

蜂斗叶组培快繁体系的建立

冷春玲, 刘丹梅 (辽东学院农业与环境学院生物系, 辽宁丹东 118003)

摘要 对蜂斗叶的组培条件进行了较系统的研究。结果表明, 以蜂斗叶的叶柄切段为外植体, 在 MS+6-BA 2mg/L 培养基上可诱导出胚性愈伤组织并分化出丛生芽; 芽丛在 MS+6-BA 1mg/L 的继代培养基上, 月繁殖系数可达 3 倍以上; 健壮芽在 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+活性炭 1 mg/L 的生根培养基上生根率为 100 %。

关键词 蜂斗叶; 组织培养

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)02-00373-01

Establishment of Rapid Propagation in Tissue Culture of *Petasites Japonicus*

LENG Chun-ling et al (Agriculture and Environment College, Liaodong University, Dandong, Liaoning 118003)

Abstract In this paper, the condition of tissue culture and rapid propagation of *Petasites Japonicus* was studied. The results showed that cultivated on MS+2 mg/L BA media, petioles produced callus and shoots; when shoots were cultivated on MS+1mg/L BA media, the reproduce coefficient was more than 3 times; and when the shoots were cultivated on 1/2 MS+0.2 mg/L NAA+1 mg/L active carbon media, the rhizogenesis rate was 100 %.

Key Words *Petasites japonicus* Miq; Tissue culture

蜂斗叶(*Petasites japonicus* Miq)为菊科蜂斗叶属多年生药菜 2 用植物, 食用部分为叶柄, 营养丰富, 风味独特, 对缓解偏头痛具有十分明显的功效^[1]。但由于在自然状态下蜂斗叶是靠地下茎进行繁殖, 速度缓慢, 因而种源奇缺, 种苗价格昂贵, 种苗投资在 75 000 元/hm² 以上, 这在很大程度上限制了其生产面积发展。因此, 笔者对蜂斗叶的组培条件进行了较系统的研究, 建立了工厂化组培快速育苗体系, 旨在缓解种源紧张局面, 降低投资成本, 对促进蜂斗叶栽培向产业化发展具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 取材与消毒 剪取嫩叶的叶柄, 自来水冲洗 1 h 后, 用浓度为 0.5 % 的新洁尔灭消毒 20 min, 然后用浓度为 0.1 % 的 HgCl₂ 消毒 5 min, 无菌水清洗 5 次并浸泡 30 min, 取出后用无菌滤纸吸干表面水分, 接种到含不同激素的 MS 固体分化培养基上培养。

1.2 愈伤组织诱导 将叶柄切成 1 cm 长的小段, 接种到愈伤组织诱导培养基上, 在 25 ℃ 条件下暗培养 3 d 后转为光照培养, 光照为 14 h/d。诱导培养基为: ①MS+6-BA 2 mg/L+IAA 0.5 mg/L; ②MS+6-BA 2 mg/L; ③MS+6-BA 1 mg/L; ④MS+6-BA 0.5 mg/L。

1.3 芽分化诱导 当愈伤组织增殖到一定数量后, 将胚性愈伤组织接种到 MS+6-BA 1mg/L 的分化培养基上诱导再生芽分化, 培养温度为 23~25 ℃, 光照为 14 h/d, 光照强度为 2 000 lx 左右, 每 20 d 更换 1 次培养基。

1.4 诱导生根 当再生芽长到 3 cm 高时, 转入生根培养基中进行生根培养。生根培养基为 ①1/2MS+IAA 0.2 mg/L; ②1/2 MS+NAA 0.2 mg/L; ③1/2 MS+IBA 0.2 mg/L。培养条件同上。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导 接种后第 10 天, 外植体没有明显变化; 接种后第 30 天, 叶柄切段的 2 端略有膨大; 接种后第 40 天左右, 切段的 2 端开始长出少量愈伤组织; 接种后第 50 天调查愈伤组织的发生率。

从表 1 可以看出, 外植体在 4 种培养基上均可形成愈

表 1 不同培养基的愈伤组织诱导频率

培养基	外植体数	出愈数	出愈率/%
①	50	44	88
②	50	46	92
③	50	38	76
④	50	29	58

伤组织, 且出愈率随着 6-BA 浓度的增加而提高。①、②培养基上的出愈率虽无显著差异, 但培养基②上形成的愈伤组织状态较好, 坚硬致密, 呈绿色, 而培养基①上的愈伤组织稍软, 呈黄绿色。因此, 采用 MS+6-BA 2 mg/L 作为继代培养基。
2.2 芽分化诱导 经过 2 次继代后, 将愈伤组织转移到分化培养基上。100 d 左右, 愈伤组织的状态逐渐发生变化, 由原来表面平滑逐渐变成表面上形成一些球状小颗粒; 120 d 左右, 少数球状颗粒上开始分化出绿色的根; 135 d 左右, 在没有分化出根的球状颗粒上开始分化出芽, 并逐渐长成无根幼苗。由此可见, 每 1 个球状颗粒就是 1 个球形胚。在之后的培养过程中, 愈伤组织在分化出芽的同时, 自身增殖速度也明显加快, 不再有根的分化。

2.3 生根培养 将再生芽移到 4 种生根培养基上, 2 周后观察, 差异较明显。在培养基①中, 生根率不足 40 %, 且根较细; 在培养基②中, 生根率均达 100 %; 但在培养基②、③、④中, 幼芽生根数较少, 多畸形, 茎的基部易产生愈伤组织, 再生根与茎的连接不紧密, 易脱落, 可能是激素浓度偏高所致, 移栽后不易脱落; 而培养基④中, 幼芽生根较为正常, 多且健壮。待根系较发达后移栽到花盆中, 成活率可达 90 % 以上, 待苗高达到 10 cm 后, 再移栽到大田, 极易成活, 其性状未见变异, 生长情况正常。

3 结论与讨论

实现工厂化育苗的关键因素在于提高组培繁殖的速率。为确保快速繁殖主要应注意 2 点: 一是控制适合的培养密度; 二是掌握合理的继代培养时间。培养密度过大, 一方面造成营养竞争和光合作用受影响, 另一方面愈伤组织块过大, 在愈伤组织上部分化出的芽丛吸收养分明显会受到愈伤组织的阻隔, 再生芽细弱, 叶片小且发黄, 转移到生根培养基后即使能生根, 移栽后也很难成活。因此, 当分化的

(下转第 375 页)

1.3 合成氨基酸的生产 细胞工程建设中的细胞融合技术和转导技术在氨基酸合成方面有重要的运用。研究发现由乳糖发酵短杆菌野生型菌株经多次诱变处理,可得到以葡萄糖为原料高收效的生产赖氨酸的突变株。但缺点是其生产赖氨酸的收率与糖消耗速度成反比^[9],若赖氨酸收率高,糖消耗速度慢。具有 α -氨基乙酸-L-半胱氨酸耐性(AECr)标记的生产菌株与糖耗速度快、产赖氨酸少的具有德夸菌耐性(DECr)和酮丙二酸耐性(KMr)的突变株进行细胞融合,结果可得到赖氨酸产量较高葡萄糖消耗速度提高3倍,发酵时间缩短1/3的新菌株^[9]。

2 秸秆木质素的降解

木质素与纤维素间形成的坚固酯键,阻碍了瘤胃微生物纤维素的降解。英国 ASTON 大学研究人员从秸秆堆中分离出一种白腐真菌,只降解木质素,不降解纤维素,用白腐真菌发酵切碎的麦秸,5~6周后,蛋白质含量不仅得到提高,而且秸秆的体外消失率从19.63%提高到41.13%。在适宜的条件下,白腐真菌的菌丝首先用其分泌的超纤维氧化酶溶解表面蜡质,然后菌丝进入秸秆内部并产生纤维素酶、半纤维素酶、内切聚糖酶、外切聚糖酶进行降解木质素和纤维素,使其成为含有酶的糖类,从而使秸秆饲料变得香甜可口,易于消化吸收^[10]。

3 基因工程技术对动物生长和代谢的调控

动物机体的生理病理变化,如生长发育、新陈代谢、遗传变异、免疫与疾病等,从本质来说,都是基因表达调控发生了改变的结果。可应用基因工程技术对动物体代谢过程中某些关键蛋白质的编码基因进行操作,即将外源基因导入动物细胞或动物受精卵中,由此稳定整合到动物基因组,并能遗传给子代,这就是转基因技术。这项技术一经产生,便在改良畜禽生产性状,提高畜禽抗病力及利用畜禽生产非常规畜牧产品等方面显示了广阔的前景。

(1)通过应用各种生物技术产品,提高动物的饲料利用率,促进动物生长。如各种饲用酶、氨基酸、维生素等。

(2)利用转基因技术生产转基因动物,无论在技术上还是在实际应用上都已获得了极大的发展。最早的转基因动物是1981年用显微注射法将疱疹病毒基因与SV40早期启动子一起导入小鼠受精卵而获成功的转基因小鼠。1985年人生长激素(PGH)转基因猪诞生。这种转基因猪的生长速度比对照组猪高15%,日增重可达1273g,饲料利用率提

高21%,采食量减少20%,背膘厚度从19~20mm,减至7~8mm,胴体脂肪沉积明显减少^[11]。另外,转基因羊、转基因鸡、转基因兔、转基因牛、转基因鱼等的研究也相继获得成功。相信随着分子生物学技术的发展,通过基因操作改善动物的生产性能具有非常好的前景。

(3)改变动物体内的代谢途径。赖氨酸在动物体内不能合成,只能由饲料供给,使饲料成本提高。通过转基因技术,改变动物的代谢途径,使动物自身合成赖氨酸已具可能性。Rees等(1990年)已经清楚大肠杆菌合成赖氨酸途径中的酶基因编码,因此,Rees等提出设想:把赖氨酸在微生物中生物合成的途径导入动物体内,这样动物自身就能合成赖氨酸。再如,半胱氨酸是羊毛合成的限制性氨基酸,由于半胱氨酸在羊瘤胃内的降解,所以在饲料中添加半胱氨酸并不能提高其在血清中的水平,如果羊能自身合成半胱氨酸,将会提高羊毛产量^[12]。Ward(1991年)将大肠杆菌中编码丝氨酸转乙酰酶、O-乙酰丝氨酸硫氢化酶基因和金属硫蛋白(MT)启动子联接,并在3'端装上GH基因的序列,然后通过转基因技术将这一构件导入羊体内,得到的转基因羊胃上皮细胞能利用胃中的硫化氢合成半胱氨酸。

综上所述,生物技术特别是基因工程技术不论是在生产改造动物所需的营养物质,提高动物生产性能,还是在解决动物机体生理病理变化,营养素的代谢调节机理以及与机体的相互关系等问题上都已开始发挥日益重要的作用。可以设想,随着生物技术的进一步发展和应用,各种生物技术产品将层出不穷,会很大程度上促进动物生产和发展,转基因技术的成功运用将完全有可能培育出生长快,饲料转化率高的动物新品种。用转基因动物来大量生产各种生理活性物质也将成为现实。

参考文献

- [1] 傅志扬.生物技术一项世人瞩目的突破[J].国外畜牧科技,1997,24(2):38-39.
- [2] 方修平,王冬梅,陆桂平.动物营养与饲料配比[N].齐鲁牧业报,2004-6-25.
- [3] 肖日进,王小芹.生物技术在动物营养学领域中的应用前景[J].中国畜牧杂志,1999,35(4):57-59.
- [4] 朱继富,弓开兴.生物技术在动物营养学上的应用[J].四川畜牧兽医,2002,31(1):48-49.
- [5] 国春艳,史良,刁玉春.生物技术在动物营养研究中的应用[J].饲料博览,2006(4):21-23.
- [6] 周庆安,姚军虎,刘文刚.基因技术在动物营养科学中的应用[J].饲料工业,2005,26(16):51-52.

(上接第373页)

芽丛密度较大时,需将芽丛连同愈伤组织进行分割,转移到新的培养基中,但愈伤组织块也不宜太小,否则会影响愈伤组织再分化的速度。继代培养的时间以3周1次为宜,如培养时间过长,愈伤组织在生长过程中的一些代谢产物积累过多会导致愈伤组织褐变,同时还会导致愈伤组织分化出根,严重影响芽的分化和生长。在继代培养时,应清除死亡的愈伤组织。正常培养条件下,每月芽数可增殖3倍以上。

为了加快繁殖速度,还可以利用再生芽的叶片进行再

诱导。一般情况下,再生芽的叶片往往在较短的时间内即可诱导出愈伤组织并分化出芽。采用该方法可使再生芽数在1个月内增加数倍;同时,还可将再生芽切成带有侧芽的茎段进行繁殖,1个月左右每个茎段可长成1个无根幼苗,每月可使苗数增殖2倍左右。由于组织培养不受季节限制,因此,通过组织培养进行繁殖的速度比田间繁殖速度要快几百倍。

参考文献

- [1] 张海洋.新型蔬菜——完达蜂斗菜[J].特种经济动植物,2003,6(12):33.