

蓝刺头组织培养和叶片再生植株的研究

朱海军 俞红强 义鸣放

(中国农业大学农学与生物技术学院,北京 100094)

摘要:以蓝刺头(*Echinops latifolius* Tausch.)叶片为外植体,建立了蓝刺头的再生体系,并对其影响因素进行了研究。结果表明,MS + 6-BA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最适分化培养基,再生率达48.33%,平均每个外植体再生芽数3.56;添加 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸银以及暗处理15d均可显著提高不定芽的再生率和再生芽数,再生率分别提高到80.33%和63.33%。

关键词:蓝刺头;再生体系;硝酸银;暗处理

TISSUE CULTURE AND PLANT REGENERATION FROM LEAVES OF *Echinops latifolius* Tausch.

ZHU Hai-jun YU Hong-qiang YI Ming-fang

(College of Agriculture and biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: Using leaves as explants, we established a high frequency regeneration system of *Echinops latifolius* Tausch, and studied the main factors which affecting plant regeneration in vitro. The results showed that the optimum medium for shoot regeneration was MS + 6-BA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The frequency of shoot regeneration was 48.33% and mean number of buds per explant was 3.56. The optimum medium plus $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 , and incubating for 15 days under dark condition could strikingly promote shoot regeneration and the number of bud, with frequency of 80.33% and 63.33% respectively.

Key words: *Echinops latifolius* Tausch.; regeneration system; AgNO_3 ; dark incubation

蓝刺头(*Echinops latifolius* Tausch.)是菊科蓝刺头属多年生宿根草本植物,在我国东北及西北大部分地区均有分布^[1],其花形奇特,观赏期长,可以做鲜切花和干花。同时由于其生态适应性广,抗性强,在干旱、贫瘠的土地及山坡疏林下生长良好,而且一次种植能多年观赏能作为地被绿化材料,极大节约管理成本。另外,蓝刺头也具有很高的药用价值,其根和花序可以入药,有清热解毒、排脓消肿、活血作用。国外将其果实作为强心剂,用于治疗高血压及动脉粥样硬化等症;其嫩枝、叶、花序可作马、骆驼的饲料^[2]。目前对蓝刺头的研究报道较少,而有关蓝刺头组织培养和植株再生的研究尚未见报道^[3-7]。本试验以蓝刺头叶片为外植体,在筛选最适不定芽分化培养基的基础上,研究了

添加硝酸银和暗培养对不定芽分化的影响,以期建立蓝刺头高频、稳定的植株再生体系,为蓝刺头组培繁殖、无性系选种及开展基因工程育种等提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 无菌材料的获得

试验材料来自中国农业大学科学园。取叶龄30d的蓝刺头根插苗叶片,用试管刷蘸少量洗衣粉洗掉叶片表面的污物,流水冲干净,75%酒精浸泡30s,2%的次氯酸钠浸泡10min消毒,最后无菌水冲洗5~6次。

1.2 不定芽分化

以MS为基本培养基,附加3%的蔗糖和0.7%的

收稿日期:2007-03-07

基金项目:北京市林业局花卉产业处资助项目(25012482)

作者简介:朱海军(1981-),男,山东潍坊人,在读硕士生,从事野生花卉引种驯化及商品化开发工作。

通讯作者:义鸣放(1957-),女,山西左权人,教授,从事花卉栽培生理的研究。E-mail: ymfang@cau.edu.cn

琼脂, pH 5.8~6.0, 经 121℃ 高温灭菌 20min。硝酸银需过滤灭菌。无菌培养室培养条件: 温度 25℃ ± 1℃, 光强 1500~2000lx, 光照时间 16h/d。

1.2.1 不同激素及浓度对不定芽分化的影响 接种时去除叶缘和叶片中脉, 切成 0.5cm × 0.5cm 的小块接种于添加 NAA 0.1mg·L⁻¹、6-BA(0.1、0.5、1.0、2.0 和 3.0mg·L⁻¹), 或只加 2,4-D(0.1、0.5 和 1.0mg·L⁻¹) 的培养基上, 远轴面向下。40d 后统计不定芽的再生率和平均每个外植体再生芽数。

1.2.2 添加硝酸银对不定芽分化的影响 在上述试验所得出的最适分化培养基中添加硝酸银(0、0.5、1.0、2.0 和 4.0mg·L⁻¹), 15d 后统计各处理分化的外植体数、再生的不定芽数量。

1.2.3 不同时间的暗处理对不定芽分化的影响 将叶片接种到最适分化培养基中暗培养 0、5、10、15、20、25 和 30d, 每隔 4d 从暗培养条件下取出 5 瓶转入光下培养。40d 后, 统计各处理分化的外植体数、再生的不定芽数及不定芽的生长状况^[8,9]。

所有处理重复 3 次, 用 SAS 软件对数据进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 不同种类和浓度的植物生长调节剂对不定芽分化的影响

MS 培养基中附加不同浓度的 6-BA、NAA 和 2,4-D, 结果表明(表 1), 植物生长调节剂种类和组合对不定芽的分化影响很大。单独使用 6-BA 仅得到较低的再生率和不定芽数; 仅添加 2,4-D 的培养基中外植体虽然有大量愈伤组织出现, 但很少有不定芽的分化, 说明 2,4-D 不利于蓝刺头叶片不定芽再生。6-BA 和 NAA 配合使用的效果要明显优于单独使用 6-BA 或 2,4-D; 其中以 6-BA 1.0mg·L⁻¹ 加 NAA 0.1mg·L⁻¹ 组合的效果最好, 不定芽再生率达到 48.33%; 但是随着 6-BA 浓度的增大, 不定芽的分化率以及平均每个外植体再生芽数反而降低, 并且随着植物生长调节剂浓度的增加, 不定芽的玻璃化现象加重。因此, 蓝刺头叶片再生最适分化培养基为 MS + 6-BA 1.0mg·L⁻¹ + NAA 0.1mg·L⁻¹。

2.2 不同浓度的硝酸银对不定芽分化的影响

在最适分化培养基中添加不同浓度的硝酸银, 对不定芽的再生影响较大。由表 2 可以看出, 添加硝酸银后不定芽的再生率以及不定芽数都显著高于对照。在 0~2.0mg·L⁻¹ 范围内, 随着硝酸银浓度的增加, 不

定芽再生率和芽数逐渐增加, 而且玻璃化苗减少; 但达到 4.0mg·L⁻¹ 后, 硝酸银对叶片再生表现出抑制作用, 再生苗的叶片表现出不健康的黄白色。综合来看, 以添加 2.0mg·L⁻¹ 的硝酸银效果最佳, 不定芽再生率和芽数分别达到了 80.33% 和 3.18, 且再生苗生长健壮, 生长势强。

表 1 不同的生长调节物质组合对蓝刺头不定芽分化的影响

Table 1 Effects of different growth regulators on shoot regeneration of *Echinops latifolius* Tausch

植物生长调节剂 plant growth regulator(mg·L ⁻¹)			不定芽再生率 shoot regeneration frequency (%)	平均每个外植体再生的芽数 mean number of buds per explant
6-BA	NAA	2,4-D		
0.1			6.67 c	0.83 c
0.5			5.00 c	1.17 bc
1.0			8.33 c	1.00 bc
		0.1	3.33 c	1.00 bc
		0.5	0	0
		1.0	0	0
1.0	0.1		48.33 a	3.56 a
2.0	0.1		18.33 b	2.63 ab
3.0	0.1		26.67 b	1.02 bc

注: 不同字母表示差异显著($p=0.05$), 下同。

Note: Different letters within columns represent significantly different at $p=0.05$ level, the same as the following tables.

本试验发现, 加入硝酸银后, 不定芽的再生途径发生了改变, 不再是单纯通过愈伤组织途径, 而是以直接形成不定芽的途径为主。多数研究证明 Ag⁺ 能促进植株再生, 直接诱导生成不定芽而减少愈伤组织的形成^[11,12], 本研究结果与之一致。

表 2 添加不同浓度的硝酸银对蓝刺头不定芽分化的影响

Table 2 Effects of AgNO₃ on shoot regeneration of

Echinops latifolius Tausch

硝酸银浓度 AgNO ₃ concentration(mg·L ⁻¹)	不定芽再生率 shoot regeneration frequency (%)	平均每个外植体再生的芽数 mean number of buds per explant
0	41.67c	1.18c
0.5	50.00bc	1.89b
1.0	70.33ab	2.81a
2.0	80.33a	3.18a
4.0	65.00bc	3.06a

2.3 不同时间的暗培养对不定芽分化的影响

将叶片接种于最适分化培养基上, 不同时间的暗培养后置于光下培养, 发现暗培养不仅能提高叶片不定芽的再生率和再生芽数, 而且也缩短了不定芽再生的时间。由表 3 可以看出, 随着暗培养时间的延长, 不定芽再生率逐渐增加, 但 20d 以后再生率呈现下降趋势, 而且不定芽生长势减弱; 就平均每个外植体再生芽

数来看,对照与暗培养 5、10、15、25 及 30d 的均无显著差异。因此,综合不定芽再生率、不定芽数和不定芽生长状况,叶片再生以暗培养 15d 的效果为佳。

表 3 暗培养对蓝刺头不定芽分化的影响

Table 3 Effects of dark culture on shoot regeneration of *Echinops latifolius* Tausch.

暗培养天数 dark days(d)	不定芽再生率 shoot regeneration frequency(%)	平均每个外植体再生的芽数 mean number of buds per explant	不定芽生长状况 growth status
0	53.33b	3.31ab	长势较强,外植体边缘褐化严重 stronger growth vigour, with serious browning at the edge of explants
5	56.67b	2.76ab	长势较强,外植体边缘稍有褐化 stronger growth vigour, with a little browning at the edge of explants
10	56.67b	3.15ab	长势较强,外植体边缘有褐化 stronger growth vigour, with browning at the edge of explants
15	63.33ab	2.73ab	长势较强,玻璃化程度轻,外植体边缘少有褐化 stronger growth vigour, with light vitrification and little browning at the edge of explants
20	81.67a	2.19b	长势弱,玻璃化严重 weaker growth vigour, strong vitrification
25	51.67b	3.68a	同上, the same as above
30	48.33b	3.03ab	同上, the same as above

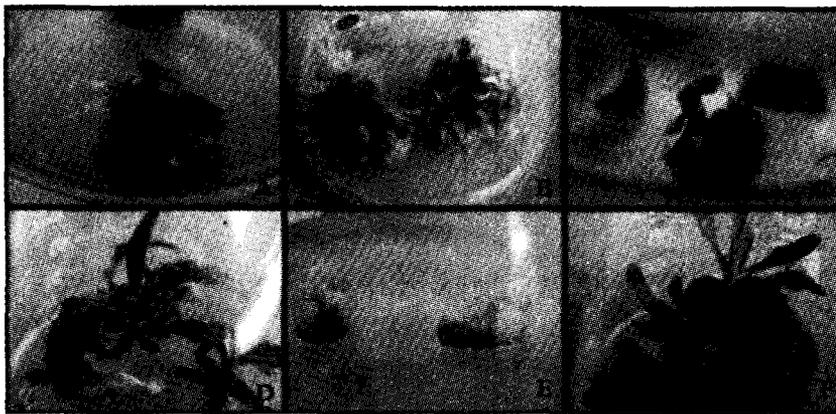


图 1 蓝刺头叶片的再生不定芽

Fig.1 Plant regeneration from leaves of *Echinops latifolius* Tausch.

A:接种于最适分化培养基上 20d 的外植体;B:接种于最适分化培养基上 40d 的外植体;
C:添加 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸银的培养基上培养 15d 的外植体;D:在添加硝酸银的培养基中生长 30d 后,
转入 MS 中生长 15d 的外植体;E:暗培养 15d 的外植体;F:暗培养 15d 再转到光下培养 30d 的外植体

A: explant cultured on optimum medium for 20 days; B: explant cultured on optimum medium for 40 days;

C: explant on medium added $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 for 15 days; D: cultured on medium with AgNO_3 for 30 days, then transported on

MS medium for 15 days; E: explant cultured under dark condition for 15 days; F: cultured under dark

incubation for 15 days, then grow in illumination for 30 days.

3 讨论

蓝刺头叶片不定芽的分化受外源生长调节物质的影响较大。本试验发现,在培养基中单一加入 6-BA 效果不好,叶片不定芽数和再生率都很低;加入 2,4-D 虽能诱导叶片产生大量愈伤,但几乎没有不定芽的分化。其他一些研究也表明,2,4-D 对愈伤诱导作用明显,但

却强烈抑制芽的形成,其原因目前尚不清楚^[12]。

本试验中,暗培养可显著提高蓝刺头叶片的再生率,而且缩短了不定芽分化的时间。这与其他一些研究结果也是一致的^[13],其原因可能是暗培养条件下 IAA 分解减少,从而提高了 IAA 的浓度,刺激了不定芽的产生。其机理还需进一步的研究。

许多研究表明, Ag^+ 是一种乙烯抑制剂,由于它的存在,乙烯不能干扰多胺的合成。因此, Ag^+ 通过促进

多胺的合成提高植株再生率。张鹏等报道,在培养基中附加 AgNO_3 ($2 \sim 12 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能明显诱导不定芽的再生^[14],这与本研究的结果一致。而蒋细旺等在菊花 (*Dendranthema morifolium*) 的培养中加入 AgNO_3 后,反而抑制了不定芽的再生,这可能是由于基因型的差异,导致了不同的植物对 AgNO_3 反应不一致^[15]。在本研究中,添加硝酸银显著促进了蓝刺头叶片分化不定芽,而且不定芽的再生途径也变成以直接发生为主,其原因有待于进一步从细胞学水平进行研究验证。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会编. 中国植物志, 第七十八卷, 第一分册. 北京: 科学出版社, 1987
- [2] 石雷, 张金政, 斯琴毕力格主编. 防沙治沙植物资源及其利用. 北京: 中国科学技术出版社, 2003
- [3] Murch S J, Wierenga E J, El-Demerdash M A, Saxena P K. In vitro propagation of the Egyptian medicinal plant, *Echinops spinosissimus* Turra. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 74: 81 ~ 86
- [4] 果德安, 楼之岑, 等. 华东蓝刺头根挥发油成分的研究. *中国中药杂志*, 1994, (02): 100 ~ 101
- [5] De-An Guo, Sheng-Hua Li. Morphological and histological studies on chinese crude drug "loulu". *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 1994, (01): 18 ~ 29
- [6] 刘玥, 叶冠, 等. 华东蓝刺头地上部分化学成分研究. *中草药*, 2004, (01): 18
- [7] 李华民, 曹堃程, 等. 砂蓝刺头中的三萜类化合物研究. *中草药*, 2002, (04): 306
- [8] 刘翠琼, 汤浩茹, 等. 不同基因型梨叶片离体培养和植株再生. *园艺学报*, 2005, 32(6): 1080 ~ 1083
- [9] 秦永华, 张上隆, 等. '丰香' 草莓叶片高效再生体系的建立. *园艺学报*, 2005, 32(1): 101 ~ 104
- [10] Chraïbi B K M, Latche A, Roustan J P, Fallot J. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Reports*, 1991, 10(4): 204 ~ 207
- [11] Yang XiaoHan, Jin Bo, Zhang Yan, Mu Ding, Tang XueMei. Enhancement of direct shoot regeneration from internode segments of chrysanthemum by silver nitrate. *Acta Horticulturae*, 1995, 404: 68 ~ 73.
- [12] 李浚明译. 植物组织培养教程. 北京: 中国农业大学出版社, 2002
- [13] 师校欣, 杜国强, 等. 黑暗培养对苹果组培快繁及叶片再生的影响. *河北农业大学学报*, 2004, 27(4)
- [14] 张鹏, 凌定厚. 提高菜心离体植株再生频率的研究. *植物学报*, 1995, 37(11): 902 ~ 908
- [15] 蒋细旺. 根瘤农杆菌介导的 Bt 与 GNA 基因转化菊花品种的研究. 华中农业大学博士学位论文, 2003

欢迎订阅《麦类作物学报》

《麦类作物学报》是由教育部主管、西北农林科技大学和国家小麦工程技术研究中心联合主办的专业性学术期刊,也是全国唯一的一份麦类作物专刊。主要刊载麦类作物(小麦、大麦、燕麦、黑麦等)遗传育种、生理生化、栽培管理、食品加工、产品贸易等方面有创见性的学术论文、领先水平的科研成果、学术报告、有新意的文献综述以及学术动态等。此外,本刊还将继续开办“著名专家介绍”以及“新成果、新品种、新产品介绍”等宣传性专栏,并继续以优惠价格刊登各类广告。读者对象为国内外农业科技人员、农业院校师生及高级农业技术推广和管理人员。

本刊为“农业科学中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、“中国科技精品期刊”,现已被英国《国际农业与生物技术文摘》数据库(CABI)、美国《化学文摘》数据库(CA)、日本《科学技术》数据库(JST)、波兰《哥白尼索引》数据库(IC)、《中国科学引文数据库》(核心库)等国内外多家权威性检索系统收录。影响因子排名已连续3年居全国农业期刊前10位。

本刊为双月刊,单月中旬出版,A4开本,180页码。每册定价20.00元,全年120元,国内刊号:CN61-1359/S,国际刊号:1009-1041。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:52-66。漏订者可直接汇款至编辑部补订。国外总发行:北京中国国际图书贸易总公司,代号:1479B。

热忱欢迎国内外专家随时指导和赐稿,亦欢迎各有关课题组、单位和个人出版专辑、刊登广告。

联系人:华千勇 电话:(029)87082642

通讯地址:陕西杨凌 渭惠路3号《麦类作物学报》编辑部; 邮政编码:712100

E-mail: mlzw@chinajournal.net.cn

网 址: <http://mlzw.chinajournal.net.cn>; <http://mlzwx.periodicals.net.cn>



欢迎投稿