

毛地黄优良变异植株组织培养及无性系的建立

梁 佼,程丽娟,陈 莹,王黎波,姜长阳*

(辽宁师范大学生命科学学院,辽宁 大连 116029)

摘 要:研究了毛地黄优良变异植株嫩茎愈伤组织的诱导、分化及无性系的建立。结果表明:MS+1 mg/L BA+0.6 mg/L 2,4-D 是毛地黄嫩茎愈伤组织诱导的理想培养基;MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 是愈伤组织分化的理想培养基;MS+0.2 mg/L BA+0.2 mg/L IAA 是不定芽壮苗培养的理想培养基;1/3MS+0.3 mg/L IAA 是生根培养的理想培养基;炉灰渣、河沙是生根试管苗移栽的理想基质。

关键词:毛地黄;组织培养;无性系

中图分类号:S567.210.43 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-4942(2007)06-0011-04

Tissue Culture and Establishment of Clonal Propagation of *Digitalis purpurea* Variant

LIANG Jiao, CHENG Li-juan, CHEN Ying, WANG Li-bo, JIANG Chang-yang*

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract The experiments for callus induction, differentiation from immature stems, the rooting and transplantation of tube seedlings and establishment of clonal propagation of *digitalis purpurea* variant was carried out. The results indicated that the ideal medium for induction and differentiation of callus were MS+1 mg/L BA+0.6 mg/L 2,4-D and MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA respectively. The effective medium for cultivating adventitious buds was MS+0.2 mg/L BA+0.2 mg/L IAA. The medium of 1/3MS+0.3 mg/L IAA was suitable for rooting. Cinder and sand were used as the best medium for transplantation.

key words *Digitalis purpurea*; Tissue culture; Clone

毛地黄(*Digitalis purpurea*)又称自由钟、洋地黄,属玄参科毛地黄属一年生草本植物,原产欧洲,我国也有栽培^[1,2]。毛地黄是重要的草药,有强心等功效;也是重要的观赏植物,近年来辽宁大连等地已经引种栽培。毛地黄进行盆栽观赏,若在温室中促成栽培,可在早春开花,植株高大且花序花形优美,多在花坛、路旁、广场和岩石园中进行栽培,也可作自然式花卉布置。目前生产中使用的毛地黄多是由种子育苗而来,存在前期生长速度慢、生产周期较长、种子发芽率较低、实生苗生长不整齐等问题,使园林绿化规模化栽培受到了一定的影响。在栽培中偶尔可以发现长势非常

旺盛的变异植株,但利用种子繁殖,因分离作用后代无法保持变异植株的优良性状,而用传统技术又难以对毛地黄进行无性繁殖。所以,我们对毛地黄优良变异植株进行了组织培养及无性系建立的研究。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料及灭菌

将在田间发现的长势非常旺盛的毛地黄变异植株嫩茎切下后,放到250 ml的磨口广口瓶中,用自来水振荡洗涤10~20 min,再用0.05%安利洗涤液振荡洗涤10~15 min,然后置于超净工作

收稿日期:2007-05-08

基金项目:辽宁师范大学教学改革项目(20050101123)

作者简介:梁佼(1985-),女,辽宁葫芦岛人,辽宁师范大学生命科学学院本科学士。

*通讯作者简介:姜长阳(1954-),男,汉族,辽宁大连人,教授,从事生物技术研究。

台上,用70%乙醇灭菌20s左右后,迅速用无菌水振荡洗涤1次,倒入0.05%HgCl₂溶液振荡灭菌10min,接着用无菌水振荡洗涤5次,将装有材料的瓶子置于约20℃室温下或温箱中12h,然后再用0.05%HgCl₂灭菌5min,接着用无菌水洗涤5次,即可获得毛地黄无菌嫩茎。

1.2 培养条件

以MS或1/3MS为基本培养基,添加不同浓度的BA、IAA、NAA、2,4-D。以MS为基本培养基加蔗糖30g/L,以1/3MS为基本培养基加蔗糖10g/L。培养基胍力强度为180g/cm²[3],pH5.8~6.0。培养温度20~25℃,光照度2000~3000lx,光照10~12h/d。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

将无菌嫩茎切成0.5cm左右茎段,接种到以MS为基本培养基,添加不同浓度BA、NAA、IAA和2,4-D的培养基上,进行愈伤组织诱导。接种后30d左右可见形成愈伤组织,60d时观察统计。由表1可见,在BA与NAA或2,4-D配合使用的培养基上均能诱导形成愈伤组织,且BA与2,4-D配合使用的诱导率明显高于BA与NAA配合使用的,其中在MS+BA1mg/L+

表1 不同浓度激素对嫩茎愈伤组织诱导的影响

激素(mg/L)				接种数量 (段)	诱导愈伤组 织数(块)	诱导率 (%)
BA	NAA	IAA	2,4-D			
0	0	0	0	50	0	0
0.2	0	0	0	50	0	0
0.6	0	0	0	50	0	0
1.0	0	0	0	50	0	0
1.4	0	0	0	50	0	0
1.8	0	0	0	50	0	0
0.2	0.2	0	0	50	25	50
0.6	0.4	0	0	50	21	42
1.0	0.6	0	0	50	36	72
1.4	0.8	0	0	50	31	62
1.8	1.0	0	0	50	42	84
0.2	0	0.2	0	50	0	0
0.6	0	0.4	0	50	0	0
1.0	0	0.6	0	50	0	0
1.4	0	0.8	0	50	0	0
1.8	0	1.0	0	50	0	0
0.2	0	0	0.2	50	37	74
0.6	0	0	0.4	50	38	76
1.0	0	0	0.6	50	50	100
1.4	0	0	0.8	50	46	92
1.8	0	0	1.0	50	50	100

2,4-D 0.6 mg/L 培养基上诱导率为100%,所诱导的愈伤组织呈淡绿色的颗粒状,为具有分化能力的愈伤组织^[4]。把在这一培养基上诱导的愈伤组织,在相同培养基上连续继代培养12代,愈伤组织的外观仍然保持不变。这说明MS+1mg/L BA+0.6 mg/L 2,4-D是毛地黄嫩茎愈伤组织诱导的理想培养基。

2.2 愈伤组织的分化及增殖培养

将上述培养的淡绿色颗粒状愈伤组织接种到以MS为基本培养基,添加不同浓度BA、NAA、IBA和2,4-D的培养基上进行分化培养,至28d愈伤组织开始分化,60d时观察统计。由表2可见,在MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA培养基上,愈伤组织的分化率达99.8%,且培养到45d时,愈伤组织能分化成密集的丛生不定芽。这说明MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA是毛地黄愈伤组织分化的理想培养基。

表2 不同浓度激素对愈伤组织分化的影响

激素(mg/L)				分化数	分化率 (%)	长势
BA	NAA	IBA	2,4-D			
0	0	0	0	0	0	
0.5	0	0	0	496	82.7	++
1.0	0	0	0	315	52.5	++
1.5	0	0	0	209	34.8	+
2.0	0	0	0	47	7.8	+
0.5	0.1	0	0	599	99.8	+++
1.0	0.1	0	0	508	84.7	++
1.5	0.1	0	0	331	55.2	++
2.0	0.1	0	0	68	11.3	+
0.5	0	0.1	0	0	0	
1.0	0	0.1	0	0	0	
1.5	0	0.1	0	0	0	
2.0	0	0.1	0	0	0	
0.5	0	0	0.1	0	0	
1.0	0	0	0.1	0	0	
1.5	0	0	0.1	0	0	
2.0	0.1	0	0.1	0	0	

注:接种愈伤组织颗粒数均为600;+++好;++较好;+一般。

2.3 壮苗分化增殖培养

将上述分化的不定芽剪成1cm左右的有芽茎段,接种到MS+0.2mg/L BA+0.2 mg/L IAA培养基上进行壮苗增殖培养,30d时观察统计。结果:每个单芽茎段平均能增殖生长成7.5个高2.5~6cm、茎粗0.15cm以上、生长旺盛的丛生无根苗;且接种茎段的成活率近100%。把在这一培养基上生长的无根苗剪段后,在相同的

培养基上连续继代培养 10 代,无根丛生苗的长势和增殖率保持不变。这说明 MS+0.2 mg/L BA+0.2 mg/L IAA 是不定芽壮苗分化增殖的理想培养基。

2.4 生根培养

将上述长势良好、茎较粗壮的不定苗剪成 2 cm 以上的茎段,接种到以 1/3MS 为基本培养基,添加不同浓度 IAA 和 NAA 的培养基上进行生根培养。至 7 d 时形成可见根原基,15 d 后根开始并迅速生长,25 d 后可长成旺盛的试管苗,此时观察统计。由表 3 可见,在 1/3MS+0.3 mg/L IAA 和 1/3MS+0.2 mg/L NAA 培养基上的试管苗生根率高,生根数目达 8.4 条/株以上。但观察发现,在 1/3MS+0.2 mg/L NAA 培养基上形成的根多是由基部的愈伤组织上长出的,几乎都是无效根^[5],其他加入 NAA 的培养基也有类似现象。而在 1/3MS+0.3 mg/L IAA 培养基上的试管苗生根率高,根数多,长势旺。这说明,1/3MS+0.3 mg/L IAA 是毛地黄试管苗生根的理想培养基。

表 3 不同浓度激素对生根的影响

激素(mg/L)		生根数	生根率 (%)	每株 平均生根数
IAA	NAA			
0.0	0.0	0	0	0
0.1	0.0	18	30.0	3.6
0.2	0.0	39	65.0	4.1
0.3	0.0	59	98.4	8.7
0.4	0.0	47	78.3	8.3
0.5	0.0	17	28.3	3.5
0.0	0.1	23	25.0	1.8
0.0	0.2	55	91.7	8.4
0.0	0.3	48	80.0	4.0
0.0	0.4	29	48.3	2.3
0.0	0.5	33	55.0	6.5

注:接种数量均为 60。

2.5 试管苗移栽与扦插

将长势旺盛的生根试管苗培养瓶打开,使试管苗直接与空气接触,放在光照强度 5 000 lx 左右、温度 20℃ 以上的条件下炼苗 3~5 d,待培养基表面上刚刚长出菌落时,将试管苗拔出,洗掉根部的培养基,然后移栽到河沙、炉灰渣、营养土、河沙与营养土混合物、炉灰渣与营养土混合物五种基质上。移栽后在保持湿度 90% 以上、温度 23~30℃、无直射光的条件下,10 d 后即可成活,25 d 时观察统计。由表 4 可见,以营养土为基质,移栽不能成活;以营养土与河沙或炉灰渣各半配制的基质,移栽的成活率也很低;以河沙或炉灰渣为基质,移栽的成活率较高。这说明河沙和炉灰渣是

毛地黄试管苗移栽的理想基质。

表 4 不同基质对移栽成活的影响

基质类型	移栽数 (株)	移栽 成活数(株)	移栽 成活率(%)
河沙	50	47	94
炉灰渣	50	48	96
营养土	50	0	0
河沙:营养土(1:1)	50	11	22
炉灰渣:营养土(1:1)	50	12	24

将在壮苗分化增殖培养基上培养的无根苗剪成 1.5 cm 左右、至少具有一个芽的茎段,扦插到上部铺有 5 cm 厚炉灰渣的温室苗床上或花盆中,按照移栽试管苗条件管理,平均成活率为 91%。扦插试管苗前 20 d 长势较缓慢,其后生长速度及长势与试管生根移栽苗基本一致。

与同期播种的实生苗相比,试管苗不仅保持了叶片大、花朵多、长势旺盛等母株的优良变异性状,而且平均花期延长了 5 d,枯萎时间晚 7 d 左右,根系也相当于实生苗的 1.5~2 倍。

3 讨论

虽然现在已有毛地黄组织培养及植株再生的报道^[6,7],但迄今未见毛地黄优良变异植株非分生组织愈伤组织的无性系建立的报道。本研究以毛地黄的嫩茎为材料建立的无性系,不仅使变异植株的优良性状得到了保存,而且还证明毛地黄的非分生组织也具有全能性。该研究所获得的高分化毛地黄嫩茎愈伤组织,还为毛地黄的转基因研究奠定了基础。这种由愈伤组织诱导分化的试管苗,栽培后完全保持了母株的优良变异性状,说明通过组织培养建立的无性系是繁殖毛地黄优良变异植株的有效途径,同时,也为毛地黄优良变异植株的迅速推广应用、工厂化育苗奠定了基础。试管苗的花期延长、枯萎时间推迟、根系发达,除遗传了母体的变异性状外,还与培养过程中使用较高浓度激素的后效作用有关。

生根培养中,在含有 NAA 的培养基上虽然也能诱导生根,但根系多是由基部的愈伤组织上长出的,这与 NAA 的愈伤组织促进作用强而化学性质较为稳定有关;长出的根多是无效根,因为愈伤组织没有输导组织,移栽后的试管苗根系吸收的营养和水分难以运输到地上部,而由叶子合成的有机营养也无法运送到根部,从而无法保证植株的正常生命活动。IAA 之所以具有良好的促进生根作用,与其化学性质不 (下转第 20 页)

种子脂肪氧化酶的电泳图谱不同, 郟城睡果子、牟平兔子墩、non-nod 和 8130 均为普通型品种, 郟城睡果子为 4 条酶带, 其他 3 份品种则呈现 3 条酶带。A. SPDB 是由 A. SP 加倍获得的, 二者种子脂肪氧化酶的电泳图谱不同, A. SP 比 A. SPDB 多一条等电点略偏酸性的 A 酶带, 其他 3 条两者均有, 但 A. SPDB 的酶带 B、D 带显色略浅。

3 结论与讨论

等电聚焦电泳技术是一种根据样品的等电点不同而使它们在 pH 梯度中相互分离的一种电泳技术, 具有分辨率高、特异性强、重现性好等特点。本研究结果表明, 花生种子脂肪氧化酶同工酶有 4 条带, 等电点分别为: pH6.35、pH7.00、pH7.46、pH7.74。等电点差异明显, 酶活性高, 通过该技术鉴定分析花生种子脂肪氧化酶同工酶完全可行。

以亚油酸为底物, 根据产生氢过氧基手性和位置专一性的不同, 植物 LOX 可分为三种类型^[7], 但本研究所得 4 条酶带的产物尚不清楚, 暂以 A、B、C、D 来表示。

根据不同品种花生种子脂肪氧化酶酶带数量的差异, 可以将供试品种分为两类: 一类呈现 4 条酶带, 即 A、B、C、D 4 条酶带均具有; 另一类呈现三条酶带, 仅含有 B、C、D 3 条酶带, 两类品种的区别在于酶带 A 的有无, 酶带 A 有何特定生理功能尚需深入研究。A. SPDB 是 A. SP 经加倍处理后的种质, A. SPDB 缺少酶带 A, 且酶带 B 和 D 显色略浅, 原因有待从分子水平深入探讨。

花生种子脂肪氧化酶与大豆相比, 在酶活性和酶活性最适 pH 值上均有较大差异^[5,8-11], 花生脂肪氧化酶酶活性最适 pH 值为 6.2 和 8.3, 大

豆为 6.5、7.0 和 9.0; 而花生脂肪氧化酶酶活性比大豆的低。因此, 本试验在借鉴大豆脂肪氧化酶鉴定方法的基础上, 经过反复试验确定了花生种子脂肪氧化酶适宜的提取条件、酶染条件和两性电解质 pH 范围: 提取液 pH7.3~7.5, 冰浴提取; 酶染缓冲液为 pH7.4 的磷酸盐缓冲液, 酶染温度 26~28℃, 振荡条件下染色过夜。本试验选用的两性电解质 pH 为 3.0~9.5, 而 4 条谱带等电点在 pH6.35~7.74 间, 因而下一步选用两性电解质的 pH 范围, 可适当缩小至 4~8 之间, 以提高酶带的分辨率。

参 考 文 献:

- [1] Feussner I, Khn H, Wasternack C. Lipoxygenase 2 dependent degradation of storage lipids[J]. Trends Plant Sci., 2001, 6(6):268-273.
 - [2] Siedow J N. Plant lipoxygenase: structure and function[J]. Annu. Rev. Pl. Physiol. Plant Mol. Biol., 1991, 42: 145-188.
 - [3] Robinson D S, Wu Z, Domoney C, et al. Lipoxygenases and the quality of foods[J]. Food Chem., 1995, 54: 33-43.
 - [4] 沈文彪, 郑天清, 万建民, 等. 胡萝卜素漂白法快速筛选耐储藏水稻品种[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(4): 387-388.
 - [5] Sanders, et al. Lipoxygenase isozymes of peanut[J]. Lipids. 1975, 10(11): 681-685.
 - [6] 陈 静, 石运庆, 吴兰荣, 等. 花生种子脂肪氧化酶鉴定方法研究[J]. 花生学报, 2006, 3: 6-9.
 - [7] Ohta H, Ida S, Mikami B, et al. Purification and Characterization of Rice Lipoxygenase Component 3 from Embryos[J]. Agri. Biol. Chem., 1986, 50(12): 3165-3171.
 - [8] 傅翠真. 大豆脂肪氧化酶的鉴定方法[J]. 大豆科学, 2004, 2: 15-17.
 - [9] 丁安林, 傅翠真. 大豆脂肪氧化酶同工酶的鉴定研究[J]. 作物学报, 1995, 20(3): 373-374.
 - [10] 丁安林, 张 艳, 常汝镇, 等. 大豆脂肪氧化酶研究进展[J]. 大豆科学, 1995, 14(1): 67-73.
 - [11] Barnes P, Galliard T. Rancidity in cereal products[J]. Lipid Technol., 1991, 3: 23-28.
-
- (上接第 13 页) 稳定, 生根培养 10 d 左右即自动分解有关, 因为在这段时间里, 它诱导形成了根原基, 这对根的伸长生长极为有利; 但根原基形成后, 若培养基中仍然存在着较高浓度的生长素, 就会抑制根原基的伸长生长。
- 河沙和炉灰渣是毛地黄试管苗移栽和扦插的理想基质, 与这两种基质通气性好有关, 这说明充足的氧气供给是移栽与扦插毛地黄试管苗根系生长非常重要的条件。

参 考 文 献:

- [1] 中国植物志编辑委员会主编. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 212.

- [2] 中国科学院植物研究所主编. 中国高等植物图鉴[M]. 北京: 高等教育出版社, 1974, 52.
- [3] 姜长阳. 培养基琼脂用量的商榷[J]. 植物生理学通讯, 1990, 2: 53-54.
- [4] 安利佳, 姜长阳. 植物组织培养导论[M]. 大连: 辽宁师范大学出版社, 1993, 55-58.
- [5] 王翠杰, 刘丽君. 影响樱桃砧木试管苗生根的因素[J]. 北方果树, 2000, 1: 15.
- [6] 施和平, 权 宏. 紫花毛地黄组织培养和植株再生[J]. 中草药, 2004, 36(3): 327-328.
- [7] 冯 敏, 毛学文, 陈 莹. 不同光质和培养基于毛地黄叶组织培养中强心苷积累和效应研究[J]. 韶关大学学报(自然科学版), 1994, 4(10): 70-73.