

影响平贝母愈伤组织生长诸因素的研究

孙 丹, 朴炫春, 廉家盛, 廉美兰

(延边大学 农学院园艺系, 吉林 龙井 133400)

摘 要:研究了培养基种类、植物生长调节剂及光照条件对平贝母愈伤组织增殖及生长的影响。结果表明:在 MS 和 B_5 培养基中,愈伤组织鲜重达最高值,但干重和鳞茎数在 MS 培养基显著好于 B_5 培养基,White,LS 和 N_6 培养基不适合于平贝母愈伤组织的培养。通过研究植物生长调节剂对愈伤组织生长的影响,发现在 MS 培养基中附加 NAA 4.0 mg/L、NAA 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L 和 2,4-D 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L 的 3 个处理对愈伤组织生长效果较好。光照对愈伤组织增殖和生长有影响,在光暗交替培养条件下,愈伤组织增殖快,生长良好。

关键词:平贝母;组织培养;愈伤组织

中图分类号:S 567.23⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)04-0218-03

贝母为百合科(Liliaceae)贝母属(*Fritillaria* L.)植物,在我国已有 2 000 多年的药用历史,是重要的中药材。贝母按原产地不同,生药划分为浙贝母、川贝母、平贝母和伊贝母 4 种。其中平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)为我国东北长白山区特有的药用贝母,国家药典中记载的中药材,记载其药效与川贝母近似,味甘而补肺,治虚寒咳嗽,是目前国内四大药用商品贝母之一。

贝母以鳞茎进行无性繁殖和用种子进行有性繁殖,繁殖系数不高,地下鳞茎发育缓慢,生长周期长,需要 4~5 a 才能发育到商品鳞茎的大小。利用组织培养技术可提高繁殖系数,扩大栽培面积,具有较高的实用价值。目前贝母鳞茎组织培养方面有了很大进展,取得了一系列技术上研究成果,但对贝母愈伤组织生长的影响因素研究较少。因此,试验研究了影响平贝母愈伤组织增殖及生长的因素,为平贝母的大量快速繁殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

平贝母于 2005 年春季购自吉林省敦化市江源镇,选择生长健壮的 2 a 生新鲜平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)鳞茎,刮去鳞片上的栓皮,用中性洗涤剂将材料充分洗涤后,在自来水下反复冲洗 40 min 后,在超净工作台用 70%乙醇溶液快速漂洗 30 s,将其放入 2%的次氯酸钠溶液(加 2 滴吐温-80)中消毒 20 min,倒去消毒液,最后用无菌蒸馏水反复冲洗鳞茎 7~8 次。

在无菌条件下剥去外鳞片,并在双筒解剖镜下剥取茎尖(约 0.2 mm),接种于 2.5×10 (Φ×h)的试管中,并接入 MS+6-BA(6-苄基腺嘌呤)2 mg/L+NAA(萘乙酸)0.5 mg/L+糖 30 g/L+琼脂 7 g/L 的固体培养基中培养,pH 5.8。培养温度(25±2)℃,相对湿度 70%,利用日光灯将光照强度调为 1 600 lx,每天光照 16 h。初代培养后将形成的愈伤组织接种到 MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L 培养基中继代培养,pH 调至 5.8。培养温度(25±2)℃,相对湿度 70%,利用日光灯将光照强度调节为 1 600 lx,每天光照 16 h。以此获得大量试验用的愈伤组织,每隔 4 周继代 1 次,作为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基种类对平贝母愈伤组织生长的影响 以 White(White), Gambor et al(B_5), Murashige and Skoog (MS), Linsmaier-Skoog (LS) 和 N_6 为基本培养基,附加 BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L,pH 值 5.8;在 200 mL 柱状瓶中注入上述培养基各 50 mL,在温度 121℃,压力 $1.2 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的条件下高压灭菌 15 min,冷凝后,将无菌愈伤组织切成 1.0 g 左右后,接入培养瓶中(每瓶接入 2 块),每个处理设置 5 次重复,在温度(25±2)℃,相对湿度 70%,光照 1 600 lx,每天光照 16 h 的条件下培养,30 d 后进行愈伤组织生长情况的调查。

1.2.2 生长素 NAA 和 2,4-D 与细胞分裂素 BA 对平贝母愈伤组织生长的影响 所用培养基为 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L(pH 5.8),进行生长素 NAA 和 2,4-D 与细胞分裂素 6-BA 的配比试验,NAA 和 2,4-D 浓度分别设为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L,BA 浓度为 0、0.5

第一作者简介:孙丹(1983-),女,在读硕士,主要从事植物组织培养与生物技术方面的研究工作,E-mail: sundan227318@163.com。

通讯作者:廉美兰。

收稿日期:2007-12-14

mg/L,培养方法和培养条件同 1.2.1。

1.2.3 光暗条件对平贝母愈伤组织生长的影响 设置 4 种光暗条件的处理,分别为:①30 d 光培养(Light Culture,下面简称 LC);②前 15 d 光培养,后 15 d 暗培养(Light-Dark Culture,下面简称 LDC);③前 15 d 暗培养,后 15 d 光培养(Dark - Light Culture,下面简称 DLC);④30 d 暗培养(Dark Culture,下面简称 DC)。将外植体接种于 MS + NAA 4.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L(pH 值 5.8)的培养基后进行培养,其它培养方法和培养条件同 1.2.1。

1.2.4 数据分析 利用 SAS 程序对试验数据进行分析,采用邓肯氏新复极差法进行比较,显著水平 $P \leq 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 培养基种类对平贝母愈伤组织生长的影响

基本培养基是植物组织培养的重要基质,由于各种植物的遗传背景、生物学特征不同,因而对营养成分的需求也不同,选择合适的培养基至关重要。将平贝母愈伤组织接种于 White、B₅、MS、LS 和 N₆ 培养基中,培养 30 d 后发现,愈伤组织的鲜物重在 B₅ 和 MS 培养基中没有显著差异,分别达到 1 947.0 mg 和 2 109.8 mg,好于 White、LS 和 N₆ 3 种基本培养基,而干物重在 MS 培养基中也显示最大值为 205.9 mg,显著优于其它处理,且 B₅ 干物质含量仅为 7.3%,少于其它处理。

表 1 培养基种类对组培平贝母愈伤组织生长的影响

培养基种类	鲜物重/mg	干物重/mg	干物质含量/%
white	1 239.4 b	125.8 b	10.2
B ₅	1 947.0 ab	142.2 b	7.3
MS	2 109.8 a	205.9 a	9.8
LS	1 085.9 b	105.9 b	9.8
N ₆	1 320.3 b	135.3 b	10.2

注:同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平,下同。

由图 1 中可以看出:愈伤组织诱导出的鳞茎数在 MS 培养基中为最多(6.3),其次是 White 培养基(4.5),其它 3 种基本培养基没有显著差异。故平贝母愈伤组织生长选用 MS 培养基较适合。

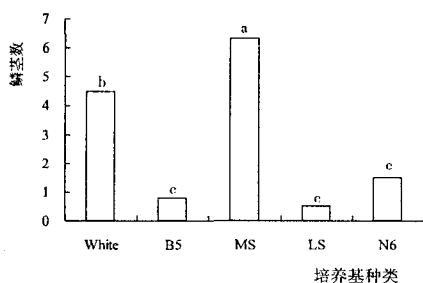


图 1 培养基种类对组培平贝母愈伤诱导鳞茎数的影响

2.2 生长素 NAA 和 2,4-D 与细胞分裂素 BA 对平贝母愈伤组织生长的影响

生长素 NAA 和 2,4-D 与细胞分裂素 BA 的配比试验结果见表 2。表 2 可以看出,愈伤组织鲜物重在单独使用 NAA 4.0 mg/L、NAA 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L 处理显著优于其它处理;而在不加 BA 时,NAA 4.0 mg/L 处理的干物重显著好于其它处理;加 BA 0.5 mg/L 时,除与 NAA 4.0 mg/L 混合使用时鲜物重最小(138.4 mg)外,其它处理没有显著性差异,而且此处理的干物质含量也最少。

表 2 生长素 NAA 与细胞分裂素 BA 对组培平贝母愈伤组织生长的影响

激素浓度/mg · L ⁻¹		鲜物重	干物重	干物质含量
NAA	BA	/mg	/mg	/%
0.5	0	1 549.4 c	181.3 bc	11.7
1.0	0	1 335.8 c	164.2 cd	12.3
2.0	0	1 354.0 c	140.6 d	10.4
3.0	0	1 803.6 b	164.1 cd	9.1
4.0	0	2 082.1 a	230.9 a	11.1
0.5	0.5	1 812.7 b	192.8 abc	10.6
1.0	0.5	1 789.2 b	211.8 ab	11.8
2.0	0.5	1 867.8 ab	192.0 abc	10.3
3.0	0.5	1 806.2 b	193.1 abc	10.7
4.0	0.5	1 401.8 c	138.4 d	9.9

表 3 生长素 2,4-D 与细胞分裂素 BA 对组培平贝母愈伤组织生长的影响

激素浓度/mg · L ⁻¹		鲜物重	干物重	干物质含量
2,4-D	BA	/mg	/mg	/%
0.5	0	1 565.2 cd	167.4 cd	10.7
1.0	0	1 358.8 e	141.8 de	10.4
2.0	0	1 605.7 cd	165.7 cd	10.3
3.0	0	1 483.8 de	149.2 de	10.1
4.0	0	1 979.8 b	194.2 b	9.8
0.5	0.5	1 464.4 de	141.7 de	9.7
1.0	0.5	1 665.6 c	176.3 bc	10.6
2.0	0.5	2 388.7 a	218.6 a	9.2
3.0	0.5	1 358.6 e	134.9 e	9.9
4.0	0.5	1 123.8 f	103.1 f	9.2

在表 3 中,2,4-D 2.0 mg/L 与 BA 0.5 mg/L 混合使用的处理在鲜物重(2 388.7 mg)和干物重(218.6 mg)上都显著好于其它处理,与 BA 混合使用时太高的 2,4-D 浓度抑制愈伤组织的生长。结果表明,NAA 4.0 mg/L、NAA 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L 和 2,4-D 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L 的 3 个处理对愈伤组织生长效果较好。

2.3 光暗条件对平贝母愈伤组织生长的影响

为了探明光暗条件对平贝母愈伤组织生长的影响,将接入愈伤组织的培养瓶放置在不同的光暗条件下进行培养,培养 30 d 后生长结果列于表 3 和图 2,在光暗混合培养的条件下的鲜物重和干物重显著好于单独光培养或暗培养的处理,是单独培养的 2 倍,干物质含量在

混合培养的条件下较高;愈伤组织诱导出的鳞茎数在光暗混合培养的条件下较多,达到 10 个以上,与 30 d 光培养(6.5 个)的没有差异,暗培养 30 d 诱导出的鳞茎数最少仅为 4.0 个。结果表明,在愈伤组织生长阶段将培养瓶放在光暗交替培养的条件下培养效果较好。

表 4 光暗条件对组培平贝母愈伤组织生长的影响

光照条件	鲜物重/mg	干物重/mg	干物质含量/%
LC	2 083.4 b	161.2 b	7.7
LDC	3 973.9 ab	364.8 a	9.2
DLC	4 245.1 a	394.5 a	9.3
DC	2 059.0 b	164.9 b	8.0

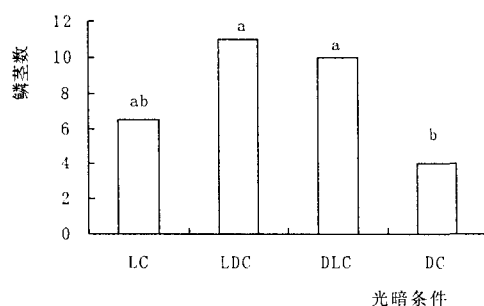


图 2 光暗条件对组培平贝母愈伤诱导鳞茎数的影响

3 讨论

培养物的成分及其供应状况直接关系到培养物生长与分化。在离体培养条件下,不同种植物的组织对营养有不同的要求,甚至同一种植物不同部分的组织对营

养的要求也不相同。不同的培养对象、阶段和目的,需要选择不同的基本培养基。

该试验最适宜培养基是 MS,可能是由于 MS 培养基无机盐浓度高,有加速植物生长的作用,能满足植物组织对矿物质营养的要求,尤其含有较高的铵态氮和硝态氮,贝母需要较高的氮素供应。

植物生长调节剂种类和浓度是影响植物组织培养最重要的因素。生长素促进愈伤组织的形成,细胞分裂素促进分化,其种类和浓度对植物的影响也较大,在平贝母愈伤组织生长中,NAA 4.0 mg/L、NAA 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L 和 2,4-D 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L 3 个处理对愈伤组织生长效果较好。

在植物组织培养中,光照是相当重要的环境因子,不仅影响细胞增殖和器官分化,而且对次生产物的形成有很大的影响,光暗混合培养有利于愈伤组织的生长,光照可促进鳞茎的形成。

参考文献

- [1] 杨继祥.药用植物栽培学[M].北京:农业出版社,1993.
- [2] 高山林,朱丹妮,蔡朝晖,等.暗紫贝母鳞茎器官培养生长特征和生物碱累积的研究[J].中国药科大学学报,1992,23(3):144-147.
- [3] 乔惠琳,麻秀芳,李灵玉.川贝母鳞茎室内生产研究初报[J].中药通报,1986,11(3):10-12.
- [4] 苏新,赵岚.浙贝母鳞茎的定向组培[J].植物生理学通讯,1990,26(5):19-21.
- [5] 张浩,陈泽彬,杨亮先.中华贝母幼茎培养及器官与体细胞胚的发生[J].华西医科大学学报,1995,26(1):33-37.
- [6] 周宝钧.平贝母鳞茎组织培养的研究[J].植物生理学通讯,1983,19(1):30-32.

Study on Several Factors Affecting Callus Growth of *Fritillaria ussuriensis* Maxim

SUN Dan, PIAO Xuan-chun, LIAN Jia-sheng, LIAN Mei-lan

(Department of Horticulture, Agriculture College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China)

Abstract: The effect of culture medium types, plant growth regulators, and light conditions on callus proliferation and growth of *Fritillaria ussuriensis* Maxim in vitro was investigated. The results showed that optimum callus fresh weight was obtained in the both medium of MS and B₅, however, optimal dry weight and number of bulb was found in MS medium; White, LS and N6 medium were not suitable for callus growth. Callus growth was vigorous in the medium of MS+NAA 4.0 mg/L, NAA 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L and 2,4-D 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L. Also, light affected callus growth, alternation of light and darkness promoted callus growth.

Key words: *Fritillaria ussuriensis* Maxim; Tissue culture; Callus