

蒲公英的组织培养研究^①孙怀娟^{1,2)②} 魏小弟^{1)③}

(1 中国热带农业科学院橡胶研究所 海南儋州 571737;

2 海南大学 海南儋州 571737)

摘要 以盆栽蒲公英的叶柄和叶片为试材,对蒲公英进行组织培养。结果表明:300 mg/L的抗坏血酸能够较好地防止褐化,直接诱导再生植株的最佳组合是MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;诱导愈伤组织和继代的最佳组合是6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5~1.0 mg/L;1/2 MS+15 g/L 蔗糖+NAA 0.1 mg/L是诱导生根的理想培养基。

关键词 蒲公英;抑褐;组织培养

分类号 Q943.1

Tissue Culture of Dandelio

SUN Huaijuan^{1,2)} WEI Xiaodi¹⁾

(1 Rubber Research Institute, CATAS, Danzhou, Hainan 571737;

2 Hainan University, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract With pot-cultured dandelion as test material, the leaf stalk and blade were used as explants for tissue culture. Addition of 300 mg/l of vitamin C into the culture medium was most effective to prevent callus from browning, and the medium MS + 0.5 mg/l 6-BA + 0.1 mg/l NAA is an optimum combination for direct regeneration. For indirect regeneration fragile calli were obtained from explants on the medium supplemented with 6-BA 0.5 mg/l and 2,4-D 0.5~1.0 mg/l. The medium 1/2 MS + NAA 0.1 mg/l was suitable for rooting.

Keywords Dandelio; anti-browning culture; tissue culture; plantlet regeneration

蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Handel-Mazzetti)

为菊科(Compositae)蒲公英属(*Taraxacum* Weber)植物。蒲公英属约2000余种,主产于北半球温带至亚热带地区,少数产热带南美洲。我国有70种1变种,广布于东北、华北、西北、华中、华东及西南各省区,西南和西北地区最多^[1]。蒲公英甘、苦、寒、无毒,归肝、胃经。现代药理研究表明,它有良好的抗菌作用。蒲公英的可食部分达84%,且含有多种营养物质和具有保健作用的化学物质。目前,关于蒲公英组织培养已有报道^[2~6],也有报道将其作为生物工程材料^[7,8]。因此,本文通过组织培养,解决了外植体的褐化问题,建立了高频再生体系,对推动快速繁殖和作为生物工程材料具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

蒲公英种子购于北方特产园艺研究所。将蒲公英栽于盆中,待长到有5~6片叶时,采集生长良好的蒲公英的叶柄和叶片,用体积分数为70%的酒精消毒30 s,无菌水洗2次,1 g/L的HgCl₂消毒6~7 min,无菌水洗5次获得无菌材料。以下,以MS为基本培养基,均加30 g/L的蔗糖,6.5~7 g卡拉胶,pH调至5.8~6.2,每个组合30~40块外植体,5次重复。光照强度为3000~4000 Lx,光照16 h/d,在温度为(24±2)℃条件进行培养,定期观测并统计结果。

1.2 方法

1.2.1 外植体的抑褐培养

① 收稿日期:2008-01-22 责任编辑/孙继华 编辑部E-mail: rdnk@chinajournal.net.cn 或 rdnk@163.com

② 孙怀娟,女,在读植物学硕士研究生。E-mail: Sun714abc@163.com。

③ 魏小弟,男,研究员。联系电话:(0898)2330 0570(办);E-mail: xdwei490901@126.com。

在培养基中加入 AC(活性炭)(1、2、3、4、5 g/L)、Vc(维生素 C)(50、100、200、300、400 mg/L)。AC 与培养基一起高压灭菌, Vc 经过抽滤除菌后再加入到培养基中^[9]。接种后分别在 1、4、7 d 检测记录褐化程度。

1.2.2 外植体直接到再生植株

用 6-BA 单因子, 将 6-BA 浓度分别设立为 0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、8、10 mg/L 组合 9 个不同处理; 采用 6-BA 配合 NAA 双因子, 将 6-BA 浓度固定为 0.5 mg/L, NAA 的浓度分别 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 mg/L 八个不同处理。

1.2.3 愈伤组织诱导和继代

用 6-BA 和 2,4-D 双因子, 将 6-BA 固定为 0.5 mg/L, 2,4-D 浓度分别为 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 mg/L; 将 2,4-D 固定为 0.5 mg/L, 6-BA 分别为 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 mg/L。

1.2.4 根的分化

1/2MS+15 g/L 蔗糖+6.5~7 g 卡拉胶+2 g/L AC, 培养基附加浓度为 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 mg/L 的 NAA 进行根分化培养。

1.2.5 炼苗及移栽

将经选择的根生长多而且良好的瓶苗移出培养室, 松动瓶盖 1~2 d, 置于房间内炼苗, 然后部分开盖 1~2 d, 最后完全揭去盖。2~3 d 后将瓶苗从瓶中取出, 洗净培养基后用 0.1% 多菌灵浸苗基部 1 min, 洗净晾干后移栽至基质为 $V_{\text{蛭石}}:V_{\text{菜园土}}=2:1$ 的盆中。置于弱光、阴凉通风、湿度为 80%~90% 的地方。

2 结果与分析

2.1 外植体的抑褐培养

外植体消毒处理后, 经过 5 d 的暗培养, 与在光照下培养的材料比较, 褐化与死亡数都较低。再经过 4 d 光照培养后, 其褐化程度与正常光照培养的外植体基本相同。虽然经过暗培养的外植体褐化有所缓解, 但随着培养时间的增加, 褐化程度也随之加重。这可能是因为暗培养只是暂时降低了多酚氧化酶的活性, 一旦恢复正常培养, 其活性也马上活跃起来。添加 AC、Vc, 植株褐化得到缓解, 在 1、4、7 d 后记录褐化程度, 结果见表 1。

表 1 褐变抑制剂对蒲公英外植体褐变的影响

褐变抑制剂	浓度	褐 变 程 度		
		1 d 后	4 d 后	7 d 后
对 照		+	++	+++
AC(活性炭)	1 g/L	0	0	+
	2 g/L	0	0	+
	3 g/L	0	0	+
	4 g/L	0	0	+
	5 g/L	0	0	+
	50 mg/L	0	++	+++
Vc(维生素 C)	100 mg/L	0	+	++
	200 mg/L	0	0	++
	300 mg/L	0	0	+
	400 mg/L	0	0	++

说明: 表中用代号表示外植体的褐化程度。①不明显, 基本无褐色, 代号“0”; ②明显, 有轻微褐变, 褐色较浅, 代号“+”; ③很明显, 褐色较深, 代号“++”; ④严重, 褐色特深, 代号“+++”。

从表 1 可以看出, 2 种抑制剂都能抑制褐变。

在培养基中加入 1~5 g/L 的 AC 后, 都能明显减轻外植体的褐化。只要加入少量的活性碳就能抑制褐化, 在 7 d 后的褐化程度仍然很低。这是因为, 活性炭作为吸附剂可去除酚类氧化造成的毒害效应, 并且在一定程度上还有降低光照强度的作用。因而常用来防止组织培养中细胞褐变的发生和发展^[10, 11]。不过, 有关文献表明: 用吸附剂抑制褐变有一个负作用, 即吸附剂在吸附有毒酚类的同时, 也会吸附培养基中的生长调节剂, 所以在都能减轻褐化的前提下, 活性炭的浓度应倾向于偏低为好^[12]。

加入 Vc 后, 其褐化程度都比对照轻。这是因为 Vc 为多羟基还原物质, 一方面可以使多酚氧化酶失活从而阻止酚类物质氧化; 另一方面 Vc 在酶的催化下能消耗溶解氧, 使酚类物质因缺氧而无法氧化^[12]。从表 1 可以看出, 在一定范围内, 随着 Vc 浓度的增加褐化程度减轻, 但是当 $p_{\text{Vc}} > 300$ mg/L 时, 其褐化程度反而加重。因为加入抗坏血酸可改变外植体周围的氧化还原电势, 从而抑制了酚类的氧化, 减轻其褐化。然而在接下来的培养过程中, 添加了抗坏血酸的培养基中的外植体在 14~20 d 的时间内都有不定芽或者愈伤组织的产生; 加入 AC 后产生不定芽和愈伤组织明显少于前者。因此认为, 在培养基中添加 300 mg/L 的 Vc 能

够较好地防止褐化,并且不影响分化。因此在后面的培养基中均加入 300 mg/L 的 Vc 以抑制外植体的褐化。

2.2 外植体直接到再生植株

2.2.1 6-BA 直接诱导再生植株

6-BA(单因子)对叶片和叶柄诱导再生植株的影响详见表 2。

6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	平均每个 外植体诱导 不定芽数	诱导率 /%
0.1	2.1	12.3
0.2	3.0	15
0.5	4.4	20
1	4.0	17.4
2	1.8	10.6
3	0	0
4	0	0
5	0	0
8	0	0
10	0	0

单用 6-BA 时, 外植体在 7 d 后开始卷曲, 14 d 后有芽的分化, 21 d 记录其诱导率。其诱导率为分化的外植体数与接种的外植体总数的比值。从表 2 可以看出, 用单因子 6-BA 诱导效果很不理想, 浓度在 0.1~2 mg/L 之间, 诱导率不超过 20%, 且当浓度大于 3 mg/L 时, 7 d 后外植体褐化, 培养基颜色加深, 不能继续诱导不定芽。20 d 后, 外植体自然枯萎。说明高浓度的 6-BA 对外植体不利, 将外植体杀死。

2.2.2 6-BA 配合 NAA 双因子直接诱导再生植株

6-BA 配合 NAA(双因子)对叶片和叶柄诱导再生植株的影响详见表 3。接种外植体在 7 d 后开始卷曲, 12~14 d 后有芽的分化, 21 d 记录其诱导率。其诱导率为分化的外植体数与接种的外植体总数的比值。从表 3 可以看出, 以 MS 为基本培养基, 在 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时, 随着 NAA 浓度增加, 诱导不定芽数、诱导率逐渐增加后又降低, 且发现当 NAA 浓度在 0.1~0.5 mg/L 时, 不定芽诱导率都在 90% 以上, 不定芽生长良好。当 $\rho_{NAA} > 1$ mg/L 时, 外植体和培养基发褐, 颜色较深。其中,

表 3 6-BA 配合 NAA(双因子)对诱导再生植株的影响

激素浓度 $\rho/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		诱导 不定 芽数	诱导率 /%
6-BA	NAA		
0.5	0.01	1.9	41.1
	0.02	2.3	44.6
	0.05	8	63.2
	0.1	18	95.5
	0.2	17	94
	0.5	14	93
	1	3	70
	2	2	53.5

MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 组合诱导不定芽数 18 个、诱导率 95.5%, 芽分化和生长效果最好。如图 1 中 C 所示。

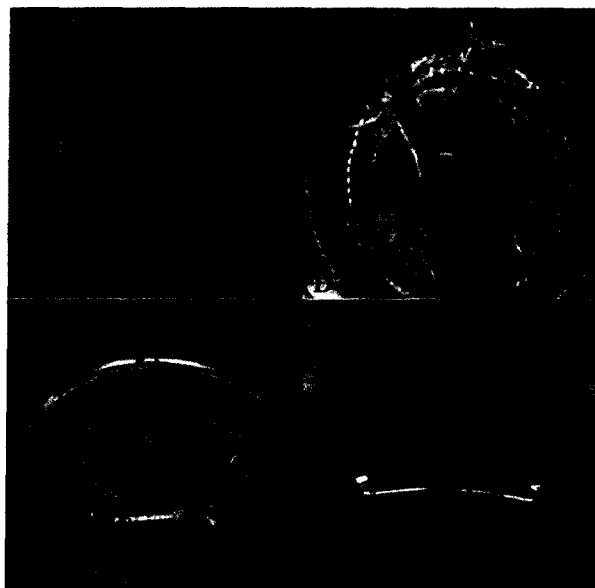


图 1 蒲公英组织培养与植株再生

说明: A 愈伤组织; B 从愈伤组织分化芽; C 从外植体直接分化芽; D 从芽分化的根。

2.3 愈伤组织诱导和继代

激素对叶片和叶柄诱导愈伤组织的影响见表 4。外植体接种约 10 d 后, 叶片开始卷曲, 边缘开始膨大, 同时在伤口边缘形成肉眼可见的愈伤组织。接种约 14 d 后, 叶片边缘切口处和基部叶脉切伤处愈伤组织稍微增多, 且愈伤组织多为黄绿色, 呈半透明状, 较疏松。继续培养 1 周后, 大部分愈伤组织开始变绿, 质地变得更加致密。

从表 4 可知, 6-BA 和 2,4-D 组合能较好地诱导愈伤组织, 当固定 6-BA 浓度时, 随着 2,4-D 浓度的增加, 愈伤组织长得愈好, 但当 $\rho_{2,4-D} > 1$ mg/L 后, 愈伤反而长得不好, 说明高浓度的 2,4-D 对愈伤组织生长不利。当固定 2,4-D 浓度时, 发现高浓度的 6-BA 也不利于愈伤组织的生长。其中 6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L 诱导率比其它组合的明显要好, 接近于 100%, 而且愈伤组织的生长速度较快, 生长状态良好, 大部分都呈现出健康的黄绿色, 质地较其他组紧密, 如图 1 中 A 所示。当把愈伤组织接种到分化培养基 MS+0.5 mg/L 6-BA 0.1 mg/L NAA 上, 能分化出芽, 如图 1 中 B 所示。

表4 激素对叶片和叶柄诱导愈伤组织的影响

激素浓度 $\rho/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		诱导率 /%	生长状态
6-BA	2, 4-D		
0.5	0.01	90	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿, 16天后有芽分化
0.5	0.02	90	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿, 16天后有芽分化
0.5	0.05	90	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿, 16天后有芽分化(量少)
0.5	0.1	91.6	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿, 18天后有芽分化
0.5	0.2	91	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿, 继代2次后有极少芽分化
0.5	0.5	96.5	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿, 继代2次后无芽分化
0.5	1	97	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿, 愈伤组织稍微疏松
0.5	2	85	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿, 培养基颜色深
0.01	0.5	74.3	10天外植体开始卷曲, 18天愈伤黄绿, 愈伤程度不够, 生长慢
0.02	0.5	80	10天外植体开始卷曲, 18天愈伤黄绿, 愈伤程度不够, 生长慢
0.05	0.5	86.7	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿, 生长慢
0.1	0.5	88.5	10天外植体开始卷曲, 14天愈伤黄绿
1	0.5	85	外植体部分褐化, 培养基颜色深
2	0.5		外植体死亡, 培养基颜色深

2.4 根的分化

NAA对再生芽分化根的影响见表5。

试验以1/2 MS+15 g/L蔗糖+6.5~7 g卡拉胶+2 g/L活性炭为培养基附加不同浓度的NAA来筛选适合的生根培养基。诱导率为生根的芽数与接种芽的总数的比值。接种后每天都观测并记录其生根状况。从表5可以看出, 在1/2

表5 NAA对再生芽分化根的影响

$\rho(\text{NAA})$ $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	生根时 间/d	诱导率 /%
0.01	13	65
0.05	11	70
0.1	7	93.5
0.2	9	86.7
0.5	10	82.5
1	12	73.4
2	16	54.4

MS+15 g/L蔗糖+6.5~7 g/L卡拉胶+2 g/L活性炭下, 不同浓度的NAA都能诱导生根, 随着NAA浓度的增加, 对再生芽的根诱导率先上升后下降, 说明当NAA浓度过高时, 会抑制根的分化。观察其生根时间, 最早生根的组合NAA浓度为0.1 mg/L, 7 d可以观察到生根。随着NAA浓度的增加, 生根时间是先加快后减慢, 当 $\rho_{\text{NAA}} < 0.1 \text{ mg/L}$ 时, 生根时间随着NAA浓度的增加而加快, 当 $\rho_{\text{NAA}} > 0.1 \text{ mg/L}$ 时, 生根时间随着NAA浓度的增加而减慢。观察后来的生长状况, 发现 $\rho_{\text{NAA}} = 2 \text{ mg/L}$ 时, 再生植株继代2次后, 自然枯萎, 说明高浓度的NAA将植株杀死。其他组合诱导生根的植株均能正常地继代生长。当 $\rho_{\text{NAA}} = 0.1 \text{ mg/L}$ 时, 不但长出的根粗壮, 根

毛多, 而且生根时间短, 成活率高, 为最佳组合。如图1中D所示。

2.5 炼苗及移栽

经过30 d左右的移栽炼苗, 大部分试管苗已长出新根, 成活率达96%, 平均生根数2~3条。叶片开始转为深绿色, 可移栽到大田栽培, 栽培管理方法与普通繁殖的种苗相同。

3 小结

植物再生有2种途径, 即器官发生和体细胞胚胎发

生, 器官发生途径又有2种方式: 直接器官发生和间接器官发生。外植体经过短暂的愈伤阶段或不经愈伤阶段而直接分化形成大量不定芽和外植体先脱分化形成愈伤组织, 然后由愈伤组织经过诱导分化形成再生植株。直接不定芽再生途径对母本的遗传物质具有“高保真性”, 很少发生变异, 是植物基因工程中最好的遗传转化系统^[13]。然而, 高效再生系统的建立是遗传转化过程中必不可少的前提条件。而多倍体为无融合生殖早在上世纪30年代就有人发现二倍体蒲公英植物进行有性生殖, 蒲公英的组织培养可以为研究无融合生殖提供一个平台, 研究无融合生殖的机理。

通过以上各试验可以得出, 在组织培养的过程中, 以叶柄和叶片为外植体, 6-BA和NAA不同浓度对蒲公英直接诱导再生植株的影响非常大, 以MS为基本培养基时, 6-BA单因子直接诱导再生植株, 浓度不能超过3 mg/L。6-BA和NAA双因子以不同浓度配合时, MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA是直接诱导再生植株的最佳组合, 6-BA 0.5 mg/L+2, 4-D 0.5~1.0 mg/L是诱导愈伤组织和继代的最佳组合, 1/2 MS+15 g蔗糖+NAA 0.1 mg/L是诱导生根的理想培养基。

蒲公英以叶柄和叶片为外植体进行组织培养是可行的, 能否以根作外植体进行组织培养需进一步的研究探索。

(下转第15页)

- (3): 274~252
- 11 赵同谦, 欧阳志云. 中国草地生态系统服务功能间接价值评估. 生态学报, 2004, 24(6): 1101~1110
 - 12 蒋菊生, 王如松. 海南橡胶产业生态. 北京: 中国科学技术出版社, 2004. 94~118
 - 13 欧阳志云, 王效科, 苗 鸿. 中国陆地生态系统服务功能及其生态经济价值的初步研究. 生态学报, 1999, 19(5): 607~613
 - 14 肖 寒, 欧阳志云, 赵景柱, 等. 森林生态系统服务功能主其生态经济价值评估初探: 以海南岛尖峰岭热带森林为例. 应用生态学报, 2000, 11(4): 481~484
 - 15 周再知, 郑海水, 杨曾奖, 等. 橡胶与砂仁间作小气候特点初探. 生态学杂志, 1994, 13(1): 27~31
 - 16 邓晓保. 热带胶茶人工群落中土壤动物季节变化研究. 生态学杂志, 1994, 13(5): 31~34
 - 17 Newman S M. A survey of interculture practices and research in Sri Lanka. Agroforestry Systems, 1985, 3(1): 25~36
 - 18 Roy S, Raj S, Choudhury M, et al. Intercropping of banana and pineapple in rubber plantations in Tripura. Indian Journal of Natural Rubber Research, 2001, 14(2): 152~158

(上接第7页)

参考文献

- 1 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第80卷第2分册[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 1~21
- 2 Bowes B G. Preliminary observations on organogenesis in *Taraxacum officinale* tissue cultures. Protoplasma, 1970, 71(1-2): 197~202
- 3 Bowes B G. The occurrence of shoot teratomata in tissue cultures of *Taraxacum officinale*. Planta, 1971, 100(3): 272~276
- 4 杨晓杰, 李 波, 王 萍. 管花蒲公英的组织培养. 植物生理通讯, 2005, 41(4): 485
- 5 唐 蓉, 韦梅琴, 熊增宏. 蒲公英试管培养中芽形成的研究. 青海大学学报(自然科学版), 2005, 23(1): 62~65
- 6 陈 华, 李 平, 刘 晶, 等. 药蒲公英再生体系的建立和优化. 生物工程学报, 2005, 21(2): 244~249
- 7 Lee M H, Yoon E S, Jeong J H, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. Plant Cell Reports, 2004, 22(11): 822~827
- 8 Müller Kai J, He Xinqiang, Fischer Rainer, et al. Constitutive *knox1* gene expression in dandelion (*Taraxacum officinale*, Web.) changes leaf morphology from simple to compound. Planta, 2006, 224(5): 1023~1027
- 9 刘 洋, 苏淑钗, 冷平生, 等. 阿月浑子外植体褐变抑制方法. 果树学报, 2007, 24(3): 393~396
- 10 夏 铭, 吴绛云, 张丽梅, 等. 红豆杉组织培养中褐变问题的研究. 生物技术, 1996, 6(3): 18~20
- 11 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中AC的作用. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214~217
- 12 陈惠娟. 植物组织培养中褐变的产生机理及克服措施[J]. 植物保护, 2005, 31(2): 79~82
- 13 Ibrahim Rusli, Debergh Pierre C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). Scientia Horticulturae, 2001, 88(1): 41~57