

苍耳愈伤组织诱导及继代培养研究

白文苑, 沈慧敏

(甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以苍耳叶片、叶柄及茎段为外植体, 在 MS 附加不同种类和浓度激素配比的培养基上, 对苍耳愈伤组织进行诱导培养, 并对生长迅速、性状好的愈伤组织进行了研究. 结果表明: 不同激素配比和不同培养方式对愈伤组织诱导率、生长量和性状有明显的影响. 在光照培养下, 当 MS+6-BA 2 mg/L + NAA 0.5~1 mg/L 时愈伤组织诱导率高且生长好.

关键词: 苍耳; 愈伤组织; 组织培养

中图分类号: Q 813.1⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1003-4315(2006)01-0065-04

Studies on callus induction and subculture of *Xanthium sibiricum*

BAI Wen-yuan, SHEN Hui-min

(College of Prataculture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The leaf blade, leaf stalk and stem of *Xanthium sibiricum* were served as explants, MS medium added different kinds of hormone and proportions was used for inducing and culturing the callus of *Xanthium sibiricum*. At the same time, how to get callus which had rapid growth and good properties was studied. The results showed that different proportion of hormones and different ways of culture had strong influence on the induction rate, growing amount and properties of the callus. The growth of callus was rapid and induction rate was the highest with 6-BA 2 mg/L + NAA 0.5~1 mg/L and light culture.

Key words: *Xanthium sibiricum*; callus; tissue culture

苍耳(*Xanthium sibiricum*)为菊科苍耳属一年生草本植物, 在我国尤其是北方分布广泛, 资源丰富. 苍耳作为药用植物历史悠久, 据资料记载苍耳全草入药, 可清热解毒, 治肾炎; 茎叶入药, 治疥癣、湿疹、虫咬伤等^[1~3].

近年来, 随着植物源农药研究的不断深入, 人们已看好苍耳作为植物源农药的潜力, 王问学等^[4]测

定了苍耳等植物的乙醇抽提物对卫茅尺蠖和菜青虫的药效, 结果表明幼虫在苍耳乙醇提取液处理后的叶片上 5~6 h 内不取食; 冯俊涛等^[5]证实了苍耳丙酮提取物对番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌和苹果炭疽病菌的菌丝生长和苹果炭疽病菌孢子萌发的抑制作用较强, 抑制效果均在 80 % 以上; 李玉平等^[6]研究了苍耳的丙酮提取液对小麦赤霉病菌、番茄灰霉病菌、辣椒疫霉病菌、苹果炭疽病菌、玉米大斑病菌的孢子萌发抑制率大于 93 %; 此外, 苍耳提取物还对粘虫的生长发育有抑制作用, 对菜青虫也有一定的驱避作用.

苍耳用途广泛, 但如果仅从野生植物体中提取分离, 则难以满足诸多方面日益增长的需要, 而且对

作者简介: 白文苑(1977-), 女, 甘肃庆阳人, 在读硕士研究生, 研究方向为植物病害综合防治.

资助基金: 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目“生物农药开发与利用”(项目编号 GNSW-2004-08).

通讯作者: 沈慧敏, 女, 河南长葛县人, 教授, 主要研究方向为生物农药开发利用. E-mail: ndshmin@gsau.edu.cn

收稿日期: 2005-07-20

野生植物资源的大量采伐,必将对环境、物种、生态造成难以弥补的破坏.应用植物细胞培养技术生产次级代谢产物或生产天然的植物成分,已在许多植物上获得成功^[7~8].本试验通过对苍耳愈伤组织的诱导培养,以期获得生长快、活性成分含量高、性状优良的愈伤组织,为今后进行细胞悬浮培养生产抑菌活性物质及苍耳快繁体系的建立提供理论依据.

1 材料与方 法

1.1 材 料

外植体:野生苍耳(*Xanthium sibiricum*)种子(采集地:兰州)经室内盆栽所得植株的叶片、嫩茎及叶柄.

培养基:以 MS 为基本培养基,并附加不同浓度的 6-BA, NAA, KT, 2,4-D 等.每升培养基中加蔗糖 30 g,琼脂 7~8 g, pH 为 5.5~6.0,每 150 mL 三角瓶内装培养基 40~50 mL,灭菌压力为 1.0 kg/cm²,灭菌时间 20 min,棉塞加牛皮纸封口,灭菌后放置 1~2 d 备用.

1.2 方 法

1.2.1 外植体消毒处理 以苍耳茎段为外植体,用 0.1% 升汞、70% 乙醇进行消毒处理,然后分别接种在 MS+6-BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的诱导培养基上,观察愈伤组织的生长情况.

1.2.2 外植体培养与光照处理 以苍耳叶片为外植体,接种在 MS+6-BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的诱导培养基上,一部分置于光照培养箱内,自然散射光培养,一部分放置在普通恒温培养箱内,黑暗中培养,观察愈伤组织的生长情况.光照培养箱温度设为 25℃,湿度为 70%~80%,光照培养强度为 2 500~3 000 lx,光周期为 12 h/d.

1.2.3 愈伤组织诱导 将外植体在流水下冲洗干净后,在超净工作台上用 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 5 min,无菌水冲洗 5~6 次,用无菌滤纸吸去表面水分,将叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块;茎段、叶柄切成长 1.0 cm 的小段,分别接种于 MS 附加不同激素种类和浓度配比的诱导培养基上,每种培养基各接 20 瓶,每瓶接 5~6 块,观察其生长情况.

1.2.4 愈伤组织继代培养 将诱导出来的愈伤组织分离并接种于 MS 附加不同激素种类和浓度配比

的继代培养基上,每 30 d 继代培养 1 次,进行愈伤组织继代培养的研究.

1.2.5 数据处理与差异显著性检验

污染率(%)=(污染外植体数/接种外植体数)×100%

死亡率(%)=(死亡外植体数/接种外植体数)×100%

愈伤组织诱导率(%)=(形成愈伤组织外植体数/接种外植体数)×100%

采用 Duncan's 新复极差法对愈伤组织诱导率进行差异显著性检验.

2 结果与分 析

2.1 消毒处理对外植体的污染控制比较

消毒时间短,污染率则高;消毒时间过长,易杀死外植体.在试验中,以苍耳茎段为外植体,比较了不同消毒时间对污染控制的影响(表 1).

表 1 消毒处理对苍耳茎段污染率的影响

Tab. 1 Effects of different sterilization time on pollution ratio of *Xanthium sibiricum* stem

编号	处理时间		接种数	污染率 /%	死亡率 /%
	70%乙醇	0.1%升汞			
	/s	/min			
1	0	5	50	12.0	18.0
2	10	10	50	8.0	36.0
3	15	15	50	0	52.0
4	20	20	50	0	100
5	25	25	50	0	100

注:结果为接种后第 2 周统计.

接种 2 周后观察发现,以 0.1% 升汞 5 min 和 70% 乙醇 10 s、0.1% 升汞消毒 10 min 时,材料有轻微污染.将 70% 乙醇、0.1% 升汞的消毒时间延长时,污染率显著下降.随着消毒时间的延长,污染率由 12% 下降至 0,但同时又因乙醇和升汞对材料毒害作用的增强,致使材料的死亡率较 0.1% 升汞消毒 5 min 上升了 82%.综合考虑几种因素,认为 0.1% 升汞消毒 5 min 为较理想的消毒处理时间,消毒处理后,在培养过程中污染率只有 12%,且褐化程度以及死亡率都较低,生长状态良好.

2.2 光照处理对叶片愈伤组织的形成

以苍耳叶片为外植体,研究不同光照条件对叶片形成愈伤组织的影响(表 2).

表 2 光照条件对苍耳叶片形成愈伤组织的影响

Tab. 2 Effects of illumination conditions on the induction of callus of *Xanthium sibiricum* leaves

诱导培养基	光照条件	接种外植体数	出愈数	出愈率/%	性状
1	光照	24	19	79	+++
	黑暗	24	14	58	+
2	光照	24	22	92	++
	黑暗	24	13	54	+
3	光照	24	20	83	+++
	黑暗	24	12	50	+
4	光照	24	21	87	++
	黑暗	24	13	54	+

注: + 表示愈伤组织性状一般, ++ 表示较好, +++ 表示最好。

从表 2 可以看出,光照条件对苍耳叶片愈伤组织形成的迟早、性状和出愈率等方面有很大的影响。据试验观察,愈伤组织在光照培养下颜色为浅黄绿

色,生长快,高度分散,性状好;暗培养下外植体黄化严重,颜色为乳白色,愈伤组织生长速度慢,性状差。

2.3 激素及浓度组合对苍耳外植体愈伤组织诱导的影响

由表 3 可以看出,将不同外植体接种在附加 6-BA, NAA, 2, 4-D 与 KT 的不同组合及浓度配比的诱导培养基上,对愈伤组织诱导率的影响存在明显的差异,而无激素的对照组及加入 2, 4-D 的处理组无愈伤组织产生,这说明激素在愈伤组织产生过程中起着决定作用,苍耳对 2, 4-D 敏感,其中以 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L、6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 激素组合的诱导率最高,而且叶片、茎段形成的愈伤组织性状也较好。如果延长培养时间,愈伤组织诱导率还可增大,但产生的愈伤组织老化,不利于以后芽的分化。

表 3 激素及浓度组合对苍耳外植体愈伤组织诱导的影响

Tab. 3 Effects of different combinations and concentration of hormones on the induction of callus of *Xanthium sibiricum* explants

编号	激素浓度/ mg · L ⁻¹				接种外植体数			形成愈伤组织数			愈伤组织诱导/%		
	6-BA	NAA	2,4-D	KT	叶片	叶柄	茎段	叶片	叶柄	茎段	叶片	叶柄	茎段
1	0	0	0	0	40	35	36	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}
2	0	0	1.0	0	40	50	50	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}
3	0	0	2.0	0	42	38	36	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}
4	0.5	0	1.0	0	66	37	37	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}
5	2.0	0	1.0	0	40	40	40	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}
6	1.0	0	2.0	0	41	50	50	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}
7	0	0.5	2.0	0	40	25	25	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}
8	1.0	0	0	0	40	45	42	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}
9	1.0	0.2	0	0	77	47	43	0	36	33	0 ^{Hh}	76.6 ^{Bb}	76.7 ^{Cc}
10	1.0	0.5	0	0	42	40	37	38	30	32	90.5 ^{Bb}	75.0 ^{Bb}	86.5 ^{Bb}
11	2.0	0.2	0	0	40	32	42	28	20	21	70.0 ^{Ex}	62.5 ^{De}	50.0 ^{Dd}
12	2.0	0.5	0	0	44	40	43	42	34	41	95.5 ^{Aa}	85.0 ^{Aa}	95.3 ^{Aa}
13	2.0	1.0	0	0	40	36	42	38	31	40	95.0 ^{Aa}	86.0 ^{Aa}	95.2 ^{Aa}
14	1.0	2.0	0	0	47	48	46	37	33	36	78.7 ^{Dd}	68.8 ^{Cc}	78.2 ^{Cc}
15	3.0	2.0	0	0	90	46	48	82	40	43	91.1 ^{Bb}	86.9 ^{Aa}	89.6 ^{Bb}
16	0	1.0	0	0	37	24	39	23	15	19	62.2 ^{Gg}	62.5 ^{De}	48.7 ^{Dd}
17	2.0	2.0	1.0	0	40	30	20	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}
18	0	1.0	0	0.2	46	51	40	37	33	30	80.4 ^{Cc}	64.7 ^{Dd}	75.0 ^{Cc}
19	1.0	0.5	0	1.0	36	40	54	24	34	48	66.7 ^{Ff}	85.0 ^{Aa}	88.9 ^{Bb}
20	0	0	0	2.0	32	40	42	0	0	0	0 ^{Hh}	0 ^{Ef}	0 ^{Ex}

注: 1. 结果为接种后第 3 周统计; 2. 表中不同的大小写字母分别表示根据 Duncan's 新复极差法达极显著水平 ($P < 0.01$) 和显著水平 ($P < 0.05$)。

2.4 愈伤组织的继代培养及生长

接种 24 d 后,将愈伤组织剥离下来分别接种在 MS、MS+6-BA 2.0 mg/L 和 MS+6-BA 3.0

mg/L 上,几天后愈伤组织迅速出现褐变现象,且组织块体积不再增大,生长速率极为缓慢。接种在 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA(0.2、0.5、1.0)mg/L

上,继代培养大约 10 d 后,愈伤组织长出新鲜疏松的淡黄色细胞团,生长速度变快。

3 讨论

生长调节物质对愈伤组织诱导有非常重要的影响^[9~11]。试验结果表明,不添加任何生长调节剂的外植体未见愈伤组织形成;而添加不同的生长调节剂,诱导结果也存在显著的差异。本试验选出了有利于苍耳愈伤组织生长的生长调节剂种类,很有必要继续深入探讨其浓度与交互作用效果。

本试验分别选择叶片、叶柄、茎段作为外植体,通过比较发现,叶片、茎段是苍耳组织培养较好的培养材料,愈伤组织性状较好,且愈伤组织的形成时间也相对较短。但愈伤组织能否进一步分化和以叶片、茎段为外植体能否建立较好的苍耳高效再生体系尚需进一步的探索^[12,13]。

14(4):17~21

参考文献

- [1] 胡树慧. 苍耳的利用价值[J]. 特种经济动植物, 2001, (6):29
- [2] 韩 婷,秦路平,郑汉臣,等. 苍耳及其同属药用植物研究进展[J]. 解放军药学学报, 2002, 19(2):122~125
- [3] 江苏新医学院编. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1985:1071
- [4] 王学问. 植物源昆虫调控剂研究[J]. 经济林研究, 1996, 14(4):17~21
- [5] 冯俊涛,石勇强,张 兴. 56 种植物抑菌活性筛选试验[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(2):65~68
- [6] 李玉平,慕小倩,冯俊涛,等. 几种菊科植物杀菌活性的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(1):68~72
- [7] 王素芳,王志林,蒋琳兰,等. 植物细胞悬浮培养[J]. 中国生物制品学杂志, 2002, 15(6):381~383
- [8] 李尚中,李 唯,李 胜,等. 小麦胚性愈伤组织诱导研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 39(2):136~140
- [9] 王小菁,李 玲. 植物生长调节剂在植物组织培养中的应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2002:42~53
- [10] Skoog F, Miller Co. chemical regulation of growth organ formation in plant tissue cultured *in vitro* [J]. Symp Soc Exp Biol, 1957, 11:118~131
- [11] Konar R N, Thomas E, Street H E. Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus Sceleratus* [J]. Cell Science, 1972, 11:77~93
- [12] Vasil V, Hildebrandt A C. Differentiation of tobacco-plants from single isolated cells in micro culture[J]. Science, 1965, 150:889~892
- [13] Krikorian A D. Cloning higher plant from aseptically cultured tissue and cells[J]. Biol Rev, 1982, 35:59~88