条件下进行 20min 湿热灭菌。

在试验中取马齿苋植株顶端的幼嫩叶片和幼嫩茎段为外植体, 首先用 75% 酒精进行表面消毒 1min, 用无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 10min, 随后用无菌水冲洗 5~6 次, 最后用无菌滤纸吸干水分并在无菌培养皿上将幼茎切成 1cm 左右的小段, 叶片切成 1cm² 左右的方块, 将其分别接种到含有不同激素配比的培养基上。在接种时将叶片的背面接触培养基。每瓶接种叶片数为 6~8 片, 每 1 种类的培养基重复 10~12 瓶。试验材料接种后在培养温度为 26±1℃ 条件下进行培养。在光照培养时所采用的光照培养时间为 12 h/d, 光照强度为 2 000~3 000 Lx。经过 21 d 培养后统计试验材料的愈伤组织诱导率。在无菌条件下将生长良好的愈伤组织切成小块, 分别转移到附加有不同激素成分的分化培养基上。经过 40 d 的培养之后统计愈伤组织分化率。随后, 将高度大约为 2cm 的不定芽分割成单芽, 将其接种于不同的生根培养基上诱导其生根。经过 15 d 培养后统计其生根状况。

2 试验结果与分析

2.1 试验材料脱分化诱导效果与试验条件的相关性

植物细胞工程的研究结果已经证实, 植物细胞全能性的表现和细胞脱分化的效果均与试验条件密切相关, 离开特定的试验条件则很难促使外植体完成植物细胞的脱分化作用, 进而难以获得愈伤组织。在试验的研究中发现, 马齿苋愈伤组织的诱导效果与外植体种类、培养基内的激素种类或浓度、培养时的光照条件有一定的相关性。

在试验中利用不同种类的马齿苋外植体获得了诱导愈伤组织的不同效果。以马齿苋的幼嫩茎段和幼嫩叶片为外植体, 分别将其接种到诱导愈伤组织的培养基 C₁ (见表 3) 上, 在光照条件下进行培养, 经过 3 周时间的培养后对其诱导效果进行观察鉴定。观察鉴定结果表明, 叶片在接种后经过 4 d 时间的培养, 其外观形态并没有发生明显的变化, 直到经过 7 d 时间的培养, 其外观形态开始发生卷曲, 在其叶柄的切口边缘处出现少量愈伤组织细胞团; 经过 14 d 的培养之后其叶片发生极度卷曲和膨大, 由此伴随着产生出比较多的愈伤组织; 经过 21 d 的培养之后其愈

伤组织快速生长, 几乎蔓延了整个叶片。以幼嫩叶片为外植体所诱导的愈伤组织呈现出淡绿色, 其质地比较致密, 生长速度比较缓慢。以幼嫩茎段为外植体经过 4 d 培养之后可以发现在其两端发生膨大并产生出少量愈伤组织细胞团; 经过 7 d 培养之后可以明显地看见由幼嫩茎段细胞所产生的愈伤组织; 经过 14 d 培养之后愈伤组织快速扩大; 在第 21 d 时, 愈伤组织大量出现, 但其颜色加深。马齿苋的幼嫩茎段为淡紫色, 由此所诱导的愈伤组织也略带微褐色, 其质地比较疏松, 生长速度相当快。由此可见, 以不同种类的马齿苋外植体为材料进行愈伤组织的诱导则其诱导效果存在着一定的差异, 以幼嫩茎段为外植体比以幼嫩叶片为外植体可以获得更好的诱导效果, 由前者所诱导的愈伤组织表现出更快的生长速度。

在试验中发现, 培养基中的激素种类和浓度对愈伤组织的诱导效果有明显的影响。在研究中以 MS 培养基为基础, 研究了两种激素(2,4-D 和 6-BA) 的特异性诱导效果。试验结果表明, 在 MS 培养基内单独附加 2,4-D 或 6-BA 对马齿苋叶片愈伤组织的诱导效果均不是很好。当在 MS 培养基内单独附加不同浓度的 2,4-D 时, 均不能诱导试验材料产生出愈伤组织(见表 1)。当在 MS 培养基内单独附加 6-BA 时, 可以诱导试验材料产生出少量愈伤组织, 但随着 6-BA 浓度的增大而其诱导愈伤组织的比率明显降低(见表 2)。然而, 当在 MS 培养基内 2,4-D 和 6-BA 以一定比例组合进行添加时, 可以诱导试验材料产生出大量的愈伤组织。当以马齿苋叶片为材料, 以 C₁ 培养基或 C₅ 培养基进行培养时, 其愈伤组织的诱导率均可以达到 100% (见表 3)。

表 1 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

培养基编号	2,4-D(mg · L ⁻¹)	接种数量	诱导数量	诱导率(%)
A ₁	0	60	0	0.00
A ₂	0.5	60	0	0.00
A ₃	1.0	60	0	0.00
A ₄	1.5	60	0	0.00
A ₅	2.0	60	0	0.00

注: 接种 21 d 后所统计的试验结果

表 2 不同浓度 6-BA 对愈伤组织诱导的影响

培养基编号	6-BA(mg · L ⁻¹)	接种数量	诱导数量	诱导率(%)
B ₁	0	60	0	0.00
B ₂	0.5	60	34	56.67
B ₃	1.0	60	28	46.67
B ₄	1.5	60	23	38.33
B ₅	2.0	60	21	35.00

注: 接种 21 d 后所统计的试验结果

对于以 C₁ 培养基和 C₅ 培养基进行培养试验的

材料在诱导愈伤组织的过程中所表现出的特异性进行仔细观察后发现,马齿苋叶片在这两种培养基上所产生的愈伤组织在外观形态上很相似。在接种后4 d 试验材料均没有表现出明显的形态变化。经过7 d 的培养之后其叶片开始发生卷曲,在其叶柄切口的边缘处出现少量愈伤组织细胞团。直到第14 d 时叶片发生极度卷曲和膨大,由此产生出比较多的愈伤组织。经过21 d 的培养之后,愈伤组织表现为快速生长,整个叶片的表面几乎全被愈伤组织所覆盖。

表3 不同浓度组合的2,4-D和6-BA对愈伤组织诱导的影响

培养基 编号	激素组合(mg·L ⁻¹)		接种数量	诱导数量	诱导率(%)
	2,4-D	6-BA			
C ₁	0.5	0.5	60	60	100.00
C ₂	0.5	1.0	60	38	63.33
C ₃	0.5	1.5	60	41	68.33
C ₄	0.5	2.0	60	38	63.33
C ₅	1.0	0.5	60	60	100.00
C ₆	1.0	1.0	60	38	63.33
C ₇	1.0	1.5	60	41	68.33
C ₈	1.0	2.0	60	36	60.00
C ₉	1.5	0.5	60	54	90.00
C ₁₀	1.5	1.0	60	45	75.00
C ₁₁	1.5	1.5	60	38	63.33
C ₁₂	1.5	2.0	60	41	68.33
C ₁₃	2.0	0.5	60	41	68.33
C ₁₄	2.0	1.0	60	49	81.67
C ₁₅	2.0	1.5	60	43	71.67
C ₁₆	2.0	2.0	60	46	76.67

注:接种21 d后所统计的试验结果

以经过21 d培养后的愈伤组织为材料,将其切成小块,分别利用相同的培养基进行继代培养。观察结果表明,经过1周时间的继代培养之后,两种愈伤组织表现出生长迅速,颜色鲜绿,质地稍致密等特征。经过2周时间的继代培养之后,两种愈伤组织则表现出生长缓慢的状态,其外观颜色开始褐化。从愈伤组织的诱导效果来看,这两种诱导愈伤组织的培养基并没有表现出显著的差异,但二者的区别在于在C₅中2,4-D的浓度比较高。根据前人的研究资料,在培养基内2,4-D浓度比较高时对于诱导愈伤组织芽的发生表现出明显的抑制作用,而且其抑制作用的后效性会持续比较长的时间。因此,在随后的试验中均采用C₁为诱导愈伤组织的培养基。

在对外植体进行培养的过程中发现,光照条件对愈伤组织的生长速度有一定的影响。在试验中将马齿苋叶片接种在诱导愈伤组织培养基C₁上,对试验材料分别进行光照培养和暗培养两种处理,经过3周

时间的培养后对其进行观察、鉴定和比较。研究结果表明,在光照条件下培养,愈伤组织生长比较快,其颜色为淡绿色。在黑暗培养条件下培养,愈伤组织生长缓慢,其颜色为淡黄色。由此推测,愈伤组织在光照条件下通过光的刺激作用而促使细胞内的前质体发生转化,进而形成叶绿体,叶绿体通过光合作用而产生光合产物,最终促进了愈伤组织的生长。当将在黑暗培养条件下已经培养过的愈伤组织转移到光照条件下继续培养时,愈伤组织的生长会明显加快,其颜色也逐渐由淡黄色转变为绿色。

2.2 试验材料再分化诱导效果与试验条件的相关性

前人的研究结果已证实,在植物体无性系的诱导和培养过程中试验条件的优化对于试验效果在很大程度上起着关键性作用。在该试验中,将在光照条件下生长良好的愈伤组织接种到具有不同激素组合的分化培养基上,试图诱导其再分化和植株再生。观察鉴定结果表明,愈伤组织被转入到不同的分化培养基上再经过一段时间的培养之后,其外观形态逐渐转变为3种类型。其一是愈伤组织呈现出暗绿色,结构致密,质地坚硬,在其表面上有瘤状突起,生长速度缓慢。其二是愈伤组织呈现出暗绿色,结构致密,质地坚硬,但在其表面上没有瘤状物突起,存在着一层白色粉末状结构,这种愈伤组织的生长速度也比较缓慢。其三是愈伤组织呈现出鲜绿色,结构稍疏松,在其表面上存在着瘤状物突起,这种愈伤组织的生长速度比较快。对试验材料在分化培养过程中的观察鉴定结果表明,愈伤组织的形态与其再分化能力有着一定的相关关系,第一类和第二类愈伤组织很难发生再分化,随着培养时间的延续而逐渐呈现出退化状态;第三类愈伤组织具有再分化的潜力,其分化的速度和效果在很大程度上决定于试验条件是否达到优化状态。

根据2种激素(6-BA和NAA)的不同含量,配制9种分化培养基(D₁~D₉),旨在研究愈伤组织的分化效果。试验结果表明,愈伤组织在D₇分化培养基上的分化效果最好,其分化率达到87.5%。在培养过程中发现,将质地结构比较疏松的愈伤组织转接到D₇培养基上再经过15 d培养之后,愈伤组织的体积明显增大,结构变得致密,在其表面形成比较大的凸起物,继而由此萌生出少量的丛生芽。然后,丛生芽不断扩大,最终密布于整块愈伤组织。刚萌生出来的幼芽,其整株颜色呈现暗红色,随着幼芽的不断长大,其幼叶逐渐转变为绿色。

含有不同激素的培养基对于诱导马齿苋再生芽产生不定根有明显的影 响。由马齿苋的愈伤组织所

产生的幼芽均不带有不定根,需要促使其产生不定根。将高度大约为 3cm 的不定芽分割成单芽,将其接种于不同的生根培养基上($E_1 \sim E_5$),经过 20 d 培养之后统计其生根率。统计结果表明,当在培养基中不加任何激素时,不能促使马齿苋的再生芽产生不定根。当在培养基内加入一定浓度的 NAA 时,对其不定根的产生表现出一定的促进作用,但生根速度比较慢且不定根的数量比较少。在培养基中加入 IBA,则对诱导马齿苋生根有明显的促进作用。随着 IBA 浓度的增大,对其诱导生根的效应更加明显。当 IBA 的浓度为 2.0mg/L 时,诱导生根的效果即高达 100%,平均每 1 株马齿苋再生芽基部可以生根 12 条以上。随着不定根的生长,小苗也迅速长高,叶片的颜色和形态也变得翠绿肥厚。再过 1 周的培养之后,可以将高度大约为 5cm 的再生苗进行移栽。在进行幼苗移栽时,先将培养瓶的瓶盖打开,在室温条件下练苗 3~5 d。然后,取出小苗,洗净根部的琼脂,将其种植于营养花卉土中,保持环境温暖湿润,按照此移栽方式其成活率可以达到 100%。

表 4 不同浓度组合的 6-BA 和 NAA
对诱导芽分化的影响

培养基 编号	激素组合(mg·L ⁻¹)		接种数量	分化数量	分化率(%)
	6-BA	NAA			
D ₁	2.0	0.2	40	7	17.5
D ₂	2.0	0.3	40	8	20.0
D ₃	2.0	0.4	40	6	14.3
D ₄	3.0	0.2	40	23	57.5
D ₅	3.0	0.3	40	18	45.0
D ₆	3.0	0.4	40	16	40.0
D ₇	4.0	0.2	40	35	87.5
D ₈	4.0	0.3	40	26	65.0
D ₉	4.0	0.4	40	23	57.5

表 5 不同激素对马齿苋再生芽生根的影响

培养基 编号	培养基 种类	激素种类及浓度 (mg·L ⁻¹)	蔗糖 (mg·L ⁻¹)	生根率(%)
E1	1/2MS	0	20	0
E2	1/2MS	NAA 0.5	20	26
E3	1/2MS	NAA 1.0	20	31
E4	1/2MS	IBA 1.0	20	93
E5	1/2MS	IBA 2.0	20	100

3 讨 论

20 世纪 70 年代不断完善的植物细胞工程技术为在细胞水平对植物体进行有效的遗传改良开辟了新途径。通过细胞的脱分化之后可以产生出大量的

愈伤组织和尚待进一步分化的薄壁细胞团,由此为植物基因工程的研究提供了良好的受体材料。自从 20 世纪 80 年代以来,关于水稻、普通小麦和玉米等主要农作物的细胞工程研究已经获得了突破性研究进展^[5,6]。然而,关于利用野生植物为研究材料开展细胞工程研究,进而对其进行遗传改良和建立其技术体系的文献报道并不多见。该研究立足于利用植物组织培养技术研究马齿苋植物在细胞水平的脱分化问题和再分化问题,旨在为马齿苋植物的遗传改良和以马齿苋无性系为转基因受体开展基因工程研究提供参考资料。试验比较详细地研究了影响马齿苋组织培养的 3 大因素(外植体种类、激素种类和浓度、光照条件)所导致的生物学效应研究结果表明,在马齿苋愈伤组织的诱导过程中,以幼嫩茎段为外植体比以幼嫩叶片为外植体可以获得更好的诱导效果,由前者所诱导的愈伤组织表现出更快的生长速度。当以马齿苋叶片为材料,以 C₁ 培养基或 C₅ 培养基进行培养时,其愈伤组织的诱导率均可以达到 100%。马齿苋叶片在这两种培养基上所产生的愈伤组织在外观形态上很相似。光照条件对于愈伤组织的生长速度有一定的影响,在光照条件下培养,愈伤组织生长速度比较快,其颜色为淡绿色;在黑暗培养条件下培养,愈伤组织生长速度缓慢,其颜色为淡黄色。根据两种激素(6-BA 和 NAA)的不同含量,配制 9 种分化培养基(D₁~D₉)。试验结果表明,愈伤组织在 D₇ 分化培养基(MS+6-BA 4.0mg/L+NAA 0.2mg/L)上的分化效果最好,其幼芽的分化率达到 87.5%。含有不同激素的培养基对于诱导马齿苋再生芽产生不定根有明显的促进作用。在培养基中加入 IBA,则对诱导马齿苋生根有明显的促进作用。根据这些初步的研究结果,建立了一套简便易行的高效的马齿苋无性系诱导体系和植株再生体系。

参考文献:

- [1] 赵霖. 21 世纪中国食品安全问题[J]. 中国食物与营养, 2001, (2): 5-6.
- [2] 季昆森. 发展生态农业是保证农产品安全的基础[J]. 环境保护, 2002, (5): 27-28.
- [3] 鲁德全. 中国高等植物[M]. 青岛: 青岛出版社, 2000.
- [4] 王红艳, 王松丽, 黄群策. 野生蔬菜马齿苋的研究进展[J]. 中国农学通报, 2004, 20(2): 31-33.
- [5] 孙敬三, 钱迎倩. 植物细胞学研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [6] 颜昌敬. 农作物组织培养[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.