

曼陀罗茎段愈伤组织诱导和再生植株的研究

黄静¹ 赵琦¹ 赵玉锦² 李楠¹ 张世煌²

(¹首都师范大学生命科学院,北京 100037;²中国农业科学院作物科学研究所玉米研究中心,北京 100081)

摘要: 本试验以曼陀罗茎段为外植体,在附加不同植物激素组合的培养基中对愈伤组织的诱导和植株再生进行研究。结果表明:采用修改的 MS 培养基(除去甘氨酸,维生素 B1 含量增加至 0.5mg/L,pH 5.5)附加 2mg/L 2,4-D 可由曼陀罗茎段诱导大量胚性愈伤组织;愈伤组织继代选用 0.5mg/L 2,4-D 为宜;不定芽的诱导采用 MS 培养基(20g 蔗糖,8g 琼脂,0.1g 水解干酪素)+6-BA(0.5mg/L);幼苗进一步转接至 1/2MS+IBA(0.2mg/L)生根培养基中,可完成曼陀罗茎段愈伤组织诱导和再生植株的组织培养过程。

关键词: 曼陀罗 愈伤组织 诱导 组织培养

Research on Inducing Callus from *Datura metel* L.Stem and Plantlet Regeneration

Huang Jing¹ Zhao Qi¹ Zhao Yujin² Li Nan¹ Zhang Shihuang²

(¹College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037; ²Maize Research Center Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The callus induction and plantlet regeneration were researched on the different plant hormone combination media with *Datura metel* L.stem as explants. The results showed as below: *Datura metel* L.callus were induced on the modified MS containing vitamin B1 0.5mg/L and 2,4-D 2mg/L without glycine, pH 5.5. The *Datura metel* L.callus were subcultured on the modified MS containing 2,4-D 0.5mg/L. The plantlet regeneration were performed on the MS medium containing sucrose 20g, hydrolyze casein 0.1g and 0.5mg/L 6-BA. 1/2MS medium containing 0.2mg/L IBA was suitable for root growth.

Key words: *Datura metel* L. Callus induction Plantlet Regeneration

近年来,原生质体融合技术、遗传转化与再生技术、分子标记与基因克隆等生物技术都取得了广泛深入的发展,而这些技术的应用都需要以组织培养为基础。曼陀罗(*Datura metel* L.)是茄科曼陀罗属 1 年生草本植物(别名洋金花、闹羊经、喇叭花、山茄子等),原产热带,是一种常见的药用植物,有祛风除湿,止喘定痛的作用,具有很高的实用价值;同时也因其花朵大而美丽,常作为观赏植物^[1]。目前有关曼陀罗组织培养的研究较少,为数不多的研究多集中在上世纪 80 年代的关于曼陀罗愈伤组织分化及悬浮细胞再生等方面^[2-4],国内仅有蔡起贵等进行由曼陀罗愈伤组织制备原生质体并再生植株的报道^[5]。借鉴前人的研究结果,并在此基础上进行了改进和摸索,完成了由室外曼陀罗植株茎段诱导愈伤组织并最终再生无菌苗植株的过程,并对各个生长阶段所用的培养基及激素配比进行了比较,为以曼陀罗为材料的遗传转化、体细胞杂交等生物技术方面的研究奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

茄科植物曼陀罗(*Datura metel* L.),取自中科院植物所百草园。

收稿日期:2007-03-19

作者简介:黄静(1982-),女,汉族,北京人,在读硕士生,研究方向:航天生物学

通讯作者:赵琦,女,教授,E-mail:zhaoci@mail.cnu.edu.cn

1.2 曼陀罗茎段愈伤组织诱导

取 7~8 叶期曼陀罗植株,用小刷子在洗涤剂中洗刷,自来水冲洗,去掉叶片。从其嫩枝上剪取 1~2cm 长茎段作为外植体,晾干水分后将茎段浸泡在 0.1% 升汞中消毒 4~5min(不时用玻棒搅动以充分杀菌),用无菌水冲洗 3~4 次,然后将带芽茎段基部切成斜面,插入已灭菌的诱导培养基中,每瓶接种 3~4 个茎段。培养条件为:28℃±1℃,光强 2 000lx,光照时间 16h/d。

1.3 愈伤组织筛选及继代繁殖

挑选绿色、胚性愈伤组织予以继代。前两次继代周期为 30d,一段时间后曼陀罗愈伤组织生长迅速,缩短继代周期为 20d。培养条件同上。

1.4 愈伤组织分化出苗

将生长到 2~3mm 的绿色、胚性愈伤组织转入分化培养基中,每瓶接种愈伤组织 4~5 块,培养条件同上。

1.5 生根壮苗培养

待小苗生长至 2cm 左右,将小苗转移到生根培养基上诱导生根,培养条件同上。

表 1 试验所用各培养基成分 (mg/L)

培养基类型	培养基成分
诱导培养基	修改的 MS (除去甘氨酸, 维生素 B1 含量增加至 0.5mg/L) + 2,4-D (2mg/L), pH5.5
继代培养基	修改的 MS (同上) + 2,4-D (0.5mg/L), pH5
分化培养基	修改的 MS (蔗糖 20g, 琼脂 8g, 水解干酪素 0.1g) + 6-BA (0.5mg/L), pH5.7
生根培养基	1/2 MS+ IBA (0.2mg/L), pH5.7

2 结果与分析

2.1 外植体消毒时间的筛选

本试验用 0.1% 的升汞作为表面消毒剂,对曼陀罗茎段进行了不同消毒时间的处理。第一批试验材料,由于消毒时间过长(7~8 min),接种到培养基中的茎段第 2d 全部变为白色,表明曼陀罗茎段死亡。因曼陀罗茎段较幼嫩,后面试验中减少消毒时间为 4~5min,最初接种在培养基中的茎段为绿色,培养 1d 后颜色保持不变,部分茎段颜色稍微变浅,效果较好。由于升汞渗透力强,往往会影响到愈伤组织的诱导,因此用幼嫩组织做外植体诱导愈伤组织应尽量避免使用,可以次氯酸钠替代。

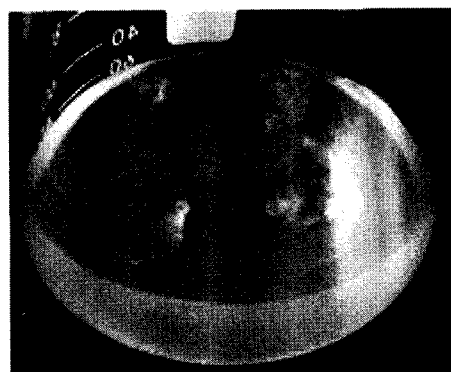
2.2 曼陀罗愈伤组织的诱导及筛选

本试验选择附加不同浓度的 2,4-D 对曼陀罗愈伤组织诱导率进行了比较。试验结果表明在修改的 MS 培养基中附加 0.5mg/L 的 2,4-D 并未诱导出曼陀罗茎段愈伤组织;而当 2,4-D 的浓度增加到 2mg/L 时,培养两周左右在曼陀罗茎段芽点处观察到愈伤组织的形成,这与前人的试验结果相同^[2]。本研究的试验结果表明 2,4-D 浓度在一定范围时(10⁻⁶M 左右)能够较好的诱导愈伤,浓度大或小都会抑制愈伤组织的形成。

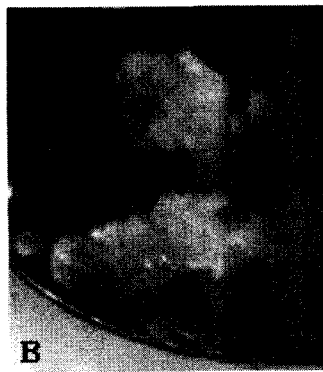
新诱导出的曼陀罗茎段愈伤组织为淡黄色,结构较为紧密,生长速度较快(图 1-A)。一段时间后,愈伤组织质地和性状开始出现明显差异,需要在继代时进行筛选。由于曼陀罗愈伤组织生长速度较快,因此本试验在继代培养基中降低了 2,4-D 的浓度为 0.5mg/L,继代过程中有的愈伤组织生长良好,淡黄色或浅绿色,结构较致密;而部分愈伤组织出现结构疏松、变白、水浸状等现象(图 1-B)。每次继代时需挑选淡绿色,结构紧密的愈伤组织,将其分成黄豆大小的组织块转入新鲜培养基中。继代 4~5 次后,愈伤组织生长相对稳定,即每次在淡绿色的周围生长出新的白色愈伤组织(图 1-C),可用于后续原生质体制备试验。

2.3 曼陀罗愈伤组织分化出苗

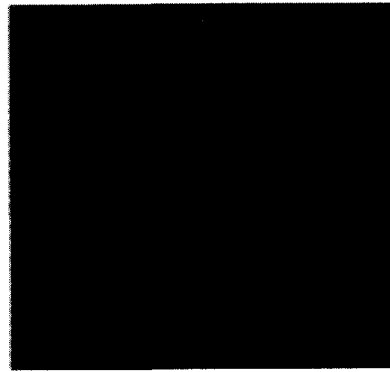
2.3.1 不同激素水平对曼陀罗愈伤组织分化出苗的影响 本试验选择 5 种不同激素水平的培养基 (①6-



A: 绿色、紧实的茎段愈伤组织



B: 愈伤组织疏松, 变白, 水浸状

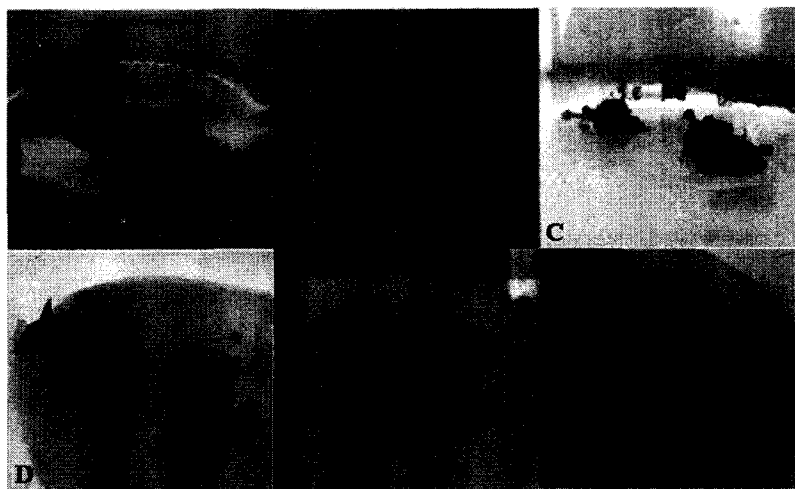


C: 用于原生体制备的白色愈伤组织

图 1 曼陀罗茎段愈伤组织

BA (0.2mg/L); ②6-BA (0.5mg/L); ③6-BA (2mg/L); ④6-BA (0.5mg/L), 2,4-D (0.1mg/L); ⑤6-BA (0.5mg/L), NAA (0.1mg/L)) 对曼陀罗愈伤组织分化效果进行比较, 试验结果表明不同激素水平下愈伤组织分化率有明显差异。

在培养基中添加不同浓度的 6-BA (①~③), 愈伤组织体积均有一定程度的增殖, 质地也由初始状态变得致密。在培养基中添加 6-BA 0.5mg/L, 曼陀罗愈伤组织分化较好, 一周后在淡黄色愈伤组织处出现绿色芽点, 随后整个愈伤组织变为翠绿色, 并转至深绿色; 一月后深绿色愈伤组织处露出幼芽, 之后幼芽展开, 从愈伤组织侧翼生长出新的深绿色小芽, 进一步培养后形成丛生芽, 出芽率约为 56% (图 2 A-E)。将产生了丛生芽的愈伤组织转入新鲜的分化培养基上进行进一步增殖壮苗, 待丛生芽长到 2cm 左右即可转入生根培养基中生根培养^[9]。在培养基中添加 6-BA 0.2mg/L 愈伤组织增殖变大并转为绿色, 细胞团也变得紧实, 但没有芽点出现, 不分化



A: 出现芽点 B: 进一步变绿 C: 出现小芽 D: 小芽生长 E: 出现无根丛生芽 F: 愈伤组织变绿但不分化

图 2 曼陀罗愈伤组织分化出苗

出芽 (图 2-F), 这可能是由于 6-BA 浓度较低造成的。随着 6-BA 浓度增加至 2mg/L, 愈伤组织增殖出芽时间加快, 但是芽生长到一定程度时, 其生长速度受到抑制, 失去形成新芽的能力, 部分愈伤组织出现不同程度的褐化。(有关褐化见后续 2.3.2)

据前人的试验结果报道在烟草组织培养中生长素与细胞分裂素表现出良好的协同作用^[6], 并且也常见于其它植物^[7]。因此本试验在 6-BA (0.5mg/L) 的基础上添加了 2,4-D (0.1mg/L) 和 NAA (0.1mg/L) 进行比较 (④, ⑤), 结果显示曼陀罗愈伤组织诱导并未表现出 6-BA 和 NAA、2,4-D 之间的协同作用。在加入生长素后曼陀罗愈伤组织变化过程明显变慢, 大约一个半月才能够形成丛生芽, 这可能是由于 2,4-D 和 NAA 对愈伤组织的再生存在抑制作用。因此, 合适浓度的 6-BA (0.5mg/L) 对曼陀罗愈伤组织出芽具有较好的效果, 与蔡起贵等人的研究结果略有不同^[5]。

2.3.2 出苗过程中曼陀罗愈伤组织的褐化 曼陀罗愈伤组织转入分化培养基③6-BA (2mg/L) 后, 部分愈

伤组织产生褐化现象(图 3),最终导致愈伤组织死亡。

褐变主要是在组织培养过程中外植体内的多酚氧化酶被激活,使细胞里的酚类物质氧化成棕褐色醌类物质,植物种类、基因型、外植体部位及生理状况等诸多因素均可导致褐变发生。本研究结果表明培养基中 6-BA 浓度增加,芽点分化速度也相对提高,但随之出现的问题就是部分愈伤组织褐化。以往研究表明 6-BA 或激动素(KT)不仅促进酚类化合物生成,而且刺激多酚氧化酶的活性,增加褐变,甘蔗组织培养中十分明显;而生长素类如 2,4-D 和 NAA 可延缓多酚合成,减轻褐变。

因此本试验分化培养基中 6-BA 的浓度为 0.5mg/L,同时添加水解干酪素以减少褐化现象出现^[8,9]。

2.4 曼陀罗生根培养

2.4.1 不同生长素对曼陀罗生根的影响 本研究采用三组不同激素浓度 MS 培养基对曼陀罗生根进行了比较研究[①MS+NAA(0.2mg/L);②MS+IBA(0.2mg/L);③1/2 MS+IBA(0.2mg/L)],试验结果发现在生根培养基①[NAA(0.2mg/L)]中,曼陀罗苗生长缓慢且逐渐弱化,并不生根;生根培养基②和③[IBA(0.2mg/L)]中,曼陀罗苗逐渐生长,大约三周后便可生根。这表明 IBA 的添加有利于曼陀罗根的生成,而 IBA 相对于 NAA 有利于曼陀罗根生成的具体原因还需要进一步探讨(图 4)。

2.4.2 无机盐浓度对生根的影响 一般认为矿物元素浓度较高有利于茎叶生长,较低有利于生根。本试验通过比较生根培养基②和③发现大小近似相同的苗在无机盐含量较低的培养基中,生根时间缩短,根的数量也有所增加。

以往研究表明,低浓度无机盐(1/2 MS)相比高浓度无机盐(MS)有利于生根,这是因为高浓度无机盐对根的生长有抑制作用。Hyndman 认为降低盐浓度提高生根的原因可能是将培养基中氮源降低到一个有利水平,而 Tones 认为可能是培养基中的盐浓度会影响渗透压,从而影响营养吸收和向培养基中释放物质^[10]。

2.4.3 丛生芽大小对生根的影响 转入生根培养基中的丛生芽大小影响曼陀罗生根。芽太小转入生根培养基③后生长受到抑制,并在生根培养基中逐渐枯萎,并不生根;芽生长到 2~3cm 后再转入,则丛生芽会在培养基中继续生长,并开始生根,根数目多为 5~6 条。这可能与芽的茁壮程度有关,因此试验中应将芽在分化培养基中继代一段时间,待丛生芽生长到一定程度后再转入生根培养基中培养。

3 讨论

植物细胞全能性的实现必需经历脱分化(dedifferentiation)和再分化(redifferentiation)两个阶段。脱分化就是使已分化的细胞回复到未分化的原始分生组织状态,从而具有全能性表达潜力。再分化就是脱分化后的细胞(愈伤组织)在特定条件下,重新进行细胞分化并以多种方式形成完整植物体的过程。本试验完成了由曼陀罗茎段诱导愈伤组织并进一步再生植株的过程,其中主要涉及到以下几个方面。

3.1 激素对愈伤组织诱导的影响

愈伤组织的形成一般要经历启动期、分裂增殖期。激素在诱导愈伤组织产生过程中所起的作用非常重要,影响着启动的快慢、细胞分裂速度、愈伤组织质地和分化潜力等。植物激素中的生长素和细胞分裂素是启动细胞脱分化和再分化的关键激素。一般而言,生长素中以 2,4-D 对愈伤组织的诱导最为有效,本试验利用修改的 MS 培养基(除去甘氨酸,维生素 B1 的含量增加至 0.5mg/L, pH 5.5)附加 2mg/L 的 2,4-D 可由曼陀罗茎段诱导出愈伤组织,曼陀罗愈伤组织继代则选用 0.5mg/L 的 2,4-D 为宜。试验表明在一定质量浓度范围内随着附加激素浓度的升高,愈伤组织增多,质量较好,但质量浓度达到一定界限后,愈伤组织的产生出现抑制。



图 3 曼陀罗愈伤组织褐化



图 4 曼陀罗丛生芽生根

3.2 激素对愈伤组织分化的影响

激素在愈伤组织的分化过程中所起的作用是极其重要的,不仅影响分化率的高低,还决定其分化的途径。Miller 和 Skoog 的细胞分裂素/生长素控制器官分化模式认为,细胞分裂素/生长素比值高时促进芽的分化,比值低时有利于细胞增殖和根的分化。许多研究中都是采用相对较高的分裂素/生长素比值,研究认为两类激素组合使用可以提高分化率和丛生芽。但本试验结果显示,曼陀罗愈伤组织诱导并未表现出 6-BA 和 NAA、2,4-D 之间明显的协同作用。另外高浓度的 6-BA 对愈伤有毒害作用,高浓度 6-BA 会导致愈伤组织褐化,这可能是细胞分裂素刺激多酚氧化酶活性提高造成的。本试验确定诱导不定芽的培养基为:MS 培养基(20g 蔗糖,8g 琼脂,0.1g 水解干酪素)+6-BA(0.5mg/L)。需要指出的是,外源激素的使用会受到内源激素的干扰,多认为是内源生长素浓度较高所致,这还有待于进一步研究。

3.3 生根培养

本试验表明曼陀罗生根培养主要受到几个因素影响,一是生长素类型,试验通过比较 NAA 和 IBA 两种生长素类型发现,IBA 相对于 NAA 更有利于曼陀罗生根,具体原因还需要进一步研究;二是无机盐浓度对根的诱导也有影响,低浓度无机盐(1/2 MS)相比高浓度无机盐(MS)有利于生根,这是因为高浓度无机盐对根的生长有抑制作用;三是丛生芽大小,结果表明只有生长到一定大小的丛生苗才能够进一步生根,芽体较小转入生根培养基后则会逐渐枯萎。本试验选择的生根培养基为 1/2MS 培养基+IBA(0.2mg/L),其适宜曼陀罗苗根的生成。

参考文献

- 1 娄凤菊,连立峰,周玉秋,王晓云.特种经济动植物,2004,5:30.
- 2 Engvild KC. *Physiol Plant*, 1973, 28: 155~159.
- 3 Schieder O.Z. *Pflanzenphysiol*, 1975, 76: 462~466.
- 4 Furner IJ, King J, Gamborg OL. *Plant Sci Lett*, 1978, 11: 169~176.
- 5 蔡起贵,姜荣锡.曼陀罗愈伤组织的原生质体再生植株.中国植物学会五十周年年会学术报告及论文摘要汇编,1983,554.
- 6 Murashige T, Skoog F. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473~497.
- 7 李劲,蒋泽平,梁珍海.江苏林业科技,2006,33(1):12~15.
- 8 谢丽霞,杜建伟,李海杰,吴芷君.垦殖与稻作,2006,1:61~62.
- 9 高国训.植物生理学通讯,1999,35(60):501~506.
- 10 李胜,杨德龙,李唯,武季玲,曹孜义.甘肃农业大学学报,2003,38(4):373~384.

·会 讯·

第二届“世界农业科学前沿论坛”通知

为扩大国内外农业科研人员之间、作者与审者之间、作者与编者之间的学术与信息交流,促进我国农业科学研究的繁荣与发展,《中国农业科学》编委会/编辑部拟定于2007年11月30日—12月2日在北京举办第二届“世界农业科学前沿论坛”,届时将邀请国内外著名专家、学者作专题报告。

会议费用与交款方式 交通、食、宿费用自理。10月20日以前注册,会务费1100元/人,现场注册1300元/人。在读研究生在10月20日以前注册,按800元/人收取;现场注册,按1000元/人收取。通过邮局或银行汇款均可。

有关报告内容等可与《中国农业科学》编辑部联系。

开户银行:中国农业银行北京北下关支行

账 号:050601040009874

户 名:中国农业科学院农业信息研究所(请务必注明“论坛注册费”)

地 址:北京中关村南大街12号《中国农业科学》编辑部(100081)

联 系 人:刘 锋 韩媛媛 路文如

电话/传真:010-84897048 62191637 13521053838

E-mail: nongyikx@163.com luwenru@mail.caas.net.cn

lw@ChinaAgriSci.com

《中国农业科学》编辑部