

马齿苋的组织培养和植株再生

王红艳, 黄群策, 秦广雍, 霍裕平

(郑州大学物理工程学院离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 用马齿苋的幼嫩叶片和茎段建立了马齿苋组织培养及植株再生系统。最适愈伤组织诱导培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L 或 2,4-D 1.0 mg/L, 愈伤组织诱导率均可达 100%。将生长良好的愈伤组织块转入分化培养基中以诱导不定芽的分化, 其最适分化培养基为 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 分化率达到 87.5%。再生苗在 1/2MS+IBA 2.0 mg/L 的培养基上诱导生根, 经过 15d 培养, 100% 生根成苗。

关键词: 马齿苋; 组织培养; 愈伤组织; 植株再生

中图分类号: S647 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)05-0084-04

Tissue Culture and Plantlet Regeneration from *Portulaca oleracea* L

WANG Hong-yan, HUANG Qun-ce, QIN Guang-yong, HUO Yu-ping

(Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Physical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: A system of tissue culture and plantlet regeneration with tender leaves and shoots from *Portulaca oleracea* L was set up. The favorable callus inducing medium was MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L or 2,4-D 1.0 mg/L. The callus induction frequency could get to 100%. The favorable shoot inducing medium was MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L and the differentiation frequency was 87.5%. The differentiated shoots were cultured on the root inducing medium of 1/2MS+IBA 2.0 mg/L for 15 days and roots appeared. All the shoots could grow into plantlet.

Key words: *Portulaca oleracea* L; Tissue culture; Callus; Plantlet regeneration

马齿苋(*Portulaca oleracea* L), 别名马齿菜、瓜子菜、马蛇子菜、五行草和长寿草等, 为马齿苋科(*Portulacaceae*)马齿苋属(*Portulaca*)一年生肉质草本植物, 遍布全国各地, 是古往今来最常见的中草药和野生蔬菜^[1]。马齿苋作为药食兼用的野生植物之一, 在我国具有很悠久的利用历史, 在许多古书如《神农本草经》、《本草纲目》、《食疗本草》、《名医别论》、《救荒本草》等中均有记载。现代科学研究表明, 马齿苋含有大量维生素、矿物质、不饱和脂肪酸、微量元素和丰富的柠檬酸、苹果酸、氨基酸、去甲肾

上腺素、多巴胺、强心苷、萜醌类、香豆素、黄酮、生物碱等多种活性成分^[2-4], 具有降血脂、降血糖、抗衰老、消炎抑菌、增强免疫等多种保健功能和疾病治疗作用^[4-6], 被国家卫生部认定为药食同源的保健食品之一, 具有广阔的开发前景。近年来, 随着马齿苋研究的深入开展, 其营养和药用价值逐渐被验证, 市场对其品种和数量的要求越来越高。如何利用生物技术选育出优良高产的品种, 已成为势在必行的工作。然而, 目前国内外有关马齿苋的研究主要集中在生药学及其所含的化学成分、生物活性物

收稿日期: 2005-11-13

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)

作者简介: 王红艳(1980-), 女, 河南安阳人, 在读硕士, 研究方向: 植物组织培养和基因工程。

E-mail: why1980221@163.com

质、临床应用、多种保健食品的加工等方面,但在组织培养、遗传改良方面却鲜有报道。笔者采用马齿苋的幼叶和幼茎建立了组织培养及再生体系,以期马齿苋的开发利用、种质改良及利用细胞工程生产有效成分方面的研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

采自生长良好的马齿苋顶端幼叶和幼茎。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基和培养条件 以 MS 为基本培养基,蔗糖浓度 3.0%,琼脂 0.7%,分别加入不同种类和不同浓度的激素,分装后于 121℃ 湿热灭菌 20 min。培养温度 (26±1)℃,光照培养时,光照时间为 12 h/d,光照强度为 2 000~3 000 lx。

1.2.2 愈伤组织的诱导和继代培养 剪取马齿苋植株顶端的幼叶和幼茎,先用 75% 酒精消毒 1 min,用无菌水冲洗 1 次,再用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min,用无菌水冲洗 5~6 次,最后用无菌滤纸吸干水分并在无菌培养皿上将幼茎切成 1 cm 左右的小段,叶片切成 0.5 cm² 左右的方块,分别接种到含有不同激素配比的培养基中(表 1),接种时叶片背面接触培养基。每瓶接种叶片和茎段 6~8 个,每种培养基重复 10~12 瓶。21 d 后统计愈伤组织诱导率。

1.2.3 诱导芽的分化 将在愈伤组织诱导培养基 12 号上生长良好的愈伤组织切成小块,分别接种至附加不同激素的分化培养基中(表 2),40 d 后统计分化率。

1.2.4 生根与移栽 将高约 3 cm 的不定芽分割成单芽,接种于分别附加 NAA 0.5, 1.0 mg/L, IBA 1.0, 2.0 mg/L 的 4 种 1/2MS 生根培养基上诱导生根。15 d 后统计生根情况。

2 结果与分析

2.1 马齿苋愈伤组织的诱导和继代培养

2.1.1 不同激素对马齿苋愈伤组织诱导的影响

由表 1 可知,在不添加任何激素的 MS 培养基上,部分叶片可先长出根,继而长成小苗;在单独附加 2,4-D 时不能诱导出愈伤;在单独附加 6-BA 时可诱导少量愈伤,随其浓度的增大诱导率降低;在 2,4-D 和 6-BA 以一定的比例组合时,可以诱导大量的愈伤。因此,确定马齿苋愈伤组织的最佳诱导培养基为 7 号和 12 号培养基,其诱导率可达 100%,而且生长速度快(图 1)。

表 1 不同激素对比对马齿苋愈伤组织诱导的影响

培养基编号	激素组合及浓度 (mg/L)		接种 数量 (个)	诱导 数量 (个)	诱导率 (%)
	2,4-D	6-BA			
1	0	0	60	0	0.00
2	0	0.5	60	34	56.67
3	0	1.0	60	28	46.67
4	0	1.5	60	23	38.33
5	0	2.0	60	21	35.00
6	0.5	0	60	0	0.00
7	0.5	0.5	60	60	100.00
8	0.5	1.0	60	38	63.33
9	0.5	1.5	60	41	68.33
10	0.5	2.0	60	38	63.33
11	1.0	0	60	0	0.00
12	1.0	0.5	60	60	100.00
13	1.0	1.0	60	38	63.33
14	1.0	1.5	60	41	68.33
15	1.0	2.0	60	36	60.00
16	1.5	0	60	0	0.00
17	1.5	0.5	60	54	90.00
18	1.5	1.0	60	45	75.00
19	1.5	1.5	60	38	63.33
20	1.5	2.0	60	41	68.33
21	2.0	0	60	0	0.00
22	2.0	0.5	60	41	68.33
23	2.0	1.0	60	49	81.67
24	2.0	1.5	60	43	71.67
25	2.0	2.0	60	46	76.67

注:愈伤组织诱导率=愈伤组织块数/接种外植体块数×100%

仔细观察 7 号和 12 号培养基诱导愈伤组织的过程发现,叶片在这 2 种培养基上的出愈情况相似,接种前 4 d 无明显变化,到第 7 天时叶片开始卷曲,叶柄及切口边缘处出现少量愈伤,到第 14 天时叶片极度卷曲和膨大,并出现较多愈伤组织,到第 21 天时,愈伤组织快速生长,几乎蔓延了整个叶片。将上述生长 21 d 的愈伤组织切成小块,分别用相同的培养基进行增殖培养时发现:继代培养第 1 周时,2 种愈伤组织生长迅速,颜色鲜绿,质地稍致密;到第 2 周时,则生长缓慢,并开始褐化。因此,这 2 种诱导愈伤组织培养基 7 号和 12 号从诱导效果上来看没有显著差异,但二者的区别在于 12 号中 2,4-D 浓度加倍了。

2.1.2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响 按方法 1.2.2 将茎段和叶片分别接种到诱导愈伤组织培养基 12 号上进行光照培养,并跟踪观察 3 周。结果发现:(1)叶片在接种前 4 d 无明显变化,到第 7 天时叶片开始卷曲,叶柄及切口边缘处出现少量愈伤,到第 14 天时叶片极度卷曲和膨大,并出现较多愈伤

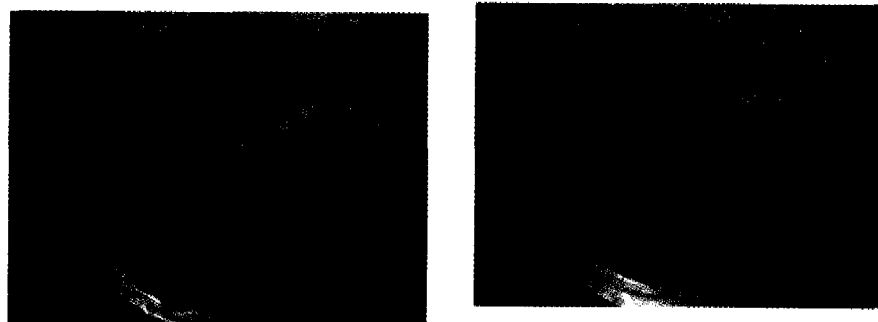


图1 叶片分别在7号和12号上的诱导情况(21d)

组织,到第21天时,愈伤组织快速生长,几乎蔓延了整个叶片。叶片诱导的愈伤呈淡绿色,质地比较致密,生长比较缓慢。(2)幼茎段在第4天时即可发现两端膨大并有少量愈伤,第7天时明显可见愈伤组织,第14天时愈伤组织大量增加,第21天时愈伤组织大量出现,但颜色加重。由于幼茎为淡紫色,所诱导的愈伤组织也略带微褐色,质地比较疏松,生长很快。由此可见,茎段比叶片诱导愈伤组织稍快,愈伤组织生长也相对快一些,但叶片取材容易方便而且可以大量操作,二者均可在短时间内获得大量愈伤组织,可根据具体要求而采用不同的外植体。

2.1.3 光照对愈伤组织诱导的影响 按方法1.2.2将叶片接种到诱导愈伤组织12号培养基上分别进行光照培养和暗培养,并跟踪观察3周。结果发现,光照条件下,愈伤组织生长较快,颜色呈淡绿色;而暗培养条件下,愈伤组织生长缓慢,颜色淡黄色。这可能是愈伤组织在光照条件下能进行光合作用的缘故。将暗培养条件下的叶片转移到光照条件下,愈伤组织生长加快,颜色也逐渐转绿。

2.2 诱导芽的分化

将光照条件下生长良好的愈伤组织接种到不同的分化培养基上进行植株再生的研究发现,愈伤组织转入不同的分化培养基后逐渐变为3种类型(图2):①暗绿色,结构致密,质地坚硬,表面有瘤状突起,生长缓

慢;②暗绿色,结构致密,质地坚硬,但表面无瘤状突起,而有一层白色粉末状结构,生长缓慢;③鲜绿色,结构稍疏松,表面有瘤状突起,生长较快。分化培养过程中观察到愈伤组织形态与分化能力有密切关系,能够分化的主要是第③类愈伤组织,而第①和②类极少能分化。究其原因,其一可能是不同愈伤组织块自身的差异;其二可能是不同分化培养基对其影响不同所致。

表2结果表明,愈伤组织在⑦号培养基上的分化效果最好,分化率达到87.5%(图3)。

表2 不同激素对比对马齿苋愈伤组织分化成苗的影响

培养基编号	激素组合及浓度 (mg/L)		接种 数量	诱导 数量	分化率 (%)
	2,4-D	6-BA			
①	2.0	0.2	40	7	17.5
②	2.0	0.3	40	8	20.0
③	2.0	0.4	40	6	14.3
④	3.0	0.2	40	23	57.5
⑤	3.0	0.3	40	18	45.0
⑥	3.0	0.4	40	16	40.0
⑦	4.0	0.2	40	35	87.5
⑧	4.0	0.3	40	26	65.0
⑨	4.0	0.4	40	23	57.5

注:愈伤组织分化率=分化的愈伤组织块数/愈伤组织总块数×100%

2.3 生根与移栽

试验结果表明,NAA对马齿苋再生芽生根有一定的促进作用,但生根速度慢且数量少;而IBA对



图2 3种不同类型的愈伤组织



图3 愈伤组织在7号培养基上的分化情况

其生根有明显的促进作用, IBA 浓度为 2.0 mg/L 时, 生根率达到 100%, 平均每株生根 12 条以上。再过 1 周后, 将高约 5 cm 的再生苗进行移栽。移栽

时, 先打开瓶盖在室温下炼苗 3~5 d, 然后取出小苗, 洗净根部的琼脂, 种植于营养花卉土中, 保持环境温暖湿润, 其成活率可达 100% (图 4)。

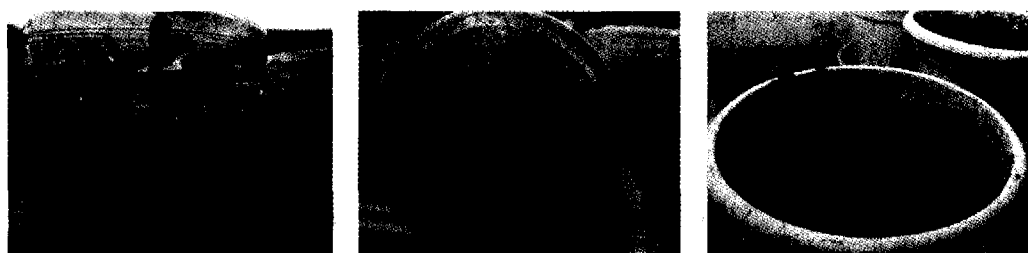


图4 再生芽的生根情况

3 讨论

通过研究建立了一套简便、易行、高效的马齿苋组织培养和植株再生体系。在愈伤组织诱导过程中, 筛选出 2 种诱导效果较好的培养基 7 号和 12 号, 其中 7 号与李焘的报道^[7]相同, 分化培养基与生根培养基略有差异。将这 2 种培养基诱导出的愈伤组织分别转接到一系列相同的分化培养基进行分化研究, 发现二者的分化能力没有差异, 均出现多种愈伤组织类型, 这与张相歧^[8]对其同科植物土人参的研究情况相似。在分化过程中, 愈伤组织生长迅速, 及时去除不易分化的愈伤组织类型并更换新鲜的培养基则有利于快速分化。此外, 整个组织培养过程中, 要尽量避免培养基中冷凝水的存在, 否则将严重影响愈伤组织诱导和分化的效果。

参考文献:

[1] 王红艳, 王松丽. 野生蔬菜马齿苋的研究进展[J]. 中国

农学通报, 2004, 20(2): 31-36.

[2] 李利峰. 马齿苋——野生蔬菜中的保健珍品[J]. 辽宁农业科学, 1997(4): 56.

[3] 王书荣. “菜中之鱼——马齿苋”[J]. 中国蔬菜, 1998(1): 51-52.

[4] 曹涤环. 浑身是宝的马齿苋[J]. 中国土特产, 1996(3): 34-35.

[5] 张兆洪, 孙美荣. 保健植物马齿苋[J]. 生物学杂志, 1991(1): 26-27.

[6] 翟玮玮, 顾立众. 马齿苋功能因子及保健食品的开发[J]. 食品科技, 2003(2): 20-24.

[7] 李焘, 王喆. 马齿苋组织培养及植株再生系统的建立[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2003, 31(2): 95-98.

[8] 张相歧, 王献平. 土人参原生质体培养再生植株[J]. 植物学报, 1995, 37(10): 754-760.