

明党参组织培养研究

胡方方, 李宗芸*, 黄淑峰 (徐州师范大学生命科学学院细胞与分子生物学研究所, 江苏徐州 221116)

摘要 采用正交设计方法, 研究了 NAA、6-BA、MS 培养基对明党参叶片与叶柄愈伤组织诱导的影响。结果表明, 叶片和叶柄都可以诱导出愈伤组织, 但叶片较叶柄更易诱导出愈伤组织; 在不同激素配比的培养基中, 以 1/2 MS + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 的培养基激素组合对明党参愈伤组织诱导效果较好。

关键词 明党参; 愈伤组织; 正交设计; 叶

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)08-02232-02

Study on Tissue Culture of *Changium smyrnioides* Wolff Leaf

HU Fang-fang et al (Institute of Cellular and Molecular Biology, School of Life Science, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116)

Abstract Effects of NAA, 6-BA, MS culture medium on leaf and petiole callus induction of *Changium smyrnioides* Wolff were studied by orthogonal design. The results showed that leaf and petiole could induce callus, and leaf was easier to induce callus than petiole. The optimal medium for callus induction was 1/2 MS + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L.

Key words *Changium smyrnioides* Wolff; Callus; Orthogonal design; Leaf

明党参(*Changium smyrnioides*)是我国特有的单种属多年生草本植物。在伞形科系统分类中, 它隶属于芹亚科(Apioideae Drude)美味芹族(*Smyrnieae* Koch)明党参属(*Changium smyrnioides* H Wolff)^[1], 分布于湿润亚热带地区的长江流域东、中部^[2], 具有“补气生津, 润肺化痰, 平肝和胃, 消肿解毒”的功效, 是我国著名的特产药用植物之一。近年来, 由于人为因素及其自身的生物学特性, 其野生资源破坏严重, 分布范围和数量日益减少, 是我国重点保护的珍稀濒危药用植物之一^[3]。组织培养可以在短期内繁殖出大量种苗, 从而加速新品种的培育和种质资源的保存, 并能够直接获取药用部分^[4]。笔者以明党参的叶片和叶柄为外植体, 采用正交试验设计方法, 探讨明党参愈伤组织诱导的最佳培养基, 旨在为明党参野生资源保护、育种以及明党参药用成分的组织培养工业化开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 明党参植株于 2005 年 11 月采自江苏省句容市红山明党参种植基地, 带土移栽到江苏省药用植物生物技术重点实验室花盆中, 在室温下培养。

1.2 方法

1.2.1 取材、消毒和接种。 分别于 2006 年 2 月和 4 月生长旺盛期截取明党参展开的幼嫩叶片以及新鲜幼嫩叶柄, 流水清洗若干小时后沥干备用。在超净工作台上, 用浓度 75% 酒精将外植体浸泡 30 s, 无菌水冲 1~2 次, 用浓度 0.1% 升汞(加少量吐温 80)浸泡 6~10 min, 用无菌水冲洗 5 次, 用无菌滤纸吸干外表的水分。将叶柄切成 0.5~1 cm 长的切段, 叶片切成约 0.5 cm² 大小, 接种于培养基上进行培养。

1.2.2 培养基及培养条件。 以 MS 为基本培养基, 附加 3% 蔗糖, 0.8% 琼脂, pH 值为 5.8, 121℃, 0.15 MPa 灭菌 20 min。培养温度为 25℃±2℃, 暗培养。

1.2.3 试验设计。 试验采用 L₈(2⁷) 正交表; 运用正交设计助手 II v 3.1 (共享版) 软件进行设计, 共 4 种因素, 包括 2 种植物生长调节剂, NAA (奈乙酸) 和 6-BA (6-苄基腺嘌呤), 分

别设 1 和 2 mg/L 2 个浓度, 培养基为 MS 和 1/2MS 培养基, 外植体为叶柄和叶片, 共有 8 组实验。因子水平安排见表 1。

水平	植物生长物质/mg/L		MS 培养基	D(外植体)
	A(NAA)	B(6-BA)		
1	1	1	1/2	1(叶柄)
2	2	2	1	2(叶片)

1.2.5 结果统计。 每组接种 20 瓶, 每瓶接种 5~7 块外植体, 定期观察外植体的生长状况, 接种 24 d 后, 统计愈伤组织诱导率并进行直观分析, 愈伤组织的诱导率指产生愈伤组织的外植体块数占接种总块数的百分率。同时观察并记录愈伤组织生长状况, 用数码相机拍照记录。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织形态学观察与分析 明党参的叶柄和叶片接种于附加不同植物生长调节剂的 MS 或 1/2 MS 培养基上, 8~9 d 左右, 在切口处可见淡黄绿色或乳白色的愈伤组织, 观察记录了明党参外植体生长 14 和 24 d 愈伤组织的形态学特征。

外植体生长 14 d 形态变化: 叶片纵向膨胀变大, 由原来的绿色变为黄绿色或者浅紫红色(图 1)。叶柄的变化出现 2 种情况, 一是叶柄膨胀变粗较明显, 由原来的浅绿色变为雪白的颜色(图 2), 后期生成愈伤组织; 二是叶柄切口处直接生成愈伤组织, 为浅黄绿色或淡绿色, 半透明(图 3)。

外植体生长 24 d 形态变化: 膨胀变大的叶片有半透明淡绿色或不透明白色的愈伤组织生成, 叶柄切口处的愈伤组织变大(图 4)。叶柄两端切口处长出的愈伤组织呈不对称哑铃状(图 5), 表现出一定的极性, 其形态学下部的生长量大于形态学上部的生长量。

2 种外植体形成的愈伤组织从形态、质地上均可分为 3 种类型: 类型 1 为黄绿色、质地紧密的愈伤组织, 用解剖刀才能剥离(图 6); 类型 2 为浅绿色近乎白色的愈伤组织, 质地较为疏松(图 7); 类型 3 为浅黄色、质地疏松的愈伤组织(图 8)。

叶片诱导的愈伤组织从初代培养到继代培养质地都比较紧密, 叶柄诱导的愈伤组织初代培养阶段较为疏松。随着继代和培养时间的延长, 愈伤组织逐渐紧密, 同时, 发现浅

基金项目 江苏省药用植物生物技术重点实验室项目(KJS03077)。

作者简介 胡方方(1981-), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物遗传学。* 通讯作者。

收稿日期 2006-12-18

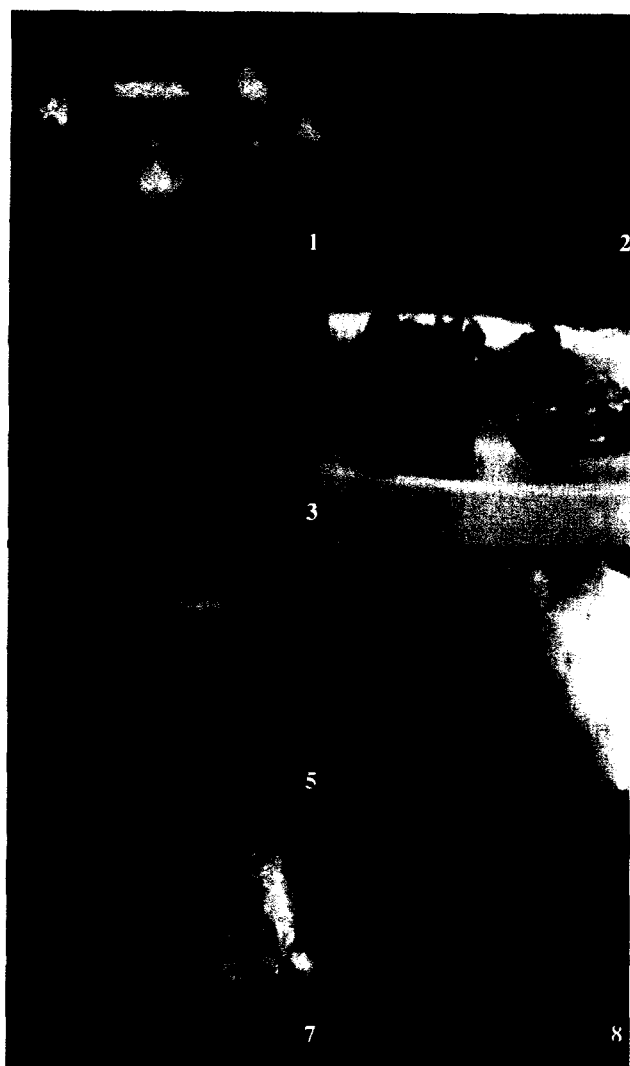


图 1~3 为初代培养 14 d 愈伤组织形态,1 为叶片,2 为叶柄(膨胀生长),3 为叶柄(伤口出现愈伤组织);图 4~5 为初代培养 24 d 愈伤组织的形态,4 为叶片,5 为叶柄(极性生长);图 6~8 为 3 种不同类型的愈伤组织,6 为质地紧密型,7 为浅绿色质地疏松型,8 为浅黄色质地疏松型。

图 1~8 明党参叶柄和叶片所产生愈伤组织的形态

黄色愈伤组织表面有时会有黄绿色或白色紧密愈伤组织生成。

2.2 浓度和取材部位对愈伤组织诱导率的影响

2.2.1 浓度对愈伤组织诱导率的影响。由表 2 可以看出,在附加不同浓度 NAA/6-BA 组合的 MS 或 1/2 MS 培养基上叶片与叶柄都能高频率诱导出愈伤组织。

极差 $RD > RA > RC > RB$, 因此,影响愈伤组织诱导的因素主次顺序为: $D > A > C > B$, 即外植体 $> NAA > MS > 6-BA$ 。各因素的最优水平分别为: A_1, B_2, C_1, D_2 , 即: 1.0 mg/L 的 NAA, 2.0 mg/L 的 6-BA, 1/2MS 培养基, 叶片为外植体。因此,以叶片为外植体对明党参愈伤组织的诱导影响最大,细胞分裂素 6-BA 对明党参愈伤组织的诱导影响最小。

2.2.2 取材部位对愈伤组织诱导率的影响。由图 9 可以看出,在这 8 组试验中,叶片诱导愈伤组织的百分率都高于叶柄的百分率。初代培养 24 d 后,2 种外植体诱导愈伤组织的

表 2 愈伤组织诱导率的结果与直观分析

处理组	植物生长调节剂//mg/L		C (培养基)	D (外植体)	诱导率 %
	A(NAA)	B(6-BA)			
1	1	1	1/2	1(叶柄)	95.74
2	1	1	1	2(叶片)	98
3	1	2	1/2	2	94.55
4	1	2	1	1	69.81
5	2	1	1/2	2	82.05
6	2	1	1	1	52.38
7	2	2	1/2	1	64.44
8	2	2	1	2	100
均值 1	89.525	82.043	84.195	70.593	656.97
均值 2	74.718	82.200	80.047	93.650	
极差	14.807	0.157	4.148	23.057	

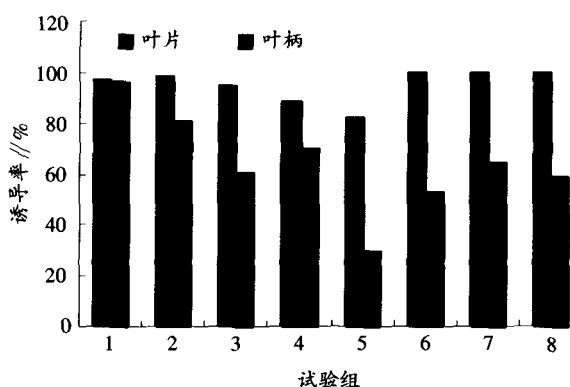


图 9 明党参叶片和叶柄诱导愈伤组织百分率

平均百分率分析表明:以叶柄为外植体诱导愈伤组织的百分率平均为 71.0%,并且大多数愈伤组织生长旺盛,呈浅黄绿色,质地相对疏松,存在个别色泽发暗的愈伤组织;以叶片为外植体诱导愈伤组织的百分率平均为 93.7%,愈伤组织呈黄绿色,生长旺盛,质地较紧密。因此,以叶片为外植体较以叶柄为外植体诱导愈伤组织更理想,培养基激素组合为 1/2MS + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 较容易诱导愈伤组织。

3 结论与讨论

利用明党参的叶片及叶柄可诱导出愈伤组织,并且这 2 种外植体都具有较高的愈伤组织诱导率,最高可达 100%,同时这些愈伤组织可以继续分化生长。说明明党参的叶片及叶柄可以诱导出能够分化生长的愈伤组织,这对于明党参的育种及物种保护具有十分重要的意义。在很多植物愈伤组织的生长过程中存在着极性生长的现象,如荞麦^[9]、普通荞麦^[10]等,在明党参叶柄诱导愈伤组织的生长过程中也发现极性生长的现象。

参考文献

- [1] 单人骅,余孟兰.中国植物志[M].北京:科学出版社,1979.
- [2] 程翔,黄致远,宗世贤.珍稀中药材明党参生态地理分布、利用与保护[J].中国中药杂志,1993,18(6):327-329.
- [3] 国家环保局,中国科学院植物研究所.稀有濒危植物的保护和研究[M].北京:环境科学出版社,1991:187-188.
- [4] 袁红霞,王金虎,陈德燕,何首乌块根愈伤组织培养[J].苏州大学学报:自然科学版,2005,22(3):86-88.
- [5] 侯建华,耿庆汉.荞麦愈伤组织培养及分化研究[J].内蒙古农牧学院学报,1995,16(3):21-25.
- [6] 王爱国,张以忠,任翠娟,等.普通荞麦愈伤组织诱导及其分化的正交设计试验研究[J].种子,2006,25(1):7-13.