

紫花地丁的组织培养和植株再生

乔琦 孔祥生 伍丽 薛娟

(河南科技大学农学院, 洛阳 471000)

摘要:以未成熟种子萌发的子叶和下胚轴为外植体建立了紫花地丁的组织培养及植株再生体系, 结果表明最适愈伤组织诱导培养基为 MS+2,4-D 0.5mg/L+6-BA 0.5mg/L 或者 MS+2,4-D 1mg/L+6-BA 0.2mg/L, 愈伤组织诱导率可达 100%, 将生长良好的愈伤组织转入分化培养基可诱导芽或根的分化, 其中诱导芽的最适培养基为 MS+6-BA 1mg/L+2,4-D 0.5mg/L, 诱导根的最适培养基为 MS+2,4-D 1mg/L+6-BA 0.2mg/L, 两种器官分化途径均能有效再生成苗。

关键词:紫花地丁; 组织培养; 愈伤组织; 植株再生

紫花地丁(*Viola yedoensis* Makino)系堇菜科堇菜属多年生宿根草本植物, 具清热、解毒和利湿的功效, 全草含苷类、黄酮类等成分, 其醇和水的提取物有较强的抗病原微生物作用, 可用于治疗痈毒、腮腺炎和尿路感染等疾病。临床上由于紫花地丁对钩端螺旋体、金葡萄球菌和腐生葡萄球菌的抑菌作用强于蒲公英, 常将二者合用, 可以扩大抑菌谱以增强疗效^[1-3]。但由于其

基金项目:国家“十五”攻关项目(2001BA701A35); 河南科技大学人才科学培养基金

340、黑选169、K10 对提高产量效应明显。穗长、容重、粒行数主要受加性效应控制, 可在早代选择; 单株产量、穗重主要受非加性基因控制, 易受环境影响, 不宜在早代选择。穗长、穗行数、穗粗与产量性状密切相关, 其中穗粗与小区产量相关达到显著水平。

利用双列杂交设计手段可以对亲本及杂交组合的一般配合力和特殊配合力进行有效分析, 应用 Zhang^[1] 等介绍的 SAS 应用程序简便、有效, 通过对不同性状配合力的分析, 可以有效地指导育种方案的设计和对优良亲本及优良性状的选择。

黑龙江省地处我国最北部, 有效积温不足是玉米品种的一个重要限制性因素, 因而与我国其他地区相比, 育种者更加关注于品种的早熟性, 通过本项研究可以发现, 早熟自交系在产量性状配合力表现上与国内应用的一些名牌晚熟自交系相比还存在一定差距, 但并不低于总体平均水平, 如何进一步提高育种材料的

种子在萌发过程中对温度十分敏感, 最适发芽温度为 25℃, 在高温下(>30℃)根系变褐色并霉烂, 在低温下(<20℃)萌发及生长缓慢, 所以人工栽培面积很少, 而野生资源破坏严重^[4]。近年来关于紫花地丁的研究较少, 主要集中在药理及有效化学成分分析等方面, 对其离体再生体系的研究尚未见报道。本试验以紫花地丁的子叶和下胚轴为外植体, 首次建立了高效的组织培养和植株再生体系, 为进一步提高紫花地丁中有效化学成分、改良品种及转基因等研究奠定基础。

1 材料与方法

供试材料紫花地丁的种子采自河南省洛阳市周山公园, 分别选取外形饱满的深褐色成熟种子和乳黄色未成熟种子各 100 粒。流水冲洗后, 置 70% 酒精中浸泡 30s, 0.1% 升汞浸泡 6~8min, 无菌水冲洗 5~7 遍, 接种于水琼培养基上, 7d 左右部分种子萌动, 统计成熟种子和未成熟种子的发芽高峰日及发芽率, 30d 后获得无菌苗; 待长至 3cm 左右, 取子叶、下胚轴各 30 个为外植体, 接种于附加不同激素的 MS 培养基上诱导愈伤组织(表 1), 隔日观察统计愈伤组织诱导率和生

一般配合力水平, 是早熟区玉米育种工作者在今后相当长一段时间内所面临的挑战。

参考文献

- [1]Yudong Z, M S K, K R Lamkey. DIALLEL-SAS05 A comprehensive program for Griffing's and Gardner-Eberhart analyses, Agron J. 2005, 97 (4): 1097~1106
- [2]A R Hallauer, J B Miranda. Quantitative genetics in maize breeding Iowa State Univ. Press, Ames, Ia, 1981
- [3]J B Holland, M M Goodman. Combining ability of tropical maize accessions with US germplasm. Crop Science, 1995, 35 (3): 767~773
- [4]SAS Institute. SAS/STAT 9 user's guide. SAS Inst., Cary, NC, 2002
- [5]杨伟光, 张君, 赵欣欣, 李继竹, 吴云艳. 几个玉米改良系主要农艺性状配合力和遗传参数的分析. 玉米科学, 2002, 10(4): 22~25
- [6]沈强云, 许志斌, 王永宏, 王兆川. 玉米自交系产量及主要穗部性状的配合力分析. 玉米科学, 2005, 13(2): 22~25
- [7]莫惠栋. 双列资料的遗传模型分析. 江苏农学院学报, 1987, 8(1): 59~64
- [8]高之仁. 数量遗传学. 成都: 四川农业出版社, 1986, 457~473

(修回日期: 2007-04-06)

长状态,采用 Excel 对不同外植体的愈伤组织诱导率进行单因素方差分析;筛选疏松易分化的愈伤组织分别转接至分化培养基(表 2)上诱导芽或根的分化,分别将高约 2cm 的不定芽分割成单芽转接至生根培养基上诱导生根,将长约 1cm 的不定根分割后转接至诱导芽的培养基上诱导芽;隔天观察培养物,对芽或根的诱导、生长进行评价,统计每克愈伤组织上诱导的芽或根的数目、发生频率和比例,后将诱导的植株炼苗移栽。上述实验中 MS 培养基的蔗糖浓度均为 3%,培养条件:培养室温度(25±1)℃,光照时间 12h/d,光照强度 40~80μmol/m²·s。

2 结果与分析

2.1 成熟种子和未成熟种子的发芽率 结果表明未成熟种子的发芽高峰日平均为 7d,比成熟种子提前 5d,其发芽率为 87%,远远高于成熟种子的 9%。

2.2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响(表 1) 经筛选,最适合愈伤组织诱导培养基为 MS+2,4-D 0.5mg/L+6-BA 0.5mg/L 或者 MS+2,4-D 1mg/L+6-BA 0.2mg/L,愈伤组织诱导率可达 100%;比较子叶和下胚轴的愈伤组织诱导率,经单因素方差分析表明这两种外植体诱导率间的差异不显著($p<0.05$)。进一步的实验表明淡黄色疏松的愈伤组织更适合器官分化。

表 1 不同外源激素对不同外植体愈伤组织的诱导

生长素 (mg/L)		细胞分裂素 (mg/L)	子叶愈伤组 织诱导率	下胚轴愈伤组 织诱导率	生长状态
2,4-D	NAA	6-BA	(%)	(%)	
0	0.5	1	74	63	绿色,致密
0.5	0	0.5	100	100	淡黄色,疏松
0.5	0.5	1	100	98	绿色,疏松
1	0	0.2	100	100	淡黄色,疏松
2	0	0	71	73	黄褐色,疏松
0	0	1	0	0	膨大,边缘出现紫色

基本培养基为 MS 培养基,下表同

表 2 不同外源激素对器官分化的影响

激素组合(mg/L)	愈伤组织	芽生长状态	愈伤组织	根生长状态
	生芽数(个/g)		生根数(个/g)	
0.5 2,4-D+1.0 6-BA	8	+++	0	
0.5 NAA+1.0 6-BA	6	++	0	
0.5 NAA+2.0 6-BA	11	++	0	
0.2 NAA+1.0 6-BA	10	++	0	
0.2 NAA+0.5 6-BA	2	+	7	+毛状根
1 NAA+0.5 6-BA	0		12	++主根明显
0.5 2,4-D+1.0 6-BA	2		10	++毛状根
1IBA+0.56-BA	0		13	++主根明显

+++代表诱导速度快,健壮,++次之,+代表诱导速度慢且发育迟缓

2.3 比较不同培养基对器官分化的影响(表 2) 经筛选,诱导芽的最适培养基为 MS+6-BA 1mg/L+2,4-D 0.5mg/L,诱导根的最适培养基为 MS+2,4-D 1mg/L+6-BA 0.2mg/L,结果表明紫花地丁可以通过生芽或者生根的 2 种器官发生途径形成再生体系。

2.4 生根培养基 分别将芽转接至无附加激素的 MS 和 MS+IBA 0.2mg/L 的生根培养基上,其中附加低浓度 IBA(<0.2mg/L)的培养基的生根速度较快,根系较粗壮,但是叶片易卷曲;而无附加激素的 MS 的生根速度较慢,但是叶片色深,无卷曲,易于炼苗。

3 讨论

3.1 在组织培养条件下,未成熟种子(种皮乳黄色)的发芽高峰日平均比成熟种子(深褐色)提前 5d,其发芽率也远比成熟种子高,因此建议使用同时期采集的未成熟种子作为供试材料。

3.2 2,4-D 和 NAA 是诱导愈伤组织的主要激素,相同浓度的 2,4-D 更加强效;6-BA 起协同作用,但不能单独诱导愈伤组织;生长素的使用浓度应高于细胞分裂素,有利于愈伤组织的快速诱导,其中 2,4-D 的最高使用浓度为 2mg/L。

3.3 当外源生长素的浓度继续高于细胞分裂素时,在愈伤组织上可诱导不定根的形成;使用 MS+2,4-D 0.5mg/L+6-BA 1mg/L 时,既有根的分化,同时还有少量芽的形成,说明诱导芽发生时,6-BA 至少是 2,4-D 的 2 倍以上,或者使用同浓度的 NAA 则全部诱导芽的发生,再次印证了生长素和细胞分裂素的分化作用以及 2,4-D 是强效生长素。结果表明紫花地丁可以通过生芽或者生根的 2 种器官再生途径,只需要常见的外源激素,容易进行组织培养,有效避免了种子萌发率较低、对温度要求较苛刻等不利因素,因此可以进行快繁,避免中药单纯采集对野生资源的破坏,同时人工栽培成群成片后,所成景观也极为美丽,为早春季节增添了花色。

参考文献

- [1]叶春芝.紫花地丁治疗蜂窝组织炎.浙江中医杂志,2006,41(3):170
- [2]童延清,李晖.紫花地丁、蒲公英体外抗菌作用研究.中华微生物学和免疫学杂志,2003,23(9):669
- [3]董爱文,朱声文,何征.紫花地丁在不同季节总黄酮含量的变化.中国医药工业杂志,2004,35(10):592~593
- [4]徐本美,孙运涛,孙超,等.紫花地丁种子的萌发性状及其栽培繁殖.种子,2003,5:24~25

(收稿日期:2007-01-23)